

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成26年(2014年)4月

目 次

- . 総括研究報告
 - 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・・・1
茶山 一彰

- . 分担研究報告
 - 1. 免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる・・・9
マウスモデルの作製に関する研究
瀬谷 司

 - 2. B型肝炎ウイルスの持続感染時における自然免疫応答回避メカニズムの・・・12
解明に関する研究
加藤 博己

 - 3. キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学的および遺伝子・・・16
タンパク質発現解析・新規モデルの作製
立野 知世

 - 4. TALE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・・・23
山本 卓

 - 5. 次世代シーケンスを用いたB型肝炎血中体液マイクロRNAの網羅的解析・・・26
田原 栄俊

 - 6. 抗HBV免疫応答を惹起する新規肝炎モデルマウスの開発・・・30
in vitro HBV感染系の樹立
丸澤 宏之

 - 7. The discovery of host restriction factors required for HBV entry・・・36
(infection) into mouse cells
Hussein H Aly

 - 8. B型肝炎ウイルス蛋白質の抗インターフェロン活性およびウイルス粒子形成にお
ける役割・・・40
坂口 剛正

9 . 肝炎モデルの改良と新規 HBV 感染モデルマウスの作製	44
阿部 弘美	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
. 研究成果の刊行物・別刷り	59

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
研究総括報告書（平成25年度）

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

研究代表者 茶山一彰 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨： NOG-SCIDを背景としたマウスにヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスにB型肝炎ウイルスを感染させB型肝炎キャリアモデルを作製した。感染成立後にヒト免疫細胞を移植し、慢性B型肝炎モデルを作製した。従来のuPA/SCIDマウス背景のB型肝炎ウイルスキャリアモデルおよび肝炎モデルと比較して、NOG-SCID背景のマウスの方がヒトアルブミン産生量は低く、ヒト肝細胞への置換率が低かったが、置換率が低くてもHBVの感染効率はuPA-SCIDと同等であった。統計学的な有意差はなかったがNOG-SCID背景のマウスの方が死亡率も低かった。どちらのマウスもヒト免疫細胞の投与により肝炎が発症した。uPA-SCIDマウスは劇症肝炎用の肝炎を発症し、ヒト肝細胞が急速消失した。この肝炎の主な炎症起細胞はNK細胞であることが見いだされた。これに対して、TK-NOG背景のマウスでは劇症型ではなく緩やかな肝炎が起こり、ヒトアルブミン値の低下、血清中HBV DNAの低下を認め、発症機序としてはCTLを介した反応であることが示唆された。また、HBVを産生するトランスジェニックマウスを3系統樹立した。さらにヒトiPS細胞より成熟肝細胞を誘導しHBV感染が引き起こされるかどうか検討を行った。iPS細胞由来の成熟肝細胞は肝特異的遺伝子であるAFPの発現やアルブミンの産生が認められた。昨年HBVレセプターの候補としてsodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が報告された。NTCPを恒常的に発現するNTCP-HepG2細胞株を樹立し、in vitroでのHBV感染系を作製した。cccDNA排除に向けた研究では、HBV coreを標的としたCRISPR/Casシステムを用いるとHBV複製中間体は1/5まで減少することを認めた。HBVの各蛋白をそれぞれ細胞に発現させたところPolymerase蛋白が細胞の蛋白合成全般を抑制することを見出した。

【研究分担者】	瀬谷 司	北海道大学大学院	教授
	加藤 博己	京都大学ウイルス研究所	准教授
	立野 知世	(株)フェニックスバイオ	取締役研究開発部長
	山本 卓	広島大学大学院	教授
	田原 栄俊	広島大学大学院	教授
	丸澤 宏之	京都大学大学院	講師
	Hussein H Aly	国立感染症研究所	主任研究官
	坂口 剛正	広島大学大学院	教授
	阿部 弘美	広島大学大学院	准教授

A. 研究目的

我々は、ヒトの免疫細胞とヒトの肝細胞をもちいて B 型肝炎のマウスモデルおよびヒト肝細胞による HBV の完全なライフサイクルを再現する継代培養系を構築した。これにより HBV の持続感染メカニズムと免疫反応に関する広範な研究が可能となった。昨年 HBV のエンターレセプターとして NTCP が見出されたことにより NTCP 安定発現株を用いて新規の *in vitro* HBV 感染培養系も構築された。本研究ではこれらのモデル動物、細胞培養系を用いて肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究、HBV 感染マウスと新規培養系を用いた創薬研究、cccDNA の排除、転写制御に関する研究を中心に行う。

B. 研究方法

肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究

従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスを 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 型肝炎モデルを作製し、ヒトの B 型肝炎発症を再現するモデルを作製する。また、移植するヒト肝細胞をヒト iPS 細胞から誘導した成熟肝細胞も用いてヒト肝細胞キメラマウスを作製し HBV 感染モデルとして利用可能か検討する。また、Cre-loxP システムを利用した肝細胞特異的に HBs 抗原蛋白を発現しヒトの肝炎を模倣するモデルマウスを作製する。さらに HBV を産生するトランスジェニックマウスの作製を行う。これらのモデルを

用いて肝炎の発症機序、HBV 感染細胞内での自然免疫応答、HBV 粒子形成機構を詳細に検討する。

C. 研究成果

肝炎モデルの改良と感染肝細胞の排除に関する研究

NOG-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 型肝炎モデルを作製した。NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスは従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスに比べるとヒトアルブミンの産生量は uPA/SCID の方が高いが、NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスの方がヒト肝細胞への置換率が低くても HBV 感染効率が良好で、死亡率も低かった(Kosaka et al., BBRC, 2013)。ヒト免疫細胞を HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに移植するとヒトアルブミン値の低下、血清中 HBV DNA の低下が認められ、既存の uPA/SCID を背景としたヒト肝細胞マウスを用いた劇症肝炎モデルとは肝炎の発症機序が異なる CTL を介した炎症反応が比較的緩やかな肝炎モデルを作製することができた(阿部班員、茶山班長)。また、ヒト iPS 細胞由来のヒト肝細胞を SCID マウスへの移植する肝細胞として使用可能かどうか検討を行った結果、ヒト成熟肝細胞へ誘導した細胞の 20-50% の細胞で肝特異的遺伝子であるアルブミン、フェトプロテインの発現が認められ、HBV を接種した結果、ヒト iPS 細胞由来の肝細胞内で HBV 複製中間体が検出された。このことからヒト iPS 細胞由来

の肝細胞でも HBV 感染は可能であることが示唆された(阿部班員、茶山班員)。また、uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスでは長期飼育を行った場合、uPA 遺伝子の欠失が起こることが知られていた。HBV 感染による慢性肝炎モデルの作製に向けて uPA 遺伝子の欠失が起こらないシステムにするため cDNA-uPA/SCID マウスを作製し、ヒト肝細胞を移植してヒト肝細胞キメラマウスを作製したところ 20 週間の長期飼育が可能となった(立野班員)。この HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの長期飼育により HBV 感染させなかったヒト肝細胞キメラマウス HBV 感染マウスに比較してアポトーシス関連の遺伝子の発現の上昇、細胞増殖に関連する遺伝子の発現低下、細胞の肥大化が認められた(立野班員)。また、HBV を産生する 1.4 倍長の HBV ゲノムを組み込んだ HBV トランスジェニックマウスを作製し 3 系統を樹立した。このうち 2 系統#31, #84 は血清中 HBV DNA 量は、いずれも 5 log copy/ml 以上であったが HBs 抗原量はいずれも 0.3-0.5IU/ml、HBe 抗原量は 10-20IU/ml と低値であった。反対に、残りの 1 系統#K では血清中 HBV DNA は 4-5 log copy/ml と低値であったが HBs 抗原量は 12 IU/ml、HBe 抗原量は 110 IU/ml と高値であった。HBV の core 蛋白の発現を調べたところ#31 では肝臓でのみ core 蛋白は発現し、#K では肝臓、腎臓で core 蛋白が発現していた。これら 3 系統について受精卵を保存した(阿部班員、茶山班員)。HBV エントリーレセプターとして NTCP が報告されたことを受け、ヒト NTCP 発現トランスジェニックマウスの作製を開始し

た。この動物実験は大臣確認実験と定められているため現在大臣確認申請中である(加藤班員)。

HBV 感染マウスと新規 HBV 培養系を用いた創薬研究

HBV のエントリーレセプターとして報告されたヒト NTCP を恒常的に発現する NTCP-HepG2 細胞を樹立した。NTCP の発現は蛋白レベルで検出可能であったが感染が成立しない細胞(Hussein 班員)感染効率が低い細胞(加藤班員)があり感染効率を上昇させる工夫が必要である。また、NTCP-HepG2 を用いて siRNA ライブラリーによる HBV 感染に関わる宿主因子のスクリーニングを進行中である。さらに HBV のライフサイクルに係る宿主因子として 500 個あるキナーゼのスクリーニングを行った結果現在までに HBV の複製に係るキナーゼとして 4 遺伝子、HBV の増殖抑制に関わる遺伝子として 5 遺伝子を見出した。これら 5 遺伝子のうちのひとつである TSSK2 はインターフェロン非依存性に働くことを確認した(Hussein 班員)。宿主側の解析では、マウスへ HBV 発現プラスミドを hydrodynamics 法により導入した実験系で ISG20 が HBV の複製を阻害していることを証明した。ISG20 の発現誘導機序としては、HBV 感染を感知した分子が細胞質内の IPS-1, TICAM-1 の両者を介して IRF3 を活性化し type I インターフェロンを誘導させ IFNAR を介して ISG20 の発現が誘導されることが証明された(瀬谷班員)。一方、ウイルス側の検討では、HBV は感染性のウイルス粒子である Dane 粒子を細胞外へ放出するが Dane 粒子だけでなく粒子内

に HBV ゲノムを持たない外側蛋白のみの中空の粒子を大量に放出することが知られている。HBV 粒子の細胞外への放出機構を詳細に調べるために細胞に preS1-preS2-S, preS2-S, S, preCore-Core, Core, HBe をそれぞれ単独で導入するとすべての蛋白が培養上清中に分泌された。Core 蛋白の C 末端にはアルギニンに富んだ領域が存在するがアルギニンの数を削っていくと Core 蛋白の培養上清中への分泌がなくなることから Core 蛋白の分泌には C 末端のアルギニンが重要であることが明らかになった。また HBV の各蛋白質のインターフェロンシグナル伝達への影響を調べるために HBV 蛋白と IFNB, IRF3, IFN stimulation responsive element (ISRE) のレポータープラスミドを共発現させセンダイウイルス Cantell 株を感染させてレポーター遺伝子の転写活性への影響を調べた。その結果 Polymerase 蛋白は対照の海シイタケルシフェラーゼ活性も強く抑制し、転写プロモーターを変えても抑制効果は変わらなかったことから Polymerase 蛋白は細胞の蛋白合成全体を抑制していることが示唆された (坂口班員)。さらに Polymerase 蛋白をドメイン毎に分けて発現させると逆転写酵素 (RT) ドメインに強力な蛋白質合成抑制作用があることが見出された。また、HBV 感染からの肝臓癌への進行症例、HCV 感染からの肝臓癌への進行症例、ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例の 3 グループでそれぞれ非癌部、癌部組織から microRNA を調製し次世代シーケンサーライフテクノロジーズ Ion PGM を用いた網羅的発現解析を行った結果、非癌部と比較して発現が上昇してい

