

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 )

革新的な動物モデルや培養技術の  
開発を通じた H B V 排除への創薬研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 27 年 ( 2015 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・・・  
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型肝炎が起きるマウスモデルの作製に関する研究  
志馬 寛明
  
  2. B型肝炎ウイルス感染に対する自然免疫応答の影響に関する研究・・・・・・・・・・  
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・タンパク質発現解析・新規モデルの作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・  
立野 知世
  
  4. TALEおよびCRISPR/Casを用いたB型肝炎ウイルスの増殖を抑制するシステムの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・  
山本 卓
  
  5. 次世代シーケンサーを用いたB型肝炎ウイルス感染と宿主因子の解析・・・・・・・・  
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、*in vitro* HBV感染系の樹立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・  
丸澤 宏之
  
  7. Analyzing host factors regulating HBV as tool to develop HBV drugs and mouse model. ....  
Hussein H Aly

- 8 . B 型肝炎ウイルス粒子形成に係わる宿主因子の同定とウイルス増殖抑制法の開発 . . . . .  
坂口 剛正
  
- 9 . トランスジェニックマウスを用いた B 型肝炎の免疫機構の解析 . . . . .  
阿部 弘美
  
- . 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .
  
- . 研究成果の刊行物・別刷り . . . . .

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 )  
総括研究報告書 (平成26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**

我々は昨年度、NOG-scid, NOD-scid を背景としたマウスを用いてヒト肝細胞、ヒト免疫細胞を移植し慢性 B 型肝炎ウイルス感染モデルを作製し論文として発表した (Kosaka et al., BBRC, 2013)。この改良型モデルマウスに重症 B 型肝炎急性肝炎治療後の患者から得られたヒト末梢血単核球を投与した結果、肝組織中へのリンパ球浸潤、HBV 感染肝細胞の細胞死、血清中の ALT 上昇、Granzyme A や IFN- $\gamma$  レベルの上昇が認められた。また、肝臓内には HBV 特異的な CTL が検出され、本モデルは HBV 特異的 CTL による HBV 感染肝細胞死が誘導されたヒト劇症肝炎モデルであると考えられた。また、HBs 抗原は陰性化し、HBs 抗体が陽性となった。さらに T 細胞を標的とした薬剤である CTLA4Ig を用いて T 細胞の活性化を抑制することで HBV 感染肝細胞の傷害が抑制できるか検討を行った結果、HBV 感染肝細胞死は阻害された。CTLA4 はリウマチに安全に使用されている薬剤であることから、B 型重症肝炎の治療として使用できる可能性が示された。また、肝炎モデルは細胞障害性 T 細胞を利用した B 型肝炎ウイルスの排除を行う上での安全策などに利用可能であり、幅広い応用研究が可能である可能性があると考えられる。また、HBV 感染が可能な NTCP-HepG2 細胞を用いて各 HBV のライフサイクルにおいて相互作用がある分子を同定した。さらに、新規の CRISPR/Cas9 システム(ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型、FokI-dCas9 型)を構築し、HBV ゲノムに対する抑制効果を検討した。その結果、ヌクレアーゼ型、ニッカーゼ型では抗 HBV 効果が認められた。

【研究分担者】	志馬 寛明	北海道大学大学院	助教
	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、肝炎モデルを改良しヒト肝炎をマウス内で再現する慢性B型肝炎モデルを作製し、HBV感染細胞の排除機構、cccDNAの排除、HBV粒子分泌抑制、HBV蛋白に対する抗体産生促進などに関与する因子の探索を行いHBV

の完全な排除を目指す創薬研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

**肝炎モデルの開発と感染肝細胞の排除に関する**

## **る研究**

重傷免疫不全であるNOGマウスにthymidine kinase遺伝子をtransgeneしたTK-NOGマウスにガンシクロビルを投与することによりマウス肝細胞を傷害し、形成されるニッチを利用してヒト肝細胞を増殖させることができるマウスモデルを用いてヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスにHBV感染患者由来の血清を用いてHBV感染させた。HBV DNA量がプラトーに達したHBV接種8週後に、B型急性重症肝炎治療後の患者から得られたヒト末梢血単核球(PBMC)を比重遠心法にて分離し、腹腔経由で移入した。PBMC移入2週後にマウス肝組織および肝灌流液中のヒトPBMCの表現型をフローサイトメーターにて解析した。また血清中のALTレベル、各種サイトカインレベル、HBs抗原、抗体、HBV DNAの定量を行った。

