

法にて解析を行っていたが、PCR による高感度な解析から  $\Delta$ Pol でも CCC と思われるバンドが出現することが明らかになった。これは、HBV ゲノム複製において必要である DR 領域を HBV ゲノムの 5'側と 3'側に持つため、この領域がベクター作製時などに相同組換えを起こし、HBV ゲノムが環状に切り出されてしまい生じた偽 CCC 分子であった。しかも、偽 CCC 分子の混入量が一定である保証がないため、HBV ゲノム複製効率を正確に定量できない可能性が示唆された。

そこで、poly(A)配列を外来のものに置き換える等の改変を加え、相同領域を 1.03 倍長にまで少なくした新たな HBV ゲノムを構築し、AdV の作製を行った。1.24 倍長と同様の PCR による解析を行った結果、ネガティブコントロールの  $\Delta$ Pol では CCC 由来のバンドは全く検出されず、kS では 1.24 倍長とほぼ同程度の CCC が検出されたことから、1.03 倍長を用いた場合に検出される CCC は、ほぼ全てが HBV ゲノム複製により生成した分子であり、HBV ゲノム複製効率の定量には極めて有用性が高いシステムであることを明らかにした。

また、肝臓由来の細胞に極めて高効率に遺伝子導入が可能な AdV と CMV プロモーターを併用した結果、定量 PCR では HBV ゲノム複製がベクター導入後僅か 4 日から確認されたことから、ハイスループット系による抗 HBV 薬スクリーニングシステムの開発を行い、抗 HBV 薬である Lamivudine や Entecavir の抗ウイルス効果を定量的かつ簡便に解析することが可能であることを示した。

また、 $\Delta$ Pol ゲノム発現 AdV と Pol 遺伝子を単独で発現する AdV を共感染した結果、kS より少ないものの HBV ゲノム複製を確認した。そこで  $\Delta$ Pol のために欠失した領域に治療用遺伝子を挿入できる可能性が示唆され、現在他の領域も欠失可能であるかどうかについての解析を進めている。

## E. 結論

本研究で確立した HBV プレゲノム高度発現 AdV システムは、複製した HBV ゲノムから生成する CCC のみを特異的かつ高効率に定量可能な方法であり、HBV ゲノム複製機構の解析だけでなく、抗 HBV 薬スクリーニング法の開発にも有用性が高いことが明らかになった。しかも本法で用いている HBV ゲノムは S タンパク質の ATG を置換しているため S 非発

現 HBV ゲノムとなっており、安全性も極めて高い。現在は既存薬での最終的な確認を行っているが、今後は様々なライブラリーを用いて抗 HBV 薬のスクリーニングを開始する予定である。

また、HBV の Pol 欠失プレゲノム発現 AdV と Pol 発現 AdV の共感染で HBV ゲノムの複製を高効率でトランスに補完するシステムの開発に成功したため、現在コアのトランスのシステムについても検討を行っており、AdV を用いた新規遺伝子治療用ベクターについても開発を進めている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Lystad A H, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, and Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 2014;15:557-565.
- 2 Kondo S, Yoshida K, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *PLoS One* 2014 9:e108627.
- 3 Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* 2014 10; e1004534.
- 4 Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, Saito I, and Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene Ther* 2015:1-9.

### 2. 学会発表

- 1 Yoshioka T, Maekawa A, Suzuki M, Kondo S, Kanegae Y, and Saito I. Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV). The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8

- 2 Maekawa A, Pei Z, Kondo S, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 3 Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Dually safer adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes with significantly low immune responses. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 4 Suzuki M, Kondo S, Saito I, and Kanegae Y. Best insertion sites and orientation for the single and double expression unit in the adenovirus vector genome. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
- 5 Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Kanegae Y, Nomoto A, and Saito I. Development of new methods to detect the replication HBV genome in the cells infected with adenovirus vector expressing pregenome RNA. 2014 International Meetin on Molecular Biology of Hepatitis B Virus, UCLA, Los Angeles, Sepetember 3-6
- 6 近藤小貴、鈴木まりこ、前川文、齋藤泉、鐘ヶ江裕美、近藤小貴、アデノウイルス感染初期における virus-associated RNA の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
- 7 鈴木まりこ、近藤小貴、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、齋藤泉、アデノウイルスベクターを用いた効率的な HBV ゲノム複製解析システムの開発:cocally closed circular DNA (CCC) の検出、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
- 8 近藤小貴、鈴木まりこ、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、齋藤泉、アデノウイルスベクターを用いた定量的 HBV 複製 ccc 及び rc ゲノム検出法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11 月 25-27 日、2014

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

複数のユニットが多重に連結した DN カセットおよび該カセットを含むベクターの製造方法  
特願 2014-242914

■平成26年度 厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
研究分担報告書

## B型肝炎ウイルス複製の miRNA による制御に関する研究

研究分担者 小池 和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究協力者 大塚 基之 東京大学医学部（病）・特任講師

