

B型肝炎ウイルス転写複製機構の解析による治療法の開発

研究分担者 齋藤 泉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の複製機構は、極めて複雑であり、依然として不明な点も多い。本研究ではHBVの複製機構を利用してHBV感染細胞でのみ治療用遺伝子を搭載したHBVシュドゲノムが複製する環状分子をアデノウイルスベクター（AdV）により肝臓に導入する新規治療法の開発を目的の1つとしており、HBV複製、特に環状二本鎖DNA（CCC）分子を効率的に検出するシステム開発が必須である。本年度は、肝臓細胞への導入効率が極めて高いアデノウイルスベクター（AdV）と強力なCMVプロモーターを併用したHBVプレゲノム高度発現AdVシステムの開発を行い、1.03倍長HBVゲノムを用いることでHBV複製に伴い生成するCCCのみを特異的に定量することに成功した。また、治療用遺伝子挿入可能領域の同定に向けてHBV複製に必須であるポリメラーゼ領域を欠失したHBVゲノムを有するAdVとポリメラーゼを発現するAdVを共感染することによりHBV複製をトランスに補完するシステムの開発に成功し、新規遺伝子治療用ベクターの治療用遺伝子挿入領域についての知見が得られた。本研究で開発したHBVプレゲノム高度発現AdVシステムは抗HBV薬スクリーニング法として極めて高い感度と安全性を兼ね備えており、既存薬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ったことから、CCC完全排除を目指す薬剤のスクリーニング法としても有用性が示された。

A. 研究目的

アデノウイルスベクター(AdV)は、肝細胞癌由来のHuH-7細胞など特に肝臓由来の細胞に高効率で遺伝子導入が可能であり、肝炎ウイルス研究には有用性の高いベクターである。本研究では、齋藤らが開発した100%の細胞の核内でAdVから環状分子を生成するシステムを応用して、B型肝炎ウイルス複製阻害、特に核内の環状二本鎖DNA(CCC)の完全排除を目指す。そのために、HBVプレゲノム高度発現AdVシステムの開発を行い、HBVゲノム複製機構の解析と、その性質を応用した新規治療用ベクターの開発及び、班員に新規ベクターを供給することにより研究推進に寄与することが本研究の目的である。

B. 研究方法

昨年度までのプラスミドとコスミドを用いた解析からHBV複製が確認されていたS発現欠失HBVゲノム(kS)あるいはネガティブコントロールとしてHBVのポリメラーゼコード領域を欠失したHBVゲノム(Pol)をCMVプロモーターから発現するアデノウイルスベクターを定法通りに作製した。kSゲノム及びPolゲノムは、汎用されている1.24倍長と相同配

列の領域を最小限に留めるように短絡した1.03倍長のものを構築し、ベクター作製に供した。

HBVゲノム複製効率の検討は、Southern法とともに、RC及びCCCを検出するプライマー/プローブの設計を行い定量PCRによっても行った。

また、HBVのポリメラーゼを発現するAdVの作製を行い、Pol発現AdVと共感染し、HBVゲノム複製効率について検討を行った。(倫理面への配慮)

本年度の研究に当たっては、既に報告されているHBVを用いており、特に倫理面に抵触する検討は行っていない。

C. 研究結果

CMVプロモーターからプレゲノムを高発現するAdVの作製は、生成効率が極めて低かったものの、作製は可能であり、得られたベクター力価は実験には十分に応用可能であった。当初、昨年度までプラスミド及びコスミドで検討を行っていた1.24倍長のHBVゲノムを用いて検討を進め、HBVゲノム複製がないPolをネガティブコントロールとしてSouthern

法にて解析を行っていたが、PCR による高感度な解析から 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 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、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 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 α -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* 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, September 3-6
- 6 近藤小貴、鈴木まりこ、前川文、斎藤

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、斎藤泉、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、斎藤泉、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 DNA
カセットおよび該カセットをを含むベ
クターの製造方法
特願 2014-242914

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服実用化研究事業(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
分担研究報告書

