

AIST
計画課題⑤：B型肝炎の新規治療薬を開発するためのウイルスの糖鎖解析に関する研究

B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と 医用応用技術の実用化へ

産業技術総合研究所
糖鎖創薬技術研究センター
成松 久

国立国際医療研究センター
清上 雅史
足永 匡紹
愛知医科大学
米田 政志
伊藤 清顕
名古屋市立大学
飯島 沙幸
尾崎 克己
富山大学
田原 和人

福島県立医科大学
伊藤 浩美
糖鎖創薬技術研究センター
梶 裕之
久野 敏
根谷内 晶
館野 浩章
佐藤 隆
千葉 靖典
安形 清彦

AIST
B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と
医用応用技術の実用化へ

(1) siRNAによるHBV形成・分泌に関わる糖鎖遺伝子の探索

HuH7細胞 → siRNAプレート (86遺伝子 x 3種の異なる配列のsiRNAs)

HuH7 cells + siRNAs + Flag-S-HBs

糖鎖遺伝子の siRNAによる阻害

不完全糖鎖HBsAg
インテグレートHBVの減少

HepG2.2.15細胞 → Day4 → Secreted virions: Real-time PCR, HBsAg: ELISA

細胞増殖

HBV DNA

HBV分泌の抑制

□ 40-60% reduction ■ > 60% reduction

HBV分泌を阻害するsiRNAの同定

感染研 HepG2.2.15.7 + siRNA

HBsAg量

HBV DNA量 (qPCR)

L-Lamivudine, E-Entecavir

糖鎖合成阻害の宿主細胞への影響

HuH7 Tunicamycin siRNA-79

AFP

siRNA-79

E-PHA RCA

レクチンプロットニング

宿主細胞に対して

- 糖鎖合成阻害剤の様な毒性は認められない
- 糖鎖プロファイルに大きな変化が見られない
- 細胞死は見られない(MITアッセイ)

ターゲット分子の同定から創薬の試み

siRNA-79

GalNAc

糖鎖を利用したsiRNAの肝臓へのDDS

マウスを用いた検証

同定されたターゲット分子へのインヒビターのスクリーニング (他班との共同研究)

HBV関連分子

インヒビター

同定されたターゲット分子

(2) 新規B型肝炎ワクチンの開発

安全

3回免疫 (約半年)

抗体獲得率 約90%

糖鎖無し

免疫低・非応答者

オカルトインフェクション エスケープミュータント

必要とされるワクチン

- 変異に対応可
- 短期高免疫獲得率
- 治療にも応用可
- 医療費の抑制

ユニバーサルワクチンではない → 公費接種へ

臓器移植時等のHBIG

輸血患者の感染事例数	2003年	13	0	1	0
	04年	11	0	1	0
	05年	11	0	1	0
	06年	11	0	1	0
	07年	14	4	1	0
	08年	7	0	0	0
	09年	7	1	2	0
	10年	11	1	2	0
	11年	13	0	0	0
	12年	6	0	0	0

臨床サイドからの問題点 (新規ワクチンの必要性)

過去にHBワクチン投与済でもHBVに感染する？

HBワクチン接種後 gp28に反応しない抗体が多い

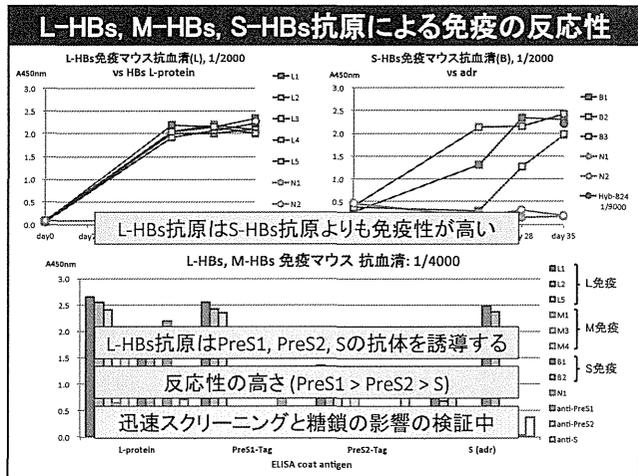
Genotype	Year	Age	HBV genotype						
Genotype 1	1997	41	1	1	1	1	1	1	1
Genotype 2	1997	41	2	2	2	2	2	2	2
Genotype 3	1997	41	3	3	3	3	3	3	3
Genotype 4	1997	41	4	4	4	4	4	4	4
Genotype 5	1997	41	5	5	5	5	5	5	5
Genotype 6	1997	41	6	6	6	6	6	6	6
Genotype 7	1997	41	7	7	7	7	7	7	7
Genotype 8	1997	41	8	8	8	8	8	8	8
Genotype 9	1997	41	9	9	9	9	9	9	9
Genotype 10	1997	41	10	10	10	10	10	10	10
Genotype 11	1997	41	11	11	11	11	11	11	11
Genotype 12	1997	41	12	12	12	12	12	12	12
Genotype 13	1997	41	13	13	13	13	13	13	13
Genotype 14	1997	41	14	14	14	14	14	14	14
Genotype 15	1997	41	15	15	15	15	15	15	15
Genotype 16	1997	41	16	16	16	16	16	16	16
Genotype 17	1997	41	17	17	17	17	17	17	17
Genotype 18	1997	41	18	18	18	18	18	18	18
Genotype 19	1997	41	19	19	19	19	19	19	19
Genotype 20	1997	41	20	20	20	20	20	20	20

6/9 → 5/6 non-A2 (A2は欧米のHBワクチン)

HBワクチンは異なるgenotype感染は防げない? (Stramer SL et al. NEJM 2011)

B型肝炎ワクチン

- S領域は糖鎖付加型等への変異が多く、エスケープ・ミュータントが増加
- ワクチン接種者(抗体保持者)がHBVに感染するケースの報告
- 免疫獲得までに時間がかかる



糖鎖付加L-HBs抗原の調製

•L-HBs抗原を糖鎖を付加した形で発現し、糖鎖の有無による抗体生産の変化を確認する

酵母の培養 菌体からの抽出 KBrによる超遠心 ショ糖密度勾配による分離 Fraction

HBVにより近いワクチンを作製し効率化を図る

(3) HBV糖鎖受容体(創薬標的)の探索

糖鎖(単純な構造) HBV糖鎖受容体分子の探索(NGSによる絞り込み)

HBV糖鎖は感染に影響

HBVエンタリーに関与?