る microRNA として HBV 感染からの肝臓癌への進行症例では 41 個、HCV 感染からの肝臓癌への進行症例では 10 個、ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例では 29 個、非癌部と比較して発現が減少している microRNA として HBV 感染からの肝臓癌への進行症例では 21 個、HCV 感染からの肝臓癌への進行症例では 11 個、ウイルス感染なしで肝臓癌への進行症例では 23 個の microRNA が認められ 3 グループに共通して非癌部と比較して発現が上昇する microRNA として miR-221 を含め 3 個が同定された (田原班員)。

cccDNA の排除、転写制御に関する研究

HBV core プロモーター領域の転写因子 FIF、HNF4 の結合領域を標的とした TALE を用いて HBV の転写阻害について検討した結果、対照のスクランブル TALE と比較してほぼ影響が見られなかった。一方、CRISPR/Cas システムを用いた系では HBV 複製中間体が 1/5 まで減少した (山本班員)。

D. 考察

NOG-scid マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスにヒト免疫細胞を投与することによって HBV に対する免疫応答を引き起こす肝炎モデルを作製することができた。肝炎の発症機序としては CTL を介した反応で比較的緩やかな炎症を惹起していることが示された。

E. 結論

肝炎モデルの改良、HBV Tg マウス、iPS 細胞由来肝細胞移植マウス、cDNA-uPA/SCID マウスをホストとしたヒト肝細胞キメラマ

ウス、in vitro HBV 感染培養系の構築が進み、HBV の各ライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となった。さらに、新規のゲノム編集技術 CRISPR/Cas システムを用いることで cccDNA の排除による HBV 完全排除に向けた創薬研究が可能となった。

F . 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. .A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441:230-235
- 2). Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic shepatitis B. *J Med Virol.*2013;85:789-798.
- 3). 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 ;48:1188-1204.

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
分担研究報告書（平成25年度）

免疫学的手法を用いたマウスモデルの改良、B型肝炎が起きる
マウスモデルの作製に関する研究

研究分担者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 自然免疫特にインターフェロン誘導系の活性化によるB型肝炎ウイルス（HBV）排除の機構に関与する因子を探索する。IFN誘導性遺伝子の網羅的解析からHBV感受性を高めるIRF-3下流遺伝子を同定し、機能解析を施行している。

A. 研究目的

HBVはMAVS(IPS-1)RNA認識経路でなく、STING-TBK1経路でI型インターフェロン(IFN)を誘導し、肝実質細胞のHBV感受性を下げる(Leong et al., submitted)。持続性B型肝炎もIFNの誘導性と関連する可能性がある。本研究はHBV感染から複製に至るHBVライフサイクルを肝細胞において阻害するIFN誘導経路の分子を同定することを目的とした。HBVの自然免疫に関する報告は乏しいので、申請分担者らは2つの系でHBV自然免疫系の解析を行う。1. ヒト肝細胞HBV培養系を使ってHBV複製阻害に関与するIFN誘導分子を同定しその基本機能を調べる。2. 核酸認識経路のKOマウスとその肝細胞株を使ってHBVの制御に関連する自然免疫因子のin vivo活性を同定する。

B. 研究方法

Hydrodynamics実験により、各種KOマウスのうち、IRF-3/7-/-、IFNAR-/-のKOマウスがHBV複製を助長した。この系でIFN誘導因子のどれがHBV複製阻害に直接関与するかを検討した。ヒト肝細胞株HepG2とその持続感染株は茶山研より恵与を受けた。この系で各種IFN誘導因子をKOまたは強制発現し、HBV複製効率を査定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

HBV plasmidのマウス肝細胞株へのtransfection、マウス個体を用いたhydrodynamicsの両方でISG20がHBVの複製阻害に働くことが証明できた。

一方、ISG20はIPS-1、TICAM-1のどちらでも発現上昇し、IRF-3依存性であったが、HBV複製阻害はこれらに依存せずIFNARによるISG20発現上昇に依存した。感染阻害作用は強く見られ、ヒト臨床の関節報告と一致した。

DNA transfectionの際type I IFNが誘導されるが、大部分はSTING-TBK1の経路に依存した。この際のIFN誘導因子は未報告の因子であった。この分子をヒト肝細胞でKD、強制発現するとHBVは期待通り複製上昇と抑制がそれぞれ見られた。

以上からIFNARがHBV感染阻害の鍵経路であるのはISG20を誘導するためと判明した。これとは別にHBVが肝細胞で複製すればDNA依存性に別のIFN誘導因子が誘導され、それがHBV複製阻害を誘起して感染防御に働くことが示唆された。

D. 考察

本研究でHBV感染は2つのエフェクター因子をIFN誘導に関連して誘導し、これらがHBV鎮静に機能することが示唆された。一つはIFNAR活性化による複製阻害で、これはISG20によって起動することが証明された。一方、DNAで起きるIFN誘導因子の中にもHBV抑制に働く因子があることが判明した。この因子のHBV阻害機構を現在調べている。本研究の成果はDNAウイルスでありながらRNAのphaseもとるHBVについて既報のウイルス抑制経路以外が複製抑制のエフェクターを起動することを細胞レベルで初めて明らかにした。

In vivoのhydrodynamicsの系でもこのことが証明できた。従って、ヒト培養系の知見はマウスモデルでも妥当な知見となることが予測された。次年度に向けてこれらエフェクターによるHBV阻害機構を解明する予定である。

E. 結論

HBV複製阻害の実行因子としてDNA認識のIFN誘導経路と、IFNAR経路からそれぞれ新規のHBV複製阻害因子を同定した。In vivoマウス肝細胞でも同様の知見を得た。これらの分子のウイルス抑制機能を同定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seiya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
- Tatematsu M, Seiya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.
- Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seiya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639.
- Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seiya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor

molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3;110(49):19908-13.

- Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seiya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014 Feb;57(2):100-10.
- Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seiya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4740-7.
- Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seiya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
- Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seiya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10900-3.
- Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seiya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8169-78.
- Tatematsu M, Nishikawa F, Seiya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun*. 2013;4:1833.
- Seiya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 May;17(5):533-44.
- Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seiya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Apr;61(2):127-38.
- Toscano F, Estomes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seiya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):764-73.

G. 知的所有権の出願・取得状況

- 特許取得 実用新案登録 その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎ウイルスの持続感染時における自然免疫応答回避メカニズムの解明に関する研究

研究分担者 加藤 博己 京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学分野 准教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)が自然免疫機構を回避するそのメカニズムの解明を目的として研究を行っている。今年度は、in vitro においてHBV感染を可能にするNTCP安定発現株を樹立することができた。現在、自然免疫応答に関与する分子群の発現を誘導もしくは抑制し、HBV感染価に与える影響を検討している。また、in vivo においてHBV感染をモニターするために、HBVレセプターであるヒトNTCPを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスの作製に着手している。これらの実験系の確立により、B型肝炎ウイルスと自然免疫機構の相互関係を詳細に解析できることが期待される。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)が持続感染する際、自然免疫応答を回避していると考えられるが、そのメカニズムは明らかではない。我々は、非自己のRNAを認識し抗ウイルスインターフェロン応答を惹起する細胞内RNAヘリケースRIG-I-like receptors (RLRs)に着目し、B型肝炎ウイルスが特にRLRsの認識を回避もしくはそのシグナル伝達を阻害しているかを検討する。また、最近明らかとなってきたcGAS依存的dsDNA認識経路に関しても、B型肝炎ウイルス感染との関係を検討する。

B. 研究方法

上記研究目的をもとに、下記1～3のような実験を中心に研究を行っている（今後も行っていく）。

1 HBV受容体であるヒトNTCPを安定的発現する細胞株を樹立する（作製済み）。さらに、RLRやcGAS依存的シグナル伝達に関与する分子群の発現を誘導もしくは抑制した時のHBV感染価を検討する（検討中）。

2 ヒトNTCPを肝臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製する。（大臣確認を申請中およびDNAコンストラクトを作製中）。

3 作製したトランスジェニックマウスを用いてHBV感染をモニターする。また、自然免疫応答に関わる分子のノックアウトマウスと掛け合わせを行い、それら分子のHBV感染における役割を検討する。

（倫理面への配慮）

培養細胞を用いた研究に関して倫理面での問題はない。マウスの作製にあたっては、大臣確認を申請中である。

C. 研究結果

研究方法1に関して、細胞株は樹立できており、HBVが感染し複製することが確認できている。現在、その感染価を上げる条件を検討している段階である。また、樹立した細胞株においてsiRNAによる発現抑制の条件も検討中である。

研究方法2に関しては、肝臓特異的トランスジェニックマウスを作製するためのアルブミン

ロモーター存在下でヒトNTCPを発現するコンストラクトを作製した。大臣確認が得られてから、以降の実験を進めていく予定である。

研究方法3に関しては、トランスジェニックマウスの作製待ちである。

D. 考察

作製したヒト NTCP 安定発現細胞株において、in vitro における HBV 感染が可能となった。しかし、感染レベルは依然低いレベルである。免疫応答等をモニターするためには、高い感染価が必要だと予想され、DMSO や PEG 存在下の条件など感染条件の検討が必要である。

E. 結論

作製した細胞株やマウスを用いて、HBV 感染をモニターできる系のセットアップが必要である。マテリアルの作製に関しては、今のところ順調に進んでいると考えられる。

G. 研究発表

1) Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, and Fujita T Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5. *Immunity* 2014 Feb;40.1-14

2) Ng CS, Jogi M, Yoo JS, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *J Virol.* 2013 Sep;87(17):9511-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
分担研究報告書（平成25年度）

キメラマウスへのHBV長期感染による肝臓の病理学のおよび
遺伝子・タンパク質発現解析・新規モデルの作製

研究分担者 立野（向谷）知世 株式会社フェニックスバイオ
取締役研究開発部長
研究協力者 石田雄二 株式会社フェニックスバイオ
大下宏樹 株式会社フェニックスバイオ
吉実康美 株式会社フェニックスバイオ
小川裕子 株式会社フェニックスバイオ