研究要旨： B型肝炎ウイルス（HBV）の完全排除は現時点では困難である。その原因は、使用可能な薬剤の作用機序が限られていることと、現在の抗ウイルス薬では排除できない HBV cccDNAの存在と考えられる。細胞内のmicroRNAは遺伝子発現を精密に制御しており、その機能の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わるのが想定される。ウイルス感染における肝細胞内microRNAの機能を調節することによって、劇的なHBV増殖抑制、排除、病態改善が見込める可能性がある。私達は、宿主microRNA let-7がHBV preS2領域のmRNAの配列と高い相同性をもつために、感染細胞ではHBV mRNAがlet-7のデコイとして作用する結果、本来のlet-7の機能が損なわれて細胞内環境の恒常性が攪乱され、癌化に寄与する可能性を見出した。さらに、let-7の効率的な肝細胞送達法の検討によって、ウイルス感染細胞内の恒常性の維持を図る方法を開発した。今後もさらにこの分子機構解明に基づくHBVの病態改善策とウイルス排除法の開発を継続する。

### A. 研究目的

B型肝炎の治療目標は「肝炎の活動性と肝線維化の抑制による肝不全の回避と肝癌発生の抑制」であり、そのためには B型肝炎ウイルス（HBV）の完全排除が理想である。しかしながら、現在の抗ウイルス薬による HBV の完全排除は困難である。使用可能な薬剤の作用機序が限られている（インターフェロンによる mRNA 破壊と逆転写酵素阻害の2通り）ことと HBV cccDNA の存在が、その理由と考えられる。HBV-DNA の細胞内動態、特に核移行から cccDNA、ミニクロモゾーム形成過程について、HBV に特徴的な分子機構これらのステップにおける肝細胞内

構が明らかになりその調節因子が同定されれば、HBV cccDNA 排除を目指した新規創薬の標的となり得る。いっぽう、宿主細胞の non-coding RNA 発現や細胞分化度などの細胞側要因の制御による HBV 複製制御が示されれば、key となる細胞因子に介入する阻害剤の探索が可能となる。また、再活性化、肝発がんの新たな分子機構が明らかとなれば創薬のための分子基盤となる。

細胞内の microRNA は遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わるのが想定されている。microRNA の役割を解析し、その発現量を

調節することによって、劇的な HBV 増殖抑制、排除、病態改善が可能となると考えられる。

## B. 方法

- 1) pregenomeを含む数種類のHBV-RNAと宿主microRNAとの相同性を*in silico*で解析し、ウイルスRNAと相互作用する可能性の高い宿主のmicroRNAとHBV側の塩基配列を抽出した。抽出したmicroRNAの機能の変化をHBV配列発現下でのレポーターアッセイにて、また、標的蛋白発現量の変化をwestern blottingにて検討した。
- 2) この変化がHBVの塩基配列と宿主のmicroRNAの相同性に依存していることを確認するために、HBV配列の当該部位に複数の変異を導入したコンストラクトを作製し、特異性を確認した。標的microRNAの過剰発現によるレスキュー実験も行った。
- 3) 当該HBV mRNA発現トランスジェニックマウスを作製し、ジエチルニトロソアミンによる化学発癌の系で、腫瘍形成性の変化を観察した。
- 4) 初代ヒト肝細胞にHBVを感染させ、それに伴う遺伝子発現変化を網羅的にmicroarrayで検討するとともに、標的microRNAの補充療法として、HBsAgに包埋したmicroRNA (Bio-nano-capsules (BNC) に含有したmicroRNA) の初代肝細胞への取り込みとその効果を検証した。

(倫理面の配慮)

組み換えDNA、レンチウイルス(P2レベル)の取扱いについては機関承認(平成16年9月10日の医学部組み換えDNA実験安全委

員会「遺伝子改変マウスを用いた消化器癌の悪性化因子および治療標的の探索的研究」)を得て、拡散防止措置を施したうえで研究を進めている。動物実験については「動物の保護および管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」および「大学等における実験動物について」の通知を遵守し、動物実験が有効かつ適正に行われるようにしつつ、当該所属機関の動物実験倫理委員会から承認を受けてすすめている(承認番号P-13-074)。

## C. 研究結果

- 1) HBVのpreS-2領域の塩基配列が、宿主のmicroRNAの一種で癌抑制機能を持つlet-7配列と高い相動性を持つことをデータベース検索から見出した。この相動性は本邦に多いHBVのgenotype B・Cともに認められた。Let7の機能を評価するためのレポーターと、genotype C由来のHBVのpreS-2 mRNAを発現するコンストラクト(蛋白は発現しないようstopコドンを挿入したもの)を用い、HBV preS-2 mRNA存在下ではlet7の機能が損なわれることを確認した。さらに、let7の本来の標的因子である癌遺伝子LIN28Bの蛋白発現量がHBV preS2 mRNA存在下では増強することを見出した。
- 2) この効果はHBV preS2のlet7認識配列に変異を入れると見られないこと・let7を過剰発現するとレスキューされることから、HBV preS2 mRNAが宿主miRNAであるlet7の機能を抑制するためと考えられた。
- 3) HBs mRNAを発現するトランスジェニックマウスではDENによる化学肝発癌の

腫瘍形成性が促進した。このことから *in vivo* においても HBs mRNA による腫瘍形成能の促進効果が示唆された。

4) 初代ヒト培養肝細胞に HBV を感染させることによって、let7 標的分子をはじめとする種々の遺伝子発現量の変化がみられたが、そこに HBsAg に包埋した let7 を BNC によって補充することによって、LIN28B をはじめとする HBV 感染による let7 標的分子の発現量変化をキャンセルすることが可能であることが確認できた。