ターゲット分子

約20個のレクチン株遺伝子について、受容体機能を検証中

HuH7+NTCP細胞の作製

糖鎖研究からHBV創薬へ(今後の展開)

- HBV糖鎖・グリコプロテオミクス解析
- 感染可能細胞(宿主細胞)のオミクス解析
- 内在性レクチンの同定
- 糖鎖改変細胞によるスクリーニング
- ヒト型糖鎖付きHBs抗原の調製

4年次-5年次の流れ

創薬のターゲット分子(糖鎖遺伝子)
新規ワクチンの開発、中和抗体
創薬のターゲット分子(レクチン)
新規検出系の開発(病態・治療効果)

工程表(研究代表者氏名: 成松 久)

(3年目)

24年度に実施すべき事項	25年度に実施すべき事項	26年度に実施すべき事項	27年度に実施すべき事項	28年度に実施すべき事項
血清HBV由来HBs抗原の構造・グリコプロテオミクス解析	(65)%/100%	多数サンプル測定システムの開発		
HBV感染可能細胞の糖鎖解析	(100)%/100%	HBV感染と比較糖鎖解析		
HBV感染に関与するウイルス表面糖鎖認識分子の同定	(50)%/100%	新規細胞を用いたHBV糖鎖受容体と阻害剤のスクリーニング		
糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響	(60)%/100%	HBV分泌阻害分子の同定と実用化のための解析、糖鎖改変HBVの感染実験		
糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量調製	(60)%/100%	大量発現系の開発と糖鎖中和抗体を用いたHBV感染阻害実験		

【別添4】

利益相反について

利益相反の有無等(平成26年度)

- ア 利益相反の有無 有(無)いずれかを記載)
- イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

他の研究班への参加状況

【別添5】

研究代表者が、「肝炎等克服政策研究事業」または「肝炎等克服実用化研究事業」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

- ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
- イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。

(以下①、②を記載)

- ①(研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名:〇〇〇〇)
- ② 今回申請している研究との違い(研究内容に重複がないことを具体的に提示)など、その必要性・合理性の説明

① 肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業)
「肝疾患病態指標血清マーカーの開発と低侵襲かつ効率的に評価・予測する新規検査系の実用化研究班」(研究代表者:成松久)

② 肝癌や他の肝疾患関連疾患病変(病態)を細分化し、それぞれを定量的に検出する分子病態マーカーの開発とその実用化が必須となっており、HBVの糖鎖解析による感染阻害などの創薬ターゲットの探索やワクチン開発をめざす本研究とは、全く研究内容が重ならない。

【別添6】

合同研究班会議開催状況

他の研究班と合同での研究班会議開催状況(平成26年度)

- ア 他の研究班と合同で研究班会議を開催していない。

- イ 他の研究班と合同で研究班会議を開催している。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成26年10月29日 NTCP合同班会議 国立国際医療研究センター

・HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索(下遠野邦忠)・B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究(脇田隆守)・B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究(田中靖人)・B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発(上田啓次)・B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究(藤田尚志)・次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究(小嶋聡一)

平成 26 年度 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『成果概要』

研究課題：B 型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

課題番号：H24-B 創-肝炎-一般-008

予定期間：H24 年度から H28 年度まで

研究代表者：加藤 直也

所属研究機関：東京大学

所属部局：医科学研究所

職名：准教授

委託費(決定額)：1 年目 130,000,000 円 2 年目 100,000,000 円 3 年目 110,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B 型肝炎ウイルス(HBV)による肝発癌抑止は肝臓病学の最重要課題の一つ
- (2) HBV による肝発癌に自然免疫系、特に MICA 発現 HBV 感染肝細胞と NK 細胞との攻防が重要
- (3) HBV 増殖を制御しても肝癌の発生は必ずしも制御できない
- (4) 抗ウイルス療法とは異なる自然免疫系の制御による肝発癌抑止戦略が必要

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ゲノムワイド関連解析(GWAS)を駆使し HBV による肝発癌における自然免疫系の役割を解明
- (2) HBV による肝発癌に関わる自然免疫系分子を同定
- (3) HBV による肝発癌に関わる自然免疫系分子の発現調節や修飾が可能な薬剤と microRNA を探索
- (4) HBV による肝発癌に関わる自然免疫系分子の発現調節や修飾により肝発癌を抑止する創薬が期待

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者

- (1) B 型肝炎に MICA 遺伝子多型が関連し、MICA 遺伝子多型に応じて血中 MICA 濃度が上昇
- (2) MICA の発現に microRNA による制御が関与していることを発見
- (3) 血中 MICA 濃度と相関する MICA の転写活性を変化させるプロモーター上の 2 つの SNP を同定
- (4) MICA プロモーター下にレポーターを発現する肝癌細胞にて MICA 発現を変える FDA 承認薬を複数同定
- (5) 強力な MICA 誘導薬 SAHA の肝癌細胞上 MICA 発現誘導と共培養での NK 細胞傷害性亢進を確認
- (6) マウス肝癌モデルにて SAHA 投与がもたらす NK 細胞による抗腫瘍効果増強を確認 (proof of concept)

・研究分担者(横須賀 収)

- (1) HBe 抗原が自然免疫に関わる RIPK2 と相互作用し IL-6 などのサイトカイン産生に影響
- (2) RIPK2 は NF- κ B 依存性分子を介して epithelial to mesenchymal transition に関与
- (3) HBV/HBx と TNF は協同的に NF- κ B を活性化、代謝・ER ストレス関連遺伝子を発現増強

・研究分担者(小池 和彦)

- (1) microRNA25-106b クラスター由来 microRNA が転写後調節を介し MICA 遺伝子発現に関与
- (2) HBV エンベロープナノカプセルを用いた microRNA の肝細胞デリバリーによる MICA 発現制御法を開発

(3) 初代培養肝細胞での HBV 感染により、肝細胞膜上 MICA 蛋白の shedding 増加

・研究分担者(松田 浩一)

- (1) B 型肝炎に MICA 遺伝子多型が関連
- (2) MICA プロモーター領域のアレル特異的に転写因子 SP-1 が結合し MICA 遺伝子発現を高める
- (3) 中国人での B 型肝炎リスクである KIF1B 多型が日本人においては相関しない
- (4) GWAS にて MHC 領域を含む複数の領域の多型が慢性 B 型肝炎から肝臓への進行に関わることを発見
- (5) 他癌腫リスク関連 400 遺伝子につき B 型肝炎で検討、共通して発症に寄与する遺伝子多型を同定
- (6) ISCU が肝臓組織の約半数で発現低下し、p53-ISCU 経路の不活化が鉄蓄積に關与することを発見
- (7) 新たな肝臓抑制遺伝子として、肝臓組織において高頻度に変異し酵素活性が低下する PADI4 を同定

・研究分担者(地主 将久)

- (1) MICA レセプター-NKG2D は腫瘍内マクロファージに高発現し、高い腫瘍細胞貪食能を有する
- (2) NKG2D 陽性マクロファージは腫瘍細胞貪食を介し IFN- α/β 等の炎症性サイトカイン産生を促進
- (3) NKG2D 陽性マクロファージは IFN- α/β を介して抗癌剤による抗腫瘍効果を高める
- (4) HBx-TG と NKG2D-KO マウスを用いて NKG2D 免疫システムの肝臓発症における役割を検証中
- (5) 腫瘍内マクロファージに高発現し抗腫瘍免疫活性を抑制する分子として TIM-4 を同定
- (6) SAHA による抗腫瘍効果が NKG2D 系免疫応答に依存することをヒト化マウスでの前臨床試験で証明

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) HBV による肝臓発症における自然免疫系の役割を解明し、肝臓発症に関わる新たな自然免疫系分子を同定
- (2) HBV 感染による MICA 発現調節機構と薬剤による MICA 発現調節機構の解明
- (3) ハイスループットスクリーニングによる新規 MICA 発現誘導薬と切断阻害薬の同定
- (4) MICA 発現誘導と切断阻害による新規肝臓発症抑止法および肝臓治療法の開発
- (5) B 型肝炎モデルを用いての NK 細胞と肝臓細胞との細胞間相互作用の解明と新規肝臓治療法の開発