研究要旨 昨年度、新たに作製した uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID homozygote マウスをホストマウスとしたキメラマウス（cDNA-uPA/SCID ホモキメラマウス）に HBV を 14 週間感染させ、感染、非感染で、病理組織観察、TUNEL 陽性細胞の割合、線維化の程度を比較したところ、顕著な差は見られなかった。今年度、HBV 感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現を調べたところ、炎症や線維化に關与するマウス遺伝子発現（ α -SMA, mCD14, mHGF, mTNF α , mTLR4, mProcollagen type1, mTGFR, mTGFB1）に差は見られなかったが、Apoptosis に關与するヒト遺伝子発現（hTNFRSF10C, hFAS）の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現（hPBK, hRRM2, hNCAPG）の低下傾向が見られた。また、HBV 感染キメラマウス肝細胞は非感染に比べて肥大していた。さらに、HBV 感染、非感染キメラマウスの肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が検出された。今年度はさらに長期間の感染飼育が可能と思われる、cDNA-uPA/SCID hemizygote マウスを用いたキメラマウス（cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウス）を作製し、HBV を接種し長期飼育観察（20 週）を行った。来年度は、cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスの遺伝子発現、病理組織学的解析を行う。

A. 研究目的

これまでのヒト肝細胞キメラマウス（uPA/SCIDキメラマウス）は、導入uPAゲノム遺伝子の欠失が起るため、長期飼育により正常マウス肝細胞の結節状の増殖が観察される。それに伴い、ヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへのHBV長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、新たに作製したuPA遺伝子欠失

の見られないcDNA-uPA/SCIDホモおよびヘミマウスをホストマウスとしたキメラマウス(cDNA-uPA/SCIDホモおよびヘミキメラマウス)の性状解析を行うと共に、HBV長期感染における病理学的、遺伝子・タンパク質発現の解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

ヒト肝細胞ヘミキメラマウスの作出

3週令のcDNA-uPA/SCID hemizygote にドナーヒト肝細胞(2YF:2才、女兒、

ヒスパニック)を 2.5×10^5 個脾臓より移植し、移植後3週目、6週目、それ以降は1週間に1回、マウス血中ヒトアルブミン(h-Alb)濃度を免疫比濁法にて測定し、32または34週令(移植後28または31週)に剖検し、肝臓、血液を採取した。

また、昨年度作製した、同じドナー細胞を用いたHBV感染(14週間)、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス(26週齢で剖検)の凍結保存肝臓組織を遺伝子発現解析、細胞サイズ測定に用いた。

cDNA-uPA/SCIDヘミキメラマウスへのHBV感染

2YFを移植した14週令(移植後11週)のcDNA-uPA/SCIDヘミキメラマウス11匹を、HBV長期感染試験(20週)に使用した。11匹のうち、5匹にHBV Genotype Cを眼窩静脈叢より 1.0×10^7 copies/mL 100 μ L接種した。残りの6匹はHBV非感染コントロールとして同様に飼育した。HBV感染の翌週から週に1回、動物にイソフルラン麻酔を施し、眼窩静脈叢より約50 μ Lを採血した。2 μ Lをh-Alb測定に、10 μ LをHBV DNAコピー数測定に用いた。

定量性リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現量の定量およびマイクロアレイ解析

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス肝臓の以下に示す遺伝子の発現を昨年度報告の方法でreal-time RT-PCR法により解析した。

マウス由来の肝臓線維化に關与す

ると思われる遺伝子(α -SMA, mCD14, mHGF, mTNF α , mTLR4, mProcollagen type1, mTGFBR, mTGF β 1) およびHBVの4週間感染によりこれまでキメラマウス肝臓で発現が変化することが報告されている一部の遺伝子

(hTNFRSF10C, hFAS, hPBK, hRRM2, hNCAPG、Tsuge M, et al. The Journal of Infectious Diseases 2011;204:224-8より)のprimerを作製し解析に用いた。primerは、ヒトとマウスに交差反応しないことを確認した。

また、HBV感染、非感染3匹ずつのTotal RNAを用いて、Affimetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (株式会社バイオマトリックス研究所、千葉)マイクロアレイ解析を行った。

血清中ウイルス濃度測定

マウス血清中HBV DNA量を昨年度報告した方法で実施した。

キメラマウスの剖検、および病理学的検査

動物の安楽死確認後に剖検を実施し、血液と肝臓を採取した。肝臓の一部はホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色標本を顕微鏡下で観察、写真撮影し、一定面積あたりのヒト肝細胞数をカウントした。

(倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを

経て加工・販売されているものを、(株)フェニックスバイオのヒト組織利用倫理委員会において承認を得た上で、購入して使用した。

ヒト肝細胞を持つキメラマウス作製実験に関しては、(株)フェニックスバイオの動物実験倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウス肝臓における線維化に關与すると思われるマウス遺伝子、HBV感染で変動があることが報告されているヒト遺伝子発現

線維化に關与すると思われるマウス遺伝子発現は、HBV感染、非感染で差は見られなかった。HBV感染で変化することが知られている遺伝子の発現では、Apoptosisに關与するヒト遺伝子発現(hTNFRSF10C, hFAS)の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現(hPBK, hRRM2, hNCAPG)の低下傾向がみられた。

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスのマイクロアレイ解析

HBV感染、非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスの肝臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、HBV感染で2倍以上上昇した17遺伝子、低下した18遺伝子が見られた。

cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスのHBV感染におけるヒト肝細胞の細胞サイズ

HBV感染、非感染14週間のキメラマウス肝臓における一定面積あたりのヒト肝細胞数をカウントした。その結果、HBV感染ヒト肝細胞半径は約1.6倍増加していた。

表 2. HBV感染、非感染キメラマウスの1定面積あたりのヒト肝細胞数

	肝細胞数/cm ²	半径*	面積*	体積*
非感染	2.04 ± 0.31 × 10 ⁵	1	1	1
感染	1.34 ± 0.07 × 10 ⁵	1.6	2.7	4.3

* 肝細胞を球と仮定して計算した。

cDNA-uPA/SCIDへミキメラマウスへのHBV感染における、一般状態、体重、h-Albの推移

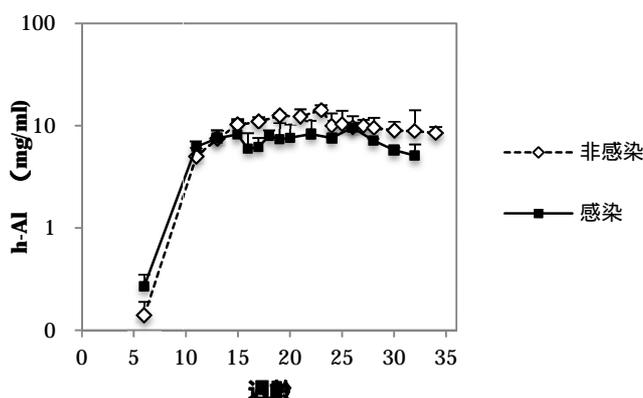


図 1 HBV感染、非感染へミマウスの血中ヒトアルブミン濃度

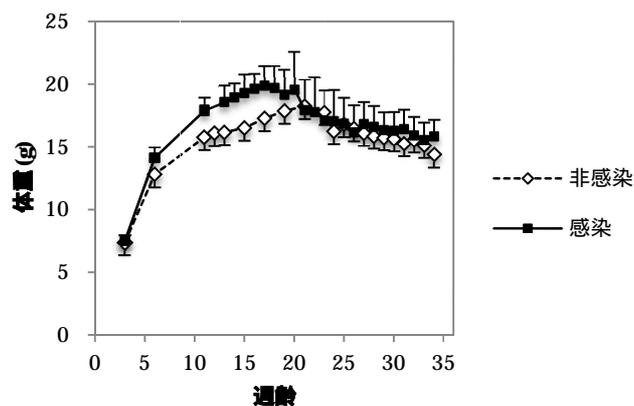


図 2 HBV感染、非感染へミマウスの体重

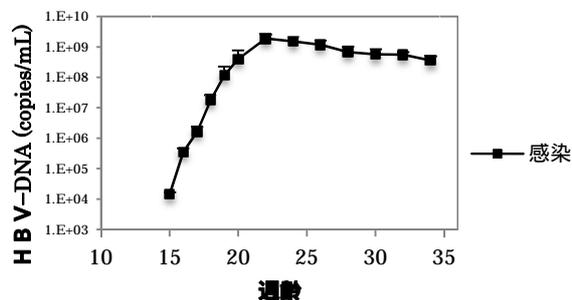


図 3 HBV感染へミマウスの血中HBV濃度

感染 8 週 (22 週齢) で HBV 感染キメラマウスが 1 匹死亡した。感染開始 20 週目にすべてのマウスの剖検を実施した。

体重に関しては、両群ともで 20 週齢以降より徐々に体重減少が観察された。h-Alb 値は両群ともほぼ安定していた。HBV 感染群では、血中の HBV レベルは感染翌週から検出され、8 週よりプラトーに達した (図 1-3)。

D. 考察

これまでのヒト肝細胞キメラマウスでは、導入 uPA ゲノム遺伝子の欠失により、長期間飼育すると、正常マウス肝細胞の結節状の増殖のためヒト肝細胞による置換率の低下が生じ、組織学的に線維化や炎症が見られる個体もあった。このことから、キメラマウスへの HBV 長期感染における組織学的変化を判定することは難しかった。そこで、昨年度、新たに作製した uPA 遺伝子欠失の見られない cDNA-uPA/SCID homozygotes をホストマウスとして作成したキメラマウスに HBV を感染させることにより、肝臓組織への HBV 感染 (14 週齢) の影響がより明らかになるのではないかと考えた。その結果、HBV 感染により、線維化、Apoptosis の増加などの病理学的な変化は見られず、炎症や線維化に關与するマウス遺伝子発現にも差は見られなかった。しかし、Apoptosis に關与するヒト遺伝子発現の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現の低下傾向がみられ、HBV 感染のヒト肝細胞

は非感染に比べて肥大しているのが確認された。このことから、今回調べたの遺伝子以外の発現にも差があるのではないかと考え、マイクロアレイ解析を行った。その結果、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が見つかった。来年度、これらの遺伝子発現を real-time RT-PCR で検証する。

今年度はさらに長期間の感染飼育が可能と思われる、cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスに HBV を接種し長期飼育観察 (20 週) を行った。来年度は、この肝臓の病理組織学的検査、および遺伝子解析も行う予定。

E. 結論

14 週間 HBV 感染 cDNA-uPA/SCID ホモキメラマウスでは、非感染に比べて炎症や線維化に關与するマウス遺伝子発現に差は見られなかったが、Apoptosis に關与する遺伝子の増加傾向、および増殖に關与するヒト遺伝子発現の低下傾向、ヒト肝細胞の肥大が観察された。マイクロアレイ解析により、HBV 感染で 2 倍以上上昇した 17 遺伝子、低下した 18 遺伝子が見られた。今後、HBV 20 週間感染、非感染 cDNA-uPA/SCID ヘミキメラマウスの肝臓における病理学的、遺伝子学的解析を実施する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies. *Int J Mol Sci*. 2013 Dec 20;15(1):58-74.