B型肝炎ウイルス複製の miRNA による制御に関する研究

分担研究者： 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ことで想定される。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microRNAの役割を解析し、その発現量を調節するこ

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ことで想定されている。

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 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与する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量が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与するという本知見は、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、より臨床応用に近づくものである。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, Arai 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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究
分担研究報告書

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

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
分担研究報告書

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, Flivastatin, 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 μ 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 μ 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 cysteine 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- 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 Bioelectron**. 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

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
分担研究報告書

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「肝発癌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 α 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, KI., 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、梶村春彦、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、梶村春彦、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 HB01
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
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
無
3. その他
無

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 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 2×10^8 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 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

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 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 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 2×10^8 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 λ 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, Kuroski 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, Kuroski 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, Tamak Ni, 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, Natsuizka 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. ***Hepatol Res* 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. ***Hepatol Res* 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 gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. ***Hepatol Res* 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. ***Hepatol Res* 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 β -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, YIitsui 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 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, 朝比奈靖浩, 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. 朝比奈靖浩, 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關与する因子の解析

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 産生能の關連

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

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）
分担研究報告書

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を目指した包括的研究

分担課題：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

分担研究者 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 μM 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 μM 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 μM 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 μM 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、ミニクロモゾ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 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、山梨大学学長の承認を得て行った。

C. 研究結果

抗 HBV 活性を示す化合物を海洋動物抽出物ライブラリーを、コアプロモーター活性を抑制する活性

を指標にスクリーニングを行った。252 画分を探索した結果、ヒットした 4 画分のうち 2 画分の主成分が Polybrominated diphenyl ether (PBDE) であった。PBDE およびその誘導体 3 化合物のウイルス粒子産生に対する影響を、HepG2.2.15 細胞を使って解析した。PBDE と一つの誘導体はウイルス産生を抑制したが (EC_{50} が数 μM)、ともに毒性 CC_{50} が 10-20 μM を示した。さらに、海洋生物からの精製化合物表品 21 化合物をスクリーニングし、3 化合物がヒットした。低毒性で、抗 HBV 活性が高かったのが、metachromin A であり、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、 EC_{50} が 0.8 μM 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、 EC_{50} が 9 μM を示した。また、Simvastatin は HBV 初期感染を抑制することが示され、 EC_{50} が 5 μM であった。preS1 ペプチドの結合を Simvastatin は阻止できなかったことから、ウイルス接着以降の過程で、Simvastatin は抗 HBV 活性を示すものとして考えられた。

D. 考察

今回、抗 HBV コアプロモーター活性やウイルス産生に対して阻害活性を示す化合物を同定し、今後 metachromin A などの誘導体や類縁化合物に対して抗 HBV 活性を検討する。また、他、海洋生物抽出物以外の天然物に対しても抗 HBV 活性の有無についても検討する計画である。また、コアプロモーターアッセイ系を B 型肝炎創薬実用化等研究事業の他班に提供し、その細胞系による低化合物ライブラリーを用いた抗 HBV 剤探索にも協力しており、本研究から波及した成果も今後期待できる。

E. 結論

本研究によって、抗 HBV 活性を示す化合物が同定され、今後、さらに検討を加えることで有効な化合物を単離同定できる可能性が示された。本研究成果は、新規 B 型肝炎治療法開発および診断法開発に繋がるものと今後も期待できる。

G. 研究発表

1 論文発表

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K: Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014

Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Molecules*, 19: 4006-4020, 2014

Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 134: 1158-1161, 2014

Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs*, 12: 462-476, 2014

Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. *PLOS one*, 9: e85360, 2014

2. 学会発表

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepacivirus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11, Banff, Canada.

Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. Los Angeles, USA.