#### D. 考察

HBV の完全排除は困難と考えられている。その原因は、使用可能な薬剤の作用機序が限られている（インターフェロンによる mRNA 破壊と逆転写酵素阻害の 2 通り）であること、及び HBV cccDNA の存在と考えられる。HBV の複製においては細胞への侵入後、DNA からの転写、RNA への逆転写、terminal protein の RNA への結合、packaging signal  $\epsilon$  による RNA のヌクレオカプシド内被胞化、逆転写、タンパク翻訳、等のいくつかの段階を経る必要がある。細胞内の microRNA は遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わるということが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内 microRNA の役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的な HBV 増殖抑制、排除、病態改善が可能となりうる。今回、我々は、HBV の preS-2 領域の mRNA 塩基配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 を吸着し その機能を攪乱する結果 肝癌で

もその重要性が報告されている癌遺伝子 LIN28B の発現を増強することを確認した。これは、HBV の cccDNA から転写される preS2 mRNA 領域の存在が細胞癌化に関与していること、「HBs 抗原量が癌化と相関する」と報告されているが、実は抗原蛋白量ではなく HBV mRNA 量はその病態の本体である可能性を示唆するものである。HBV mRNA の病態形成、とくに肝発癌に関わる可能性は、今年度の *in vivo* モデルによる検討でも確認した。さらに、HBsAg を用いた microRNA の感染肝細胞への効率的なデリバリーは、HBV による肝発癌を抑制する可能性がある。今回用いた BNC による microRNA の肝細胞への送達は臨床応用可能な新規核酸療法として期待できるものである。いっぽう、吸着される microRNA が宿主細胞に与える影響だけでなく、ウイルス側の複製・増殖への影響を検討することで、ウイルス増殖の制御や完全排除にも応用できるかもしれない。今後さらに検討を加えていきたい。

#### E. 結論

細胞内環境の修飾による HBV 複製制御によって HBV 排除が可能とれば、HBV キャリアにおける肝不全、肝癌発生を防ぐのみならず、HBV キャリア状態を解消することとなり、その社会的インパクトは大きい。いっぽうで、核酸アナログで排除しきれない cccDNA から産生される HBV mRNA が宿主 microRNA の機能を攪乱することで細胞癌化などの病態に関わるという本知見は、cccDNA 残存時の肝発癌予防法の開発につながると考える。今年度の成果

としての肝細胞への microRNA の効率的デリバリー法の開発は、より臨床応用に近くのものである。これらの知見に立脚して、来年度以降も、分子機構の解明に基づく病態改善効果のための方策とウイルス排除法の開発を継続していきたいと考えている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. *Genome Res* 2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25653310.
- 2) Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(1):1-6.
- 3) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol.* 2014;49(2):173-84.
- 4) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating

hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014;5(14):5581-90.

- 5) Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462-463:42-8.
- 6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of PNPLA3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res.* 2014;44(10):E137-44.

### 2. 学会発表

- 1) 高田朱弥、大塚基之、小池和彦 HBs抗原に依存した肝発癌機序の解明と発癌予防法の開発. JDDW 神戸 2014.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

■平成26年度 厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)  
B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
研究分担報告書

## HBsAg 陰性、HBc 抗体陽性患者における 肝切除・肝移植後補助療法に関する計画 および高脂血症治療薬の意義について

研究分担者 國土 典宏 東京大学医学部肝胆膵外科、人工臓器移植外科 教授

研究要旨: 近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)の増加に伴い、非B非C肝に発生する肝細胞癌は増加傾向にあると報告されている。しかし、非B非C肝の一部にはB型肝炎への既感染症例が含まれており、HBcAb 陽性例の予後については不明な点が多い。当科の肝細胞癌に対する肝切除の成績をもとに、肝炎ウイルスの抗原・抗体別の予後を解析した。nBnC 症例の3分の1にはアルコール多飲歴を認め、B型肝炎の既感染の意義は限定されたものであると考えられた。そこでさらに高脂血症治療薬であるスタチンの投与が肝細胞癌再発の抑制にどの程度寄与しているかを多施設共同研究で調査する予定である。

### A. 研究目的

非B非C肝の一部にはB型肝炎への既感染症例が含まれており、HBcAb陽性例の予後への影響を明らかにした上で高脂血症治療薬であるスタチンの肝癌再発抑制効果を調査する。

### B. 研究方法

1997年から2011年に肝切除を当科で行った肝細胞癌患者1486例のうち初発でAblationなどの前治療を行っていない682例を対象とした。B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別、高脂血症治療薬投与別の無再発生存率や全生存率を検討した

(倫理面の配慮)

全手術対象患者は包括的同意書を得ており、また、非介入試験での予後調査である。

### C. 研究結果

B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別の生存期間や無再発生存期間には差を認めなかった。非B非C型かつHBc抗体陽性41例の無

再発生存率は陰性例101例に比較して有意に良好であった。しかし、これを非B非Cかつアルコール多飲歴のない90例について限定して解析したところ、HBc抗体の有無による予後の差は認められなかった。また、スタチン投与群は非投与群に比較して予後良好な傾向がみられたが検討症例数をさらに増やす必要がある。

### D. 考察

非B非C症例の3分の1にはアルコール多飲歴を認め、NASHやNAFLDなどHBV, HCV肝炎症例とは異なった背景が存在すると考えられる。HBcAbの意義については非ウイルス性肝障害の因子を除いて考慮すると予後への影響は限定されたものだった。スタチンによる発癌抑制効果が再発抑制にどの程度寄与するかは今後の検討課題である。