(2) Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut* 62;1055-61, 2013

(3) Asato Tachibana, Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato Repopulation of the Immunosuppressed Retrorsine-treated Infant Rat Liver with Human Hepatocytes. *Xenotransplantation* 20;227-38, 2013

(4) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K, Inoue K, Yoshihara M, Takaoka A, Kohara M.

Targeted induction of interferon- in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS One*. 8;e59611, 2013

(5) Kosaka, K. Hiraga, N. Imamura, M. Yoshimi, S. Murakami, E. Nakahara, T. Honda, Y. Ono, A. Kawaoka, T. Tsuge, M. Abe, H. Hayes, C. N. Miki, D. Aikata, H. Ochi, H. Ishida, Y. Tateno, C. Yoshizato, K. Sasaki, T. Chayama, K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441;230-5, 2013

(6) Arai M, Tokunaga Y, Takagi A, Tobita Y, Hirata Y, Ishida Y, Tateno C, Kohara M. Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT. *PLoS ONE* 2013 Dec 16;8(12):e82527.

(7) 石田雄二、山崎ちひろ、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" 「細胞」7月号 "細胞移植" 特集, 2013

2. 学会発表

(1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi Y, Yoshizane Y, Chayama K, Tateno C. Development of a novel in vitro hepatitis B virus-infection model by using fresh human hepatocytes isolated from humanized mouse

liver. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 平成 25 年 10 月 21 日 Shanghai Medical College, Fudan University

(2) Kakuni M, Tachibana, A, Shimada T, Tateno C. Using PXB-mice® to Study the Effects of Antiviral Agents against Hepatitis B Virus. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 平成 25 年 10 月 21 日 Shanghai Medical College, Fudan University

(3) 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 from two different donor cells 第 28 回 日本薬物動態学会 平成 25 年 10 月 9 日 東京都 江戸川区夕ヶホール船堀

(4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Chayama K, Tateno C. Primary human hepatocytes isolated from mice with humanized livers as a novel in vitro hepatitis B virus infection model. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 27 日 大阪国際会議場

(5) Tateno C. Recent improvement and applications of chimeric mice

with humanized livers for drug development. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 27 日 大阪国際会議場

(6) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. Cellular reaction of the humanized chimeric mouse liver after bile-duct ligation. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 26 日 大阪国際会議場

(7) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice. 第 20 回 肝細胞研究会 平成 25 年 9 月 26 日 大阪国際会議場

(8) 石田雄二、山崎ちひろ、柳愛美、吉実康美、藤川和幸、茶山一彰、立野知世 PXB マウス由来の初代培養ヒト肝細胞に対する HBV の持続感染 第 9 回 広島肝臓研究プロジェクト研究センターシンポジウム 平成 25 年 6 月 29 日 ホテルグランヴィア広島

(9) 立野知世、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由実子、山崎ちひろ、加国雅和 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性検出のためのヒト ALT-1 特異的 ELISA の開発 第 40

回日本毒性学会学術年会 平成 25
年 6 月 19 日 幕張メッセ 国際会議
場

(10) 石田雄二、茶山一彰、立野知世
肝細胞キメラマウス由来培養ヒト肝
細胞の HBV に対する感染性に関する
解析 第 49 回 日本肝臓学会 平成
25 年 6 月 6 日 京王プラザホテル

(11) 立野知世 ヒト肝細胞キメラ
マウス由来 ” 新鮮ヒト肝細胞 ” の薬
物代謝研究への利用 薬物動態談話
会 4 月定例会 平成 25 年 4 月 10 日
千里ライフサイエンスセンター

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
分担研究報告書（平成25年度）

TALE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、CRISPR/Cas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タンパク質やCRISPR/Cas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酵素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/

Casシステムを構築し、HBVの増殖抑制効果を調べた。

C. 研究結果

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を調べたが、有意な抑制効果は確認できなかった。これに対して、CRISPR/Casシステムを用いた場合、コントロールのHBV量を1/5程度に低下させることが示された。

D. 考察

昨年、海外の複数のグループからTALENを用いたHBVの増殖抑制効果について報告された。今回我々の行ったTALEやTALENの実験では、明確な抑制効果は見られなかったが、作製したTALEやTALENがゲルシフト解析および培養細胞での評価において高い活性を示していることから、条件検討によって抑制効果を改善できると考えている。しかし

ながら、HBVの多型性を考慮すると、複数の標的配列をTALENによって同時に切断することが必要と考えられる。この点では、TALEやTALENよりCRISPR/Casシステムの方がHBV破壊に適していると思われる。

今年度の研究によってCRISPR/Casシステムを用いたHBVの増殖抑制が可能であることを示した。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効果が知られており、より安全性の高いシステムの利用が必要である。

E. 結論

CRISPR/CasシステムによってHBVの増殖を抑制する効果を確認した。今後は、off-target効果を抑えるDouble nickase型のCasを用いて、同時にHBVの複数個所を切断するシステムの確立を目指す。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions, *Genes Cells*, 2014, in press
- 2)Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, Yamamoto T and Matsuura S. TALEN-mediated single-base -pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS

(MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1461-1466

3)Nakagawa Y, Yamamoto T, Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M and Sakuma T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp Anim*, 2014, 63: 79-84

4) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3379

5)Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for humancell and animal applications. *Genes Cells*,2013, *Genes Cells*, 18: 315-326

2. 学会発表

- 1)山本 卓、Platinum TALENの開発と様々な動物におけるゲノム編集、理研シンポジウム「ゲノムデザイン技術と疾患モデル研究」、つくば、2013
- 2)Yamamoto T, Targeted genome editing using highly-active TALENs、京都大学iPS研究所セミナー、京都、2013
- 3)Sakuma T, Woltjen K, Hosoi S, Suzuki K, Kawahara A, Okada Y, Ochiai H, Matsuura S and Yamamoto T, Improved TALEN construction and evaluation methods for animal and human cell applications, Genome Engineering-Research & Applications, Italy, 2013

4) Sakuma T and Yamamoto T, Platinum Gate TALEN: Establishment of highly-active TALEN construction system, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Matsue, 2013

5) 山本 卓, 鈴木賢一、相田知海、田中光一、佐久間哲史、高活性型TALENを用いたゲノム編集、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013

6) 李 紅梅, 藤本直子, 笹川典子, 白井紗矢, 山本 卓, Woltjen Knut, 櫻井英俊, 山中伸弥, 堀田秋津. TALENやCRISPR/Cas9を用いたデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞のゲノム手術、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノム編集研究の新展開」、神戸、2013

7) 山本 卓, 高活性型TALENの開発と哺乳類培養細胞および動物での標的遺伝子改変、第65回日本生物工学会シンポジウム「次世代植物バイオテクノロジー」、広島、2013

8) 山本 卓, ゲノム編集技術を利用した培養細胞および動物個体での標的遺伝子改変、奈良県立医科大学講演会、橿原、2013

9) 山本 卓, ゲノム編集革命-人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変技術の開発、平成25年度広島バイオフィォーラム「ここまで進んだゲノム科学とその活用」、広島、2013

10) 山本 卓, ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、第15回京都市心血管代謝セミナー、京都、2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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、特願2013-88940

2) ヌクレアーゼを発現させるためのベクターおよびベクターセット、ならびに変異を受けた細胞の取得方法、特願2013-098724

3) DNA結合ドメインを含むポリペプチド、特願2013-166768

4) 核酸挿入用ベクター、特願2013-2303

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
分担研究報告書（平成25年度）

次世代シーケンスを用いたB型肝炎血中体液マイクロRNAの網羅的解析

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

次世代シーケンサーを用いたB型肝炎排除のための網羅的解析から、B型肝炎の予後診断およびB型肝炎根治のための治療法の開発をめざす。本研究では、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体を用いてIonPGMを用いた次世代シーケンス解析を行った。既知のマイクロRNAに関しては、非がん部比較してHBVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ41種、21種を見いだした。HCVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ10種、11種を見いだした。非ウイルス肝がんでは顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ29種、23種を見いだした。これらの結果から肝臓癌で共通に増加するマイクロRNAとして3種見いだすことに成功した。

A. 研究目的

肝臓癌の発症には、B型肝炎やC型肝炎などのウイルス性肝炎からの発症と非ウイルス性の肝がんがある。本研究では、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体を用いてライフテクノロジーズIonPGMを用いた次世代シーケンス解析を行い、HBVウイルス性肝癌、HCVウイルス性肝癌、非ウイルス性肝癌の発生におけるマイクロRNAの発現変化を網羅的に明らかにして、肝炎から肝臓癌へと移行するリスク診断マーカーの同定を目的とする。

B. 研究方法

HBV感染性肝がん患者8名（男性7名、女性1名）、HCV感染性肝がん10名（男性6名、女性4名）、非ウイルス性肝がん7名（男性4名、女性3名）から、採取した癌部組織および非がん部組織を採取した。

採取した組織から、RNAを精製して、Agilent bioanalyzerを用いて、精製されたRNAの品質を確認した。

精製したRNAを簡易型次世代シーケンサーIonPGMシステムを用いて、RNAシーケンスを行い網羅的解析し疾患に

より変動するマイクロRNAを明らかにする。

得られた次世代シーケンスデータを既知のマイクロRNAデータベース配列と照合する解析を行い、そのリード数からそれぞれの組織で発現しているマイクロRNAを定量する。

次世代シーケンスで解析した既知のマイクロRNAの定量解析データをデータベース化し、ウイルス肝炎、HBV肝がん、HCV肝癌と比較して、肝臓癌におけるマイクロRNA変動を網羅的に解析し、肝がんへの進行にともなうマイクロRNA変動による肝炎診断の開発に結びつける。

（倫理面への配慮）

本研究は、平成13年3月に3省（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」ならびに関連8学会によって作成された「遺伝学的検査に関するガイドライン」に準拠して行う。具体的には、資料は最初に連結可能匿名化し、広島大学医学部付属病院の指定する個人情報管理者の下に、一般医学研究よりも厳格な管理を行う。資料提供者からの質問・意見等に関しては、各病院が責任を持って対応す

る。

C. 研究結果

HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体からRNAを抽出して、ライフテクノロジーズ Ion PGM解析のためのバーコード標識を用いたライブラリー構築を行った。作成したライブラリーを318シークエンスタップを用いて Ion PGMを用いた次世代シークエンズ解析をおこなった。得られたシークエンズデータを miR base のデータベースと照合して、既知のマイクロRNAに一致するものと、一致しない配列に分類し、既知のマイクロRNAについては、HBVウイルス性肝癌、HCVウイルス性肝癌、非ウイルス性肝癌におけるリード数によりその発現解析を個行った。その結果、同一患者の非がん部と比較してHBV肝癌組織で発現が顕著に増加するマイクロRNAとして、41種類を同定した。また、HCV肝癌組織で発現が顕著に増加するマイクロRNAとして10種を同定した。さらに、非ウイルス性肝癌では、29種類のマイクロRNAの発現が顕著に増加していた。これらの肝癌において増加するマイクロRNAのうち、何れのタイプの肝癌でも共通に発現が増加するマイクロRNAは、miR-221を含む3種であった。一方で、同一患者の非がん部で減少するマイクロRNAは、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性発がんにおいて、それぞれ21個、11個、23個であった。何れのタイプの肝癌でも減少するマイクロRNAではなかった。ウイルス性発がんとは非ウイルス性発がんでは分類した場合、HBV肝癌で共通に増加していたマイクロRNAは5種、共通に減少していたマイクロRNAは4種であった。