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立野班員らは、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った。

丸澤班員らは、薬剤誘導性に肝細胞で特異的にCreタンパクを発現する遺伝子改変マウスとして、Albumin(Alb)-Cre-ERT2マウスを活用してtamoxifenに反応するコンストラクトを作製し、CreによるLoxPの組換え作用によりpromoter配列を含まないHBV抗原タンパクを発現する遺伝子改変マウス作製のため、CAG promoter下流にloxPで挟んだ緑色蛍光タンパク(GFP)を置き、その下流にHBs抗原の遺伝子配列を配置したコンストラクトを作製した。これは、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。このコンストラクトのマウス胚へのinjectionを実施し、目的とする遺伝子改変を達成したF0マウスを最終的に合計3ライン確保した。

瀬谷班員らは、IFNAR欠損細胞を用いたin vitro,IFNAR KOマウスを用いたin vivoの系

でIFN誘導遺伝子によるHBV複製阻害活性を検討した。

加藤班員らは、RIG-I様受容体の必須アダプター分子であるIPS-1の発現を抑制したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株を作製し、さらにIPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスを作製中である。また高感度にHBV感染を検出する方法としてフローサイトメーターを用いて感染細胞におけるHBsやHBc量を検出する系を検討中である。

## **HBV感染マウスと新規HBV培養系を用いた創薬研究**

HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの同定するため田原班員らは、miRBaseに登録された約2500のマイクロRNAをノックダウンできるmiRNAに相補的なLNA核酸ライブラリーを用いて、uPA/scid肝細胞移植マウス由来のHBVを感染させた初代培養細胞を用いて、スクリーニングを実施した。HBs抗原を指標に、ウイルス量が減少するマイクロRNAを検索した。また、HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発のため、血清及び組織から、Qiagen miRNeasy kit を用いて精製し、バイオアナライザー2000 (Agilent)にて、精製したRNAの純度を検定した。このRNAを用いて、次世代シーケンサーIon PGMで小分子RNAの配列を解析した。配列情報は、CLC bio社 CLC Genomics Workbenchを用いて解析を行った。

Aly班員らは、HepG2-AD38.7細胞のtet-on/off システムを用いて、ヒトキナーゼ分子におけるHBVライフサイクルに影響を及ぼす分子のスクリーニングを行い、ヒトTSSK2を同定した。またヒトヘリカーゼ、G蛋白共役型レセプター、核レセプター、サイトカインレセプターのスクリーニングを検討中である。キナーゼ分子として501遺伝子、ヘリカーゼ分子として133遺伝子、G蛋白共役型レセプター分子として380遺伝子、サイトカインレセプターとして116遺伝子、核レセプターとして52遺伝子のスクリーニングを行い現在詳細に検討中である。

## **cccDNAの排除、転写制御に関する研究**

山本班員らは、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TAL Eタンパク質およびHBVのコアタンパク質を切断する人工ヌクレアーゼのTALENの作製し、HepG2細胞におけるHBVの増殖抑制効果について調べた。さらに、HBVのコアタンパク質を標的とするCRISPR/Cas9システム(ヌクレアーゼ型、ニックアーゼ型、FokI-dCas9型)を構築し、ヒト培養細胞での活性評価を行った後に、HBVの増殖抑制効果をHepG2細胞およびT23細胞において調べた。

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

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

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### **肝炎モデルの開発と感染肝細胞の排除に関する研究**

HBV感染させたマウスにPBMC移入2週間後、血清中ヒトアルブミン値、ALTを調べたところPBMCを移入しなかったコントロールマウスと比較してALTは有意に上昇、ヒトアルブミン値は有意に減少した。HBVを感染させたマウスと感染させていないマウスにPBMCを移入した実験ではHBV感染マウスで生着率が有意に高率であった。またPBMCを移入したマウスでは有意にHBV DNAレベルが低下していた。さらに、組織学的検討では、PBMC移入マウスでは肝臓内へのリンパ球の集簇が認められ、肝細胞の細胞死も認められ