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

- (1) レアバリエントを含む B 型肝炎関連 MICA SNP タイピングによる肝臓発症超高リスク群の囲い込み
- (2) 前臨床試験で抗腫瘍効果を証明し得た MICA 発現誘導薬による肝臓発症抑止法、肝臓治療法の開発
- (3) 特許取得し製薬企業導出も念頭にいた NKG2D など自然免疫活性を指向した新規治療薬の開発

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 自然免疫制御という新発想による発症予測、発症予防法開発を通して HBV による肝臓発症予防に貢献
- (2) 肝臓治療による高額医療費の抑制が実現可能
- (3) 肝臓死による就労可能人口の低下を防止することにより、厚労福祉施策への貢献が可能

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者

- (1) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013; 58: 875-882
- (2) Lo PHY, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One* 2013; 8: e61279
- (3) Goto K, Lin W, Zhang L, Jilg N, Shao RX, Schaefer EA, Zhao H, Fusco DN, Peng LF, Kato N, Chung RT. The AMPK-related kinase SNARK regulates

- hepatitis C virus replication and pathogenesis through enhancement of TGF- β signaling. *J Hepatol* 2013; 59: 942-948
- (4) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014; 49: 748-754
- (5) 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: E137-E144
- (6) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e91822
- (7) 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: 42-48
- (8) 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: 5581-5590
- (9) Goto K, Kato N. MICA SNPs and the NKG2D system in virus-induced HCC. *J Gastroenterol* 2014 (Epub ahead of print)

•研究分担者(横須賀 收)

- (1) Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. *Cytokine* 2013; 64: 577-583
- (2) Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. *Immunol Lett* 2013; 152: 8-15
- (3) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoi T, Yokosuka O. Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region. *PLoS One* 2013; 8: e73615
- (4) Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O. Corticosteroid for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25: 1492
- (5) Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. *Cytokine* 2013; 64: 577-583
- (6) Miyauchi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir against virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients. *Int J Med Sci* 2013; 10: 647-652
- (7) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, Yokosuka O. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. *Int J Med Sci* 2013; 10: 567-574
- (8) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7197-7206
- (9) Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of Hepatitis B Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in Japan: Efficacy of Nucleos(t)ide Analogues for Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 21455-21467
- (10) Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2014 (Epub ahead of print)

•研究分担者(小池 和彦)

- (1) 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: 5581-5590
- (2) 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: 42-48
- (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: 173-184
- (4) Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for the future management of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2014 (in press)

•研究分担者(松田 浩一)

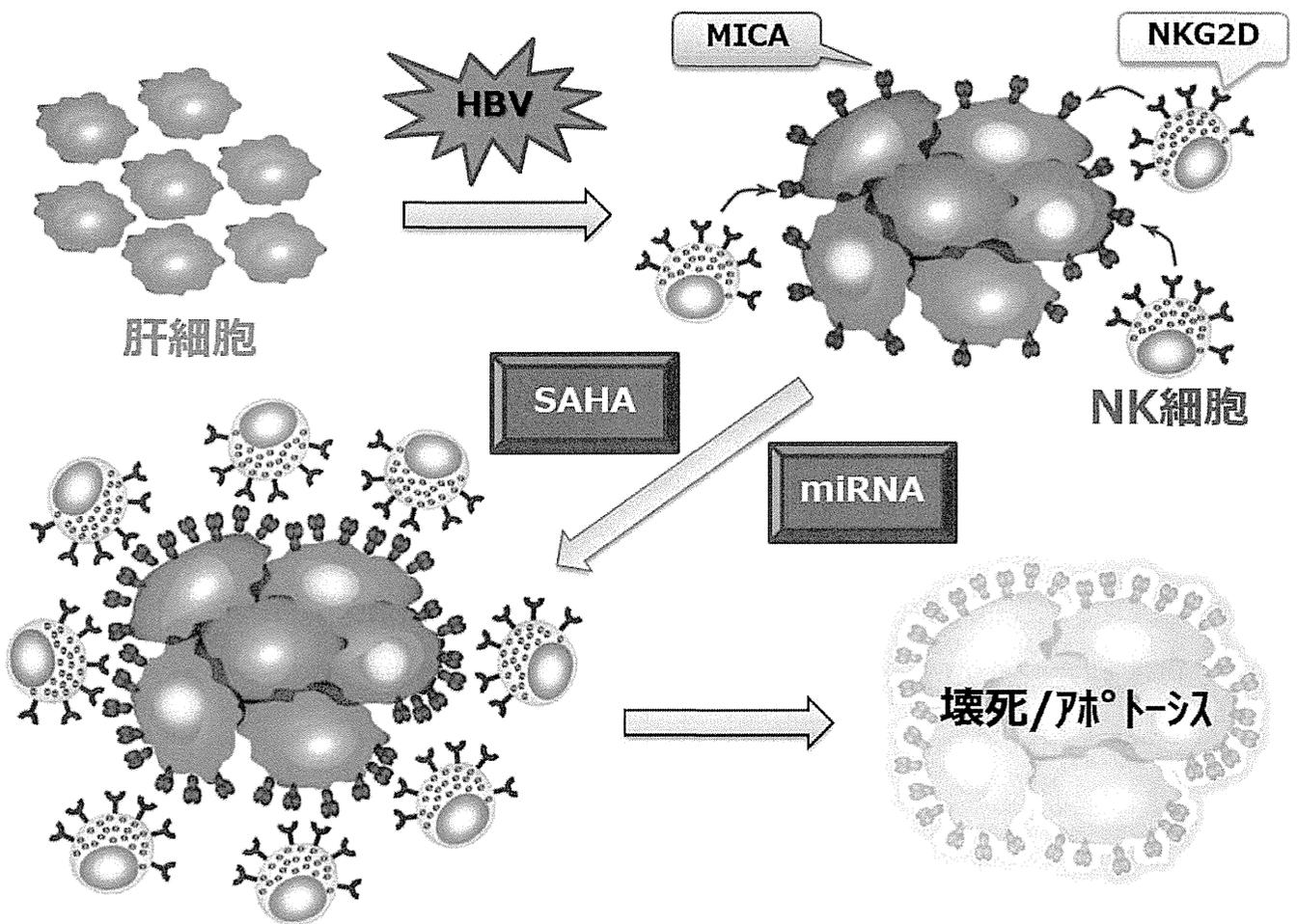
- (1) Lo PHY, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One* 2013; 8: e61279
- (2) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. *J Hepatol* 2013; 58: 875-882

•研究分担者(地主 将久)