D. 考察

HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織におけるマイクロRNAの発現は、同一患者の非がん部と比較した結果、共通に変化しているマイクロRNAは見いだしたものの、マイクロRNAの発現変化はその発がん過程により大きく異なることが示唆された。つまり、ウイルス性と非ウイルス性での発がんの過程は、異なるエピゲノム変化に起因している可能性が考えられた。

癌部および非癌部の検体からRNA非癌部と比較して癌部で共通に発現が増加していたマイクロRNA 3種のうち、miR-221は、E2F、MYC、NF- κ B、 β -catenin、RB1、細胞周

期に関わるWEE1、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子1のAPAF1、ANXA1、転写抑制因子CTCFなどの重要な分子を直接の標的にして様々な癌種で寄与していることが知られており、肝癌発がんにおいてもmiR-221が大きく寄与している可能性が示唆された。その他の2種のマイクロRNAは、肝癌での関与の報告はないが、他の癌種では細胞周期やEMT(上皮間葉転移)を制御しているマイクロRNAの機能が知られており、今後肝癌の発がん過程におけるこれらのマイクロRNAの寄与について詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本年度は、既知のマイクロRNAに関しては、非がん部比較してHBVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ41種、21種を見いだした。HCVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ10種、11種を見いだした。非ウイルス肝がんでは顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ29種、23種を見いだした。これらの結果から肝臓癌で共通に増加するマイクロRNAとして3種見いだすことに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Mikihisa Takano, Chieko Yamamoto, Keisuke Sambuichi, Keisuke Oda, Junya Nagai, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, and Ryoko Yumoto, Introduction of a Single Transporter Gene ABCA3 Directs RLE-6TN to More Type II-like Alveolar Epithelial Cells, MEMBRANE, Vol.38(5), 246-253(2013).

(2) Shiotani B, Nguyen HD, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, Tahara H, Zou L., Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1., Cell Rep. 2013 May 30;3(5):1651-62,(10.1016/j.celrep.2013.04.018).

2. 学会発表

(1) Hidetoshi Tahara, Proteomic analysis of EV in senescence and cancer., ISEV Workshop on EV Proteomics and Lipidomics, Melbourne 2014

(2) 岡田恵、田原栄俊, 老化細胞由来エクソ

ソームの生物学的意義とがん微小環境への影響，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

(3) 鶴崎慎也，塩谷文章，志戸岡友希，嶋本顕，田原栄俊，PRPF19 をターゲットとした siRNA の抗がん剤としての応用の可能性，第36回分子生物学会年会，神戸 2013

(4) 藏元達谷、福永早央里、石原えりか、山本佑樹、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，細胞老化における miR-22 の新規ターゲット探索と機能解析，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(5) 志戸岡 友希，鶴崎 慎也，塩谷 文章，嶋本 顕，田原 栄俊，細胞老化におけるPRPF19の発現抑制に關与するmiR-27bの解析，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(6) 石原えりか、竹下文隆、小坂展慶、高橋陵宇、藏元達谷、塩谷文章、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊，マクロファージ細胞を用いた新規 small RNA デリバリーモデルの構築への試み，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(7) 岡田恵，中村亜由美，宗岡美紗，塩谷文章，嶋本顕，田原栄俊，老化細胞由来exosomeの分泌メカニズムと生物学的意義の探索，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(8) 福永早央里、石原えりか、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，老化を調節する microRNA による膵臓がん細胞抑制メカニズムの解明，第36回分子生物学会年会，神戸 2013

(9) 池田梢，岡本沙矢香，二瀬由宇，田原栄俊，血漿中miRNAを用いた膵がん特異的なバイオマーカーの探索と次世代シーケンサーによる配列解析の可能性，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(10) 田原栄俊，Therapeutic role of micro RNAs in cancer and cellular senescence，Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting，東京 2013

(11) 田原栄俊，老化を誘導する抗腫瘍核酸医薬の可能性，第72回日本癌学会学術総会，横浜市 2013

(12) 福永早央里、石原えりか、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，老化関連 microRNA による膵臓がん抑制メカニズム，第72回日本癌学会学術総会，横浜市 2013

(13) 塩谷文章、志戸岡友希、田原栄俊，PRPF19 の発現抑制は DNA 損傷を誘発し細胞老化を誘導する，第72回日本癌学会学術総会，横浜市 2013

(14) 福永早央里、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，老化関連miRNAによる膵臓がん抑制機構の解明，がん若手ワークショップ，蓼科 2013

(15) 志戸岡友希、塩谷文章、鶴崎慎也、田原栄俊，細胞老化におけるPRPF19の発現抑制に關与するmiRNAの解析，第5回日本RNAi研究会，広島市 2013

(16) 藏元達谷、石原えりか、福永早央里、山本佑樹、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，細胞老化における miR-22 の新規ターゲット探索と機能解析，第5回日本RNAi研究会，広島市 2013

(17) 岡田恵、中村亜由美、宗岡美紗、藤田知信、河上裕、田原栄俊，細胞老化によって増加するexosome分泌の機能とメカニズム解析，第5回日本RNAi研究会，広島市 2013

(18) 田原栄俊，がんの発生・進展における

マイクロRNAの関与，名古屋大学H25特徴あるプログラム_キャンサーサイエンスコース，名古屋市 2013

(19) 田原栄俊，マイクロ RNA を用いた革新的がん診断・治療，第14回ホルモンと癌研究会，東京都文京区 2013

(20) 田原栄俊、岡本沙矢香，Ion Torrent(TM) を利用した最新研究成果，第2回Ion Torrent ユーザーグループミーティング，大阪市 2013

(21) 田原栄俊，老化を誘導する核酸抗がん剤にむけた exosome DDSの開発，第29回日本DDS学会学術集会，京都市 2013

(22) 塩谷文章、志戸岡友希、田原栄俊，PR PF19の発現抑制による細胞老化誘導とがん分子標的としての可能性，第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都 2013

(23) M. Okada, A. Nakamura, M. Muneoka and H. Tahara，Characterization Of Exosomes Secreted From Senescent Fibroblasts.，ISEV 2013，Boston 2013

(24) H. Tahara, M. Okada, M. Muneoka and A. Nakamura，Secretory mechanism and functions of senescence-associated exosomes，ISEV 2013，Boston 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 出願番号：特願2014 - XXXXX

発明者：田原栄俊、落谷孝広

発明等の名称：アルツハイマーを診断できる方法

出願日：平成26年03月20日(2014年) 予定

2. 出願番号：特願2014-41594

発明者：田原栄俊、池田梢

発明等の名称：膵がんの検出を補助する方法

出願日：平成26年03月4日

出願国：日本国、国際特許申請予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
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
分担研究報告書（平成25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 京都大学医学研究科 消化器内科 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、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HBVウイルス抗原を発現する遺伝子改変マウスを新たに作成し、これらの2種のモデルマウスを交配することにより、ヒト肝炎を模倣した免疫応答の誘導が可能な新規B型肝炎モデルマウスの開発を目指している。また*in vitro* HBV感染モデルとして、TALENを用いた遺伝子破壊技術を活用し、肝培養細胞において抗HBV分子、DNAウイ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ている。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)はさまざまなウイルス感染症の中でも、そのウイルス感染に対する多彩な宿主免疫応答が誘導されることが特徴のひとつである。事実、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、ウイ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に対する抗ウイ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イルス抗原タンパクの発現を抑制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イルス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新規に作成し、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、どのように抗ウイ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、遺伝子情報をコードしている DNA や RNA の配列に変異を導入する活性をもつ複数のヒト遺伝子編集酵素が、HBV に対する抗ウイルス作用を発揮していることが明らかになりつつある。この遺伝子編集酵素の中心を占めるのが、Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) ファミリーである。APOBEC ファミリー分子は、塩基配列上のシチジン (C) を脱アミノ化する酵素活性を有しており、その結果、標的となる DNA や RNA の塩基配列が変化をきたす作用を有している。遺伝子編集酵素群の生理的役割は現時点では不明なものが多いが、複数のファミリー分子は、生体に感染したウイルスに対する防御機構として機能していることがわかってきている。この中でも、APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3C は HBV のゲノム配列において C→T/G A への遺伝子変異を高頻度に誘導する作用をもつことが報告され、APOBEC ファミリー分子が感染時にウイルス遺伝子に塩基変化を導入することによって、ウイルスを不活化する役割を担っていると考えられるようになった。我々のこれまでの検討結果から、肝炎ウイルス感染とそれに伴う炎症反応、ならびにイン

ターフェロン産生反応により、肝細胞にこれらの遺伝子編集酵素群のいくつかが特異的に発現誘導されること、APOBEC ファミリー分子のひとつである activation induced cytidine deaminase(AID)が抗 HBV 作用を有していること、などが明らかになってきた。しかしながら、HBV が肝細胞に感染した際に、どのようにして宿主因子に認識され、抗ウイルス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イ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、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、抗 HBV 作用を有する APOBEC family とともに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 を用いた新しい遺伝子破壊技術による *in vitro* ノックアウト肝細胞の樹立に着手した。

B. 研究方法

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

まずはじめに、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の作成を行った。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 に反応する性質をもった変異型 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。このコンストラクトを用いてマウス胚への injection を実施し、F0, F1 マウスを取得した。また、Cre による LoxP の組換え作用により promoter 配列を含まない個々の 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のコンストラクトとしては、まず 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ものを作成した。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作成を行い、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 マウスを合計7ライン確保した。引き続き、得られた各ラインの F0 マウスから F1 マウスをそれぞれ樹立し、薬剤誘導刺激後のそれぞれの F1 ラインの表現型を検討した。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

抗 HBV 作用を有する APOBEC family とともに、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開始した。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、AID, APOBEC3F/G, STING, cGAS それぞれに対応するユニットの作成を行った。同時に、薬剤耐性遺伝子を構成的に発現するカセットを挿入した targeting vector を作成した。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正)及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正)並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正)に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報に適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済

産業省・環境省令第一号)「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成16年文部科学省・環境省令第一号)その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

モデルマウス作成のためのコンストラクト作成、マウス胚への injection、F0 マウスを 7 ライン樹立し、それぞれのラインの F1 マウスの獲得までの作業を完了した。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作成のためのコンストラクトとしては、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ベクターを構築した。このコンストラクトをマウス胚に injection し、F0 マウスを 2 ライン確保することができた。他方、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作成のためのコンストラクトとしては、CAG promoter 下流に loxP で挟んだ GFP を挿入し、その下流に HBs 抗原の遺伝子配列を配置したベクターを作成した。また、上記、誘導型 Cre 発現コンストラクトと同様に、