た。これらのことから移入したヒトPBMCによってHBV感染肝細胞を傷害しHBV DNA量が低下したと考えられた。次に、血清中の各種サイトカインの産生レベルを調べたところPBMC移入マウスではコントロールマウスと比較して有意にGranzyme A、IFN- $\gamma$  レベルが上昇していた。さらに本モデルマウスにおけるGranzyme A、IFN- $\gamma$  産生細胞は何か調べるためにフローサイトメトリーにより肝臓内に浸潤したリンパ球の表現型を検討した。その結果、HBV感染マウスでは非感染マウスと比較してヒトPBMCの生着率が2.6倍程度上昇しており、またPBMC移入マウスでのみCD8陽性、テトラマー陽性のHBV特異的CTLが検出された。これらのことから本モデルにおける肝障害はHBV特異的CTLが主役であると考えられた。そこで、有効な治療法が確立していないB型劇症肝炎に対する有効な治療法していないためT細胞を標的とした薬剤であるCTLA4Igを用いてT細胞の活性化を抑制するか否かについて検討を行った。PBMC移入前にCTLA4Igを投与したところヒトアルブミン値の減少やHBV DNA量の減少は認められずCTLA4IgによってHBV感染肝細胞の傷害が阻害された(阿部班員、茶山班員)。

マイクロアレイ解析では、HBV感染、非感染で大きな遺伝子変化は認められなかったが、HBV感染キメラマウス肝臓において、増殖に関する遺伝子低下が観察された。また、14週間および20週間HBVを感染させたキメラマウス肝臓組織において、炎症、apoptosis、線維化の増加は認められなかったが、肝細胞のサイズの増加が観察され、14週間感染マウスにおいては、2核細胞の割合の増加が観察された。また、HBV感染肝細胞と非感染肝細胞を継代移植したところ、肝細胞の生着には差は認められなかったものの、非感染キメラマウスは高置換になったが、HBV感染キメラマウスは低置換に留まった。これらのことから、HBV感染キメラマウスの肝細胞に形態変化がおり、増殖能が低下している可能性が考えられた。そこで、肝細胞が増殖期にあるキメラマウスにHBVを感染させることにより、HBVの肝細胞増殖における影響を調べる実験を行った。予想に反して、非感染、HBV感染キメラ

マウス間にヒトアルブミンの増加に差は見られなかったが、これらのマウスから分離した肝細胞には大きな差が観察された。HBV感染キメラマウス肝細胞の直径は増加し、2N細胞の割合が約半分に減少していた。また、2核細胞の割合は約5倍程度増加していた。

これらのことから、HBVはin vivoのヒト肝細胞に対して、増殖阻害作用を有している可能性が考えられた（立野班員）。

薬剤誘導型HBsAg発現マウスの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。HBsAg発現後の肝組織を用いたマイクロアレイ解析の結果、IFN-lambda受容体1、Pin1、IL-17受容体遺伝子の発現上昇が認められHBV急性感染応答としてIFN-lambdaシグナルが関与する可能性が示唆された（丸澤班員）。

IFNAR欠損細胞、IFNAR KOマウスを用いたHBV複製阻害活性実験では、RNAiによるISG20の阻害実験でもpolyI:CなどによるHBVの産生抑制がISG20に依ると判明した。ISG20は過剰発現でHBVのRNAを分解したが、肝細胞由来のRNAは分解しなかった。また、HBV plasmid のDNAも殆ど分解しなかった。HBV RNAから産生されるゲノムDNAは減少した。以上からISG20はウイルスRNAに特異的なエクソヌクレアーゼと判明した（瀬谷班員）。

IPS-1ノックダウンNTCP安定発現株は親株に比べてHBV感染によりHBcおよびHBs mRNA量やHBcタンパク質量が顕著に上昇することを確認できている。現在、cccDNAの検出を試みている段階である（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**

約2500のマイクロRNAをノックダウンできるmiRNAに相補的なLNA核酸ライブラリーを用いて、HBs抗原を指標に、ウイルス量が減少した候補マイクロRNAを同定した。それらのうちあるマイクロRNAは、HBVの肝切除により顕著に減少するマイクロRNAであり、HBVウイルス産生に寄与する可能性が考えられた。また、HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発を目指す。次世代シーケンスの

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

### **cccDNAの排除、転写制御に関する研究**

CRISPR/Cas9システムを用いた抑制効果についてHepG2細胞検討を行った。その結果、ヌクレアーゼ型およびNニッカーゼ型のCRISPRを用いた場合、有意にHBV量を低下させることがHepG2細胞において示された。一方、FokI-dCas9型では、抑制効果を確認することができなかった（山本班員）。