山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜

安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜

田中智久、陳文家、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本在来馬におけるウマヘパシウイルス感染第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜
土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司、トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜

天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、坂本直哉、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司 Tyrphostin 類縁化合物の C 型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜

Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19. Hiroshima

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

HBV の *in vitro* 感染・増殖系の確立と抗ウイルス薬スクリーニング系への応用

研究分担者 田川陽一 東京工業大学 大学院生命理工学研究科・准教授

研究要旨：内皮細胞の管腔ネットワークとヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞との共培養による肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL^{hES/iPS})による HBV の感染を検討し、班内分担者と連携して各段階における薬剤スクリーニング系の確立を目的とした。さらに、星細胞株を導入し、この IVL を長期安定かつ肝機能を高めることを検討した。

A. 研究目的

初代培養肝細胞やヒト肝癌由来細胞株等では HBV の感染は成立できないことが知られているが、ヒト肝細胞を移植できるマウスに導入したキメラマウスでは HBV の感染が可能である。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスは高価であり大規模な薬剤スクリーニング等には適さない。また、今日、医薬品開発といえども動物実験代替法の必要性が訴えられており、*in vivo* を反映した *in vitro* 感染・増殖モデルの開発が望まれる。一般的な肝細胞株は幼若（腫瘍）細胞であり、また、肝臓から調製された初代肝細胞は培養中に肝機能が低下してしまうことから、成熟肝細胞としての特異的細胞内システムを有していないということになる。このような細胞環境はこれらのシステムを利用して増殖する HBV にとっては望ましくない。実際の肝臓は実質細胞である肝細胞と非実質細胞である類洞内皮細胞や星細胞等からなり、特異的な組織構造を形成している。また、肝臓中の肝細胞は立体的であり、肝細胞—肝細胞、肝細胞—類洞内皮細胞（直接の結合はない）、肝細胞—微小胆管という3つの細胞極性を有しているが、様々な細胞内小器官の配置・構成や酵素活性は細胞極性に依存していると考えられる。特に、HBV のレセプターと同定されたナトリウム・胆汁酸共輸送体(NTCP)は肝細胞の類洞側細胞表面に発現していることが知られている。

我々は、ヒト初代培養肝細胞と内皮細胞等、または、ヒト ES/iPS 細胞由来分化細胞を用いて細胞極性を再構築した高機能肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL^{hPH} または IVL^{hES/iPS})の構築に成功している。そこで、IVL^{hES/iPS} を用いて cccDNA の安定形成系または効率よい *in vitro* HBV 感染・増殖系を確立することを目的とする。さらには、この系を用いて、cccDNA の選択的不活化やワクチン開発を試みる。

B. 研究方法

Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)ゲル上に形成した血管内皮細胞の管腔ネットワークにヒトES/iPS細胞から分化誘導した肝細胞系譜細胞を播種して肝組織様構造 (IVL^{ES/iPS})を構築した。その IVL^{ES/iPS} にHBV感染性粒子を添加し、培養期間中の細胞からプレゲノムRNAをRT-PCR法により定量し、培地中からは放出されたHBV粒子を回収しゲノムDNAを定量した。

さらに、IVLに星細胞を導入して、肝組織構造の安定化について検討するため、星細胞株TWNT4およびLX2を内皮細胞ネットワーク構築後に播種し、その後、初代培養肝細胞を播種した。星細胞共培養の効果については、尿素合成能とアセトアミノフェンの感受性を指標に解析を行った。

(倫理面の配慮)

東工大ではヒト ES 細胞専用実験室を有し、田川のヒト ES 細胞を用いた肝組織分化誘導研究はすでに文部科学大臣より承認を得ており、東工大のヒト ES 細胞倫理規則および文部科学省のヒト ES 細胞使用指針に遵守し実験をおこなった。また、その他の研究では、細胞株や市販されている内皮細胞株等を用いたため、人権擁護、不利益等は発生していない。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞を用いてアクチビン A を特定濃度で一定期間処理した後、安定的な IVL^{iPS} を構築した。IVL^{iPS} は 2 週間以上培養が可能となり、その培養期間中に肝特異的遺伝子発現や尿素合成能などの肝特異的代謝機能が上昇することを確認した。さらに、HBV のレセプターとして唯一知られている NTCP の遺伝子発現が肝癌細胞株ではほとんどなかったが、IVL^{hiPS} においては非常に強く 2 週間程上昇が観られた。IVL^{hiPS} に HBV を感染させたところ、細胞内で HBV の増殖および HBV 粒子の細胞外へ放出など HBV が感染可能であることが再確認できたとともに、少なくとも数日間はその現象が効率的に観察され、機能的なモデル構築に成功した。