HBs 抗原発現用コンストラクトもマウス胚への injection を実施し、F0 マウスを 7 ライン確保することに成功した。うち、先行する 1 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、肝炎としての免疫応答は乏しい可能性が示唆された。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示唆されたため、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ことから、今後、免疫応答を活性化する工夫を追加していくこととした。

2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

まず、*in vitro* の HBV 感染系の基盤となる DMSO+PEG 処理した HepG2 細胞への血清検体由来の HBV 感染の至適条件を設定した。このモデルを活用して、HepG2 細胞への TALEN を用いた特異的な遺伝子破壊を導入することとした。引き続き、AID, APOBEC3F/G, STING, cGAS それぞれに対応する TALE ユニットの設計を行い、それぞれの TALEN 発現ベクター作成した。また同時に、薬剤耐性遺伝子(puromycin)を構成的に発現するカセットを挿入した targeting vector を作成した。リポフェクションによりこれらの新規作成 vector を HepG2 細胞に導入し、puromycin でのセレクションを開始した。現在、hetero-knockout

細胞の構築までが完了しており、homo-knockout 細胞の樹立次第、HBV 陽性血清の *in vitro* 感染実験を開始する予定である。

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。同時に、*in vitro* においても培養細胞を用いた HBV 感染系を樹立することができれば、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イ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が可能となり、多様な HBV 感染病態に対応可能な創薬への貢献が期待できる。

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の作成を行った。また、*in vitro* HBV 感染モデルの樹立をめざし、TALEN を用いた抗 HBV 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) 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) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Hga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014(in press)
- 3) Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer*.2014.134(5):1067-76.
- 4) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T: Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013. 288(44):31715-27.
- 5) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto

Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S:
Efficacy and safety of prophylaxis with
entecavir and hepatitis B immunoglobulin
in preventing hepatitis B recurrence after
living donor liver transplantation.
Hepatol Res.2013.43: 67-71.

- 6) Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka
T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K,
Koike K, Uemoto S, Chiba T: Dynamics
of defective hepatitis C virus clones in
reinfected liver grafts in liver transplant
recipients; ultra-deep sequencing analysis.
Journal of Clinical Microbiology. 2013.
51:3645-3652.
- 7) Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K,
Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y,
Miyagawa-Hyashino A, Haga H,
Marusawa H, Teramukai S, Chiba T:
Pretransplant serum hepatitis C virus RNA
levels predict response to antiviral
treatment after living donor liver
transplantation. PLoS One .2013.8:e58380.

2 . 学会発表

- (1) 丸澤宏之 . 慢性炎症によるゲノム異常
生成と肝発癌 . 第 72 回日本癌学会学術
総会 . パシフィコ横浜 2013.
- (2) 千葉勉、丸澤宏之 . 炎症と遺伝子不安
定性 . 第 72 回日本癌学会学術総会 .
パシフィコ横浜 2013.
- (3) 金秀基、丸澤宏之 . 肝幹/前駆細胞を起
源とする肝発癌モデルを用いたゲノム
異常の網羅的解析 . 第 17 回日本肝臓学
会大会 . 品川プリンスホテル 2013.
- (4) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸
澤宏之、喜多村晃一、脇田隆字 .
IL-1/TNF- α によるシチジンデアミナー
ゼ AID 誘導を介した B 型肝炎ウイルス
感染排除機構 . 第 61 回日本ウイルス学
会学術集会 . 神戸国際会場 2013.

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（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
分担研究報告書（平成25年度）

The discovery of host restriction factors required for HBV entry (infection) into mouse cells.

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. 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. NTCP overexpression rendered HepG2 cells permissive to HBV infection, in this year we tried to establish HBV infectivity in mouse hepatocytes by the overexpression of human NTCP.

A. 研究目的 Aim

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 Method

In order to establish immune-competent HBV small animal model system we are aiming to first discover the human restriction host factors that limit HBV infectivity to only human and Chimpanzee hepatocytes. Last year, we used induced pluripotent stem cells (IPS) cells. These cells were previously shown to pass into 4 different stages until they differentiate into human hepatocytes (Definitive endoderm, Hepatic specification, Immature hepatocytes, Mature hepatocytes.) We aimed on identifying the stage of differentiation that is permissive for HBV infection, and by comparing the gene expression in this stage and the previous non permissive stage, we aimed to identify the

receptor required for HBV entry.

However, sodium taurocholate transporter (NTCP) was found last year to be the receptor required for HBV entry.

We then changed our aim from identifying the HBV entry receptor, to analyse if human NTCP can induce HBV infection of mouse hepatocytes.

To reach this target we used the following:

1- Establishment of mouse hepatocyte cell line permissive to HBV replication.

In-vivo primary mouse hepatocytes were previously reported to support HBV replication, however primary hepatocytes undergo senescence and death when cultured in-vitro. Hence we used primary like immortalized mouse hepatocytes by SV40-LT Oncogene. We then assayed HBV replication in these cells using the following:

HBV genome expressing plasmid is transfected into the obtained cell clones and HBV replication was assayed by the amplification of nuclease resistant HBV-DNA packaged in HBV-core particles by real-time PCR.

2- HBV-infection into immortalized mouse hepatocytes.

-HBV virus inoculum was derived from the medium supernatant of HepG2-4A5 cells. The supernatant was concentrated with PEG, and was used for infection.

Myc tagged Human NTCP was cloned from primary human hepatocytes, Myc tag

is added at carboxy terminus and cloned into lenti virus vector and introduced into mouse hepatocytes. The expression of human NTCP was confirmed by western blot. HBV infection was then performed, and infected cells were assayed for HBV infectivity by the amplification of nuclease resistant HBV-DNA packaged in HBV-core particles by real-time PCR.

(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 result

HBV replication by the transfection of HBV-DNA was successfully established in immortalized mouse hepatocytes confirming that no block is present at the replication level of HBV in these cells. Human NTCP expression was confirmed by western blot analysis and its distribution to the cell membrane was also confirmed by immunofluorescence. However, infection of HBV particles into these cells was not successfully established, suggesting the presence of other host restriction factor required for HBV entry into mouse cells.

We then moved into the identification of host factors required for HBV life cycle in human HepG2 cells. Stable HepG2 cells expressing human NTCP and efficiently infected with HBV were established. We treated these cells

with siRNA libraries targeting several membrane proteins followed by HBV infection after 2 days. We then screened for the membrane proteins required for HBV entry which might act as another HBV receptor, this work is still undergoing.

We also screened for host factors required for HBV replication using AD38.7 cells. Since kinases are involved in many signaling pathways, and protein functions. We screened 500 human kinases for its function on HBV replication. We identified 4 kinases that are required for HBV replication, and 5 kinases that significantly suppress HBV. One of these kinases, TSSK2, it showed an efficient suppression of HBV infection and replication. Using interferon non-responsive cells we proved that the suppressive function of this kinase on HBV is interferon independent. We are now working on the identification of the mechanism by which TSSK2 suppress HBV.

D. 考察 discussion

The permissiveness of mouse hepatocyte to HBV replication confirmed that there is no block at the replication level to HBV in mouse cells. However the lack of infection by HBV particles into human NTCP expressing cells suggested the presence of a still unknown host factor required for the establishment of HBV infection into mouse hepatocytes. This host factor may be another entry receptor, or another internal factor suppressing the early steps of HBV infection. Using siRNA library

screening, we are currently trying to identify human host factors required for HBV life cycle, and its effect on HBV infectivity when overexpressed in human NTCP expressing mouse hepatocytes.

E. 結論 conclusion

Mouse hepatocytes were susceptible to HBV replication, however HBV entry was not observed even after the expression of human NTCP receptor, suggesting the lack of another factor required for HBV entry. We are aiming to identify host factors affecting HBV entry and/or replication that might be required for HBV infectivity in mouse hepatocytes.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1- Masashi Iwamoto, Koichi Watashi, Senko Tsukuda, Hussein Hassan Aly, Masayoshi Fukasawa, Akira Fujimoto, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Takayoshi Ito, Osamu Koiwai, Hiroyuki Kusuhara, Takaji Wakita. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. , 2013 Dec 14. pii: S0006-291X(13)02111-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.052. [Epub ahead of print].

- 2- Takayuki Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Moeko Miyashita, **Hussein Hassan Aly**, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya., Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639
- 3- Yuichi Abe, **Hussein H. Aly**, Michio Imamura, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Makoto Hijikata, Thromboxane A2 synthase inhibitor and prostaglandin I2 receptor agonist are potent anti-Hepatitis C virus (HCV) drugs, *Gastroenterology* (2013), 145(3): 658-667.e11

2. 学会発表

1. **Aly HH**, Watashi K, Chayama K, Wakita T. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. *2013 international meeting on molecular biology of hepatitis B viruses, Poster Presentation, October, Shanghai, China.*
2. Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, **Aly HH**, Suzuki R, Aizaki H, Kusuhaara H, Wakita T. Mechanistic analysis of hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. *2013 international meeting on molecular biology of hepatitis B viruses, Poster*

Presentation, October, Shanghai, China.

3. Yuichi Abe, **Aly H. Hussein**, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Makoto Hijikata. Thromboxane A2 synthase inhibitors prevent production of infectious hepatitis C virus. *International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, October 2013, Melbourne, Australia*
4. **Aly HH**, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle. *The 61th meeting of the Japanese society of virology. Oral presentation, 2013, Kobe, Japan.*
5. **Aly HH**, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Functional screening of human kinases interacting with Hepatitis B virus life cycle. *The 36th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Poster presentation, 2013, Kobe, Japan*

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（**B型肝炎創薬実用化等研究事業**）
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
分担研究報告書（平成25年度）

B型肝炎ウイルス蛋白質の抗インターフェロン活性および
ウイルス粒子形成における役割

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（広島YE株）の各蛋白質を培養細胞で発現させた。各蛋白質のインターフェロン・シグナル伝達に対する影響を検討したが、明瞭な特徴を明らかにできなかった。一方、P蛋白質（特に逆転写ドメイン）が全般的に蛋白質合成を抑制することを見いだした。また、いくつかのHBV蛋白質が単独発現で細胞から放出されることを見いだし、ウイルス粒子形成機構の解明に通じる成果を得た。

A. 研究目的

B型肝炎の治療戦略を検討するために、ウイルス蛋白質をプラスミドから発現する系を構築し、各蛋白質の性状を解析した。

インターフェロン（IFN）はウイルスに特異的に作用するサイトカインであり、ウイルスに対する自然免疫に重要な働きをしている。医薬品としてウイルス治療にも用いられているが、B型肝炎ウイルス（HBV）に対しては、C型肝炎ウイルスのようにウイルスの排除に通じるような効果は得られていない。この理由を明らかにするために、HBV蛋白質が、IFNシグナル伝達を阻害するかどうか検討することを第一の目的とする。