HBV, C-VLP出芽は、ESCRT機能を阻害するDN変異体で出芽が阻害された。少なくとも成熟粒子の放出にESCRTが関与している。S-VLP出芽は阻害されなかったため、空粒子の出芽には関与していない可能性がある。

Alixは868残基のV字型分子であり、膜に結合する。ESCRTの構成蛋白質の一つであるが、単独でも膜を湾曲させて、エクソゾーム形成、一部のウイルス出芽をおこすと考えられている。AlixとCore蛋白質が直接結合することを確認し、そのそれぞれの結合ドメインを同定した。Alixの欠失変異体の一部で、HBV, C-VLPの出芽が抑制されることを観察しており、この変異体がDN変異体として働いている可能性がある。S-VLPには全く影響を与えない。坂口らはLC3が、HBs蛋白質やpreS2-S蛋白質、preS1-S2-S蛋白質と共局在することを見いだしており、HBV出芽とautophagyとの関連が疑われた。現在のところ、autophagy阻害剤3-MAは、HBVあるいはS-VLP, C-VLPの出芽に影響がないとの結果が得られた。

BST2/tetherin/CD317は、インターフェロン誘導性のType II 膜蛋白質であり、C末端にGPIアンカーが結合することで、N端、C端

の両方で膜に結合する分子である。HIV-1において、細胞表面でウイルスを物理的に引き留めることで出芽を抑制することが明らかになっている。HIV-1はそのVpu蛋白質によって、tetherinの作用を不活化している。tetherinは過剰発現すると、C-VLPの出芽は阻害しないが、HBVおよびS-VLPの出芽を阻害した。従ってtetherinは潜在的にウイルス出芽を阻害すると考えられる。ところが、HBV持続感染HepG2由来細胞（T23細胞）では、tetherinのsiRNAによるノックダウンあるいは過剰発現でHBVの出芽は影響を受けないというデータがあり、持続感染細胞ではtetherinの働きを無効化する機構があることが推測される。HBV増殖がtetherinの阻害作用から逃れるような機構が存在する可能性が考えられる（坂口班員）。

#### D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスにB型急性重症肝炎治癒後の患者から得られたPBMCを移入することで、HBV特異的なCTLによるヒトの劇症肝炎を再現するモデルを作製した。

#### E. 結論

本モデルマウスにより免疫学的機序によるウイルス排除によるHBVの持続感染から治癒を目指す治療を開発することが可能となった。また、HBVのライフサイクルと相互作用のある宿主因子の検討から新規治療薬となり得る分子が見いだされた。さらに、新規のゲノム編集技術である3種の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. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat.* 21: e89-97. 2014.
2. Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K, Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial

virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther.* 2014; in press.

3. Leong CR, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, Chayama K and Seya T. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J Innate Immun.* 2014; in press.
4. Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect.* 2014; in press.

##### 2. 学会発表

1. 茶山一彰, Hepatitis B mouse model involving CTL, 肝炎部会, 2015/1/25, 台北
2. 茶山一彰, 肝硬変の新たなマネジメント, 第102回日本消化器病学会中国支部例会, 2014/11/29, 広島
3. 茶山一彰, 肝炎ウイルス感染と肝細胞癌, 日本消化器関連学会機構(JDDW)2014, 2014/10/26, 神戸
4. 茶山一彰, 肝炎ウイルスに対する創薬研究, 第50回日本肝臓学会総会, 2014/5/29, 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 名称：急性重症肝炎モデル非ヒト動物の作製方法、急性重症肝炎モデル非ヒト動物、劇症肝炎治療薬のスクリーニング方法および劇症肝炎治療薬  
発明者：茶山一彰  
権利者：広島大学  
種類：特許  
番号：特願2014-217516  
出願年月日：2014年10月24日  
国内外の別：国内
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 肝炎等克服実用化研究事業  
( B型肝炎創薬実用化等研究事業 )  
分担研究報告書 (平成26年度)

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 志馬寛明 北海道大学大学院医学研究科 助教  
研究協力者 瀬谷司 北海道大学大学院医学研究科 教授

