

Biochem Biophys Res Commun. 2014 May 23;448(1):56-62.

8. Tsunamasa Watanabe, Hiroto Hatakeyama, Chiho Matsuda-Yasui, Yusuke Sato, Masayuki Sudoh, Asako Takagi, Yuichi Hirata, Takahiro Ohtsuki, Masaaki Arai, Kazuaki Inoue, Hideyoshi Harashima and Michinori Kohara. *In vivo* therapeutic potential of Dicer-hunting siRNAs targeting infectious hepatitis C virus. *Scientific Reports* 2014 Apr 23;4:4750.

9. Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Masahiro Kitabatake, Toru Nishiwaki, Hideki Fujii, Chise Tateno, Misako Yoneda, Kouichi Morita, Kouji Matsushima, Shigeo Koyasu, Chieko Kai. Phagocytic cells contribute to the antibody-mediated elimination of pulmonary-infected SARS coronavirus. *Virology* 454-455:157-68. (2014).

10. Sayeh Ezzikouri, Makoto Ozawa, Michinori Kohara, Naima Elmdaghri, Soumaya Benjelloun, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Recent Insights into Hepatitis B Virus-Host Interactions. *J. Med. Virology* 86(6):925-32. doi: 10.1002/jmv.23916. Epub 2014 Mar 6. (2014).

11. Yuri Kasama, Takuo Mizukami, Hideki Kusunoki, Jan Peveling-Oberhag, Yasumasa Nishito, Makoto Ozawa, Michinori Kohara Toshiaki Mizuochi, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF-kB signaling. *PLoS ONE* 9(3):e91373. doi: 10.1371/journal.pone.0091373. eCollection 2014. (2014).

12. Haru Ogiwara, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Asako Takagi-Kamiya, Tsubasa Munakata, Namiko Nomura, Futoshi Shibasaki, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida and Michinori Kohara. Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. *The American Journal of Pathology* 184(1):171-83 (2014).

2. 学会発表

1. 徳永優子、小原道法、須藤正幸: Non-DAA

セリンパルミトイル基転移酵素阻害剤とDAA併用による薬剤耐性株の出現を押さえた強力なHCV複製阻害 第50回日本肝臓学会総会 2014.5.29 (東京)

2. 小原道法: 「免疫の賦活化によるウイルス性肝炎治療及び肝線維症治療に向けて」 第9回高輪ウイルス肝炎フォーラム 2014.6.14 (東京) (招待講演)

3. 藤幸知子、堀江 亮、米田美佐子、倉石武、安井文彦、宗片圭祐、池田房子、基礎友里、権賢 貞、石井美穂、佐藤宏樹、服部正策、喜田 宏、小原道法、甲斐知恵: 霊長類感染モデルを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原発現組換え麻疹ウイルスの防御効果の解析 第61回日本実験動物学会 2014.5.15-5.17 (札幌)

4. Takahiro Sanada, Kyoko Tsukiyama-Kohara, S Ezzikouri, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara : Development of Tupaia Belangeri for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomic research. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)

5. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kuraishi, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Shosaku Hattori, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Chieko Kai.: Attenuated recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen is protective against HPAIV challenge in cynomolgus monkeys. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)

6. Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara, Yuri Kasama : Comprehensive analysis of B-lymphoma cells spontaneously developed in transgenic mice that express the full hepatitis C virus genome in B cells. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)

7. Takahiro Sanada, Kyoko Tsukiyama-Kohara, S Ezzikouri, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara : HBV Pathogenesis and host response in *Tupaia belangeri*. 2014 International

- Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 2014.9.3-6 Los Angeles (USA)
- 8.Masaaki Arai, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asako Takagi, Yoshimi Tobita, Kazuaki Inoue, Michinori Kohara : Resistance to cyclosporine S derives from mutations in Hepatitis C virus nonstructural proteins. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Virus 2014.9.7-11 Banff(Canada)
- 9.Yuko Tokunaga, Kiminori Kimura, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Mitsuko Hara, Keisuke Munekata, Tsunekazu Hishima, Soichi Kojima, Michinori Kohara. : Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Virus 2014.9.7-11 Banff(Canada)
- 10.Tubasa Munakata, Makoto Inada, Yuko Tokunaga, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Akio Nomoto : Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Virus 2014.9.7-11 Banff(Canada)
- 11.Sayeh Ezzikouri, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara: Inhibitory effects of pycnogenol on Hepatitis C Virus replication. 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-27 パシフィコ横浜
- 12.Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Yasushi Itoh, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Prophylatic effect of H5N1 influenza vaccine based on attenuated replicative vaccinia virus that contains endogenous adjuvant component. KeystoneSymposia (The Modes of Action of Vaccine Adjuvants (S1)) 2014.10.8-13 Seattle (USA)
- 13.Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Yasushi Itoh, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Prophylatic effect of H5N1 influenza vaccine based on vaccinia virus vector in cynomolgus monkeys. 8th Vaccine & ISV Congress 2014.10.26-28 Philadelphia (USA)
- 14.安井文彦、宗方圭祐、倉石 武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田 宏、甲斐智恵子、小原道法:H5N1高病原性鳥インフルエンザ組換えワクシニアワクチン単回接種による免疫長期持続作用機序の解析 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜
- 15.棟方 翼、徳永優子、真田崇弘、脇田隆字、野本明男、小原道法:C型肝炎ウイルス感染時にTLR3はIFN非依存的に発現して抗ウイルス作用を示す 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜
- 16.斉藤 誠、安井文彦、棟方 翼、飛田良美、小澤 真、小原恭子、伊東利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田規一、小原道法:亜型を超えた感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜
- 17.徳永優子、木村公則、大槻貴博、林 幸子、原 祥子、宗方圭祐、比島恒和、小路弘行、小嶋聡一、小原道法:選択的Wnt/ β -catenin/CBPシグナル阻害剤による肝線維症改善作用 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜
- 18.Seyeh Ezzikouri、池 海英、真田崇弘、永野希織、山口千穂、神田雄大、金沢伯弘、奥谷公亮、上野晃聖、中川寛子、Chimene Nze NKOGUE、三好宣彰、小澤 真、Soumaya Benjelloum、村上周子、田中靖人、小原道法、小原恭子:Development of Tupaia belangeri fpr HBV persistent infection. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜
- 19.菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄:Anti-

CCR4抗体はTregと感染細胞を同時に標的にする事で、STLV-1自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜

20.Michinori Kohara, Yuko Tokunaga, Tsubasa Munakata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masayuki Sudoh : A Serine

palmitoyltransferase inhibitor inhibits hepatitis C virus replication in human hepatocytes. 第37回日本分子生物学会 2014.11.25-27 パシフィコ横浜

21.安井文彦、伊藤 靖、池尻 藍、北嶋正大、宗方圭祐、迫田義博、喜田 宏、坂口薫雄、小笠原一誠、小原道法:H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス感染に対する哺乳動物宿主の免疫応答とインフルエンザ組換え生ワクチン接種による発症防御 第18回日本ワクチン学会学術集会 2014.12.6-7 福岡国際会議場

22.Ai Ikejiri, Fumihiko Yasui, Yasushi Itoh, Masahiro Kitabatake, Nobuo Sakaguchi, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara :

Highly pathogenic avian influenza A H5N1 virus causes severe symptoms due to insufficient induction of humoral immune response. 第43回日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12.京都国際会館

23.Kiminori Kimura, Takahiro Otsuki, Yuko Tokunaga, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara : Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the hepatitis C virus suppresses viral protein level in mouse liver. 第5回発がんスパイラル国際シンポジウム 2015.2.26-27 神戸ポートピアホテル

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

HBV高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析

研究分担者 保富 康宏（独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター長）

研究協力者 高野淳一郎（独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター・研究員）

塩釜ゆみ子（独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター・特任研究員）

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は難治性の疾患であり、有効な治療法も現在のところ確立されていない。HBVのこれらの問題を解決するためには適切な動物モデルの存在が必要であり、現時点ではヒト肝細胞を持つ免疫不全マウスが唯一のモデルとして用いられている。HBV感染症のような長期にわたる疾患においては宿主の免疫系が病態や予後を知るうえで重要であるが、マウスモデルではこれら免疫系の解析には不適である。本研究ではHBVの持続感染を示すことが報告されているツパイ (*Tupaia belangeri*) を用いてHBVの感染動態や病態についての解析を行うことを目的に、HBV高感受性ツパイコロニーの作製とその個体における免疫学的な解析を行うことを目的として、ツパイの繁殖・育成方法の検討とHBV感染実験を行った。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっている。HBVはヒトと類人猿以外では、ヒト肝細胞キメラマウスでの感染系が知られているが、キメラマウスにおいては機能的な免疫機能が存在しないために、ヒトでの感染を示しているとは考えられない。本研究では、作製したHBV分子クローンもしくはHBV感染ヒト肝細胞キメラマウスの血清を用いて、ヒトと類人猿以外で唯一HBVに自然状態で感受性があり、機能的な免疫系を保持したままでHBV感染を示すツパイ (*Tupaia belangeri*) でのHBV持続感染モデルの確立を目標とする。また、ヒトの場合、HBVが垂直感染を起こすため、ツ

パイにおいても垂直感染が成立するHBV持続感染ツパイ系統の作出も試みる。本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発へ道を開き、国民の健康増進につながると共に、肝障害の低下に伴う医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考える。

B. 研究方法

(1) 繁殖・育成

出産予定日のある程度予測する必要性と雄から雌への攻撃の可能性を少なくするため、交配時の雌雄同居は5日間とした。妊娠期間が42～45日であるが、妊娠の確認については、体重の増加と目視による体型の変化の確認により行った。分娩後は仔ツ