さらに、この *in vitro* 感染システムが長期間可能になるように、IVL の構造安定性を試みた。星細胞株 TWNT4 または LX2 を導入したところ、内皮細胞ネットワークへ向かって遊走が認められ、その後マウス初代培養肝細胞を播種したところ、さらにネットワークへ遊走が観察された。構造的には長期間の安定が確認されたが、用いた星細胞株は増殖性が高く、一面が星細胞でおおわれることになったため、改良が望まれた。また、星細胞を導入した IVL では、尿素産生の有意な促進は認められなかったが、アセトアミノフェンによる感受性は有意に上昇することが確かめられた。

D. 考察

この IVL^{ES/iPS} では、実際の肝臓の組織と類似した肝細胞特異的な極性シグナルを構築することができたため、類洞側の肝細胞表面に局在している NTCP の発現が誘導でき、特に 2 週間以上の発現が維持されていることから、HBV の感染・増殖が可能となったと考えられる。また、HBV 感染後に NTCP の発現が低下していく現象は大変に興味深い。

用いた星細胞株は、増殖性が高く、遺伝子発現解析により、活性化されていることが確認できた。つまり、個体における肝の線維化状態に近いと思われ、肝細胞の極性は乱れていることが考えられ、NTCP の発現などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。従って、星細胞株の活性化を抑制した IVL 構築を検討する必要性がある。

E. 結論

IVL^{ES/iPS} では、その他の細胞株などの *in vitro* 系に比較して、有意に効率の良い *in vitro* HBV 感染・増殖系の確立に成功したため、現在、特許出願中であり、論文も作成中である。

しかしながら、来年度から抗 HBV 阻害薬における試験に应用を目指すには、さらに高効率の感染・増殖システムへ改良する必要性があると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, **Tagawa Y.** An *in vitro* liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci Bioeng.* (2014) 118:107-111, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.

今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, **田川 陽一**: 霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存・輸送・解凍、最新動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、(株)技術情報協会、P504 ~ 508、2014 年

2. 学会発表

田川陽一: ES 細胞から *in vitro* 器官形成モデル、そして、最小ほ乳類 *in vitro* 生命システム、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)2014 年(シンポジウム)

玉井美保、藤山陽一、**田川陽一**: *In vitro* liver model derived from murine ES/iPS cells for animal use alternative: 動物実験代替を目指した *in vitro* 肝組織モデル、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)、2014 年(口頭 & ポスター)

今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, **田川 陽一**: A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells 霊長類 ES/iPS 細胞用緩慢法凍結保存液の開発、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)、2014 年(ポスター)

玉井美保、酒井宏司、宮川真一、**田川陽一**: マウス門脈結紮による肝再生モデルにおける IL-6 依存性、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)

守矢 恒司、玉井美保、豊田 優、**田川 陽一**: アセトアミノフェン誘導肝障害の *in vivo* および *in vitro* モデルによる解析、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)

苅谷智行、玉井美保、相川博明、**田川陽一**: ES 細胞および TS 細胞を用いたマウス胚盤胞 *in vitro* モデルにおける TLR 応答、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)

玉井美保、**田川陽一**: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルにおける肝代謝能、第 21 回肝細胞研究会、東京(東京医科歯科大学)、2014 年(ポスター)

守矢 恒司、玉井美保、豊田 優、**田川 陽一**: 概日リズムを考慮したアセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける急性期タンパク質による保護作用、第 21 回肝細胞研究会、東京(東京医科歯科大)、2014 年(ポスター)

田川陽一、玉井美保、藤山陽一: 最小哺乳類 *in vitro* システムの戦略と応用、第 66 回日本生物工学会大会 シンポジウム(試験管から個体までの人工生命体研究の現状と将来)、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014 年(シンポジウム)

玉井美保、藤山陽一、**田川陽一**: 流体デバイスを用いたマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデル、第 66 回日本生物工学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014 年(ポスター)