## 研究要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) 排除に肝細胞のインターフェロン誘導系、特に IRF-3/7 と IFNAR が重要と判明した。IFN-inducible genes の中から HBV 複製阻害因子を網羅的に探索したところ、細胞質内エクソヌクラーゼの ISG20 が HBV 複製阻害に最も有効と分かった。ISG20 の HBV 抑制機構を調べている。

### A. 研究目的

HBV はI型インターフェロン (IFN) が奏効する肝炎を誘起して肝硬変・肝がんになる。本研究はHBV感染とIFN経路を含む自然免疫のHBV応答に関するものである。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RNA、DNAウイルス認識に関与する経路のHBV応答を調べる。2. RNA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を同定する。

### B. 研究方法

HBVに感受性のIFNAR欠損マウス肝細胞株は当研究室のHussein が樹立した。IFNAR<sup>-/-</sup>マウスにHBV plasmids (茶山先生より恵与) をHydrodynamic injection するin vivo系とヒトHepG2細胞株 (またはNTCP発現株) をHBV感染させる細胞培養系を用いた。ISG20は当研究室でcDNAクローニングして発現ベクターに組み込んだ。Northern, southern 解析は既報に拠った。

#### (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

IFNAR欠損マウス肝細胞株でIFN-inducible genes のHBV複製阻害活性を評価した。2つの遺伝子に強いHBVs産生阻害活性があった。IFNAR<sup>-/-</sup>マウスのHBV plasmid増幅系でIFN-inducible genes のHBV抑制活性を検証したところ、その中の1つ、ISG20にin vivoのHBV増幅阻害活性を再現できた。RNAiによるISG20

の阻害実験でもpolyI:CなどによるHBVの産生抑制がISG20に依ると判明した。ISG20は過剰発現でHBVのRNAを分解したが、肝細胞由来のRNAは分解しなかった。また、HBV plasmid のDNAも殆ど分解しなかった。HBV RNAから産生されるゲノムDNAは減少した。以上からISG20はウイルスRNAに特異的なエクソヌクラーゼと判明した。HBVがIFN投与で改善する理由の1つはISG20がHBVのpgRNA, mRNAを積極的に分解するためである。

### D. 考察

Takaokaらの最近の論文ではRIG-IがHBVのpgRNAのε stem鎖を認識してIFN-λを発現誘導させることがHBVの排除に重要だとしている。この場合、HBV DNAではなくRNAがRIG-I sensorで検知される結果IFN誘導とIFN-inducible genesが発現することになる。我々の検討ではIFN-λもISG20を誘導するので、(マウス肝細胞と違いヒト細胞では) RIG-IがHBVを認識する可能性はありうる。しかし、RIG-IがpgRNAを認識するなら、pgRNAはISG20などを回避して安定に存在する必要がある。

我々の別の結果はHBVのDNA polymerase がMAVS経路のIFN誘導を強く阻害することを示唆した。ISG20が宿主RNAを分解せずpgRNAを分解し易いことを考慮すると、HBVのRNAではなくDNAがRIG-I/MAVS経路を活性化してIFNを産生誘導し、ISG20の発現上昇とRNA分解を起こしているかもしれない。これらは今後の検討課題である。

ISG20が常に活性型でRNAを分解する活性を持つのか、どのようにウイルスRNAだけを識別して分解するのか、細胞質内で如何なる分子会合を作って機能発揮するのか、等の解決すべき問題を残すが、本研究はHBVの自然免疫はISG20というエフェクター分子の活性化を目指すことを検証した。ISG20はRNaseLと異なり、HBV RNAのみを標的とする。

ISG20を活性化する（または発現上昇させる）低分子化合物の探索はHBV創薬に重要な主題となりうる。

## E. 結論

ISG20はIFN誘導性に産生され、HBV RNAを標的として、これらを分解することでウイルスの増殖を阻害することを検証した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takaki, H., K. Honda, K. Atarashi, F. Kobayashi, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, M. Shingai, and T. Seya. 2014. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Molec. Immunol.* 57: 100-110.
2. Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J. Innate Immun.* 6: 293-305.
3. Okamoto, M., H. Oshiumi, M. Azuma, N. Kato, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 192: 2770-2777.
4. Kasamatsu, J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. INAM Plays a Critical Role in IFN- $\gamma$  Production by NK Cells Interacting with Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Accessory Cells. *J. Immunol.* 193: 5199-207.
5. Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* 193: 5118-28.
6. Nakai, M., T. Seya, M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, and H. H Aly. 2014. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol.* 27: 285-294.
7. Kumeta H, H. Sakakibara, Y. Enokizono, K. Ogura, M. Horiuchi, M. Matsumoto, T. Seya, and F. Inagaki. 2014. The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1. *J Biomol NMR.* 58: 227-230.
8. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. *Int J Biochem Cell Biol.* 53C: 329-333.