### E. 結論

本解析結果からは非B非C型肝炎でHBc抗体陽性例が陰性例に比較して予後が不良と

いう結果は得られなかった。しかし、一方、高脂血症治療が肝癌の再発抑制に貢献する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kokudo T, Hasegawa K, Yamamoto S, Shindoh J, Takemura N, Aoki T, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugawara Y, Kokudo N. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma associated with hepatic vein thrombosis. *J Hepatol* 2014; 61:583-8.
- 2) Lim C, Mise Y, Sakamoto Y, Yamamoto S, Shindoh J, Ishizawa T, Aoki T, Hasegawa K, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Above 5cm, size does not matter anymore in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 2014; 38:2910-8.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

特になし



■ 平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)  
B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
研究分担報告書

## 1. HBV の遺伝子発現制御機構の解析

## 2. スタチンによる抗酸化因子発現誘導、抗 HBV 活性の解析

研究分担者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究要旨： 転写調節領域に結合し、転写制御に働く宿主因子を明らかにすることは、エピジェネティックな分子機構を解明する上で非常に重要である。HBV Enhancer II/Basal core promoter領域に結合し、プレゲノムプロモーター活性に関与する宿主因子を同定した。その中のひとつLUC7L3は、ノックダウンによってプレゲノムプロモーター活性及びHBc抗原発現を亢進させた。

培養細胞系でスタチンによる細胞保護作用を解析し、Fluvastatin等が抗酸化因子NQO1、Nrf2の発現を誘導することを明らかにし、また軽度ながら抗HBV活性を見出した。

### A. 研究目的

慢性B型肝炎などHBV感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルスDNAの完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。感染細胞の核内HBV DNAを完全に排除できる新規治療薬が開発されれば、HBVキャリアからの肝不全、肝がんの発生を防ぎ、キャリア状態の解消に繋がる。そのために、新たな創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築が重要である。

本年度は、HBVの遺伝子発現機構を明らかにするため、転写制御領域に結合しHBV遺伝子発現に関与する宿主因子を探索、同定した。また、スタチンによる抗酸化因子の発現誘導、抗HBV活性を解析した。

### B. 研究方法

HBV遺伝子型A, B株(HBV-Aeus, -Bj56)のゲノム1.24倍長を持つ各プラスミドpUC-HBAeus, pUC-HBBj56は 国立国際医療センター 溝上センター長から供与された。両プラスミドから、core promoter/enhancer領域遺伝子(nt 900-1857)をFirefly luciferaseレポーターベクターへサブクローン化し、転写活性測定に用いた。各プラスミドをLipofectamine LTXを利用してHuH-7細胞に導入した。ウイルス抗原の発現はウエスタンブロットで、転写活性はdual luciferase assay系で測定した。HBVプレゲノムRNA、また抗酸化因子RNAの発現は、リアルタイムRT-PCRによって定量測定した。

(倫理面への配慮)

株化細胞および既にクローン化された遺

伝子を用いた研究であり該当しない。

## C. 研究結果

### 1. HBVの遺伝子発現制御機構の解析

昨年度、質量分析によって、HBV Enhancer II/Basal core promoter領域に結合する因子群を同定し、さらにsiRNAによるノックダウン解析から、プレゲノムプロモーター活性に関与する宿主因子を選抜した。ノックダウンによってHBV転写活性が有意に上昇する因子としてLUC7-like 3 (LUC7L3)を見出した。LUC7L3のノックダウンによってHBV遺伝子型A及びBのプレゲノムプロモーター活性は2～3倍まで上昇した。このとき、HBc抗原の発現が実際に亢進することも遺伝子型Bで確認した。

### 2. スタチンによる抗酸化因子発現誘導、抗HBV活性の解析

昨年度に続き、8種類のスタチン (Rosuvastatin, Atorvastatin, Compactin, Fluvastatin, Lovastatin, Pitavastatin, Pravastatin, Simvastatin) による抗酸化、抗炎症因子の発現誘導効果を解析した。Atorvastatin, Fluvastatin, Pitavastatin, Simvastatin をそれぞれ終濃度 3  $\mu$ M で添加したHBV複製HuH-7細胞では、NAD(P)H dehydrogenase, quinone (NQO) 1 及び Nrf2 の mRNA 発現の有意な上昇が認められた。Atorvastatin, Fluvastatin, Simvastatin を 3  $\mu$ M で添加、3日間培養したところ25～35%のHBVプレゲノムRNA量の低下が認められた。

## D. 考察

### 1. HBVの遺伝子発現制御機構の解析

転写調節領域に結合し、転写制御に働く宿主因子を明らかにすることは、エピジェネティックな分子機構を解明する上で非常に重要である。また、HBV Enh II/BCP領域は、プレゲノムRNA、HBc抗原の発現に必須であるだけでなく、HBV関連肝発がん例でこの領域の変異が蓄積することから癌化にも関与すると考えられている。

本年度、Enh II/BCP結合しHBV転写活性を負に制御する因子としてLUC7L3を同定した。LUC7L3は、酵母Luc7pのホモログであり、Luc7pはU1 snRNP splicing complexを形成するサブユニットであることが知られている。しかしながら、転写調節における機能については全くと言ってよいほど明らかにされていない。今後、HBV転写制御における分子機構を明らかにしたい。