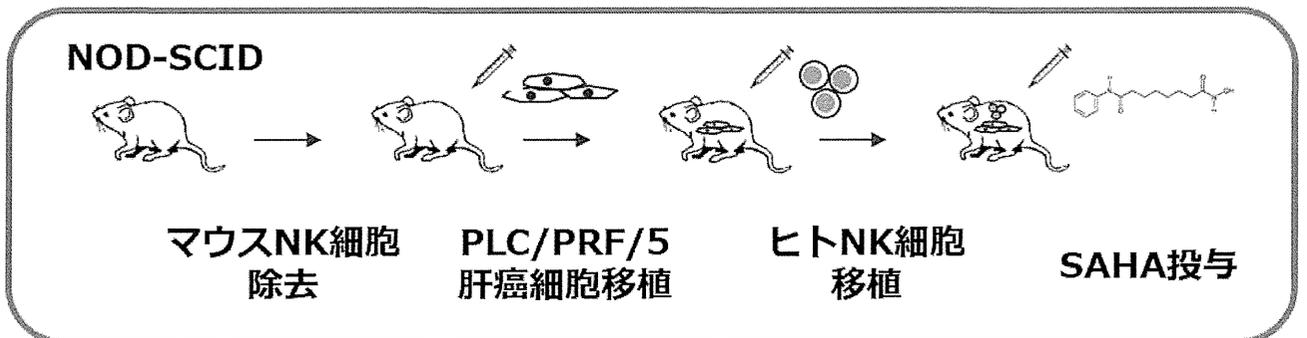
- (1) Yoneda A, Jinushi M. TIM-3 as an emerging target for immunotherapy in cancer management. *Immunotargets Ther* 2013; 2: 135-141
- (2) Jinushi M, Yagita H, Yoshiyama H, Tahara H. Putting the brakes on anticancer therapies: suppression of innate immune pathways by tumor-associated myeloid cells. *Trends Mol Med* 2013; 19: 536-545
- (3) Baghdadi M, Nagao H, Yoshiyama H, Akiba H, Yagita H, Dosaka-Akita H, Jinushi M. Combined blockade of TIM-3 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62: 629-637
- (4) Baghdadi M, Yoneda A, Yamashina T, Nagao H, Komohara Y, Nagai S, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Takeya M, Tahara H, Viollet B, Yagita H, Jinushi M. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. *Immunity* 2013; 39: 1070-1081
- (5) Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosaka-Akita H, Jinushi M. Cancer stem cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells. *Cancer Res* 2014; 74: 2698-2709
- (6) Jinushi M. Immune regulation of therapy-resistant niches: Emerging targets for improving anticancer drug responses. *Cancer Metastasis Rev* 2014; 33: 737-745
- (7) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014; 105: 1-8
- (8) Jinushi M. Yin and yang of tumor inflammation: how innate immune suppressors shape the tumor microenvironments. *Int J Cancer* 2014; 135: 1277-1285
- (9) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014; 105: 1-8
- (10) Baghdadi M, Jinushi M. The impact of TIM gene family on tumor immunity and immunosuppression. *Cell Mol Immunol* 2014; 11: 41-48
- (11) Jinushi T, Shibayama Y, Kinoshita I, Oizumi S, Jinushi M, Aota T, Takahashi T, Horita S, Dosaka-Akita H, Iseki K. Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4. *Cancer Med* 2014 (Epub ahead of print)

Ⅷ. (3年間の研究成果の)概要図等

肝癌細胞MICA発現増強によるNK細胞傷害性亢進



ヒト化マウス肝癌移植モデルでのSAHA抗腫瘍効果



- ① コントロールに比しSAHA投与群で有意に腫瘍退縮
 - ② SAHAの抗腫瘍効果はNKG2D阻害で減弱
- ⇒ SAHAによる抗腫瘍効果はMICA-NKG2D免疫応答による

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- ・昭和 61 年-平成 3 年 千葉大学医学部第一内科
- ・平成 4 年 国立がんセンター研究所ウイルス部
- ・平成 5 年-平成 20 年 東京大学医学部第二内科/消化器内科

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・小侯政男:元東京大学大学院医学系研究科消化器内科教授、現山梨県病院機構理事長
- ・下遠野邦忠:元京都大学ウイルス研究所教授、現千葉工業大学教授

・主な研究課題

- ・B 型肝炎
- ・C 型肝炎
- ・肝癌

・これまでの研究実績

- (1) Goto K, Kato N. MICA SNPs and the NKG2D system in virus-induced HCC. *J Gastroenterol* 2014 (Epub ahead of print)
- (2) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014; 49: 748-754
- (3) 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: E137-E144
- (4) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e91822
- (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: 42-48
- (6) 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: 5581-5590
- (7) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013; 58: 875-882
- (8) Lo PHY, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y,

- Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. PLoS One 2013; 8: e61279*
- (9) Goto K, Lin W, Zhang L, Jilg N, Shao RX, Schaefer EA, Zhao H, Fusco DN, Peng LF, Kato N, Chung RT. The AMPK-related kinase SNARK regulates hepatitis C virus replication and pathogenesis through enhancement of TGF- β signaling. *J Hepatol* 2013; 59: 942–948
- (10) Kumar V, Lo PHY, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e44743
- (11) Li Q, Yu CH, Yu JH, Liu L, Xie SS, Li WW, Yang X, Fan WB, Gai ZT, Chen SJ, Kato N. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2012; 7: e29928
- (12) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011; 43: 455–458
- (13) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2011; 2: 338
- (14) Chang J-H, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Guleng B, Dharel N, Shao R-X, Tateishi K, Jazag A, Kawabe T, Omata M. Double-stranded-RNA-activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not essential in interferon treatment. *Liver Int* 2010; 30: 311–318
- (15) Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 2465–2468
- (16) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 2009; 49: 1954–1961
- (17) Dharel N, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Otsuka M, Wang Y, Jazag A, Shao R-X, Chang J-H, Adler MK, Kawabe T, Omata M. Potential contribution of tumor suppressor p53 in the host defense against hepatitis C virus. *Hepatology* 2008; 47: 1136–1149
- (18) Shao R-X, Kato N, Lin L-J, Muroyama R, Moriyama M, Ikenoue T, Watabe H, Otsuka M, Guleng B, Ohata M, Tanaka Y, Kondo S, Dharel N, Chang J-H, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Absence of tyrosine kinase mutations in Japanese colorectal cancer patients. *Oncogene* 2007; 26: 2133–2135
- (19) Wang Y, Kato N, Amarsanaa J, Dharel N, Otsuka M, Taniguchi H, Kawabe T, Omata M. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 2006; 130: 883–892
- (20) Kato N, Ji G, Wang Y, Baba M, Hoshida Y, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Dharel N, Goto T, Shao R-X, Matsuura T, Ishii K, Shiina S, Kawabe T, Muramatsu M, Omata M. Large-scale search of single nucleotide