HBVでは、core蛋白質からなるヌクレオカプシドが、主としてHBs（S）およびpre-S1-S2-Sを含むエンベロープを獲得して成熟粒子が産生される。一方で、ヌクレオカプシドをもたない中空粒子が多数産生される。これらのウイルス粒子形成の機構を詳細に解明し、成熟粒子の合成を抑制する手段を見つけるべく、ウイルス様粒子の産生系を構築し、ウイルス粒子形成におけるウイルス蛋白質間相互作用と出芽機構について研究を行うことを第二の目的とした。

B. 研究方法

HBV広島YE株（Accession# AB206816）のゲノムcDNAから各蛋白質を発現するプラスミドを構築した。これを培養細胞に導入し、各蛋白質の発現をウェスタンブロット、蛍光抗体法で確認した。

レポーターアッセイは、プラスミドを293T細胞（T抗原発現ヒト腎臓上皮由来細胞）に導入して行った。HBV蛋白質発現プラスミドの他に、IFN- γ プロモーターあるいはIRF3プロモーター下に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミドを細胞に導入し、誘導剤としてセンダイウイルスCantell株を感染させた。あるいはレポータープラスミドとして、IFN stimulation responsive element（ISRE）の下流に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドを用い、精製ヒトIFN- γ あるいはCantell株で刺激した。海椎茸ルシフェラーゼ発現プラスミドを内部対照として用いた。

ウイルス蛋白質出芽の検討は、肝炎ウイル

ス蛋白質発現プラスミドを293T細胞に導入し、24時間後に上清と細胞をそれぞれ分取して行った。上清は超遠心後の沈殿を回収し、細胞は溶解し、それぞれウェスタンブロット法でウイルス蛋白質を解析した。

C. 研究結果

HBV広島YE株の蛋白質を発現させた。蛋白質は、HBs (S), Pre-S2-S, Pre-S1-S2-S, core, pre-core-core, HBe, X-HA (HAタグ付加), P-FLAG (FLAGタグ付加) であり、これらの発現をそれぞれの特異抗体あるいは分子タグに対する抗体で確認した。蛍光抗体法でも蛋白質発現と細胞内局在を確認した。

センダイウイルスCantell株を感染させると細胞内センサー分子RIG-Iが活性化され、IFN- β が誘導される。HBV蛋白質の中に、この経路を部分的に抑制するものが見つかった。特にP蛋白質は強い抑制能があった。分泌されたIFN- β は自己ならびに周辺の細胞のIFN- β / 受容体に結合して、Jak/STAT系のシグナル伝達を介して、ISRE下流の抗ウイルス蛋白質、IRF7等の合成を誘導する。HBV蛋白質はこれも部分的に抑制したが、P蛋白質の強い抑制作用が際立っていた。

試験中に、対照の海椎茸ルシフェラーゼの活性もP蛋白質で強く抑制され、P蛋白質はIFNシグナル伝達を特異的に阻害するのではなく、蛋白質合成を全般的に抑制することが示唆された。この抑制について、転写プロモーターを変えても起こること、mRNAは大きく減少していないことから、転写ではなく、翻訳が全般的に抑えられていると考えられた。P蛋白質をさらにドメイ

ン毎に分けて発現するプラスミドを構築して検討したところ、逆転写酵素 (RT) ドメインに強力な蛋白質合成抑制作用があることを見いだした。

HBV蛋白質を293T細胞で単独で発現すると、HBs (S), Pre-S2-S, Pre-S1-S2-S, core, pre-core-core, HBeは培養上清に放出された。core蛋白質はC端側に特徴的な塩基性アミノ酸、特にアルギニンのクラスターをもっている。これを欠損した"short core"蛋白質は培養上清には検出できず、core蛋白質の放出には、C端側の塩基性アミノ酸が必要であると考えられた。塩基性アミノ酸クラスターは複数あり、これをC端側から順次削っていったところ、端から少なくとも2つのクラスターが細胞からの放出に重要であると考えられた。

D. 考察

HBV蛋白質によるIFNシグナル伝達阻害実験では、P蛋白質以外には明瞭な結果を得ることが出来なかった。P蛋白質は予想外に蛋白質合成全般を抑制し、特に翻訳を阻害すると推定された。P蛋白質によるアポトーシス誘導などの細胞傷害性について検討が必要である。

HBV蛋白質はそれぞれを発現させたところ、多種類の蛋白質が培養上清に放出された。超遠心による沈殿に回収されているので、いずれも何らかの構造物として培養上清に存在していると考えられる。HBsはシグナル配列をもっているため、分泌経路で細胞表面まで運ばれ、そこからウイルス粒子様の構造をとって出芽して放出されていると推測される。pre-core-coreにもN端に疎

水性アミノ酸のシグナル配列として働く部分があり、分泌経路を介して放出されていると考えられる。この場合には、細胞内と放出された蛋白質ではサイズが大きく異なり、放出にあたってプロセッシングを受け、HBe様の蛋白質に変化したものと考えられる。

HBeについては、前半の疎水性配列によって分泌経路を介した放出が考えられる一方で、coreは疎水性配列を欠き、分布経路に依存しないで細胞から放出されると考えられる。この場合には、coreのC末端側の塩基性アミノ酸クラスターが必須であった。この機構は不明である。

今後は、それぞれの放出経路、関与する宿主機能などの性質を解明し、複数のHBV蛋白質を組み合わせることで実際のHBV粒子に近いウイルス様粒子を作製することで、HBV粒子形成の詳細を解明する予定である。

E. 結論

HBV 広島 YE 株の蛋白質発現系を作製した。HBV 蛋白質の IFN シグナル伝達に対する影響は不明であったが、P 蛋白質（特に逆転写ドメイン）が全般的に蛋白質合成を抑制することを見いだした。また、いくつかのHBV 蛋白質が単独発現で細胞から放出されることを見いだした。各蛋白質の放出について、その性状と分子機構について検討する必要がある。

F. 健康危険情報

（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) Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y,

Sakaguchi T Trans-regulatory polarity shift during the viral RNA synthesis dictates the negative genome polarity of the Mononegavirales. J Virol. 2014. 88:690-8.

2) Irie T, Yoshida A, Sakaguchi T Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization. PLoS One 2013. 8:e73740

3) Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a board range of viruses. PLoS One 2013, 8: e55343

2. 学会発表

(1) 坂口剛正、柿タンニンによる多様なウイルスの不活化とその応用、第56回近畿アグリハイテクシンポジウム～柿タンニンの底力～、奈良、2013

(2) 坂口剛正、川端涼子、福士雅也、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、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25年度3班合同班会議、広島、2013

(3) 小田康祐、的場康幸、川端涼子、入江崇、福士雅也、坂口剛正、自然免疫の抑制に関わるセンダイウイルスCタンパク質と宿主転写因子STAT1の構造生物学的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(4) 星野羊一、入江崇、小田康祐、福士雅也、坂口剛正、センダイウイルスCantell株の増殖動態とIFN β 誘導の定量的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(5) 坂口剛正、吉田明日香、入江崇、センダイウイルス感染によるストレス顆粒様構造の形成とIFN誘導におけるC蛋白質の関与、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(6) 入江崇、吉田明日香、川端涼子、坂口剛正、センダイウイルス株間の著しいインターフェロン誘導性の違いを生む因子、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(7) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T, Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role on restricted production of copyback-type DI genomes to escape from detection by host innate immunity, The 12th Awaji international forum on Infection and Immunity, Awaji, 2013

(8) 坂口剛正、HBV蛋白質の性状解析、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、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25年度茶山班会議、広島、2013

(9) 小田康祐、川端涼子、福士雅也、入江崇、坂口剛正、センダイウイルスCタンパク質と転写因子STAT1の相互作用の構造学的解析、第28回中国四国ウイルス研究会、広島、2013

(10) Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y, Sakaguchi T, A novel regulatory mechanism determining the genome polarity of the Mononegavirales, NSV2013, Granada, Spain, 2013

(11) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T, Different production of viral RNA species between Sendai virus strains causes their

remarkable difference in IFN inducibility, NSV2013, Granada, Spain, 2013

(12) 坂口剛正、HBV蛋白質の性状解析、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、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25年度茶山班班員ミーティング、広島、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 国内特許

特許第5421901号

発明の名称：エンテロウイルス属の非エンベロープに対する抗ウイルス剤および抗ウイルス用組成物

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2010-505931

出願日：平成21年3月31日

登録日：平成25年11月29日

(2) ロシア特許 平成25年10月

国際出願番号：PCT/JP2010/056879

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

出願人：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

ロシア出願番号: 20111146534

特許番号：2491929

特許期間満了日：2030年4月16日

(3) 中国特許 平成25年9月

同上

中国出願番号: 201080016783.2

厚生労働科学研究補助金（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
分担研究報告書（平成25年度）

肝炎モデルの改良と新規HBV感染モデルマウスの作製

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：ヒトiPS細胞より成熟肝細胞を誘導し、HBV産生細胞の培養上清を濃縮して感染源として調製したHBV溶液を接種しHBV感染が引き起こされるかどうか検討を行った。iPS細胞由来の成熟肝細胞は肝特異的遺伝子であるAFPの発現やアルブミンの産生が認められた。今回誘導させた肝細胞は成熟肝細胞に誘導後7日間までしか培養できないため培養上清中のHBVDNAを十分検討できなかったが複製中間体が検出された。このことよりiPS細胞由来の成熟肝細胞はHBV感染が引き起こされたと考えられる。今後、この細胞をSCIDマウスに移植してヒト肝細胞マウスを作製し既存のHBV感染モデルとの比較を行う予定である。

A. 研究目的

肝炎モデルを改良し慢性B型肝炎モデルを作製、またHBV産生モデルとしてHBVTgマウスを作製し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する因子の探索を目的とする。また、iPS細胞由来の肝細胞を用いたヒト肝細胞マウスを作製し、既存のヒト肝細胞キメラマウス、HBVTgマウスモデル間での感染効率等の比較を行う。

B. 研究方法

下記の3種類のヒト肝細胞マウスモデルを作製し、HBを感染させマウスモデル間の比較を行う。

ヒト肝炎モデルを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型肝炎モデルを作製する。

3.5kb pregenome RNAを生成するような1.4倍長のHBVゲノムをC57BL/6J-Jclマウス受精卵へ導入しHBV産生マウスを作製する。得られた個体の血清中HBVDNA、HBs抗原、HBe抗原、HBVゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を樹立する。

iPS細胞からBasma et al., の3ステップからなる方法により成熟肝細胞を作製し、SCIDマウスへ移植を行う。

～のマウスモデルを用いてHBV感染効率、血清中HBVDNA、HBs抗原量、HBe抗原量を測定、肝細胞中のHBV複製中間体の解析を行った。また、～のモデルについてはin vitroでのHBV感染実験も行った。