### 2. スタチンによる抗酸化因子発現誘導、抗HBV活性の解析

昨年度、ヒト肝がん細胞へのスタチン添加によるHeme oxygenase 1、Glutamate cystein ligaseの発現亢進を報告した。今年度さらに解析を進め、抗酸化因子NQO1、また酸化ストレス応答系制御転写因子Nrf2の発現もAtorvastatin, Fluvastatin, Pitavastatin, Simvastatinによって発現亢進が認められた。今後、マウスまたはラットの肝障害モデルへのスタチン投与によって肝障害が回復しうるかなどを評価したい。

## E. 結論

HBV の Enh II/BCP 配列に結合し HBV 転写活性を負に制御する宿主因子を同定した。スタチン類による抗酸化、抗炎症因子の発現誘導及び軽度ながら抗 HBV 活性を見出した。

## F. 研究発表

### 論文発表

#### 1. 論文発表

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- $\alpha$  in Infectious Virus Production. *J Virol*. 88: 7541-7555, 2014.
2. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. *J Virol*. 89: 2220-2232, 2015,
3. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 95: 2658-2667, 2014.
4. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 207: 38-44, 2014.
5. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal

enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. *Biosens Bioelectro* 58:33-39, 2014.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

■平成26年度 厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)  
B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
研究分担報告書

## HBV複製に関与する長鎖ノンコーディングRNAの 同定と治療への応用

研究分担者 北川 雅敏 浜松医科大学医学部分子生物学講座 教授

研究要旨：我々が見いだした長鎖ノンコーディングRNA UHG1は、HBV複製に伴い発現上昇を示し、HBV複製の制御に関与し、肝硬変、肝癌において発現亢進の傾向がある事が判明した。今後はUHG1のさらなる機能解析を通じて分子標的としての評価を進め、新たなHBV複製阻害薬の創成を目指す。

### A. 研究目的

本研究ではHBV複製に関与する長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) を同定、機能解析し、未だに未知である肝発がんや再活性化機構を明らかにする。以て、HBV複製に関与するlncRNAを標的としたスクリーニング系の構築し、治療薬の創成を目指す。

### B. 研究方法

Huh-7細胞にHBVゲノムを導入した複製システム (鈴木哲朗班員と共同) を用いて、HBV複製に伴い発現変動するlncRNAをマイクロアレイで同定した。UHG1の機能解析はsiRNAを用いたノックダウンし、HBVの複製能に対する影響をRT-PCR、ELISA解析する事で行った。また肝炎、肝硬変、肝癌患者におけるUHG1の発現はORIGENE TissueScanマイクロアレイを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は「肝発がんおよび肝癌の進展に関与する発現遺伝子の同定」として本学ヒトゲノム倫理委員会に申請し、既に承認されている。

### C. 研究結果

我々はこれまでの研究成果としてHBV複製に伴い著明な発現上昇を示す宿主細胞由来の6種のlncRNA (UHG1-6)、発現低下を示す7種(DHG1-7)を見出している。本年度は最も期待できるUHG1を中心に機能解析を行なった。

HBV複製系では対照群(ベクター導入)と比べて3-4倍にUHG1の発現が有意に亢進した。HBV複製系においてUHG1をノックダウン(KD)するとHBV mRNA量が抑制された。さらに、産生されるHBs、HBe抗原もUHG1のKDで低下する傾向を示した。HBV複製に伴いHIF1 $\alpha$ やMMP14等の遺伝子発現が上昇するが、UHG1のKDによりこれらの発現が抑制された。一方で、肝炎、肝硬変、肝癌患者におけるUHG1の発現をマイクロアレイで解析したところ、肝硬変、肝癌において発現亢進している傾向がある事が判明した。

### D. 考察

本研究で同定された機能未知のlncRNA UHG1はHBVの複製制御に関与している可能性が高いと考えられる。UHG1は肝硬変、肝癌において発現亢進している傾向がある事からも分子標的としての妥当性が示唆される。今後は、UHG1のHBV複製への機能やUHG1標的遺伝子、UHG1誘導機構について解析する。この研究成果を基盤としてUHG1の発現あるいは機能を阻害する分子のスクリーニング系を構築し、化合物スクリーニングを実行することにより、治療薬候補の発見が期待できる。

### E. 結論

本研究により我々は、HBVゲノムの複製制御に関与する可能性が高いlncRNA UHG1を見い出した。

### G. 研究発表

論文発表

1. Kotake, Y., Naemura, M., Kitagawa, K., Niida, H., Tsunoda, T., Shirasawa, S. and Kitagawa, M.: Oncogenic Ras regulates the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology* in press. PMID25501747
2. Kitagawa, K., Shibata, K., Matsumoto, A., Matsumoto, M., Ohhata, T., Nakayama, K.I., Niida, H. and Kitagawa, M.: Fbw7 targets GATA3 through CDK2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* 34:2732-2744, 2014. PMID:24820417
3. Fukasawa, H., Furuya, R., Yasuda, H., Fujigaki Y., Yamamoto, T., Hishida, A. and Kitagawa,