パイの体重を毎日測定すると共に、授乳状況によって人工哺育を行っている。

(2) HBV 感染実験

接種するウイルス株は肝細胞キメラマウス血清で高い力価を持つ Genotype A のウイルス株を用いた。生後 24 時間以内及び生後 3 日目の仔ツパイの腹腔内もしくは皮下へ 1×10^7 コピー/ $100 \mu\text{L}$ のウイルスを接種した。接種後、定期的に採血を行い、血清は使用するまで -80°C で保管した。

血中ウイルス量の定量は S 遺伝子に設計された Taqman PCR によって実施した。

(3) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種したウイルス株から得られた HBV DNA をクローニングした。48 クローンの全長 DNA 配列を決定し、得られたコンセンサス配列を基にして PCR 法によって、2 種類の断片のクローンを作製した後に、pUC19 ベクターに同時にライゲーションし、HBV ゲノム全長の 1.24 倍長の分子クローンを作製した。分子クローンを Huh-7 にトランスフェクションし、培養上清から HBV を精製し感染実験に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) 繁殖・育成

昨年に中国より輸入した個体を F0 として交配を行い F1 の作出を試みた。これまでの出生数は 152 頭で、そのうち 83 頭が離乳まで育成された。育成中の死因の多く

は生後 3 日以内の衰弱死で、出産確認時には死亡している個体が多い。

F1 の一部個体が性成熟まで育成できたため、F2 の作出も試みているが、現在までに離乳までは至っていない。

(2) HBV 感染実験

これまでにウイルスを接種した個体は 54 頭で、12 週齢を過ぎた個体では、血中にウイルスが検出された。経時的な採血による各個体でのウイルス検出の持続性については、38 頭で 2 回以上ウイルスゲノムが検出されており、最も多く検出された個体では 9 回検出できた (表 1)。また、これらの個体で検出された血中ウイルス量の最高値は 1.6×10^5 コピー/mL で、検出された血中ウイルス量の平均は 2.2×10^3 コピー/mL であった。

(3) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種しているウイルス株の全長配列から得られたコンセンサス配列を基に、1.24 倍長の HBV 分子クローンを作製できた。Huh-7 細胞株にトランスフェクションを行い、産生された HBV を含む培養上清を 5 頭の仔ツパイに接種した。これら 5 頭中 3 頭からウイルスが検出され、血中ウイルス量の平均は 8.5×10^1 コピー/mL であった (表 2)。

D. 考察

免疫機能を有したまま唯一 HBV 感染モデルと成りえるツパイであるが、実験動物としては確立されていない状態である。本研究では、安定的にツパイを飼育管理・繁殖・育成方法について良好な結果が得られたことにより、安定的にツパイでの研究が

推進可能となった。また、これまでに 32 頭が他の研究班員の実験に供与された。

HBV 感染実験では血中から高頻度でウイルスゲノムが検出されている個体も確認できている。これらの F1 個体から F2 個体の作出も試みており、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立が大きく期待できる。

遺伝子配列の明らかな分子クローンを用いた感染実験においても、例数が少なく解析途中ではあるが血中にウイルスゲノムが検出された。HBV 感染キメラマウス血清を接種した場合と比較するとウイルス量が少ない傾向があるため、精製方法や濃縮方法に改善が必要である。

E. 結論

HBV に対して自然免疫を維持したまま感受性を持つツパイを研究に使用するためのコロニー作製の基本となる、飼育管理・繁殖・育成方法の確立について、良好な結果が得られた。また、高頻度でウイルスゲノムが検出されている個体も確認され、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立に向けて大きく期待できることとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park E.J., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub

2. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GA β generation in nonhuman primates *PLoS One in press*

3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y., Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen J. *Immunol.* 2015 *in press*

4. Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014;32:1727-1735.

5. Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111:3086-3091.

6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. *PLoS One* 2014;9: E-pub

7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. *Mol Ther. Nucleic Acids* 2014:E-pub

8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y., Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J.Am.Heart Assoc.* 2014 E-pub

9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y, Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. *Parasitol. Int.* 2014 E-pub

2. 2014年11月13日

特許出願 : 特願 2014-229283

発明の名称 : C型肝炎の治療及び/又は予防用医薬組成物

2. 学会発表

1. 加藤 誠一、岡村 智崇、張 險峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第62回 日本ウイルス学会学術集会

2014年11月10日～12日パシフィコ横浜 会議センター

2. Tsujimura Yusuke, Yasutomi

Yasuhiro: Suppressive effect of *Mycobacteria major* secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with RIG-I. 第43回日本免疫学会総会