竹下裕治、張本乾一、玉井美保、南隆之、荻博次、長岡紀幸、松川昭博、吉田靖弘、**田川 陽一**: QCM-D による様々な細胞種の接着と伸展の観察、第 66 回日本生物工学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター)2014 年(ポスター)

Yoh-ichi TAGAWA, Miho Tamai, Sungho Ahn, Kenji Nakashima, Masahiko Ito, and Tetsuro Suzuki: Human iPS cell-derived in vitro model for Hepatitis B virus infection and proliferation, 2014 World Stem Cell Summit, San Antonio (Marriott Rivercenter) 2014 年 (poster)

Miho TAMAI, Yoichi Fujiyama, **Yoh-ichi TAGAWA**: High- and multi-functional in vitro liver model derived from mouse ES/iPS cells on micro-fluidic device, 2014 World Stem Cell Summit, San Antonio (Marriott Rivercenter) 2014 年 (poster)

玉井美保、藤山陽一、**田川陽一**: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルの肝細胞極性、第9回「長野ミーティング: 生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方) 2015 年(口頭)

田川陽一、玉井美保、守矢恒司、藤山陽一: 人工哺乳類システム、第9回「長野ミーティング: 生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方) 2015 年(口頭)

守矢恒司、玉井美保、豊田優、小松銀河、**田川陽一**: アセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける概日リズムの影響、第9回「長野ミーティング: 生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方) 2015 年(口頭)

田川陽一、玉井美保、藤山陽一: 最小哺乳類 *in vitro* モデルの構築と応用 -ES/iPS 細胞を用いた試み-、第14回分子予防環境医学研究会、大阪(大阪市立大学) 2015 年(特別講演)

田川陽一、玉井美保、藤山陽一: 再生医科学研究オーバービュー -ES 細胞から分化細胞、組織、そして、生命システム シンポジウム「細胞を創る」研究会 7.0, 東京, 2014 年(シンポジウム)

田川陽一: B 型肝炎感染・増殖 *in vitro* システム、イノベーションジャパン 2014, 東京(ビックサイト)、2014 年(ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願および取得

名称: 細胞培養デバイス、細胞培養システム、及び細胞培養方法、発明者: 藤山陽一、**田川陽一**、権利者: 株式会社島津製作所、東京工業大学、種類: 特許、特許第5686310

名称: 肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワクチンの製造方法、スクリーニング方法、およびキット発明者: **田川陽一**、玉井美保、アン ソンホ、鈴木 哲朗、伊藤 昌彦、中島 謙治 権利者: 東工大、浜松医科大学 種類: 特許 番号: 特願2014-52754 出願年月日: 2014年03月14日 国内外の別: 国内

B 型肝炎ウイルスの持続感染に関与する宿主因子の同定

分担研究者：福原崇介 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野
研究協力者：なし

研究要旨：

B型肝炎の根治を目指す治療法の確立には HBV の持続感染を可能にする新たな宿主因子の同定が必要である。本研究では、定量的なプロテオミクス法である SILAC 法および質量解析を用いて、HBV 感染に関与する分子をスクリーニングした。SILAC 法では HBV 感染に伴い核内で有意に発現が減少する分子で、HBV の感染性に関与する分子として LRPPRC を同定した。また、質量分析によりコア蛋白と相互作用する分子として SRPK1 を同定した。shRNA によるノックダウンにより HBV の Pregenomic RNA の核外移行に LRPPRC が関与していることが明らかになった。現在、CRISPR/Cas9 法を用いて、LRPPRC のノックアウト HepG2 細胞の樹立を試みている。また、CRISPR/Cas9 系によって SRPK1 ノックアウト HepG2 および HepG2.2.15 細胞を樹立した。SRPK1 は HBV ゲノムのコア粒子への取り込みを抑制する抑制因子であることが判明した。