- M.: Anti-cancer agent-induced nephrotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **14**, 921-927, 2014. PMID:24476314
4. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T. and Kitagawa, M. : YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells* **19**: 504-516, 2014. PMID: 24774443
- 学会発表
1. Kitagawa, M., Kitagawa, K. : GATA3 is a novel target for an E3 ligase SCF-Fbw7 in T-cell development. The FEBS EMBO 2014 Conference, Aug 30-Sep. 4. 2014, Paris.
  2. Kitagawa, K., Kitagawa, M.: Fbw7 targets GATA3 and contributes to regulation of T-cell development. FASEB Science Research Conferences, Ubiquitin and Cellular Regulation. Jun 15-20, Saxtons River.
  3. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T., Kitagawa, M. : YB-1 Promotes Transcription Of Cyclin D1 In Human Non-Small-Cell Lung. The Annual Meeting Of American Thoracic Society International Conference. May16-21. 2014, San Diego.
  4. Uchida, C., Kitagawa, M.: Possible contribution of pRB-NuMA interaction in mitotic progression. Gordon Research Conference "Genomic Instability", Jul 6-11. 2014, Hong Kong.
  5. 原田雅教、神武洋二郎、大畑樹也、北川恭子、丹伊田浩之、松浦駿、船井和仁、椛村春彦、須田隆文、北川雅敏: 非小細胞肺癌において YB-1 は cyclinD1 の転写を亢進させる 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014 年 4 月 25-27 大阪
  6. 酒井聡、井上靖道、中西真、林秀敏、北川雅敏 : p53 依存的な TRB1 のタンパク質発現制御機構の解析平成 26 年度 がん若手研究者ワークショップ、2014 年 9 月 4 日、蓼科
  7. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb、柴田進和、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz : マウス ES 細胞における Xist の発現抑制機構 日本遺伝学会第 86 回大会 2014 年 9 月 17 日、長浜、滋賀県.
  8. 北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏 : Fbw7 の T 細胞分化の制御における新規基質 GATA3 の分解の寄与 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 26 日 横浜
  9. 丹伊田浩行、松沼亮一、北川雅敏 : DDB2 依存的 HB01 リクルートは UV により生じるシクロブタン型ピリミジンダイマーの効果的な修復に必要である 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜
  10. 内田千晴、服部隆行、山本直樹、北川雅敏 田矢洋一 : RB タンパク質は紡錘体微小管の正しい配置に関わる 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜.
  11. 原田雅教、神武洋二郎、北川恭子、丹伊田浩行、椛村春彦、北川雅敏 : 非小細胞肺癌において Y-box binding protein 1 (YB-1) はサイクリン D1 に直接結合し転写活性を亢進させる。第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25-27 横浜
  12. 丹伊田浩行、松沼亮一、北川雅敏 : DDB2-dependent HB01 recruitment is required for efficient repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 2 日 鹿児島
  13. 北川雅敏、北川恭子 : T 細胞分化過程における GATA3 の Fbw7 依存的分解の分子機構 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、京都.
  14. Chiharu Uchida, Masatoshi Kitagawa, Yoichi Taya: Possible contribution of pRB - NuMA interaction in mitotic progression. 第 19 回静岡健康・長寿学術フォーラム、2014 年 11 月 7 日、沼津.

15. 丹伊田浩行、松沼亮一、荻朋男、森脇真一、  
北川 雅 敏 : DDB2-dependent HBO1 recruitment is essential for repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜 無  
3. その他  
無
16. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb、柴田進和、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz : 未分化 ES 細胞の Xist 発現抑制機構 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、横浜
17. 北川恭子、柴田清、大畑樹也、丹伊田浩行、北川雅敏 : T 細胞分化過程における GATA3 分解機構 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日 横浜

## G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無
2. 実用新案登録

■平成26年度 厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)  
B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
研究分担報告書

## iPS細胞を用いたHBV感染・培養系の確立と 新規抗ウイルス薬の探索

研究分担者 朝比奈 靖浩 東京医科歯科大学 教授

【目的】B型肝炎ウイルス (HBV) に対する創薬には、汎用性の高いより生体に近いHBV感染培養モデルの構築が必要であるため、我々はヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) から分化誘導した肝細胞系細胞を用いてHBV感染系の構築を試みた。【方法】ヒトiPS細胞株から肝細胞系譜へと分化誘導し、iPS由来肝幹/前駆細胞 (iPS-Hep細胞) を純化した。本iPS-Hep細胞を用いてHBV感染実験を行い、また純化したiPS-Hep細胞におけるNTCP遺伝子発現およびIFN $\alpha$ 添加時のIFN応答系の遺伝子発現誘導について解析した。【結果】HepG2. 2. 15細胞由来HBVを培養上清に添加したところ、細胞内に0.3copies/cellのcccDNAと $2 \times 10^8$ copies/mlのHBVDNAが上清中に確認され、HBV感染がiPS-Hep細胞において成立することが確認された。純化したiPS-Hep細胞ではNTCPのmRNA高発現を認め、IFN $\alpha$ 添加時のIFN誘導遺伝子の発現量誘導能は肝癌細胞株に比し有意に良好であった。【結語】ヒトiPS細胞由来肝幹・前駆様細胞においてHBV感染を成立させることに成功した。本HBV感染系を用いることでより生体に近いHBV全ライフサイクルの解析と新たな創薬展開が期待できる。

### A. 研究目的

近年B型肝炎ウイルス (HBV) 受容体のSodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) を強制発現した肝癌細胞株においてHBVの感染・複製系の解析が可能であることが報告された。しかし、肝癌細胞株では自然免疫系、代謝機能、細胞寿命などの形質が正常肝細胞とは異なっており、HBV感染が宿主自然免疫に与える影響などを検討することは困難である。一方、初代培養ヒト肝細胞を用いた場合、長期間の培養継続が困難であるうえ比較的短期間で代謝機能が低下し、多くのドナーから樹立することも難しい。したがって、B型肝炎ウイルスに対する創