2014年12月10日～12月12日、京都国際会議場

3. 藤城 (伊藤) 康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英: 再生医療評価系としてのカニクイザルMSCを用いた細胞標識の解析。第61回日本実験動物学会学術総会。2014年5月15-17日。北海道, 札幌市

4. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏: 新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第157回 日本獣医学会学術集会 平成26年9月9日～9月12日 北海道、札幌

5. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏: C型肝炎ウイルスに対するDNAワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第18回 日本ワクチン学会学術集会 平成26年12月6日～12月7日 福岡国際会議場

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 2014年11月6日

「NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

ツパイ免疫学的解析系の確立、感染・発症評価系の改良、効率の良いHBV-ツパイ
感染実験モデルの確立

研究分担者 小原 恭子 鹿児島大学共同獣医学部 教授

研究要旨：これまでにツパイの飼育、繁殖法を確立し、150匹の産子を得た（平成26年12月現在）。繁殖に用いた♀は15匹であるが、全ての♀が出産し、平均産子数は3.7匹であった。また、HBV遺伝子型C, J, A2, D3, D7 Eを新生児に接種したが、全ての遺伝子型に感染感受性を示した。HBVの接種法は皮下が効率が良く、遺伝子型A2やJを接種した複数個体で持続感染成立が見られた。また、ツパイ個体の中でも、HBV感染がより効率良く成立するものがある事が明らかとなり、今後HBV感受性系統として増やす予定である。また、新生児にHBVを感染させた場合、半数(6/12)の母親が感染した。さらに、交配した♂9匹のうち、6匹が♀から感染した。この様に、ツパイにおいて、HBVの水平感染や性的接触による感染が成立する事も明らかとなった。今後はワクチン接種実験等を行い、評価系として確立していく。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の動物感染モデルはチンパンジーのみであり、感染実験はヒト肝臓キメラマウスで行われているが、免疫系が不全であり、その反応を研究する事が困難である。免疫反応が完全なツパイがこれらに変わる動物実験モデルとなれば、ワクチン開発や創薬において極めて強力なツールとなる。本研究では、ヒトに近いゲノム情報を持つツパイをB型肝炎の実験動物として樹立しており、HBVの基礎研究に加え、新規治療薬やワクチン、診断薬の開発に大きく貢献すると期待される。

B. 研究方法

ツパイの繁殖には♀15匹、♂10匹を使用した。♀は15匹全頭出産できたが、♂は10頭中8匹であった。

FACSの解析機器はFACSVerse™(Becton Dickinson)を導入した。

新生児へのHBV接種は、生後0日目に $10^6 \sim 2 \times 10^7$ のHBV, genotype A2, C, J, D3, D7の腹腔内と皮下接種を行った。また、一部の個体ではHBVの追加接種を行った。生後4週目から各個体0.5mL採血を行ってウイルス量とALT値の測定をした。HBV量の測定は定量PCRで、ALTは測定キット（和光）を用いた。その後2週間隔で測定を継続している。

(倫理面への配慮)

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(H16.12.28)、組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針(H14.1.31)に基づき、実施する。遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、鹿児島大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会(H25年 月;承認番号25010 B型肝炎ウイルスの感染性クローンの作出とORF遺伝子の発現)の承認並びに大臣確認(H25年12月17日25受文科振第2170号;遺伝子組換えB型肝炎ウイルスの感染性クローンの作出と実験動物感染)を得ている。動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(H18.6.1)に従う。

C. 研究結果

ツパイの飼育や交配の方法も確立し、系統を選ぶ事で食殺を防ぐ事も可能となった。新生児はこれまでに、150匹得られている(平均算子数 $3.7+/-0.7$)。次に、HBVの持続感染系を樹立するために、新生児に対してHBVの感染を行った。HBVの感染経路は腹腔内や静脈内、皮下等の経路を検討し、皮下接種が最も効率良くウイルス感染を成立させる事が明らかとなった。また、各種HBV株、A2, C, D3, D7, J株を新生児に接種して検討したところ、いずれのウイルス株も感染を成立したが、持続感染の成立が見られたのは、A2とJ株であった。また、ツパイの系統の中でHBV感染感受性に違いが見られ、ウイルス感染に高感受性を示す産子を提供できるツパイのペアを選

抜した。また、実験の過程で、新生児にHBVを接種したにも関わらず母獣への感染が50%で認められた。また、感染した母獣から、父獣への感染も67%で見られた。これらの結果から、ツパイ感染系でHBVの水平感染や性的接触による感染が生じる事が明らかとなり、今後感染経路の解析研究モデルとしても有用と考えられた。

D. 考察

ツパイの妊娠期間は40日程度であり、離乳までの期間が60日程度である。年間3-4回の繁殖が可能である。これから計算すると、1匹あたり、年間10-15匹の産子が得られる。調べた全てのHBV株に感染感受性を示したが、持続感染を成立させるためには、A2かJ株の皮下接種が良いと考えられた。また、ツパイのHBV感染感受性系統を今後確立していく必要がある。さらに、ツパイ新生児感染実験から、母親や父親に水平感染が成立し、感染経路の解析にも使用できる可能性が明らかとなった。

E. 結論

ツパイの飼育法も確立し、持続感染を成立できるHBVの株はA2やJである事が明らかとなった。また、接種法は皮下が良い事も明らかとなった。HBV感染に感受性が良い個体も存在し、これらを系統化する事で、より良い評価系の確立が可能となった。今後は、この様なツパイHBV持続感染系を用いたワクチンや薬剤候補物質の評価を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ezzikouri S, Nishimura T, Kohara M, Benjelloun S, Kino Y, Inoue K, Matsumori A, Tsukiyama-Kohara K*. Inhibitory Effects of Pycnogenol® on Hepatitis C Virus Replication. *Antiviral Research* 113C 93-102, 2015.
- 2) Tsukiyama-Kohara K*, Kohara M*. *Tupaia belangeri* as an Experimental Animal Model for Viral Infection. *Experimental Animal* Oct 30; 63(4):367-74, 2014.
- 3) Zare-Bidaki M1, Tsukiyama-Kohara K, Kazemi Arababadi M*. Toll-like receptor 4 and hepatitis B infection: molecular mechanisms and pathogenesis. *Viral Immunology* Sep;27(7):321-6, 2014.
- 4) Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M*. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* May 23;448(1):56-62, 2014.
- 5) Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K*. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Medical Virology* Jun;86(6):925-32, 2014.

2. 学会発表

- 1) Tsukiyama-Kohara K and Kohara M. A comprehensive study of B-lymphoma cells spontaneously developed in transgenic mice that express the full hepatitis C virus genome in B cells. 第37回日本分子生物学会 2014年11月

2) Kohara M, Tokunaga Y, Tsukiyama-Kohara K, Sudoh M. Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. 第37回日本分子生物学会 2014年11月

3) Ezzikouri, S., Chi, H.Y., Sanada, T., Nagano, K., Yamaguchi, C., Kanda, T., Kanazawa, N., Okuya, K., Ueno, K., Nakagawa, H., Nkogue, C.N., Ozawa, M., Miyoshi, N., Benjelloun, S., Murakami, S., Tanaka, Y., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. Development of *Tupaia belangeri* for HBV persistent infection. 第62回日本ウイルス学会2014年11月

4) Sayeh E, Kohara M, Kohara K, Inhibitory Effects of Pycnogenol on Hepatitis C Virus Replication. 第73回日本癌学会, 2014年9月(神奈川).

5) Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M, Resistance to cyclosporin A derives from mutations in Hepatitis C virus nonstructural proteins, HCV2014, 2014年9月(カナダ).

6) Sanada T, Yamamoto N, Tsukiyama-Kohara K, Ezzikouri S, Tateno C, Kohara M, HBV pathogenesis and host response in *Tupaia belangeri*, 2014 HBV international Meeting, 2014年9月(アメリカ).

7) Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, and Kasama Y, Comprehensive analysis of B-lymphoma cells spontaneously developed in transgenic mice that express the full hepatitis C virus genome in B cells, 第16回国際ウイルス学会(ICV2014), 2014年7月(カナダ).

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価

研究分担者 石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトプロジェクトリーダー

研究要旨: 世界中で新規ワクチンの開発研究が行われているが、未だ感染症の根絶に資する手法は確立されていない。現在は、より効果的で安全なワクチン開発のために新規アジュバントの開発研究が活発に行われている。実際に、国内で認可され使用されているアジュバントの種類は少なく、作用機序にも不明な点が多く残されているため、安全性が懸念されている。Toll様受容体9 (TLR9)の合成リガンドであるCpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN)は強力なアジュバントとして働く事が知られており、実際に様々な感染症に対する臨床試験が行われている。昨年、我々は核酸であるCpG ODN (K3)と多糖であるβグルカン (SPG)を用いた新規ナノ粒子型アジュバントK3-SPGの開発に成功した。さらに我々はK3-SPGが強力なアジュバントとして働く事をマウスとサルを用いた実験によって明らかとし、従来のCpG ODNに比べヒト細胞においても、強力に自然免疫応答を誘導する事を示した。本年度は、K3-SPGを含むTLR9リガンドのツパイへの有用性を検討するために、in vitroとin vivoでの評価を行った。

A. 研究目的

現在、効果的で安全性の高い新たなワクチン開発のために、世界中で新規アジュバントの開発が進められている。実際に、いくつかのアジュバントは臨床試験が進んでいる。本研究では、我々がこれまでに開発研究を行って来た CpG ODN アジュバントを用いて新規 B 型肝炎ワクチンへの応用とワクチンの開発を目的とする。

B. 研究方法

ツパイでの TLR9 リガンドの効果を評価するために、ツパイから脾臓を摘出し脾細胞を調整後、ヒト型、マウス型の CpG ODN

および我々が昨年開発に成功したナノ粒子型 TLR9 リガンドである K3-SPG で刺激を行った。6 時間後に RNA を回収し自然免疫活性化能を real time PCR 法で解析した。TLR9 リガンドのアジュバント活性を検討するために、ツパイにモデル抗原であるオバルブミン単独またはヒト型、マウス型の CpG ODN および K3-SPG をアジュバントとして共に免疫し、その後の獲得免疫応答(体液性免疫、細胞性免疫応答)を評価した。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所動物実験委員会規程に基づき飼育され、日

本動物学会が定めた、苦痛の軽減等に配慮した指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

ツパイ脾細胞を TLR9 のリガンドである CpG ODN で刺激を行い、サイトカインの mRNA レベルを検討した結果、ヒト型 CpG ODN である D35 や K3-SPG 刺激時に、I 型インターフェロンである IFN- α や IFN- β の mRNA レベルの上昇が確認された。マウス型の CpG ODN ではほとんど I 型インターフェロンの mRNA に変化が見られなかった。

IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインに関しては、ヒト型、マウス型 CpG ODN 共に強く誘導するが、大きな差は確認出来なかった。

実際に、ツパイにおけるアジュバント効果を検討したところ、モデル抗原であるオバルブミンのみの投与で、抗原特異的抗体が誘導された。抗原と CpG ODN アジュバントを投与した群においても、抗原のみの群に比べ、有意な抗原特異的抗体の誘導が確認出来ず、また異なるアジュバントによる差も確認出来なかった。抗原特異的細胞性免疫応答を評価するために、免疫後のツパイから脾臓を摘出し、脾細胞を調整後、抗原であるオバルブミンで処理し、6 時間後の IFN- γ の mRNA レベルを測定した。その結果、抗原のみの群と比較し、ヒト型 CpG ODN をアジュバントとして投与した群において、強力に IFN- γ の mRNA が誘導されている事が確認された。

D. 考察

本研究ではこれまでに開発研究を行って

きた CpG ODN のツパイにおける有用性を検討した。実際に、ツパイにおいて TLR9 リガンドが自然免疫応答を活性化する事が脾細胞を用いた実験により示す事ができた。しかしながら、ヒト型、マウス型どちらの CpG ODN に対しても自然免疫応答を活性化したため、種差による大きな違いは確認出来なかった。

さらに、*in vivo* における CpG ODN のアジュバント効果は細胞性免疫応答においては確認できたが、体液性免疫（抗原特異的抗体）においては、抗原単独投与時に比べ変化はなかった。

今後は、抗原をモデル抗原であるオバルブミンから他の抗原（B 型肝炎ウイルス抗原など）に変える事で、TLR9 リガンドの効果を検討して行く必要がある。また、刺激を短時間での評価しか行えていないため、CpG ODN 処理後 24 時間後などの自然免疫応答なども詳細に解析する必要がある。

E. 結論

今回の研究により、TLR9 リガンドのツパイにおける有用性を示す事ができた。しかしながら、アルミニウム塩など他のアジュバントとの比較は行えていないため、TLR9 リガンドの優位性を示す事はできなかった。さらには、*in vivo* においてはモデル抗原でのみ実験を行った事から今後は B 型肝炎ワクチン開発のためにも、ワクチン抗原を用いながら有効なアジュバントを選定する事が重要である。また、さらに有用なアジュバントのスクリーニングも重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khatoo M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *J Biol Chem*. 2015 Jan 26. pii: jbc.M115.636365. [Epub ahead of print]
- 2) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jonai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur J Immunol*. 2014 Dec 22. doi: 10.1002/eji.201445132. [Epub ahead of print]
- 3) Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1064-9.
- 4) Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 Sep 29;32(43):5607-13.
- 5) Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine*. 2014 Sep 15;32(41):5295-300.
- 6) Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhata K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014 Jul 10;9(7):e101835.
- 7) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8+ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *Biomed Res Int*. 2014;2014:158128.
- 8) Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, Aoshi T, Matsumoto Y, Ishii KJ, Egwang TG, Druilhe P, Horii T. Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *LoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98460.
- 9) Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal

- pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014 May 14;15(5):551-63.
- 10) Onishi M, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Coban C, Ishii KJ. Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. *Vaccine*. 2014 May 23;32(25):3004-9.
 - 11) Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat Commun*. 2014 Apr 10;5:3566.
 - 12) Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, Croxford JL, Koo CX, Ishii KJ, Akira S, Raulet DH, Gasser S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res*. 2014 Apr 15;74(8):2193-203.
- ## 2. 学会発表
- 1) Kuroda E, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
 - 2) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvanticity. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
 - 3) Kobiyama K, Ishii KJ. Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvanticity in immunogenicity of DNA vaccine. 2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA. Jul 21-23, 2014.
 - 4) Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ. Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
 - 5) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
 - 6) Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ. AdvaxTM, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
 - 7) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action

of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.

- 8) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. Antigen free systemic monotherapy by nanoparticulate TLR9 agonist induces CTL responses for the tumor regression. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 9) Kuroda E, Ozasa K, Kobiyama K, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 10) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine adjuvant. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 11) Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN production. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

招待講演

- 1) 2014年4月27~30日 23th.National Congress of Immunology 「Good and Bad Inflammation During Vaccination」
- 2) 2014年5月14日 熊本大学 最先端研究セミナー (リエゾンラボ研究会) 「Adjuvant Innovation for influenza and cancer vaccination」
- 3) 2014年6月1日 第40回神戸薬科大学卒業研修講座 「ワクチン開発研究の最前

線 安全安心なワクチンを目指して」

- 4) 2014年7月2日~4日 第41回日本毒性学会学術年会 教育講座 座長「がんワクチン開発の現状と課題」シンポジウム 座長「ワクチンの安全性評価」
- 5) 2014年7月11日 京都府立医科大学 特別講義「ワクチン、アジュバントの基礎と臨床：細胞死とマクロファージの役割」
- 6) 2014年8月25日~26日 第2回免疫記憶ーワクチン国際研究会シンポジウム 「Innovation and renovation of vaccine adjuvant」
- 7) 2014年9月11日~12日 第21回日本免疫毒性学会学術年会 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」
- 8) 2014年9月18日 日本生物科学研究所 第二研究会「アジュバント開発研究の最前線“免疫の種差と動物ワクチン”」
- 9) 2014年9月25~26日 第73回日本癌学会学術総会「次世代アジュバントの開発研究」
- 10) 2014年10月8日~13日 Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. 「Nucleic Acids as "Built-in" or "Inducible" Adjuvant during Vaccination」
- 11) 2014年10月16日 「医薬品等区分」俯瞰に関するワークショップ「次世代ワクチン<アジュバント>」
- 12) 2014年10月18日 第87回日本生化学会大会 「RNA Polymerase-IIIは細胞質の

RNA:DNAハイブリッドと細胞内
miRNA発現を制御する」

- 13) 2014年10月18日～19日 第46回日本小
児感染症学会総会・学術集会「過去の
歴史から学ぶこれからのワクチン開発
と戦略」
- 14) 2014年10月20日～21日 The 1st
International Symposium on Mucosal
Immunity and Vaccine Development 2014
(東京大学) 「Nucleic acids as ‘built-in’
or ‘inducible’ adjuvant during
vaccination」
- 15) 2014年11月6～7日 The 2014 Fall
Conference of The Korean Association of
Immunologists 「New mechanism of action
and potential biomarkers for vaccine
adjuvant」
- 16) 2014年11月10日～12日 第62回日本ウ
イルス学会学術集会シンポジウム「次
世代のワクチン開発～Next generation
vaccine development」 「New mechanism
of action and potential biomarkers for
vaccine adjuvant」
- 17) 2014年12月4日～5日 第12回日本糖鎖
科学コンソーシアム (JCGG) シンポジ
ウム「新規アジュバント開発に向け
て」
- 18) 2014年12月4日～5日 第27回日本バイ
オセラピー学会学術集会「がん免疫療
法に資する核酸医薬を基盤としたアジ
ュバントの開発」

19) 2015年2月3日 琉球大学 講義「アジ
ュバント開発研究の新展開：安全でよ
く効くワクチンを目指して」

20) 2015年3月25日～28日 日本薬学会 第
135年会「アジュバント開発研究の最前
線：データベースを駆使した安全性、
有効性のバイオマーカー」

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特願 2013-196206, PCT/JP2014/074835
「免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチ
ド含有複合体及びその用途」平成 26 年 9
月 19 日、石井 健・小檜山 康司・青枝 大
貴・武下 文彦・粕谷 祐司・丹羽 貴子・
小泉 誠、独立行政法人医薬基盤研究所・
第一三共株式会社

PCT/JP2014/084772 「免疫賦活活性を有
する核酸多糖複合体の抗腫瘍薬としての応
用」平成 26 年 12 月 26 日、石井 健・青枝
大貴・小檜山 康司、独立行政法人医薬基
盤研究所

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

ツパイ小動物モデルを用いたHBV感染時の自然免疫応答の解析

研究分担者 押海裕之、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス (HBV) はマウスには感染しない。これまでHBVの宿主としてはヒトやチンパンジーの他、ツパイに感染することが知られている。自然免疫応答はウイルスの抑制に非常に重要である一方で、多くのウイルスはこの宿主自然免疫応答を抑制することで感染を成立させる。そこで、ツパイ動物モデルを用い、HBV感染時の自然免疫応答とウイルスによるその抑制機構を解明することで、新たな治療法開発の基礎データを収集することを目的として実験を実施した。まず、我々は、ヒトとマウス細胞ではHBVのDNAに対する自然免疫応答が異なることを示し、マウス動物モデルで得られて結果は、ヒトの自然免疫応答を理解するうえでは十分はないことが示唆された。そこで、ツパイ個体へのHBV感染実験を行い、ツパイ感染時には肝臓でのDDX60分子の発現が上昇することを発見すると同時に、このDDX60の活性制御機構を解明した。また、HBVのタンパク質がDDX60と結合するRIG-I分子の翻訳後修飾を阻害することを発見したことから、今後、HBVタンパク質によるRIG-Iの抑制を阻害する薬剤やDDX60の活性化を制御する薬剤がB型肝炎の治療に使えるかをツパイ動物モデルを用いて検証する。

A. 研究目的

自然免疫応答はウイルスの排除に重要である一方で、多くのウイルスはこの宿主の自然免疫応答を抑制することで感染を成立させる。B型肝炎ウイルス (HBV) の感染小動物モデルとしてのツパイを用いることで、HBV感染時の自然免疫応答機構を解明し、またHBVによる宿主自然免疫を抑制するメカニズムを解明し、B型肝炎に対する新たな治療法確立の基礎をつくることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト、マウス、ツパイの培養細胞を用い、

HBVのDNAに対する自然免疫応答を、サイトカインの産生やタンパク質の細胞内局在を指標に調べた。また、HBVに感染させたツパイ個体の各臓器からRNAを抽出しサイトカインの発現を調べた。肝臓由来の細胞株を用い、HBVのタンパク質を試験管内で発現させ、HBVタンパク質による自然免疫抑制機構を調べた

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトサンプルは使用していない。動物実験に於いては動物愛護上の配慮を行い実験計画は学内の機関により承認されている。

C. 研究結果

ウイルス由来の DNA 認識経路はヒトとマウスの細胞では異なることを、TBK1 タンパク質のリン酸化を指標に解明した。

ツパイ動物モデルから、HBV 感染時には肝臓で DDX60 分子の発現上昇が観察された。この DDX60 分子は、I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生に必要であることを、動物モデルをもちい明らかにした。

また、HBV のタンパク質が DDX60 と共にはたらく RIG-I タンパク質の翻訳後修飾としてのポリユビキチン化を阻害する分子機構を解明した。

一方で、HBV は宿主の自然免疫応答を抑制する能力を有する。我々は、RIG-I の活性化を抑制する HBV タンパク質の機能部位を同定し、これが、RIG-I の翻訳後修飾を阻害することを解明した。

D. 考察

ヒトやマウスの培養細胞を用いた解析から、ウイルス DNA に対する自然免疫応答は、ヒトとマウスの細胞では大きく異なっていた。これは、マウス動物モデルで得られた結果をそのままヒトに応用することが出来ないことを意味しており、マウス以外の小動物モデルとしてのツパイの重要性を示唆している。

我々は、HBV のタンパク質による RIG-I タンパク質の翻訳後修飾の阻害をヒト細胞を用いて我々は明らかにしたが、ツパイ個体に対する感染実験でも HBV による宿主の自然免疫応答の抑制が観察されたことから、ヒトと同様のメカニズムによりツパイの自

然免疫応答を抑制していると推測される。

これは、ツパイ動物モデルが HBV 感染のモデルとして非常に優れていることを示唆している。

E. 結論

ヒトやマウスの培養細胞を用いた研究と、ツパイ感染モデル実験から得られて成果から、ツパイ動物モデルがマウス動物モデルと比較して、ヒトへの感染に非常に近い有用なモデル実験系であることが示唆された。

また、HBV による自然免疫応答抑制のメカニズムの一端を解明できたことから、今後この抑制を解除する薬剤の投与が新たな治療法として有用かどうかを検討できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasamatsu J, Azuma M, Oshiumi H, Morioka Y, Okabe M, Ebihara T, Matsumoto M, Seya T. INAM plays a critical role in IFN- γ production by NK cells interacting with polyinosinic-polycytidylic acid-stimulated accessory cells. *J. Immunology* 193: 5199-5207 (2014)
- 2) Leong CR, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, Chayama K, Seya T. A MAVS/TICAM-1-independent interferon-inducing pathway contributes to regulation of hepatitis B virus replication in the mouse hydrodynamic injection model. *J. Innate Immune.* 7: 47-58 (2015)

- 3) Takaki H, Oshiumi H Matsumoto M, Seya T. Dendritic cells subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 53: 329-333 (2014) 無し
- 4) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. J. Immunology 192: 2770-27777 (2014)

2. 学会発表

- 1) 押海裕之 松本美佐子 瀬谷司 ユビキチンによるウイルスRNAセンサーRIG-Iの活性化制御機構 日本生体防御学会 仙台 2014年7月

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他