C. 研究成果

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 型肝炎モデルを作製し論文として発表した(Kosaka et al., BBRC, 2013)。従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスに比べるとヒトアルブミンの産生量は uPA/SCID の方が高いが、NOG/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスの方がヒト肝細胞への置換率が低くても HBV 感染効率が良好で、死亡率も低かった。また、HBV 感染マウスに対して抗ウイルス薬であるエンテカビルを投与すると 3 週間で血清中 HBV DNA は 3log copy/ml 減少した。従って改良型の NOG/SCID マウスを背景としたヒト肝細胞キメラマウスは従来の uPA/SCID マウス由来のヒト肝細胞キメラマウスと同等以上の HBV 感染モデル、B 型肝炎モデルとして使用可能であると考えられる。

HBV 産生マウスから得られた血清中 HBV DNA、HBs 抗原、HBe 抗原、HBV ゲノム複製の状態など特徴をつかみ安定して実験に使用できるような系統を 3 系統 (#31, #84, #K)を樹立した。#31, #84 の系統では血清中の HBV DNA はいずれも 5 log copy/ml 以上であったが HBs 抗原量はいずれも 0.3-0.5IU/ml、HBe 抗原量は 10-20IU/ml と低値であった。反対に、#K では血清中 HBV DNA は 4-5 log copy/ml と低値であったが HBs 抗原量は 12 IU/ml、HBe 抗原量は 110 IU/ml と高値であった。HBV の core 蛋白の発現を調べたところ #31 では肝臓でのみ core 蛋白は発現し、#K では肝臓、腎臓で core 蛋白が発現していた。これら 3 系統について受精卵を保存した。

iPS 細胞由来の肝細胞において肝細胞に特異的に発現している AFP、アルブミンの発現を免疫染色で調べた結果、20-50%の細胞が AFP、アルブミンを発現する成熟肝細胞であった。この細胞に HBV 産生細胞由来の HBV を感染させ、翌日 PBS を用いて感染源を除去

し、HBV 感染 3 日後、6 日後の培養上清中 HBV DNA を測定したところ感染 3 日後に比べて 6 日後の HBV DNA は減少していた。今回行った方法では成熟肝細胞に分化した後は 7 日間しか培養できなかったため、HBV 添加後の培養上清中 HBV DNA では HBV 感染の有無は判定できなかった。そこで、細胞外へ放出される前の HBV 複製中間体が形成されているかどうか調べるために肝細胞内の HBV core capsid を抗 HBV core 抗体に結合させ、SDS, proteinase K を用いて蛋白を分解させた後、核酸を精製し HBV core capsid 内に内包された HBV ゲノムの検出を試みた。その結果、iPS 細胞由来の成熟肝細胞内には core capsid に包まれた HBV ゲノムが検出され、HBV 感染が引き起こされていたことが示唆された。

D. 考察

NOG-scid マウスを用いることで長期ヒト血球細胞の生着が期待できる。HBV Tg マウスは高 HBV 量、低 HBV 量の両系統のマウスが得られた。iPS 由来の肝細胞への HBV 感染は複製中間体を検出することによって確認したが感染性の HBV 粒子が放出されているかどうかは未だ不明である。今後分化誘導方法を検討し長期間培養できるようなシステムの構築を目指す。さらに iPS 細胞由来の肝細胞を SCID マウスに移植しヒト肝細胞マウスを作製し、このマウスとの比較を行う。

E. 結論

改良型肝炎モデル、HBV Tg マウス、iPS 細胞由来肝細胞移植マウスを用いることで炎症反応の制御、HBV のライフサイクルに関する研究が促進され、宿主免疫を制御しながら HBV のライフサイクルを標的とした創薬研究が可能となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441:230-235

2). Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating

microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic shepatitis B. *J Med Virol.*2013;85:789-798.

3). 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 ;48:1188-1204.

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T and Chayama K.	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun.	441	230-235	2013
Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K.	Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic shepatitis B.	J Med Virol	85	789-798	2013
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.	48	1188-1204	2013
Tsuge M and Chayama K.	Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy.	J Gastroenterol.	48	779-780	2013
Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, <u>Seiya T.</u>	IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection.	J Immunol.	in press		2014

Tatematsu M, <u>Seya T</u> , Matsumoto M.	Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses.	Biochem J.	458(2)	195-201	2014
Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, <u>Seya T</u> .	MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells.	Mol Immunol.	57(2)	100-110	2014
Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, <u>Seya T</u> , Inagaki F.	Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling.	Proc Natl Acad Sci U S A.	110(49)	19908-19913	2013
Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, <u>Seya T</u> .	The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model.	J Immunol.	191(9)	4740-4747	2013
Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, <u>Seya T</u> .	A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses.	PLoS Pathog.	9(8)	e1003533	2013
Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, <u>Seya T</u> , Arase H.	Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion.	J Virol.	87(19)	10900-10903	2013
Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, <u>Seya T</u> , Takaku H, Shimotohno K.	Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells.	J Virol.	87(14)	8169-8178	2013
Tatematsu M, Nishikawa F, <u>Seya T</u> , Matsumoto M.	Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA.	Nat Commun.	4	1833	2013
<u>Seya T</u> , Azuma M, Matsumoto M.	Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer.	Expert Opin Ther Targets.	17(5)	533-544	2013

Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, <u>Seya T.</u>	Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus.	Arch Immunol Ther Exp (Warsz)	61(2)	127-138	2013
Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, <u>Seya T.</u> , Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S.	Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor.	J Immunol.	190(2)	764-773	2013
Funabiki M, <u>Kato H.</u> , Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, and Fujita T	Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5	Immunity	40	1-14	2014
Ng CS, Jogi M, Yoo JS, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, <u>Kato H.</u> , Fujita T	Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses	J Virol	87(17)	9511-22	2013
Kakuni M, Yamasaki C, Tachibana A, Yoshizane Y, Ishida Y, <u>Tateno C.</u>	Chimeric mice with humanized livers: a unique tool for in vivo and in vitro enzyme induction studies.	Int J Mol Sci.	15(1)	58-74	2013
Arai M, Tokunaga Y, Takagi A, Tobita Y, Hirata Y, Ishida Y, Tateno C, Kohara M.	Isolation and Characterization of Highly Replicable Hepatitis C Virus Genotype 1a Strain HCV-RMT.	PLoS One.	8(12)	e82527	2013

Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E, <u>Yamamoto T</u>	FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions	<i>Genes Cells</i>	in press		2014
Ochiai H, Miyamoto T, Kanai A, Hosoba K, Sakuma T, Kudo Y, Asami K, Ogawa A, Watanabe A, Kajii T, <u>Yamamoto T</u> , Matsuura S.	TALEN-mediated single-base pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	111	1461-1466	2014
Nakagawa Y, <u>Yamamoto T</u> , Suzuki KI, Araki K, Takeda N, Ohmuraya M Sakuma T.	Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice.	<i>Exp Anim</i>	63	79-84	2014
Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, Suzuki K, Miyamoto T, Sakamoto N, Matsuura S and Yamamoto T.	Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity.	<i>Scientific Reports</i>	3	3379	2013
Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S, <u>Yamamoto T</u>	Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications	<i>Genes Cells</i>	109(27)	10915-10929	2013

Mikihiisa Takan o, Chieko Yama moto, Keisuke Sambuichi, Keis uke Oda,Junya Nagai, Akira S himamoto, <u>Hide toshi Tahara</u> , a nd Ryoko Yumo to	Introduction of a Single Transporter Gene ABCA 3 Directs RLE-6TN to More Type II-like Alveo lar Epithelial Cells	MEMBRAN	Vol.38(5)	246-253	2013
Shiotani B, Nguyen HD, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, <u>Tahara H</u> , Zou L.	Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1.	Cell Rep.	30;3(5)	1651-62	2013
Ikeda A, Shimiz u T,Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hat ano E, Uemoto S, ChibaT, <u>Mar usawa H</u>	Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma.	Gastroenter ology	146(1)	222-232	2014
Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujim oto Y, Mori A, Miyagawa-Haya shino A, Hga H, <u>Marusawa H</u> , ChibaT, Ue moto S	Chronic rejection associa ted with antiviral thera py for recurrent hepatitis C after living donor li ver transplantation.	Transplanta tion	in press		2014
Kim SK, Nasu A, Komori J,Sh imizu T, Matsum moto Y, Minaki i Y,Kohno K,Sh imizu K,Uemoto S, Chiba T, <u>Marusawa H</u>	A model of liver carcino genesis originating from hepatic progenitor cell s with accumulation of genetic alterations.	Int J Cance	134(5)	1067-76	2014
Watashi K, Lia ng G, Iwamoto M, <u>Marusawa H</u> ,UchidaN,Dai to T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, KiyoharaT, Suz uki R, Li J, To ng S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Waki ta T	Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a c ytidine deaminase AI D.	J Biol Che	288(44)	31715-27	2013

Ueda Y, <u>Marusawa H</u> , Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S	Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation.	Hepatology	43	67-71	2013
Ohtsuru S, Ueda Y, <u>Marusawa H</u> , Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T	Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver graft recipients: ultra-deep sequencing analysis.	Journal of Clinical Microbiology	51	3645-3652	2013
Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Hyashino A, Haga H, <u>Marusawa H</u> , Teramukai S, Chiba T	Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation.	PLoS One	8	e58380	2013
Masashi Iwamoto, Koichi Watashi, Senko Tsukuda, <u>Hussein Hassan Aly</u> , Masayoshi Fukasawa, Akira Fujimoto, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Takayoshi Ito, Osamu Koiwai, Hiroyuki Kusuhara, Takaji Wakita.	Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP.	BBRC	Dec 14. pii: S0006-291X(13)02111-6. doi		2013
Abe Y, <u>Aly HH</u> , Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M.	Thromboxane A2 synthase inhibitors prevent production of infectious hepatitis C virus in mice with humanized livers.	Gastroenterology	145(3):	658-67	2013
Takayuki Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Moeko Miyashita, <u>Hussein Hassan Aly</u> , Masako Matsumoto, and Tsukasa Seya	Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA.	PloS One	8(12)	e83639	2013

Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y, <u>Sakaguchi T</u>	Sendai virus C proteins regulate viral genome and antigenome synthesis to dictate the negative genome polarity.	J Virol	88	690-8	2014
Irie T, Yoshida A, <u>Sakaguchi T</u>	Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization.	PLoS One	8	e73740	2013
Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, <u>Sakaguchi T</u>	Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (<i>Diospyros kaki</i>) on a board range of viruses.	PLoS One	8	e55343	2013
Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K.	.A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun	441	230-235	2013
Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, <u>Abe H</u> , Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K.	Circulating microRNA-212 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B.	J Med Virol	85	789-798	2013

<p>Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Gishnaba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K.</p>	<p>Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients.</p>	<p>J Gastroenterol.</p>	<p>48</p>	<p>1188-1204</p>	<p>2013</p>
--	---	-------------------------	-----------	------------------	-------------