薬には、汎用性の高いより生体に近いHBV感染培養モデルの構築が必要であるが、これまでHBVライフサイクルの評価が可能な適切な感染培養モデルはなかった。そこで我々は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) から分化誘導した肝細胞系細胞を用いてHBV感染系の構築を試みた。

### B. 研究方法

ヒトiPS細胞株にactivin A、FGF、BMP4、HGFを段階的に添加することにより肝細胞系譜へと分化誘導した後、これらのうちCD13+CD133+陽性細胞を繰り返しFACSにより分離することでiPS由来肝幹/前駆細胞 (iPS-Hep細胞) を純化した。本iPS-Hep細胞

胞を用いて種々の条件下でHBV感染実験を行い、とくに感染効率向上のため dimethyl sulfoxide 処理 および polyethylene glycol 添加を行った。感染に用いたHBVはHepG2. 2. 15細胞由来の培養上清を用いた。また、純化したiPS-Hep細胞におけるNTCP遺伝子発現およびIFN $\alpha$ 添加時のIFN応答系の遺伝子発現誘導について解析し、肝癌細胞株と比較検討した。

(倫理面への配慮)

所属施設の倫理委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

肝細胞系譜へと誘導したヒト iPS 由来細胞は、AFP、HNF4a を高度に発現しており、FACS を用いて CD13+CD133+ 陽性細胞 (iPS-Hep 細胞) を純化することにより、一定期間の継代培養が可能であった。純化した iPS-Hep 細胞において NTCP の mRNA 発現を解析したところ、肝癌細胞株と比較して 100 倍以上の発現量を認めた。また、iPS-Hep 細胞における IFN $\alpha$  添加時の IFN 誘導遺伝子 (ISGs: MxA, PKR, ISG15) の発現量誘導能は HepG2-NTCP に比し iPS-Hep 細胞で有意に高かった ( $p < 0.001$ )。次に iPS-Hep 細胞における HBV の感染性を検討するために、HepG2. 2. 15 細胞由来 HBV を培養上清に添加したところ、細胞内に 0.3copies/cell の cccDNA と  $2 \times 10^8$ copies/ml の HBVDNA が上清中に確認され、HBV 感染が iPS-Hep 細胞において成立することが確認された。

### D. 考察

分化レベルを制御・純化することで、ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆様細胞において HBV 感染を成立させることに成功した。本 iPS-Hep 細胞は、肝癌細胞株とは異なり、

IFN 添加時の ISGs 誘導能が保たれていることから、宿主自然免疫を中心としたウイルス・宿主間相互作用の解析が可能性であると考えられる。iPS-Hep 細胞における HBV 感染系を用いることでより生体に近い HBV 全ライフサイクルの解析と新たな創薬展開が期待できる。

### E. 結論

ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆様細胞において HBV 感染を成立させることに成功した。本 HBV 感染系を用いることでより生体に近い HBV 全ライフサイクルの解析と新たな創薬展開が期待できる。

### G. 研究発表

#### 論文発表

1. Murakawa M\*, [Asahina Y\\*](#), Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kitazume-Kusano A, Watanabe T, Kawai-Kitabatake F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai N, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. \*MM and YA contributed equally to this work. Impaired induction of IL28B and expression of IFN $\lambda$ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 doi: 10.1111/jgh.12902.
2. Tsuchiya K\*, [Asahina Y\\*](#), Matsuda S, Muraoak M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. \* These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2014; 120: 229-273.
3. Tsuchiya K, [Asahina Y](#), Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage



- hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2014; 20: 291–297.
4. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, Asahina Y, Enomoto N, Arii S, Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. *Oncology* 2014; 86: 53–62.
  5. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzuka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatology* 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421.
  6. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; 9: e86449.
  7. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: evaluation by near infrared spectroscopy. *Hepatology* 2014; 44: 319–326.
  8. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoteric acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatology* 2014; 44: 1339–1346. doi: 10.1111/hepr.12309.
  9. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2014; 44: 720–727.
- 学会発表
1. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Gene alterations in  $\beta$ -catenin and p53/cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
  2. Nakagawa M, Asahina Y, Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based-direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
  3. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN/4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of

- ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
4. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, YItsui Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
  5. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Azuma S, Asahina Y, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase-14 regulates the maturation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
  6. Tsuchiya K, Yasui Y, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Clinical outcomes in patients who develop hepatocellular carcinoma after hepatitis C viral eradication by antiviral therapy. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
  7. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Yamamoto K, Sasazuki T, Sugiyama M, Seto W, Yuen M, Poovorawan Y, Ahn SH, Han K, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang J, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
  8. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN  $\lambda$  4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
  9. Tsuchiya K, Yasui Y, Takada N, Nakakuki S, Matsuda S, Kaneko S, Muraoka M, Yamashita N, Hattori N, Tamaki N, Osaki S, Suzuki T, Hosokawa K, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriaminepentaacetic acid magnetic resonance imaging and contrast enhanced ultrasonography with sonazoid as part of therapeutic strategies for small nonhypervascular hepatic nodular lesions. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
  10. 中川美奈, 朝比奈靖造, 渡辺 守 シンポジウム 難治性C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討 第40回日本肝臓会東部会 東京, 2014年11月
  11. 朝比奈靖造, 中川美奈, 渡辺 守 シンポジウム NS3およびNS5A阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル3剤併用療法の治療効果 第50回日本肝臓会総会 東京, 2014年5月