- polymorphisms for hepatocellular carcinoma susceptibility genes in patients with hepatitis C. **Hepatology** 2005; 42: 846–853
- (21) Hoshida Y, Kato N, Yoshida H, Wang Y, Tanaka M, Goto T, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Imazeki F, Yokosuka O, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8. **J Infect Dis** 2005; 192: 266–275
- (22) Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T, Omata M. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. **Hepatology** 2005; 41: 1004–1012
- (23) Shao R-X, Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Hoshida Y, Moriyama M, Kawabe T, Omata M. Acyclic retinoid inhibits human hepatoma cell growth by suppressing fibroblast growth factor-mediated signaling pathways. **Gastroenterology** 2005; 128: 86–95
- (24) Otsuka M, Kato N, Shao R-X, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, Taniguchi H, Moriyama M, Shiratori Y, Kawabe T, Omata M. Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. **Hepatology** 2004; 40: 243–251
- (25) Goto T, Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Moriyama M, Shiratori Y, Koike K, Matsumura M, Omata M. Synergistic activation of the serum response element-dependent pathway by hepatitis B virus x protein and large-isoform hepatitis delta antigen. **J Infect Dis** 2003; 187: 820–828
- (26) Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T, Moriyama M, Otsuka M, Shiina S, Shiratori Y, Ito Y, Omata M. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. **Hepatology** 2003; 37: 65–71
- (27) Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. **J Infect Dis** 2002; 186: 155–163
- (28) Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M. Hepatitis C virus core protein activates NF- B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. **J Biol Chem** 2001; 276: 16399–16405
- (29) Ono SK, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, Schinazi RF, Carrilho FJ, Omata M. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. **J Clin Invest** 2001; 107: 449–455
- (30) Goto T, Kato N, Ono-Nita SK, Yoshida H, Otsuka M, Shiratori Y, Omata M. Large isoform of hepatitis delta antigen activates serum response factor associated transcription. **J Biol Chem** 2000; 275: 37311–37316
- (31) Otsuka M, Kato N, Lan K-H, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances P53 function through augmentation of DNA-binding affinity and transcriptional ability. **J Biol Chem** 2000; 275: 34122–34130
- (32) Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K-H, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. **Hepatology** 2000; 32: 405–412
- (33) Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Lan K-H, Yoshida H, Carrilho FJ, Omata M. Susceptibility of

- lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. **J Clin Invest** 1999; 103: 1635–1640
- (34) Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan K-H, Carrilho FJ, Omata M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. **Hepatology** 1999; 29: 939–945
- (35) Masaki T, Okada M, Shiratori Y, Rengifo W, Matsumoto K, Maeda S, Kato N, Kanai F, Komatsu Y, Nishioka M, Omata M. pp60c-src activation in hepatocellular carcinoma of humans and LEC rats. **Hepatology** 1998; 27: 1257–1264
- (36) Kato N, Lan K-H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. **J Virol** 1997; 71: 8856–8859
- (37) Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, Imazeki F, Hashimoto E, Hayashi N, Nakamura A, Asada M, Kuroda H, Tanaka N, Arakawa Y, Omata M for the Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. **Gastroenterology** 1997; 113: 558–566
- (38) Togo G, Toda N, Kanai F, Kato N, Shiratori Y, Kishi K, Imazeki F, Makuuchi M, Omata M. A transforming growth factor type II receptor gene mutation common in sporadic cecum cancer with microsatellite instability. **Cancer Res** 1996; 56: 5620–5623
- (39) Niwa Y, Matsumura M, Shiratori Y, Imamura M, Kato N, Shiina S, Okudaira T, Ikeda Y, Inoue T, Omata M. Quantitation of α -fetoprotein and albumin messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 1996; 23: 1384–1392
- (40) Kanai F, Shiratori Y, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Kanegae Y, Saito I, Nakabayashi H, Tamaoki T, Tanaka T, Lan K-H, Kato N, Shiina S, Omata M. Gene therapy for alpha-fetoprotein-producing human hepatoma cells by adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. **Hepatology** 1996; 23: 1359–1368
- (41) Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M, Ogura K, Niwa Y, Kawabe T, Omata M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. **Hepatology** 1995; 22: 1027–1033
- (42) Kawai S, Imazeki F, Yokosuka O, Ohto M, Shiina S, Kato N, Omata M. Clonality in hepatocellular carcinoma: analysis of methylation pattern of polymorphic X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase gene in females. **Hepatology** 1995; 22: 112–117
- (43) Komatsu Y, Shiratori Y, Kawase T, Hashimoto N, Han K, Shiina S, Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Tada M, Ikeda Y, Tanaka M, Omata M. Role of polymorphonuclear leukocytes in galactosamine hepatitis: mechanism of adherence to hepatic endothelial cells. **Hepatology** 1994; 20: 1548–1556
- (44) Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Komatsu Y, Shiina S, Kawabe T, Kawase T, Toyoshima H, Ihori M, Shiratori Y, Omata M. Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 1994; 20: 1418–1425
- (45) Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, Ito Y, Ohto M, Omata M. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: increase of the virus in advanced liver disease.

Hepatology 1993; 18: 16–20

- (46) Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, Ito Y, Ohto M, Omata M. Detection of hepatitis C virus RNA in acute non-A, non-B hepatitis as an early diagnostic tool. **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 192: 800–807
- (47) Hosoda K, Omata M, Yokosuka O, Kato N, Ohto M. Non-A, non-B chronic hepatitis is chronic hepatitis C: a sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA in the liver. **Hepatology** 1992; 15: 777–781
- (48) Hosoda K, Omata M, Yokosuka O, Kato N, Ohto M. Nucleotide sequences of 5′–1′ of hepatitis C virus in patients with chronic liver disease. **Gastroenterology** 1992; 102: 1039–1043
- (49) Omata M, Yokosuka O, Takano S, Kato N, Hosoda K, Imazeki F, Tada M, Ito Y, Ohto M. Resolution of acute hepatitis C after therapy with natural beta interferon. **Lancet** 1991; 338: 914–915
- (50) Hosoda K, Yokosuka O, Omata M, Kato N, Ohto M. Detection and partial sequencing of hepatitis C virus RNA in the liver. **Gastroenterology** 1991; 101: 766–771
- (51) Kato N, Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Ohto M. Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. **J Clin Invest** 1990; 86: 1764–1767

平成26年度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）
 研究発表会
 2015/1/27(火)
 国立国際医療研究センター国府台病院

B型肝炎における自然免疫の機能解明と その制御による発癌抑止法開発

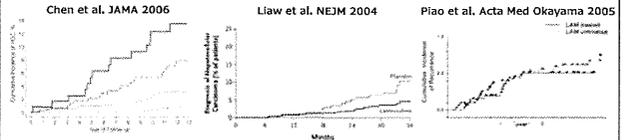
東京大学 医科学研究所
 先端ゲノム医学分野
 加藤 直也



B型肝炎においては、抗ウイルス療法とは異なる 肝発癌抑止戦略が必要である

B型肝炎は核酸アナログによりコントロール可能な病気になりつつある

- 経口薬でほとんど副作用がない
- HBV増殖を抑えHBV DNA量を劇的に減らす
- ALT値を下げる(正常化させる)
- 肝組織所見を改善させる
- エンテカビル/テノホビルでは耐性出現もほとんどない

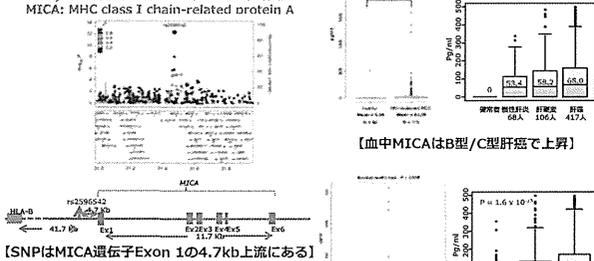


肝機能正常でも HBV DNA量に応じて 0.1~1%/年の発癌
 ラミブジン治療でも 発癌リスク低下は たかだか1/2
 ラミブジン治療しても 肝機能は良くなるが 肝発癌の再発は減らない

われわれの研究では、HBV DNA組み込み由来HBxが肝発癌に重要な役割をしており、核酸アナログによる肝炎沈静化・肝硬変の抑止だけでは発癌を回避できない可能性があり、抗ウイルス療法とは異なる肝発癌抑止戦略が必要である

