

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)

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をロックダウンできる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をロックダウンできる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).

## 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

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

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