12. 朝比奈靖浩  
公聴会 NS3 および NS5A 阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル 3 剤併用療法の治療効果  
第 50 回日本肝臓会総会  
東京, 2014 年 5 月
13. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
パネルディスカッション C 型慢性肝炎に対するインターフェロンをベースとしたプロテアーゼ 3 剤併用療法の治療効果と DAA 耐性変異の検討  
第 19 回日本肝臓会大会  
神戸, 2014 年 10 月
14. 櫻井幸, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
パネルディスカッション B 型慢性肝炎疾患における核酸アナログ治療中の肝発癌危険因子の検討  
第 40 回日本肝臓会東部会  
東京, 2014 年 11 月
15. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
ワークショップ 高齢者 C 型慢性肝炎への IFN 治療後発癌と発癌に関与する因子の解析  
第 19 回日本肝臓会大会  
神戸, 2014 年 10 月
16. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
ワークショップ ウイルス性急性肝炎および de novo B 型肝炎の動向  
第 40 回日本肝臓会東部会  
東京, 2014 年 11 月
17. 東正新, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
ワークショップ 肝細胞癌スクリーニング時における拡散強調画像陽性所見の重要性  
第 40 回日本肝臓会東部会  
東京, 2014 年 11 月
18. 村川美也子, 朝比奈靖浩, 中川美奈, 後藤文男, 大谷賢志, 河合富貴子, 谷口未樹, 新田沙由梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 井津井康浩, 東正新, 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺 守  
ワークショップ C 型慢性肝炎治療における IFN 不応性に関わる IL28B 近傍遺伝子多型(SNP)と血球内 IFN  $\lambda$  産生能の関連  
第 50 回日本肝臓会総会  
東京, 2014 年 5 月
19. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
ワークショップ インターフェロン治療後の線維化マーカーの推移と発癌リスクの検討  
第 50 回日本肝臓会総会  
東京, 2014 年 5 月
20. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守  
ワークショップ 次世代プロテアーゼ阻害剤併用 3 剤治療の適応症例の検討  
第 100 回日本消化器病学会総会  
東京, 2014 年 4 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

■平成26年度 厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)  
B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
研究分担報告書

## HBV プロモーターおよびウイルス産生を標的にした 化合物探索

研究分担者 森石 恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨: B型肝炎ウイルス (HBV) のコア蛋白質遺伝子上流のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子と連結させ、海洋生物抽出物ライブラリーから新規の抽出物をスクリーニングし、ヒットした4抽出物のうち二つの主成分が Polybrominated diphenyl ether (PBDE) であった。PBDEとその誘導体は HepG2. 2. 15 細胞からのウイルス粒子産生に対して抑制活性を示し、EC50 が 0.2-0.8  $\mu\text{M}$  で、SI 値が 12.8-18.2 であった。また、海洋生物由来の精製化合物 21 種を探索したところ、二種の化合物がヒットし、細胞毒性が低かった化合物が metachromin A であった。HepG2. 2. 15 細胞のウイルス DNA 放出を指標に抗 HBV 活性を測定したところ、EC50 が 0.8  $\mu\text{M}$  で、SI 値が 19.6 であった。また、漢方由来の化合物の Berberine も HepG2. 2. 15 細胞に対して抗 HBV 活性を示したが、EC50 が 9  $\mu\text{M}$  を示した。また、Simvastatin は HBV 初期感染を抑制することが示され、EC50 が 5  $\mu\text{M}$  であった。これらの結果は、新規抗 HBV 薬開発などに繋がるものと期待される。

### A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者は世界で三億人を越えるといわれ、半数の肝癌患者が HBV 感染に由来すると考えられている。細胞内に cccDNA が残されていても、ウイルス蛋白質の発現を制御できれば、再活性化などに際し、感染拡大や病原性発現を抑制・遅延させることができる。核内にある cccDNA は宿主ヒストンと会合し、ミニクロモソームを形成することから、エピジェネティックな制御をうけると考えられる。HBV のコア蛋白質コード領域の上流に、プロモーター領域が存在しており、宿主の転写因子 HNF4、C/EBP、PPAR $\gamma$  などが認識する配列が認められる。コア蛋白質は、ウイルス粒子を形成するキャプシド蛋白質と考えられ、感染性粒子を構成する構造蛋白質である。

本研究で、HBV 感染を抑制する化合物探索と感染による細胞内変化を解析し、得られた成果を新規 B型肝炎治療薬開発に発展させることを目指す。今回は、HBV コアプロモーターを制御する化合物探索し、ウイルス粒子産生を抑制する化合物同定を目指した。

### B. 研究方法

遺伝子型 C (CAT 株) からコアプロモーター領域を PCR で増幅し、pGL2 プラスミドに組み込み、

ルシフェラーゼ遺伝子と連結させ、細胞株を樹立した。その細胞株を用いて、45 海洋生物抽出物をスクリーニングした。MTS 法によって細胞増殖を測定した。また、HBV を持続産生している HepG2. 2. 15 細胞および親株の HepG2 細胞の細胞内微細構造を透過型電子顕微鏡によって解析した。HepG2 に NTCP を発現させ、樹立した細胞に Hep38.7 細胞由来の HBV を感染させる培養細胞系で、感染初期過程を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大