A. 研究目的

B 型肝炎に対する現行の治療は HBV の逆転写酵素を標的としているため、核内に存在する cccDNA には効果がないことから根治は難しい。従って、HBV 感染を根治するには新たな宿主因子の同定と、それを標的とした創薬が重要である。本研究では質量分析や定量的なプロテオミクス法である SILAC 法を用いて、HBV 感染によって核内で変動する分子を同定し、その中から HBV の持続感染や病原性に関与する宿主因子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

宿主因子の探索として、核または膜画分を精製した後に、SILAC 法を用いて HBV 感染によって核内で有意に発現が変化している蛋白質を網羅的にスクリーニングした。遺伝子発現の確認としては、Taqman-array および定量 PCR を行った。また、OSF タグを付加したコア蛋白質と結合する蛋白質を質量分析により網羅的に探索した。SILAC 法および質量分析により同定された分子のうち、スコアの高い分子を標的とした shRNA を作製し、HBV の感染性に関与する分子をスクリーニングした。HBV の感染性の評価としては、HBV ゲノムが Integrate されている HepG2.2.15 および HBV の受容体である NTCP を安定的に発現する HepG2/NTCP C4 細胞に対する感染の系を用いた。HBV 感染性粒子はテトラサイクリンを除去した HepAD38 細胞の上清より得て、PEG により濃縮したものをを用いた。感染後、10 日後に HBc の発現を Western Blotting にて、rcDNA 量をリアルタイム PCR 法により評価した。CRISPR/Cas9 系を用いて同定された分子を欠損させた HepG2 および HepG2.2.15 細胞を樹立し、HBV の感染性やウイルスゲノムの複製効率を検討した。

C. 研究結果

SILAC 法により核内で発現上昇した因子を 9 種類、減少した因子を 32 種類同定した。また、膜画分でも変動した因子を 40 種類同定した。2 次スクリーニングとして HepG2.2.15、T23 および YE12 細胞を用いて、HBV 感染による遺伝子発現変動を検討し、それぞれの細胞で同じ発現パターンを示す因子として 20 種類の宿主因子を同定した。それらの因子を標的とした shRNA を作製し、ノックダウン HepG2.2.15 細胞を樹立した。20 種類の宿主因子のうち、LRPPRC をノックダウンした細胞では、細胞内および上清中のコア関連 HBV-DNA 量が有意に低下していた。LRPPRC は特定の mRNA に結合し、核から細胞質への輸送に関与することが知られているため、HBV の pregenomic RNA の輸送への関与を検討した。HepG2.2.15 および 1.28 倍長の HBV-DNA を導入した細胞において、LRPPRC の発現抑制によって、核内の pregenomic RNA の量は増加し、細胞質内で減少することが明らかとなった。以上の成績より、LRPPRC は pregenomic RNA の輸送を介し、HBV の感染性を正に制御していることが示唆された。現在、CRISPR/Cas9 系を用いて LRPPRC ノックアウト

HepG2 細胞を樹立している。

質量分析により同定されたコア蛋白質と結合する分子のうち、スコアの高い 12 分子に対する shRNA を作製し、ノックダウン HepG2/NTCP 細胞を樹立した。1.28 倍長のプラスミドを導入した系や、HBV の感染の系により、HBV を負に制御する因子として SRPK1 が同定された。SRPK1 のノックアウト HepG2 細胞を樹立したところ、HBV の高い複製効率が確認された。

D. 考察

本研究により、HBV の感染性に関与する宿主因子が同定された。LRPPRC は HBV の Pregenomic RNA が核外に輸送されるのに重要な因子であることがこれまでの結果から示唆される。今後は、ノックアウト細胞による解析に加え、LRPPRC の発現に影響する薬剤や分子を同定する。また、HBV 感染における SRPK1 の役割もさらに明らかにし、LRPPRC と同様に、発現や活性に影響する分子を同定する。

E. 結論

プロテオミクス法により、HBV 感染に関与する分子として LRPPRC および SRPK1 を同定することができた。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1. [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 α -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

2. 学会発表

1. [Takasuke Fukuhara](#), Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, [Takasuke Fukuhara](#), Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, [Takasuke Fukuhara](#), Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. [Takasuke Fukuhara](#), Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし