

- 美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰
立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来の新鮮培養ヒト肝細胞におけるHBVの水平感染第10回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム（2014.7, 広島）
- 9) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C: Characterization and proliferation assessment of hCK19- and hEpCAM-positive cells in bile duct-ligated chimeric mice with humanized livers. 2014 FASEB Summer Research Conference (2014.7, Keystone, CO)
- 10) 内田 宅郎, 平賀 伸彦, 今村 道雄, 柘植 雅貴, 阿部 弘美, 相方 浩, 石田 雄二, 立野 知世, 茶山 一彰: cDNA-uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製および肝炎ウイルス感染. 第18回日本肝臓学会大会 (2014.10, 神戸)
- 11) 平賀伸彦, 今村道雄, 内田宅郎, 柘植雅貴, 阿部弘美, 相方 浩, 石田雄二, 立野知世, 茶山一彰: 超免疫不全 TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス. 第18回日本肝臓学会大会 (2014.10, 神戸)
- 12) Nelson CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K: Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decrease with cell density in primary cultured hepatocytes. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 13) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Murakami K, Chayama K: A novel humanized cDNA-iPA/SCID mouse for the study of HBV and HCV infections. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 14) Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K: A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infection. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 15) DebRoy S, Hiraga N, Imamura M, Canini L, Pohl RT, Persiani S, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Chayama K, Dahari H: HCV kinetics in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 16) Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga N, Canini L, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Dahari H, Chayama K: HBV infection in humanized chimeric mice has multiphasic viral kinetics from inoculation to steady state and an HBV half-life of 1 hr. 65TH AASLD (2014.11, Boston)
- 17) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C: In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®) transplanted using cells from three different donors. 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting (2014.10, San Francisco, CA)
- 18) 土居 茜, 佐能 正剛, 山崎ちひろ, 石田 雄二, 加国雅和, 立野知世, 太田茂: ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた CYP2D6 基質のヒト体内動態予測. 第53回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2014.11, 広島)
- 19) Tateno C: Development of novel chimeric mice with humanized livers and

infected with HBV as hosts. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B-Recent progress in basic and clinical research (2014. 11, Hiroshima)

- 20) 山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、景山豊、岩崎由美子、石田雄二、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞“PXB-cells”の性状解析. 細胞アッセイ研究会シンポジウム (2015. 1, 東京)
- 21) 立野知世: ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物. 第8回ラットリソースリサーチ研究会 (2015. 1, 京都)
- 22) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二、井上薫, 吉田緑: ヒト肝細胞キメラマウス (PXBマウス) における卵胞発育不全. 第31回日本毒性病理学会 (2015. 1, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2012-102814 (H24年4月27日出願中)
「ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータートランスジェニックマウス」、
PCT/JP2013/062806 (H25年4月25日出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

TALEおよびCRISPR/Casを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発

研究分担者 山本 卓 広島大学大学院理学研究科・教授
研究協力者 佐久間哲史 広島大学大学院理学研究科・特任助教

研究要旨

本研究では、B型肝炎ウイルス (HBV) の増殖を抑制するシステムを確立するために、HBV に結合する人工タンパク質 TALE および HBV ゲノムを切断する TALEN および CRISPR システムを設計・合成し、HBV の増殖に対する影響を調べた。その結果、ヌクレアーゼ型およびニッカーゼ型の CRISPR/Cas9 システムによって HBV の増殖を強く抑制する効果が確認された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の共有結合性閉環状型 DNA (cccDNA) は肝細胞の核内に存在し、ウイルス増殖の際の複製中間体として働く。抗ウイルス薬投与後も cccDNA は肝細胞に残存することから、この DNA の完全除去が完全治療につながると考えられる。そこで本研究では、cccDNA を標的として結合あるいは切断する人工制限酵素 TALEN や CRISPR/Cas9 システムを設計・作製し、肝炎ウイルスの増殖を抑制する作用について培養細胞において検討することを目的とする。

B. 研究方法

HBV のコアプロモーター領域の転写調節因子 FTF や HNF4 の結合する TALE タンパク質および HBV のコアタンパク質を切断する人工ヌクレアーゼの TALEN の作製し、HepG2 細胞における HBV の増殖抑制効果について調べた。さらに、HBV のコアタンパク質を標的とする CRISPR/Cas9 システム (ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型、FokI-dCas9 型) を構築し、ヒト培養細胞での活性評価を行った後に、HBV の増殖抑制効果を HepG2 細胞および T23 細胞において調べた。

C. 研究結果

昨年度の結果から TALE タンパク質および TALEN を用いて、HepG2 細胞での HBV の増殖に与える効果が確認できなかったため、本年度は CRISPR/Cas9 システムを用いた抑制効果について HepG2 細胞検討を行った。その結果、ヌクレアーゼ型および Nニッカーゼ型の CRISPR を用いた場合、有意に HBV 量を低下させることが HepG2 細胞において示された。一方、FokI-dCas9 型では、抑制効果を確認す

ることができなかった。

D. 考察

本研究によって CRISPR/Cas システムを用いた HBV の増殖抑制が可能であることが示された。しかしながら、CRISPR/Cas システムには、類似配列へ変異を導入する off-target 作用が知られている。そのため、HBV ゲノム破壊と同時に、細胞のヒトゲノムへの変異導入について調べる必要がある。ニッカーゼ型の CRISPR は、off-target 作用を避けることが知られており、より安全性が高いと予想されるが、この点を off-target の候補配列のシーケンスによって確認する必要がある。

E. 結論

CRISPR/Cas9 システムのヌクレアーゼ型とニッカーゼ型によって HBV の増殖を抑制する効果が確認された。今後は、off-target 作用による細胞のゲノムへの変異導入を解析し、安全性について評価を行うことが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154, 2015
- 2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 5: 5560, 2014

3)Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and Yamamoto T. Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells. *Scientific Reports*, 4: 7125, 2014

4)Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, Yamamoto T and Mori K. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *Journal of Cell Biology*, 206: 347-356, 2014

5)Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4: 5400, 2014

2. 学会発表

1) Yamamoto T, Suzuki K and Sakuma T. Targeted genome editing using Platinum TALENs. 第47回日本発生物学会, 名古屋, 2014

2)山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での標的遺伝子改変. 第10回肝免疫・ウイルスフロンティア, 東京, 2014.

3)Yamamoto T. Genome editing using Platinum TALENs, Technical Symposium. Application of haploid cell lines and innovative genome-editing technologies in cell biology. 第66回日本細胞生物学会, 奈良, 2014

4)山本 卓. ゲノム編集の基本原則と研究の現状. 第87回日本生化学会フォーラム次世代ゲノム編集技術の展開, 京都, 2014

5)山本 卓. ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変, 平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 東京 2014

6)山本 卓. ゲノム編集技術の基本原則と現状. 第6回遺伝子組換え実験安全研修会, 東京, 2014

7)Yamamoto T. Genome editing cultured cells and animals and using TALENs and CRISPR/Cas. The 3rd International Institute for Advanced Studies". Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, Kyoto, 2014

8)山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性. 第12回日本再生歯科医学会学術大会総会教育講演、徳島、2014

9)Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using TALENs. JARI & ISEV Japan 6th Annual meeting, Genome editing makes new RNA world, Hiroshima, 2014

10)佐久間哲史, 中出翔太, 西川綾美, 茶山一彰, 鈴木賢一, 山本 卓. マルチgRNAシステムを用いたCRISPR/Cas9によるゲノム編集, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014

11)Yamamoto T. Genome editing in cultured cells and animals using site-specific nucleases, The 8th meeting of Bone Cartilage Frontier, Tokyo, 2014

12)Yamamoto T. Targeted Genome Editing in Cultured Cells and Animals. Genome Editing

Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research, Niigata, 2015

13)山本 卓. ゲノム編集研究の現状と可能性. 第20回分子複合医薬研究会, 大阪, 2015

H. 知的財産権の出願・登録状況

1)PPRモチーフを利用したDNA結合性タンパク質の設計方法及びその利用、国際出願PCT/JP2014/061329 (平成26年4月22日)

3)DNA結合ドメインを含むポリペプチド、国際出願PCT/JP2014/062518 (平成26年5月9日)

4)核酸挿入用ベクター、国際出願PCT/JP2014/079515 (平成26年10月24日)

次世代シーケンサーを用いたB型肝炎ウイルス感染と宿主因子の解析

研究分担者 田原栄俊 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨

HBVの治療法は、ウイルスによる肝炎および発がんの予防につながることから、革新的な治療法の開発が期待されている。また、肝臓におけるウイルス排除をモニターできるバイオマーカーの開発も同時に重要である。本研究では、マイクロRNAに焦点を当てて、HBVを排除できる画期的な治療法を開発をめざす。また、HBV肝炎組織、同一患者での術前、術後の血清でのマイクロRNAを次世代シーケンスにより解析し、HBV排除の効果を評価できるバイオマーカーの開発を行う。

A. 研究目的

肝炎克服には、HBV排除可能な治療法の確立と、それらの治療効果を検証できるバイオマーカーの開発が必要である。HBV排除の治療戦略として、HBVのウイルス産生を抑制するマイクロRNAあるいは遺伝子を網羅的にスクリーニングし、治療標的の同定をめざす。HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発を目的とする。

B. 研究方法

1. HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの同定
miRBaseに登録された約2500のマイクロRNAをノックダウンできるmiRNAに相補的なLNA核酸ライブラリーを用いて、uPA/scid肝細胞移植マウス由来のHBVを感染させた初代培養細胞を用いて、スクリーニングを実施した。HBs抗原を指標に、ウイルス量が減少するマイクロRNAを検索した。

2. HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発
血清及び組織から、Qiagen miRNeasy kitを用いて精製し、バイオアナライザー2000 (Agilent)にて、精製したRNAの純度を検定し

た。このRNAを用いて、次世代シーケンサーIon PGMで小分子RNAの配列を解析した。配列情報は、CLC bio社 CLC Genomics Workbenchを用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

検体のマイクロRNA解析は、腫瘍組織を用いた体細胞変異の検索であることから「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とはならないが、個人情報保護の観点から、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠したJCOGの「非ゲノム解析研究」ポリシーに従って適切に連結可能匿名化もしくは連結不可能匿名化を行った上で実施する。

C. 研究結果

1. HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの同定

約2500のマイクロRNAをノックダウンできるmiRNAに相補的なLNA核酸ライブラリーを用いて、HBs抗原を指標に、ウイルス量が減少した候補マイクロRNAを同定した。それらのうちあるマイクロRNAは、HBVの肝切除により顕著に減少するマイクロRNAであり、HBVウイルス産生に寄与する可能性が考えられた。

2. HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発

次世代シーケンスの解析により、健常人血清とHBV患者血清で顕著に増減するマイクロRNAを見いだすことができた。未知の小分子RNA画分の配列についても、HBV感染患者と健常人で異なる配列も見いだすことができた。また、非HBV患者とHBV患者における血清中のマイクロRNA配列は、Iso-miRの割合が違うことを見いだした。肝臓に高発現するmiR-122についても、大きく異なっており、HBV感染によるマイクロRNAのプロセッシング異常が起こっていることが示唆された。本年度同定したマイクロRNA-Xは、HBV肝切除により顕著にウイルス量が減少し、肝炎治療のバイオマーカーになる可能性が見いだされた。

D. 考察

1. HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの同定については、同定に成功した候補マイクロRNAについて、異なる細胞培養系またはヒトHBV産生マウスを用いてウイルス産生抑制効果を検証する必要がある。未解析の候補マイクロRNAについても、HBV産生の抑制に直接関与しているかどうか解析を進める必要がある。

2. HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発

今回同定したHBVに特異性の高いマイクロRNAについて、HBVウイルス産生機序との関連についても、今後検討する必要がある。

E. 結論

HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの候補を同定することができた。HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーとして、HBV感染で増減するマイクロRNAバイオマーカーを同定した。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuyama, K., Sun, H., Usuki, S., Sakai, S., Hanamatsu, H., Mioka, T., Kimura, N., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y. & Igarashi, Y. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-beta peptide. *FEBS letters* 589, 84-88 (2015).
2. Shimamoto, A., Yokote, K. & Tahara, H. Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming. *Frontiers in genetics* 6, 10 (2015).
3. Yuyama, K., Sun, H., Sakai, S., Mitsutake, S., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y. & Igarashi, Y. Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* 289, 24488-24498 (2014).
4. Yamasaki, S., Taguchi, Y., Shimamoto, A., Mukasa, H., Tahara, H. & Okamoto, T. Generation of human induced pluripotent stem (Ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF-Beta1 regulation of pluripotency. *PLoS One* 9, e87151 (2014).
5. Shimamoto, A., Kagawa, H., Zensho, K., Sera, Y., Kazuki, Y., Osaki, M., Oshimura, M., Ishigaki, Y., Hamasaki, K., Kodama, Y., Yuasa, S., Fukuda, K., Hirashima, K., Seimiya, H., Koyama, H., Shimizu, T., Takemoto, M., Yokote, K., Goto, M. & Tahara, H. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS One* 9, e112900 (2014).
6. Miyagi, T., Shiotani, B., Miyoshi, R., Yamamoto, T., Oka, T., Umezawa, K., Ochiya, T., Takano, M. & Tahara, H. DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins. *Cancer Sci* 105, 870-874 (2014).
7. Lotvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzas, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M.H., Witwer, K.W. & Thery, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 3, 26913 (2014).
8. Kim, D.K., Lee, J., Kim, S.R., Choi, D.S., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Go, G., Nhung, D., Hong, K., Jang, S.C., Kim, S.H., Park, K.S., Kim, O.Y., Park, H.T., Seo, J.H., Aikawa, E., Baj-Krzyworzeka, M., van Balkom, B.W., Belting, M., Blanc, L., Bond, V., Bongiovanni, A., Borrás, F.E., Buee, L., Buzas, E.I., Cheng, L.,

- Clayton, A., Cocucci, E., Dela Cruz, C.S., Desiderio, D.M., Di Vizio, D., Ekstrom, K., Falcon-Perez, J.M., Gardiner, C., Giebel, B., Greening, D.W., Gross, J.C., Gupta, D., Hendrix, A., Hill, A.F., Hill, M.M., Nolte-t Hoen, E., Hwang, D.W., Inal, J., Jagannadham, M.V., Jayachandran, M., Jee, Y.K., Jorgensen, M., Kim, K.P., Kim, Y.K., Kislinger, T., Lasser, C., Lee, D.S., Lee, H., van Leeuwen, J., Lener, T., Liu, M.L., Lotvall, J., Marcilla, A., Mathivanan, S., Moller, A., Morhayim, J., Mullier, F., Nazarenko, I., Nieuwland, R., Nunes, D.N., Pang, K., Park, J., Patel, T., Pocsfalvi, G., Del Portillo, H., Putz, U., Ramirez, M.I., Rodrigues, M.L., Roh, T.Y., Royo, F., Sahoo, S., Schiffelers, R., Sharma, S., Siljander, P., Simpson, R.J., Soekmadji, C., Stahl, P., Stensballe, A., Stepien, E., Tahara, H., Trummer, A., Valadi, H., Vella, L.J., Wai, S.N., Witwer, K., Yanez-Mo, M., Youn, H., Zeidler, R. & Ghossein, Y.S. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* (2014).
9. Hosoi, T., Inoue, Y., Nakatsu, K., Matsushima, N., Kiyose, N., Shimamoto, A., Tahara, H. & Ozawa, K. TERT attenuated ER stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 378-382 (2014).
10. Hirokawa, T., Shiotani, B., Shimada, M., Murata, K., Johmura, Y., Haruta, M., Tahara, H., Takeyama, H. & Nakanishi, M. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint. *Cancer Res* 74, 3880-3889 (2014).
11. Hirashio, S., Nakashima, A., Doi, S., Anno, K., Aoki, E., Shimamoto, A., Yorioka, N., Kohno, N., Masaki, T. & Tahara, H. Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9, 2117-2122 (2014).
12. Ao, M., Miyauchi, M., Inubushi, T., Kitagawa, M., Furusho, H., Ando, T., Ayuningtyas, N.F., Nagasaki, A., Ishihara, K., Tahara, H., Kozai, K. & Takata, T. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. *PLoS One* 9, e110519 (2014).
- SP6800 Spectral Analyzer, Direct Detection of Exosome by SP6800 Spectral Analyzer, CYTO2014, "Ft. Lauderdale, Florida, USA", 2014年5月19日, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center
3. Hidetoshi Tahara, "Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function", "Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function", International Symposium on Extracellular Vesicles for Biomedical Applications, "Seoul, Korea", 2014年5月29日, "Clinical Lecture Hall 2, Seoul National Children's Hospital"
4. Hidetoshi Tahara, "Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function", "Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function", KSEV2014 (Korean Society for Extracellular Vesicles), "Seoul, Korea", 2014年5月30日, "Ewha Campus Complex, Ewha Womans University, Seoul"
5. 田原 栄俊, "Liquid Biopsy による疾患の診断と核酸医薬の開発の現状", (PMDA 職員研修会), 東京都, 2014年6月17日, 独立行政法人医薬品医療機器総合機構
6. 田原 栄俊, "小さな巨人「マイクロRNA」によるがん診断およびがん治療戦略", NPO 法人国際医科学研究会第8回フォーラム, 東京都, 2014年6月29日, フクラシア東京ステーション
7. 田原 栄俊, "老化誘導型核酸医薬の開発に向けて", 「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 東京都, 2014年8月21日, 学術総合センター
8. 田原 栄俊, "Direct detection of extracellular vesicles and exRNA", "Direct detection of extracellular vesicles and exRNA", 第1回日本細胞外小胞学会, 広島市, 2014年8月28日, グランドプリンスホテル広島
9. 福永早央里, 塩谷文, 嶋本顕, 田原 栄俊, "老化を調節する microRNA による膵臓がん抑制機構の解析", "Functional analysis of senescence-associated miRNA suppresses pancreatic cancer", 第6回日本 RNAi 研究会, 広島市, 2014年8月28日, グランドプリンスホテル広島

2. 学会発表

1. Megumi Okada, Ayumi Nakamura, Misa Muneoka, Nao Nitta, Hidetoshi Tahara, "Biogenesis and biological activity of exosomes in replicative senescent cells.", "Biogenesis and biological activity of exosomes in replicative senescent cells.", ISEV (INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES) 2014, ロッテルダム(オランダ), 2014年5月1日,
2. 品末 聡也, 田原 栄俊, "Direct Detection of Exosome by

10. 山本 佑樹, 塩谷 文章, 嶋本 顕, 田原 栄俊, "細胞老化を誘導する microRNA の網羅的スクリーニング", "High-content screening of senescence-associated microRNAs", 第6回日本 RNAi 研究会, 広島市, 2014年8月28日, グランドプリンスホテル広島, , , , ,
11. 品末 聡也, 岡田 恵, 宗岡 美紗, 植田 俊樹, 佐古 直紀, 新田 尚, 田原 栄俊, "スペクトル型フローサイトメーター SP6800 によるエクソソームの一粒測定", "Direct Detection of Exosome by

SP6800 Spectral Analyzer,第6回日本RNAi研究会,広島市,2014年8月28日,グランドプリンスホテル広島

12,二瀬 由宇、岡本 沙矢香、竹田育子、高橋 哲也、松本 昌泰、田原 栄俊,アルツハイマー患者における血漿中マイクロRNAの解析と診断への応用,Analysis of plasma miRNAs in patients with Alzheimer's disease as applied to the diagnosis,第6回日本RNAi研究会,広島市,2014年8月28日,グランドプリンスホテル広島

13,岡田 恵、宗岡 美紗、岡本 沙矢香、二瀬 由宇、塩谷 文章、嶋本 顕、田原 栄俊,細胞老化における細胞外小胞エクソソーム分泌の生物学的意義の探索,The analysis of biological significance of exosomes in replicative senescence.,第6回日本RNAi研究会,広島市,2014年8月29日,グランドプリンスホテル広島

14,山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊",,細胞老化を誘導する microRNA の網羅的スクリーニング ,High-content screening of senescence-associated microRNAs,平成 26 年度 がん若手研究者ワークショップ,長野県茅野市,2014.9.3-6,蓼科グランドホテル滝の湯

15.田原 栄俊,テロメア検査、マイクロRNA 検査を用いた健康管理への活用,,第24回日本医療薬学会年会シンポジウム,名古屋市,2014年9月28日,名古屋国際会議場

16,田原 栄俊,老化誘導型核酸医薬の開発,,新適塾「未来創薬への誘い」第28回会合,大阪府,2014年10月6日,千里ライフサイエンスセンター

17. 二瀬 由宇、岡本 沙矢香、竹田育子、高橋 哲也、松本 昌泰、田原 栄俊,,アルツハイマー患者における血漿中マイクロRNAの解析と診断への応用,Analysis of circulating miRNAs in plasma from patients with Alzheimer's disease toward application for the diagnosis,第37回日本分子生物学会,神奈川県横浜市,2014年11月26日,パシフィコ横浜

18.福永早央里, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊",,老化を調節する microRNA の膵臓がん細胞における機能解析,Analysis of senescence-associated miRNA that suppress pancreatic cancer,第37回日本分子生物学会,神奈川県横浜市,2014年11月26日,パシフィコ横浜,,

19.山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊",,microRNA による細胞老化誘導機構の解明 ,Elucidation of mechanism underlying cellular senescence induced by miRNAs,第37回日本分子生物学会,神奈川県横浜市,2014年11月26日,パシフィコ横浜

20. Yu Ninose, Sayaka Okamoto, Ikuko Takeda, Tetsuya Takahashi, Masayasu Matsumoto,Circulating miRNAs as liquid biopsy in Alzheimer's disease and panc

reatic cancer toward application for the diagnosis.Extracellular Biomarkers Summit,"Boston, USA",2015年3月16日,Hyatt Regency Cambridge

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服実用化研究事業
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書 (平成26年度)

抗 HBV 免疫応答を惹起する新規肝炎モデルマウスの開発、*in vitro* HBV 感染系の樹立

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 講師

研究要旨：

HBV感染により惹起される多様な免疫応答が、B型肝炎の病態形成や治療効果に深く関与していることが知られている。本研究課題では、薬剤誘導性に肝細胞特異的にHBV ウィルス抗原を発現する新しい遺伝子改変マウスを作成し、ヒト肝炎病態を模倣した免疫応答の詳細な解析を進めている。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析からは、HBs抗原タンパクを肝細胞特異的に発現させた成体マウスの肝組織では、さまざまなサイトカイン関連遺伝子の発現変化が顕著に生じていることが確認された。また*in vitro* HBV感染モデルとして、TALEN/CRSPRを用いた遺伝子破壊技術を活用し、肝培養細胞においてDNAウィルス感染センサー分子のノックアウトを行い、新しいHBV感染細胞系の樹立を進めた。

A. 研究目的

B型肝炎ウィルス(HBV)感染者には、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、無症候性キャリアと、きわめて多様な臨床病像が生じることが知られている。こうしたHBV感染による多様な病態の形成には、ウィルスが感染した肝細胞に対する免疫応答が中心的な役割を果たしている。加えて、インターフェロンや核酸アナログ製剤によるHBVに対する抗ウィルス療法に際しても、背景に存在する免疫系の応答機構の理解が、HBs抗原の消失などの臨床的治癒状態を達成するための必須条件となる。したがって、HBV治療における新しい創薬ターゲットを探求するためには、HBVにより惹起される多様な免疫応答を模倣した*in vivo*モデルの樹立が急務である。しかしながら、幼

少時にHBV感染したヒトの場合には無症候性キャリアとなるのと同様に、モデルマウスにおいても胎児期にわずかでもHBV抗原提示が存在すると免疫寛容状態となってしまう、肝炎を発症しないことが知られている。このため、薬剤誘導性に成人期にHBV抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスがひとつのモデル候補となりうる。しかしながら、HBVは自らのゲノム中にpromoterやenhancerモチーフを有していることから、胎児期から完全にウィルス抗原タンパクの発現を抑止したモデルの構築がきわめて困難である。そこで、薬剤誘導性に肝細胞特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスと、CreによるLoxPの組換え作用により内在性ウィルスpromoter配列を含まな

い HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスを作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、肝炎としての免疫応答の惹起が可能なB型肝炎モデルマウスの新規開発を目指すことを本研究課題の目的とする。

一方、DNA ウィルスである HBV が肝細胞に感染する際に、宿主側因子にどのように認識され、どのように抗ウィルス免疫応答が誘導されているかについては不明な点が多い。近年、DNA ウィルス感染時の自然免疫系による細胞内センサーとして、STING-cGAS 経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。DNA センサーである環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS)からの STING の活性化を介してウィルス DNA が認識されることにより、I型インターフェロンが誘導され、抗ウィルス免疫応答が作動することがわかってきた。しかしながら、HBV が肝細胞に感染した際に、HBV DNA がどのようにして宿主因子に認識され、抗ウィルス免疫応答が誘導されているかについては不明なままである。感染した肝細胞からのウィルスの完全排除を達成するためには、十分な免疫応答の乏しい慢性感染持続状態においても HBV 感染時のセンサー機構を活性化することが、新しい抗 HBV 制御機構につながるものと期待される。そこで、これらの細胞内センサー遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築して HBV 感染感受性を検証することにより、HBV 制御の分子機構を明らかにすることにした。この目的を達成するために、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グ

ループとの共同開発により、TALEN ならびに CRISPR system を用いた新しい遺伝子破壊技術による *in vitro* ノックアウト肝培養細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

薬剤誘導性に肝細胞で特異的に Cre タンパクを発現する遺伝子改変マウスとしては、Albumin(Alb)-Cre-ERT2 マウスを活用した。マウス作成のためのコンストラクトとしては、Cre を誘導可能にするために、estrogen 受容体部分に点突然変異を複数導入し、内在性 estrogen に反応せず、tamoxifen に反応する性質を持った変異型 estrogen 受容体 (ERT2)と Cre の融合タンパク質をヒト Albumin promoter 配列の下流に挿入したコンストラクトを作成した。また、薬剤誘導前の微量 Cre タンパク質のリークの可能性が否定できないため、非誘導時には Cre 産生が全く生じていない既存の薬剤誘導性 Cre マウスとして、Mx1-Cre マウスも併用して解析を進めることとした。

他方、Cre による LoxP の組換え作用により promoter 配列を含まない HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作成のためには、CAG promoter 下流に loxP で挟んだ緑色蛍光タンパク(GFP)を置き、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したコンストラクトを作成した。すなわち、Cre の存在しない状況ではマーカー分子としての GFP を発現し、Cre の存在下では LoxP の組換え作用によって HBs 抗原を発現することが期待できる構造としている。このコンストラク

トのマウス胚への injection を実施し、目的とする遺伝子改変を達成した F0 マウスを最終的に合計 3 ライン確保した。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

近年、DNA ウィルス感染のセンサー分子として同定された STING, cGAS に着目し、これらの遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築することによる新しい *in vitro* HBV 感染モデルの作成を行った。標的遺伝子のノックアウト技術として、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グループが専門とする人工ヌクレアーゼのひとつである TALEN 技術を用いるとともに、CRSPR/Cas9 system も同時進行で活用することとし、共同研究を開始した。植物病原細菌キサントモナス属がもつ TALE を DNA 結合ドメインとして利用した TALEN では、TALE は約 34 アミノ酸からなるほぼ完全な繰り返し構造からなっている。そのうちの 12,13 番目のアミノ酸の違いが DNA 塩基認識特異性を決定することから、STING, cGAS それぞれに対応するユニットの作成を行った。また、STING, cGAS に特異的な認識配列を有する CRSPR を搭載したレンチウイルスベクターを作成し、HepG2 細胞への導入効率と遺伝子破壊効率を検証した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

Cre による LoxP の組換え作用により HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス(HBsAg-flox マウス)と、誘導型 Cre

発現マウス(Alb-Cre-ERT2 マウス、Mx1-Cre マウス)を交配することにより、薬剤誘導性に HBs 抗原を発現する 2 種類のモデルマウスを樹立した。うち、先行する数ラインからの F1 マウスを用いて、薬剤誘導性に GFP 発現の消失すること、それと同時に血中に HBs 抗原タンパク質が発現・分泌されることを確認した。しかしながら、薬剤誘導 1 週間、2 週間後のマウス肝組織には有意な炎症細胞浸潤が認められなかったことから、顕在性の肝炎としての免疫応答は乏しい可能性が示唆された。しかしながら、同じ肝組織から抽出した RNA を用いた Real-time-RT PCR 解析からは、薬剤誘導によりインターフェロン下流遺伝子の発現が誘導されていることが確認できたため、少なくとも HBs 抗原への免疫応答は惹起されているものと推定された。そこで、Alb-Cre-ERT2 X HBsAg-flox 交配マウスの HBs 抗原発現後の肝組織中の遺伝子発現プロファイルを Agilent 社の SurePrint Mouse gene expression (8X60K)によるマイクロアレイ解析を実施した。興味深いことに、HBs 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現させた成体マウスの肝組織では、さまざまなサイトカイン関連遺伝子の発現変化が顕著に生じていることが確認された。中でも、IFN-lambda 受容体 1、Pin1、IL-17 受容体遺伝子の発現上昇が惹起されていることがわかった。すなわち、HBV 急性感染時の初期免疫応答として、IFN-lambda シグナル経路などが活性化されている可能性が示唆された。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

STING, cGAS それぞれに特異的な TALE ユニットならびに CRISPR の設計を行い、それぞれ TALEN 発現ベクターと CRISPR 導入用レンチウィルスベクターを作成した。TALEN はリポフェクションにより HepG2 細胞に導入し、puromycin でのセレクションを行った。TALEN 導入を行った homo-knockout 細胞では、標的遺伝子の完全破壊が十分に達成できていない可能性が、その後の real-time 定量PCRの結果から示唆された。これに対して、CRISPR 導入細胞では、高率に cGAS, STING 遺伝子破壊が達成できていることが、標的遺伝子領域の target sequence ならびに real-time 定量PCRから確認できたため、CRISPR 導入細胞を用いて HBV 感染実験を行った。CRISPR 発現レンチウィルスベクターの HepG2 細胞への導入後に、B 型慢性肝炎症例から採取した HBV 陽性血清を培地に添加し、1 週間後に細胞回収を行ったところ、cGAS ノックアウト細胞では有意に細胞中の HBV 複製中間体量が上昇していることが明らかとなった。これに対して、STING ノックアウト細胞では、コントロール細胞と比較して、HBV 陽性血清の添加による細胞内 HBV 複製中間体量の変化は認められなかった。

D. 考察

薬剤誘導性に任意の時期に HBV 抗原タンパクを肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成することにより、ヒト B 型肝炎病態を模倣した新しい B 型肝炎モデル動物の構築を目指すことを本研究

課題の目標としている。肝細胞への HBs 抗原発現により病理学的な肝炎像は確認することが困難であったが、HBV に対する自然免疫応答を模倣したサイトカイン発現変動が HBs 抗原発現肝組織で認められたため、モデルマウスの表現型としては一定の成果を得ることが出来たものと考えられる。今後は、HBs 抗原発現前にあらかじめ HBV 抗原蛋白により免疫を付加しておくことにより、ウィルスに対する獲得免疫応答の解析も進めていく方針としている。同時に、*in vitro* において培養細胞を用いた HBV 感染系を樹立することにより、薬剤スクリーニングに際して異なる genotype やさまざまな変異ウィルスを含んだ血清検体を感染実験に簡便に試用することを目指していく。

E. 結論

肝炎としての免疫応答の惹起が可能な B 型肝炎モデルマウスの新規開発を目指し、薬剤誘導性に肝細胞特異的に HBV 抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウスを作成し、HBV に対する自然免疫応答の解析を開始した。また、*in vitro* HBV 感染モデルの樹立をめざし、TALEN/CRISPR を用いた DNA ウィルスセンサー分子の特異的な遺伝子破壊を行った肝培養細胞の樹立を継続していく。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. *J Hepatology*. 2014. 61: 492-501.
- 2) Inuzuka T, Takahashi K, Chiba T, Marusawa H: Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions. *Pathogens*. 2014. 3: 377-389.
- 3) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014. 146(1): 222-232.

2. 学会発表

- (1) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. The viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2015.3.12-15, Istanbul.
- (2) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H.

Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 11th JSH Single Topic Conferences. 2014.11.20, Hiroshima.

- (3) 犬塚義、上田佳秀、千葉勉、丸澤宏之。B型肝炎ウイルス再活性化の早期発見と核酸アナログ早期治療の有用性。第102回日本消化器病学会近畿支部例会。2015.2.21 京都
- (4) 犬塚義、丸澤宏之、上田佳秀、千葉勉。化学療法・免疫抑制療法により惹起されるHBV再活性化例の臨床像とウイルス学的特徴。第24回抗ウイルス療法研究会総会 2014.5.7-9 山梨
- (5) 犬塚義、上田佳秀、千葉勉、丸澤宏之。化学療法・免疫抑制療法により再活性化するHBVのウイルスゲノム解析。第10回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム 2014.7.5 広島

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

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)
分担研究報告書 (平成26年度)

Analyzing host factors regulating HBV as tool to develop HBV drugs and mouse model.

研究分担者 Hussein Hassan Aly Ibrahim、国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨

There is no immunocompetent small animal model that is permissive to hepatitis B virus (HBV) infection. We are trying to identify the host factors that are required for the species restriction of HBV infection in human and chimpanzees, and use it to construct an immune-competent transgenic mouse that is permissive for HBV. Also we are trying to develop new anti-HBV drugs targeting the host factors required for HBV life cycle. The block of HBV infection in mouse cells is reported to be at the entry level, since all other parts of HBV life cycle can be efficiently recapitulated in mouse. Recently, sodium taurocholate transporter (NTCP) was discovered as a new entry receptor for HBV infection. However, no HBV infection was reported in mouse hepatocytes expressing human NTCP, suggesting either the lack of other host factor required for HBV infection, or the presence of a host inhibitory pathway in the mouse. We are screening for host factors affecting HBV life cycle and studying its effect on HBV infectivity on mouse hepatocytes, and the discovery of new anti-HBV drugs targeting these host factors.

A. 研究目的

The aim of this study is to understand the anti-HBV immune response and to utilize this knowledge for the development of novel and evidence-based therapeutic regimen for chronic HBV infection. To accomplish this, the primary aim of this study is to first establish an immunocompetent small animal model supporting HBV infection. The intermediate objective is to assess if an evidence-based and innovative therapy can be developed for chronic HBV-infected subjects with retrieved information. The final target is to provide a strategy and road map of immune therapy for HBV patients.

B. 研究方法

Host factors affecting HBV life cycle:

We work to identify host factors regulating HBV life cycle, and design new anti-HBV drugs targeting these factors.

1- Screening for human kinases regulating HBV replication: (started from 2013)

Using HepG2-AD38.7 cells in which HBV replication is inducible by tetracycline off system, and kinase siRNA (501 genes) library, we screened for those regulating HBV replication in the cell.

According to the function of each kinase on HBV life cycle, we classified our results into kinases suppressing HBV, and kinases required for HBV life cycle.

Mechanistic Analysis of TSSK2 function on HBV replication.

We Used protein/protein interaction studies, overexpression and silencing, deletion mutants, RNA/protein interaction, to analyzed the mechanism by which TSSK2 suppresses HBV replication in the cell. As output for measuring the effect on HBV, we used southern blot, and real time PCR to measure HBV-DNA, we measured nuclease resistant core associated DNA, we used northern blot, and real time-RT-PCR for the detection of HBV-RNA, we used western blot for the detection of HBV proteins, and we constructed core, S1, S2, and X promoter luciferase reporter plasmids to assay the effect on transcription.

2- Screening for human helicases (133 genes), GPCR (380 genes), Nuclear receptors (52 genes), Cytokine receptors (116 genes).

Using HepG2-AD38.7 cells in which HBV

replication is inducible by tetracycline off system, and siRNA libraries, we screened for those regulating HBV replication in the cell. According to the function of each kinase on HBV life cycle, we classified our results into factors suppressing HBV, and factors required for HBV life cycle.

(倫理面への配慮) Ethical

All mice that will be used in this study will receive human care and permissions from institutional review board to conduct the study.

C. 研究結果

Host factors affecting HBV life cycle:

1- A) We screened 1182 host genes affecting HBV replication covering the following: 1- Kinases (501 genes), 2- Helicases (133 genes), 3- G-protein coupled receptors (380 genes), 4- Cytokine receptors (116 genes), 5- Nuclear receptors (52 genes).

B) We are currently analyzed by mechanistic analysis.

2- Using the human Kinase library, we identified a new pathway suppressing HBV replication.

A) We found that Testis Specific Serine Kinase 2 (TSSK2) expression was induced in liver cells in response to HBV infection.

B) TSSK2 kinase suppress HBV replication through its interaction with Superkiller Viralidic Activity 2-Like (SKIV2L) helicase.

C) TSSK2 phosphorylates SKIV2L helicase, and this phosphorylation is important for the binding between SKIV2L and HBV-mRNA.

D) This is followed by SKIV2L mediated HBV-mRNA degradation through the RNA exosome.

D. 考察

This year in the HBV international meeting, it was

reported that while HBV and HDV are using the same HBV surface antigen to attach and infect hepatocytes; HDV infection was possible in mouse hepatocytes expressing human NTCP (the newly identified HBV receptor) but not HBV. This suggest that the problem of permissiveness of mouse hepatocytes to HBV infection is not at the hepatocyte surface, but may be another host factor is required in the early steps of HBV infection, or an inhibitory pathway in the mouse suppressing HBV infection in the early stages. To identify the human host factors required for HBV life cycle and its effect on HBV infectivity when overexpressed in human NTCP expressing mouse hepatocytes, we used siRNA library screening.

Using the Kinase library screening, we discovered TSSK2 kinase to be induced by HBV replication in the cells. We also found that TSSK2 further phosphorylates SKIV2L helicase. SKIV2L helicase was known to identify and degrade invading viral RNA in the yeast. RNA degradation is carried through its interaction with the RNA exosome complex. No similar phenomenon was yet reported in human. We showed that phosphorylation of SKIV2L helicase in human by TSSK2 is important to bind with both HBV-mRNA and RNA exosome, and is required for the degradation of HBV-mRNA through the exosome complex.

We are recently planning to use this phenomenon to

1- To study its effect on HBV permissiveness of mouse hepatocytes

2- To develop a new anti-HBV drug targeting the degradation of HBV-mRN.

E. 結論

RNA exosome complex plays an important role regulating HBV-mRNA levels. This is mediated through the interaction with HBV-mRNA bound to SKIV2L helicase. SKIV2L helicase phosphorylation by TSSK2 kinase is required for this binding. We are aiming to use

this phenomenon to develop a new anti-HBV drug targeting the degradation of HBV-mRNA.

F. 健康危険情報

なしです

G. 研究発表

1. 論文発表

今年はなしです

2. 学会発表

1- Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Analyzing new host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Oral presentation, Taipei, Taiwan

2- Aly HH, Watashi K, Wakita T, Chayama K. The identification of a new interferon-independent host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

3-

3- Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Host factors interacting with Hepatitis B virus life cycle. Egyptian-Japanese day, molecular biology of hepatitis viruses. Oral presentation, 2014, Cairo, Egypt.

4- Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. The identification of a new host mechanism suppressing Hepatitis B virus replication. The 62nd meeting of the Japanese society of virology. Oral presentation, 2014, Yokohama, Japan.

5- Aly HH The identification of a new interferon independent anti-hepatitis B virus pathway. The second Japan-Italy hepatitis meeting. Oral presentation, 2014, Hiroshima, Japan.

6- Aly HH, the 11th JSH Single Topic Conference.

SKIV2L helicase suppress HBV replication in interferon independent manner. Poster presentation, 2014, Hiroshima, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

B型肝炎ウイルス粒子形成に係わる宿主因子の同定とウイルス増殖抑制法の開発

研究分担者 坂口 剛正 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) の粒子形成について、宿主因子である ESCRT あるいは Alix、tetherin が関与することを示した。これらについて HBV 増殖を抑制する方法を検討した。Core 蛋白質と Alix の直接的な相互作用を阻害することが有力な方法であると考えられた。他に Autophagy の HBV 粒子形成の関与については確実な結果が得られておらず、さらに検討が必要である。今後は、様々な網羅的な手法によって、HBV 増殖に関する新たな宿主因子の検索を行う予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の粒子形成について、昨年度から研究を開始した。培養細胞にウイルス遺伝子を導入して HBV 複製を起こすシステム、あるいは HBV 蛋白質、特に HBs あるいは Core 蛋白質を発現してウイルス様粒子 (VLP) を産生させるシステムを用いて、粒子形成に必要な宿主因子あるいは阻害的に働く宿主因子を、様々な方法で検索する。宿主因子の候補について、詳細な生化学的・分子生物学的な解析を行い、その作用機構を解明する。さらに同定された宿主因子を直接的あるいは間接的に阻害する因子を研究して、HBV 増殖抑制法を開発し、抗 HBV 薬を開発するための基礎とする。

B. 研究方法

HBV 広島 YE 株 (Accession# AB206816) を主に用い、この 1.4 倍長全ゲノムをもつプラスミドを培養細胞 HepG2 あるいは T23, 293T に導入して、ウイルス複製と粒子形成をおこさせた。あるいは HBs 蛋白質を単独で発現させて生じるウイルス様粒子 (S-VLP)、Core 蛋白質によるウイルス様粒子 (C-VLP) を用いた。

各種の宿主因子の発現プラスミドあるいはドミナントネガティブ変異体 (DN 変異体) を用い、あるいは CRISPR/Cas9、shRNAi、siRNA を用いたノックアウト、ノックダウンを行った。宿主因子とウイルス蛋白質の相互作用を免疫共沈降法で、共局在を蛍光顕微鏡で検討した。

C. 研究結果

1. ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport)

多小胞体での膜輸送、細胞質分裂に関与する宿主蛋白質複合体であり、HIV-1 をはじめとする多くのエンベロープウイルスの出芽に働くことが示されている。HBV, C-VLP 出芽は、ESCRT 機能を阻害する DN 変異体で出芽が阻害された。少なくとも成熟粒子の放出に ESCRT が関与している。S-VLP 出芽は阻害されなかったため、空粒子の出芽には関与していない可能性がある。

2. Alix (ALG2-interacting protein X)

Alix は 868 残基の V 字型分子であり、膜に結合する。ESCRT の構成蛋白質の一つであるが、単独でも膜を湾曲させて、エクソゾーム形成、一部のウイルス出芽をおこすと考えられている。Alix と Core 蛋白質が直接結合することを確認し、それぞれの結合ドメインを同定した。Alix の欠失変異体の一部で、HBV, C-VLP の出芽が抑制されることを観察しており、この変異体が DN 変異体として働いている可能性がある。S-VLP には全く影響を与えない。さらに確認が必要であるが、HBV の出芽に Alix と Core 蛋白質の結合が重要であることは、ほぼ確実と思われる。これを阻害することで HBV 増殖抑制効果が得られる可能性がある。

3. Autophagy

我々は LC3 が、HBs 蛋白質や preS2-S 蛋白質、preS1-S2-S 蛋白質と共局在することを見いだして

おり、HBV 出芽と autophagy との関連が疑われた。現在のところ、autophagy 阻害剤 3-MA は、HBV あるいは S-VLP, C-VLP の出芽に影響がないというデータを得ている。一方、2011 に HBV 出芽に autophagy が関連しているという論文が発表されており、さらに異なる細胞、あるいは autophagy 促進剤を用いた検討が必要である。

4. BST2/tetherin/CD317

インターフェロン誘導性の Type II 膜蛋白質であり、C 末端に GPI アンカーが結合することで、N 端、C 端の両方で膜に結合する分子である。HIV-1 において、細胞表面でウイルスを物理的に引き留めることで出芽を抑制することが明らかになっている。HIV-1 はその Vpu 蛋白質によって、tetherin の作用を不活化している。tetherin は過剰発現すると、C-VLP の出芽は阻害しないが、HBV および S-VLP の出芽を阻害した。従って tetherin は潜在的にウイルス出芽を阻害すると考えられる。

ところが、HBV 持続感染 HepG2 由来細胞 (T23 細胞) では、tetherin の siRNA によるノックダウンあるいは過剰発現で HBV の出芽は影響を受けないというデータがあり、持続感染細胞では tetherin の働きを無効化する機構があることが推測される。HBV 増殖が tetherin の阻害作用から逃れるような機構が存在する可能性があり、興味深い。

D. 考察

今年度は既報の HBV 出芽に関する宿主因子を中心として検討を行った。HBV 出芽への ESCRT の関与は明確であったが、ESCRT は生体に必須な働きをしているので、ウイルス抑制のために阻害することは困難である。一方で、Alix の変異体の一部が DN 変異体として働いたので、Alix と Core 蛋白質の相互作用を阻害すると HBV 増殖抑制につながる可能性がある。この相互作用を阻害する低分子化合物を検索する必要がある。

Autophagy が HBV の出芽に働いているかどうかについて、現時点では曖昧である。Autophagy が関与することが明らかになれば、Autophagy の制御は様々な薬剤によって、ある程度可能であるので、将来的に HBV 増殖抑制につながる可能性がある。

今後は、網羅的な手法を用いて、HBV 蛋白質と相互作用する宿主因子を検索することを予定している。

E. 結論

HBV 粒子形成に重要な宿主因子をいくつか同

定、確認することができた。これらをもとにして、HBV 粒子形成を抑制する方法の開発が期待できる。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Latief MA, Chikama T, Shibasaki M, Sasaki T, Ko J-A, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A, Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy *in vitro*. *Lasers Med. Sci.* 30(1):383-387, 2015
- 2) 坂口剛正、上田恭子、川端涼子、柿渋でウイルス対策 柿タンニンによる強力なウイルス不活化作用、*ニューフーズインダストリー* 56(11):17-24, 2014.

2. 学会発表

- (1) 竹中啓、富樫盛典、三宅亮、坂口剛正、秀道広、 π 環境中ウイルスの迅速検知システム、平成 26 年室内環境学会学術大会、東京、2014
- (2) 坂口剛正、B 型肝炎ウイルスの細胞からの放出、厚生労働省 B 型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じた HBV 排除への創薬研究、平成 26 年度 3 班合同班会議、大阪、2014
- (3) 福士雅也、川端涼子、坂口剛正、B 型肝炎ウイルス P 蛋白質による全般的な蛋白質合成阻害、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
- (4) Takenaka K, Togashi S, Miyake R, Sakaguchi T, Hide M. Integrated micro-impaction cartridge covered with microporous light-blocking film for low-concentration airborne virus detection. The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ TAS 2014 Conference, San Antonio, USA, 2014
- (5) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. IFN- α -inducible, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA type-dependent manner. The 13th Awaji international forum on Infection and Immunity. 奈良、2014
- (6) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role in restricted production of copyback-type

defective-interfering genomes to escape from detection by host innate immunity. IUMS2014 XVI International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014

(7) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. Stress granule-like structures are not involved in recognition of Sendai virus infection. IUMS2014 XVI

International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014

(8) 坂口剛正、川端涼子、福士雅也、小田康祐、入江崇、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、第29回中国四国ウイルス研究会、山口、2014

(9) 坂口剛正、小田康祐、入江崇、ウイルスによる自然免疫抑制の構造学的解析、平成26年度中四国乳酸菌研究会総会および研究発表会、岡山、2014

2. 特許申請

発明の名称：高マンノース型糖鎖分離デバイス

出願人：国立大学法人広島大学、旭化成メディカル株式会社

発明人：堀貫治、黒川洋、平山真、巖倉正寛、水口博義、坂口剛正他

出願番号：特願 2015-21620

出願日：2015年2月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

(1) 特許第 5593572 号

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

特許権者：シャボン玉石けん株式会社、国立大学法人広島大学

発明人：川原貴佳、草場麻衣子、坂口剛正

出願番号：特願 2011-509373

出願日：平成 22 年 4 月 16 日

登録日：平成 26 年 8 月 15 日

(2) 特許第 5571577 号

発明の名称：A型インフルエンザウイルス属のエンベロープウイルスに対する抗ウイルス性衛生用繊維製品

特許権者：国立大学法人広島大学、アルタン株式会社

発明人：島本整、沖中泰、坂口剛正、辻徹、中井義昭

出願番号：特願 2010-542140

出願日：平成 21 年 12 月 11 日

登録日：平成 26 年 7 月 4 日

(3) 特許第 10-1426744 号 (韓国)

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

特許権者：シャボン玉石けん株式会社、国立大学法人広島大学

発明人：川原貴佳、草場麻衣子、坂口剛正

出願番号：第 2011-7024542 号

出願日：2011 年 10 月 18 日

登録日：2014 年 07 月 30 日

トランスジェニックマウスを用いたB型肝炎の免疫機構の解析

研究分担者 阿部 弘美 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授

研究要旨

我々は昨年度、NOG-scid, NOD-scid を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎ウイルス感染モデルを作製し論文として発表した (Kosaka et al., BBRC, 2013)。この改良型モデルマウスに重症 B 型肝炎急性肝炎治癒後の患者から得られたヒト末梢血単核球を投与した結果、肝組織中へのリンパ球浸潤、HBV 感染肝細胞の細胞死、血清中の ALT 上昇、Granzyme A や IFN- γ レベルの上昇が認められた。また、肝臓内には HBV 特異的な CTL が検出され、本モデルは HBV 特異的 CTL による HBV 感染肝細胞死が誘導されたヒト劇症肝炎モデルであると考えられた。また、HBs 抗原は陰性化し、HBs 抗体が陽性となった。さらに T 細胞を標的とした薬剤である CTLA4Ig を用いて T 細胞の活性化を抑制することで HBV 感染肝細胞の傷害が抑制できるか検討を行った結果、HBV 感染肝細胞死は阻害された。CTLA4 はリウマチに安全に使用されている薬剤であることから、B 型重症肝炎の治療として使用できる可能性が示された。また、肝炎モデルは細胞障害性 T 細胞を利用した B 型肝炎ウイルスの排除を行う上での安全策などに利用可能であり、幅広い応用研究が可能である可能性があると考えられる。

A. 研究目的

肝炎モデルを改良しヒト肝炎をマウス内で再現する慢性B型肝炎モデルを作製し、HBV 感染細胞の排除機構、cccDNAの排除、HBV 粒子分泌抑制、HBV蛋白に対する抗体産生促進などに関与する因子の探索を目的とする。

B. 研究方法

重傷免疫不全であるNOGマウスにthymidine kinase遺伝子をtransgeneしたTK-NOGマウスにガンシクロビルを投与することによりマウス肝細胞を傷害し、形成されるニッチを利用してヒト肝細胞を増殖させることができるマウスモデルを用いてヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスにHBV感染患者由来の血清を用いてHBV感染させた。HBV DNA量がプラトーに達したHBV接種8週後に、B型急性重症肝炎治癒後の患者から得られたヒト末梢血単核球(PBMC)を比重遠心法にて分離し、腹腔経由で移

入した。PBMC移入2週後にマウス肝組織および肝灌流液中のヒトPBMCの表現型をフローサイトメーターにて解析した。また血清中のALTレベル、各種サイトカインレベル、HBs抗原、抗体、HBV DNAの定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に関わる動物実験は、広島大学動物実験倫理審査委員会の承認を得ている。またヒト血球の使用に関しても臨床研究の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

HBV感染させたマウスにPBMC移入2週間後、血清中ヒトアルブミン値、ALTを調べたところPBMCを移入しなかったコントロールマウスに比較してALTは有意に上昇、ヒトアルブミン値は有意に減少した。HBVを感染させたマウスと感染させていないマウスにPBMCを移入した実験ではHBV感染マウスで生