B型およびC型肝炎における肝発癌には MICAが重要な役割を果たしている

B型/C型肝炎関連SNPはMICAに存在
 MICA: MHC class I chain-related protein A

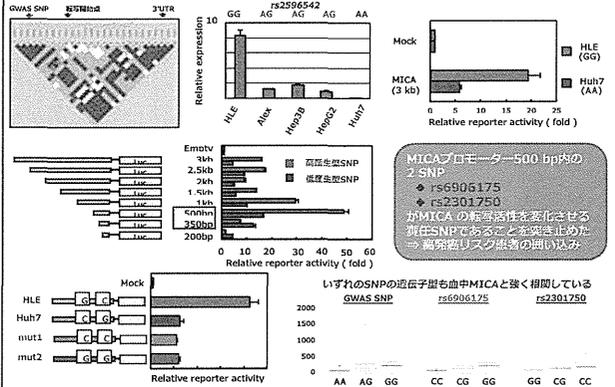


【SNPはMICA遺伝子Exon 1の4.7kb上流にある】
 B型およびC型肝炎発癌においては MICA/自然免疫が 重要な役割を担っている
 【B型/C型肝炎で血中MICAはAA<AG<GG】

Nature Genetics 2011, PLoS One 2012

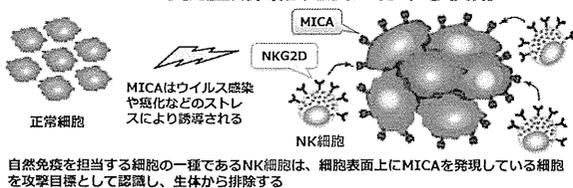
MICAの発現調節機構の解明~MICA発現調節のための基礎的検討~

MICA locusのSNPは広範囲に強い linkage disequilibrium
 肝癌細胞株においてもMICA SNP遺伝子型が mRNA発現量を規定している
 MICAプロモーター上のSNPにより その転写活性が異なる

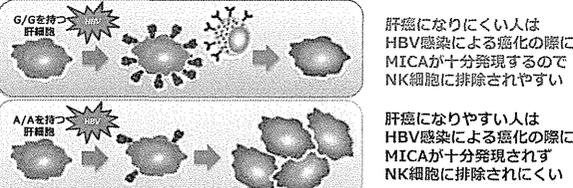


MICAプロモーター500 bp以内の2 SNP
 ◆ rs6906175
 ◆ rs2301750
 がMICAの転写活性を変化させる
 両SNPであることを実証した
 ⇒ 発癌リスク増強の鍵い込み

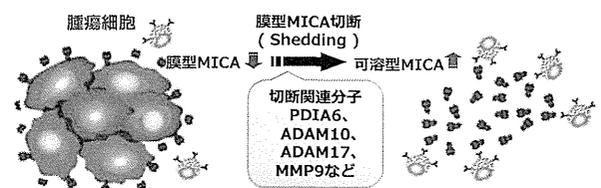
MICAの抗腫瘍自然免疫における役割



MICA発現量を規定する遺伝子多型が肝癌感受性を決定する作業仮説



B型肝炎では膜型MICAの切断により可溶性MICAが増え、可溶性MICAはdecoyとして働き、NK細胞のサーベイランスを回避している可能性がある



- ◆ HBx蛋白はMICA切断関連分子を誘導する (Lara-Pezzi et al. J Clin Invest 2002)
- ◆ 肝癌細胞は可溶性MICAによりNK細胞傷害から逃避している (Jinushi et al. J Hepatol 2005)
- ◆ HBV感染により可溶性MICAが増加する (Ohno et al. Oncotarget 2014)

創薬を目指した戦略

自然免疫機構の制御により

- ① B型肝炎を抑制
- ② B型肝炎を治療
- ③ HBV感染細胞を排除するには、

1. 膜型MICA発現を増やす
2. HBVによる自然免疫回避機構を解明し克服する
 - 1) 可溶性MICAを減らす = MICA切断関連分子を阻害
 - 2) 新規自然免疫回避機構の解明
3. NK細胞を増やす/活性化する
4. MICA-NKG2Dシステムを強化する

創薬標的

1. 膜型MICA発現を増やす

~FDA承認済み化合物ライブラリーを用いたスクリーニング: Drug Repositioning~

PLC/PRF/5 (B-HCC) stable cell

MICAP +10k -10k 1k 100k 10k

プロモーター領域 = 1kb

Puromycinで選択

FDA 640種

生涯活性/安全性が既知の承認薬を用いており最適化が早まる

Vorinostat

MICA発現レベル

PLC/PRF/5 未処理 Vorinostat MICA 発現抑制 MICA 発現促進

Vorinostat, Tranilast が複数のMICA発現促進薬を抑制

Vorinostat は

- 肝がん治療薬
- 皮膚がん治療薬 (TACE阻害剤)
- アルブミン がん化誘発・腫瘍抑制
- 白血病、大腸癌、乳癌等に治療 (米国)
- HDAC阻害薬はMICA発現を誘導する
- Tranilastはアルレル十一酸系治療薬

in vitroにおけるVorinostatの抗B型肝炎効果の検証

Vorinostat 処理後PLC/PRF/5細胞 に対するNK細胞傷害性増強

Vorinostat 処理後PLC/PRF/5細胞 に対するNK細胞傷害性増強の MICA抗体による中和

Vorinostat 処理によりB型肝炎感染細胞の膜型MICA発現増強を介してNK細胞傷害性が促進された

非臨床試験: マウスモデルによるVorinostatの抗B型肝炎効果の検証

NOD-SCID マウスNK細胞 除去

PLC/PRF/5 肝臓細胞移植

ヒトNK細胞 移植

Vorinostat 投与

Relative tumor size

Days of treatment

Vorinostat の効力に由来するNK細胞の効力増強が、HBV複製抑制効果、安全性の向上、肝臓癌の抑制、HBV感染細胞の排除、抗がん効果の薬的効果、肝臓癌の抑制

Vorinostat の副作用に関して製薬企業と協議中

約800種のHDAC阻害薬スクリーニングに期待

カスタムライブラリーを構築中

MICA発現促進薬のハイスクリーンスクリーニング (この月/隔月/隔年) に実施済み

2. HBVによる自然免疫回避機構を解明し克服する

1) 可溶性MICAを減らす = MICA切断関連分子を阻害

MICA切断関連分子を阻害し可溶性MICAを減らすことによりB型肝炎抑制/止/B型肝炎治療/HBV感染細胞排除を目指す

規程に肝臓癌に用いられている唯一の分子標的薬であるSorafenibはMICAの発現を抑制して腫瘍増殖を抑制しているとの報告あり Koiga K et al. Sorafenib inhibits the shedding of MICA on HCC cells by down-regulating a disintegrin & ADAMs. Hepatology 2010

HepG2 vs HepG2.2.15 (内因性のMICA重蛋白)

HBV感染により可溶性MICAが増加する => HBVによる細胞性自然免疫回避機構

Oncotarget 2014

ADAM10阻害薬: GI254023X OPIC/PRF/5 細胞に対するNK細胞傷害性を検討

MICA切断を阻害する化合物のスクリーニング

NanoLuc-MICA NanoLuc MICA

Puromycinで選択

化合物1280種

Luc assay

可溶性MICA (上清中Luc)/膜型MICA (細胞中Luc)よりMICA切断割合をスクリーニング

TAPS-1 (ADAM inhibitor) (Positive Control) B94 (ADAM inhibitor) (Positive Control)

上清中Luc/細胞中Lucの比率が高い化合物を優先

細胞MICAを増加させるかどうかPACSで検証

前もった化合物の候補を絞り込むこともできない

より効率的なMICA切断阻害薬の探索

MICA切断分子阻害薬によりB型肝炎感染細胞に対するNK細胞傷害性が増強した

抗CTLA-4抗体 (Ipilimumab) は内因性抗MICA抗体を誘導する

YERVOY (ipilimumab) Injection

200mg/50mL

2011年進行性メラノーマに対してFDA承認

Jinushi. Immunol Rev 2008

製薬企業による臨床開発へ

2) 新規自然免疫回避機構の解明

Hep3B 細胞

組み込みHBV DNA由来の Fusion HBx を発現している

Truncated HBx Human sequence

Hep3B vs Fusion HBx KD Hep3B

cDNA array

Fusion HBxにより

ULBP1 - NKG2D

NGR1, Lg3 - MICA/D2

共にNK細胞傷害性が減少

組み込みHBV DNA由来 Fusion HBx による新規自然免疫回避機構

MTT assay

Relative cell proliferation

Time (hr)

Mock 細胞

KD 細胞

Number of cells

P < 0.001

Fusion HBx KD Hep3Bは

- 増殖能が増える
- 浸透能が増える
- 足場依存性増殖しない
- ノードマウスに感染しない

3. NK細胞を増やす/活性化する

Z-NK[®]細胞 (細胞傷害活性を著しく高めたNK細胞) 療法 (テラ株式会社・東大医科開発センター)

Saito et al. Hum Gene Ther Methods 2013

共同研究開発を検討中

4. MICA-NKG2Dシステムを強化する

MICAを認識するNKG2DのB型肝炎癌における役割の検討

HBx-TGモデル (B型肝炎癌モデル)

免疫細胞 (NK細胞など)

HBx-TGモデル x NKG2D-KO

解析を急ぐため +化学発癌 (DEN) と同時に解析

発癌 肝細胞

B型肝炎癌に対するNKG2Dアゴニスト抗体療法の検討

HBx-TGモデル (B型肝炎癌モデル)

NKG2D-Fc (アゴニスト)

EBV発癌モデル

NKG2Dアゴニスト 特許申請No.20100111973 2014年4月に BMSにライセンスアウト 共同研究にてハーバード大学 で臨床試験準備段階

Zheng et al. Cell 2011

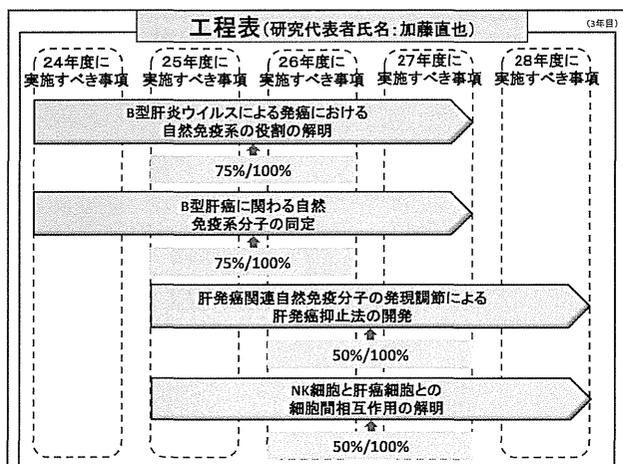
コントロール

NKG2Dアゴニスト

Relative cell proliferation

P < 0.0001

30k4 NKG2D アゴニスト



【別添4】

利益相反について

利益相反の有無等(平成26年度)

ア 利益相反の有無 無

【別添5】

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服政策研究事業」または「肝炎等克服実用化研究事業」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

【別添6】

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成26年度)

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。

平成 26 年度 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『成果概要』

研究課題：B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-009

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：藤田 尚志

所属研究機関、部局：京都大学、ウイルス研究所

職名：教授

委託費(決定額)：1年目 260,000,000 円 2年目 230,000,000 円 3年目 242,000,000 円
計 732,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎ウイルス (HBV) は持続感染となった場合、完治させる治療法がなく、肝硬変、肝臓がんの原因となっており、新たな治療法の開発が期待されている。
- (2) HBV はヒトの肝臓で増殖するが、実験的にはヒト肝移植マウスなどの特殊な系以外では増殖不可能である。抗ウイルス薬剤の開発には培養細胞、動物モデルの確立は重要である。
- (3) ウイルスは免疫系を阻害することによりその存在を図っているが、その機構の解明は HBV に対する新たな治療法の開発に必須である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 自然免疫は細胞に備わるウイルス増殖抑制機構であり、その活性化はウイルスの感染排除に重要と考えられるが、HBV に対する自然免疫機構の解明が進んでいない。
- (2) HBV による免疫系の阻害機構を解明し、新たな治療法の開発の基盤とする。
- (3) 複数のストラテジーによって HBV 感染の治療法の糸口を開発することにより、新たな薬剤の開発、遺伝子治療法の開発へつなげる。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

- (1) ヒト自然免疫マイクロアレイによるウイルス感染による遺伝子活性化モニター法を確立した。
- (2) 天然二重鎖 RNA をマウスに経口投与し、各種組織でインターフェロン系を活性化し、EMCV ウイルスによる致死率が減少する事を確認した。マウスを用いた HBV 感染予防・治療への応用が可能である。
- (3) HBV の受容体として報告されたヒト NTCP を HepG2 細胞に発現させた。この細胞は HBV 粒子からの感染が可能であった。この細胞で細胞質ウイルス RNA センサーである RLR の機能を阻害すると HBV 増殖が高率に増加した。以上より HBV は RNA センサーによって感知され、増殖が制御されていると考えられた。
- (4) ヒト NTCP を肝臓で発現するトランスジェニックマウス系統を樹立した。

・研究分担者(加藤宣之)

- (1) HBV 蛋白質 (遺伝子型 C) は宿主の DNA センサーの機能を抑制しない事を見出した。DNA センサー、cGAS は肝由来ヒト細胞株で発現が高く、HBV 感染制御に関与する可能性が考えられた。

・研究分担者(土方誠)

- (1) ヒト不死化肝細胞HuS-E/2細胞の自然免疫機構を解析し、ウイルス感染の初期応答はI型IFNとIII型IFNの相乗作用によることを見出した。I型だけでなくIII型IFNも用いる治療法が有効と考えられた。
- (2) HBV受容体NTCPを発現させたHuS-E/2細胞を作成し、HBV粒子からの感染が起きる事を見出した。しかしHBV感染後、HBV RNAが転写されるが、初期に転写抑制が観察され、抑制機構の存在が考えられた。
- (3) HBV粒子産生系に薬剤ライブラリーで処理することで粒子産生が上昇させるものを数種類見出した。解析の結果、これらの薬剤の標的因子がHBV遺伝子複製や粒子産生を抑制していると考えられた。

・研究分担者(松浦善治)

- (1) NK細胞はHBV産生細胞の、HBV-DNAの複製の抑制活性を示した。しかし、HBV感染細胞とNK細胞を共培養するとNK細胞の活性化能(IFN γ 産生能)が抑制された。しかしIL12やIFN α によってNK細胞を強制的に活性化すると、抑制が解除され、IFN α による抗HBV治療を行う上で、IL12の併用の可能性が示唆された。
- (2) *In vitro*のHBV感染系ではHBVに対する強い自然免疫応答は観察されなかった。
- (3) ヒトNTCPのトランスジェニックマウスを作製し、HBV感染実験を開始した。

・研究分担者(柘植雅貴)

- (1) ヒト肝細胞キメラマウスにB型肝炎ウイルスを接種し、経時的にヒト肝細胞内の遺伝子発現変化を次世代シーケンサーによって解析した。その結果、HBV感染8週間後に137遺伝子が発現亢進、18遺伝子が発現抑制された。発現亢進した遺伝子について、HBV感染による転写活性の変化と生理機能の解析を行なった。

・研究分担者(渡邊綱正)

- (1) HepG2細胞へ1.24倍長HBVゲノム保有プラスミドを導入することによりIII型IFN(IFN- λ)が誘導され、さらに導入HBV Genotypeによりその程度に差を認めた。
- (2) ヒト初代肝細胞でHBV感染によって自然免疫応答、特にIII型IFNが誘導されることを見出した。

・研究分担者(水腰英四郎)

- (1) B型慢性肝炎患者の各病態における樹状細胞数と表面マーカーの特徴を明らかにした。
- (2) B型慢性肝炎患者樹状細胞の発現遺伝子解析を行い、各病態における発現遺伝子パターンを同定した。
- (3) 上記結果より、B型慢性肝炎患者の樹状細胞機能に影響を与える遺伝子の一部を明らかにした。

・研究分担者(竹原徹郎)

- (1) NK細胞には、NK細胞活性型レセプターNKp46と抑制型レセプターNKG2Aとを共に強発現しているNKp46^{high}NKG2A^{high}分画が存在していた。このNKp46^{high}NKG2A^{high}分画は、強い細胞傷害活性とサイトカイン分泌能を有しており、IFN治療で著明に増加する事を見出した。

・研究分担者(斎藤泉)

- (1) 抗HBV複製効果を示す新規shRNAを複数同定した。また、アデノウイルスベクターで唯一残存していたウイルス由来産物であるVA RNA発現を欠失した高力価新規VA欠失AdVの作製に世界で初めて成功し、このベクターを用いる方がshRNAの活性が上昇することを示すとともに、従来のAdVから発現していたVA RNAにより細胞側の複数の遺伝子発現に影響を受けていたことを明らかにし、現在本研究で用いているVA欠失AdVの有用性と安全性を証明した。
- (2) 抗HBV効果を検討するために必須である高率、かつ簡便なHBVゲノム複製機構解析システムをCMV

プロモーターとアデノウイルスベクターの利点を組み合わせ開発したことにより、CCC 及び RC を効率的かつ定量的に測定することが可能になった。これらのベクターを班員に供給している。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) ヒト NTCP を発現させた HepG2 細胞から自然免疫関連遺伝子のノックダウン、ノックアウトにより HBV が高率で複製する細胞を作製する。その細胞を用いて抗ウイルス化合物のスクリーニングを行なう。
- (2) マウスを用いた HBV 感染モデルの作製を目指す。ヒト NTCP を肝臓で発現するトランスジェニックマウスを作製し、マウスの遺伝的背景（自然免疫、獲得免疫に関するもの）を変更することにより HBV 感受性マウス系統を樹立する。
- (3) HBV 感染マウスモデルが確立したら、HB に対して誘導される免疫応答を検討し、解明する。
- (4) 自然免疫を誘導する細胞質センサーである cGAS, 及びそのシグナルアダプターである Sting の HBV 感染における関与を、岡山オリジナル肝細胞株を用いて明らかにする。
- (5) 不死化ヒト肝細胞 HuS-E では HBV 感染後にウイルス遺伝子発現が抑制されるがその機構を明らかにする。同細胞を用いた化合物スクリーニングで得られた、HBV の増殖を阻害あるいは促進する化合物の作用機構を明らかにし、その成果を基に治療薬の開発を行なう。
- (6) ヒト肝キメラマウスで HBV によって誘導される宿主遺伝子群の解析を進め、その生理的意義を解明することによって新規 HBV 治療法の開発を目指す。
- (7) ヒト肝キメラマウスでの解析により NK 細胞の抗 HBV 応答への関与が示唆された。in vitro, in vivo でヒト肝とヒト NK 細胞が共存する系を樹立し、詳細な検討を行う。
- (8) HBV 感染者の樹状細胞の解析結果から得られた知見をもとに、樹状細胞を培養してその機能を回復させ治療に用いる（樹状細胞ワクチン）新規治療法の開発につなげる。
- (9) NK 細胞、特に NKp46^{high}NKG2A^{high} 分画による HBV 排除のメカニズムを明らかにし、抗ウイルス治療効果との関連を解析する。また、同分画を増加させる、あるいは活性を増強させる薬剤の開発を目指す。
- (10) 複数の shRNA を同時に細胞に導入できる実用的なアデノウイルスベクターを開発する。特に複数の発現単位を導入することによって生じる恐れのある相同組換えを起こさないベクターの開発を目指す。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

- (1) 新規抗 HBV 薬の開発が可能となる。
- (2) HBV 遺伝子型によるテーラーメイド医療が可能になる。
- (3) HBV 感染患者の樹状細胞のマーカーを指標とした HBV 排除に向けた新しい治療方法、治療ガイドラインの開発が可能になる。
- (4) NK細胞の正常な活性化を維持する事による新たなHBV治療法の開発が期待される。
- (5) HBV に対する遺伝子治療の基礎が確立される。

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新規治療法を基盤とした HBV 対策のためのガイドラインの作成

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究分担者（土方誠）

- (1) 特許登録：山口達哉、瀬川昌也、溝上雅史、田中靖人、下遠野邦忠、土方 誠、肝炎ウイルスの増殖方法、及びその利用、特許第 5327793 号、登録日：平成 25 年 8 月 2 日

研究分担者（柘植雅貴）

(1) Tsuge M, Chayama K. Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol* 2013;48:779-80.

(2) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol* 2013;48:1188-204.

研究分担者 (渡邊綱正)

(1) Arata S, Nozaki A, Takizawa K, Kondo M, Morimoto M, Numata K, Hayashi S, Watanabe T, Tanaka Y, Tanaka K. Hepatic failure in pregnancy successfully treated by online hemodiafiltration: Chronic hepatitis B virus infection without viral genome mutation. *Hepatol Res*, 2013 in press.

(2) Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Application of a Newly Developed High-Sensitivity HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Patients with HBsAg Seroclearance. *J Clin Microbiol*, 51; 3484-91, 2013.

研究分担者 (斎藤 泉)

(1) Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda H, Ono Y, Kondo S, Saito I, Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Sci Rep*, 3:1136, 2013.

VIII. (3年間の研究成果の)概要図等

本研究の概略図に3年間の研究成果を赤字で示した。