9. Tatematsu, M., T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Beyond double-stranded RNA: TLR3 signaling in RNA-induced immune responses. *Biochem. J.* 458: 195-201.

10. Seya, T. 2014. Measles virus takes a two-pronged attack on PP1. *Cell Host Microbe.* 16: 1-2.

11. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tatematsu, M. Azuma, and T. Seya. 2014. Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling. *Methods. Enzymol.* 535: 149-165.

12. Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H Takaki, M. Matsumoto, K.Chayama, and T. Seya. 2015. A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model. *J. Innate Immun.* 7: 47-58.

13. Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, and T. Seya. 2015. PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A\*2402 transgenic mice. *Immunobiol.* 220: 74-82.

14. Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, H. Shime, and T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat Commun.* 6: 6280.

15. Maruyama, A., H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press).

## 2. 学会発表

省略

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 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 肝炎等克服実用化研究事業  
( B 型肝炎創薬実用化等研究事業 )  
分担研究報告書 ( 平成26年度 )

B型肝炎ウイルス感染に対する自然免疫応答の影響に関する研究

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)感染時における自然免疫応答の役割の解明を目的とし研究を行っている。今年度は、RIG-I様受容体からのシグナルが顕著に減弱しているIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株を樹立した。この細胞株にHBV感染を行った場合、NTCP安定発現親株と比べHBcおよびHBs mRNA量やHBcタンパク質量が顕著に上昇することが明らかとなった。このことは、RIG-I様受容体による認識がHBV感染を抑制することを強く示唆している。現在までのところHBV感染が認められていないヒトNTCPトランスジェニックマウスを、IPS-1欠損マウスと掛け合わせることにより、HBV感染が成立す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、まず自然免疫応答を回避し感染を樹立させ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、ウイルス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様受容体に着目し、B型肝炎ウイルスがRIG-I様受容体の認識をどのように回避もしくはそのシグナル伝達を阻害するか、その機構を明らかにしていきたい。さらに、RLRによるシグナル伝達が起こらない状況を利用することにより、細胞やマウスレベルにおいてHBV感染系の樹立を目的とする。

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している。

1 前年度樹立したHBV受容体であるヒトNTCPを安定的に発現するHepG2細胞株において、RIG-I様受容体の必須アダプター分子であるIPS-1の発現を抑制したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株を作製する(作製済み)。HBV感染価を検

討する(詳細に検討中)。

2 IPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスを作製する。(現在マウスの掛け合わせ中)  
3 作製した細胞株やトランスジェニックマウスを用いて高感度でHBV感染をモニターする系を検討する。

(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無い。マウスの作製にあたっては、大臣確認済である。

C . 研究結果

研究方法1に関して、IPS-1ノックダウンNTCP安定発現株は樹立できており、親株と比べHBcおよびHBs mRNA量やHBcタンパク質量が顕著に上昇することを確認できている。現在、cccDNAの検出を試みている段階である。

研究方法2に関しては、肝臓特異的アルブミンプロモーター存在下でヒトNTCPを発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウス

に種々の条件でHBV感染実験を行っているが、今のところ肝臓でのHBV複製は認められていない。そこで、IPS-1ノックアウトマウスとの掛け合わせを行っている。IPS-1遺伝子が欠損した条件下で、感染が認められるようになることを期待している。

研究方法3に関しては、FACSを用いて感染細胞におけるHBsやHBc量を検出することを試みている。現在、種々の抗体を用いて条件検討を行っている段階である。

#### D. 考察

作製したIPS-1ノックダウンNTCP安定発現株において高いHBV感染価が認められている。しかし、cccDNAが検出できる複製レベルであるどうかは未だ明らかではなく、今後の課題である。またIPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスが得られ、in vivoでのHBV感染が認められることが期待される。

#### E. 結論

作製した細胞株やマウスを用いて、HBV感染を高感度でモニターできるFACSなどの実験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、IPS-1欠損ヒトNTCPトランスジェニックマウスにおけるHBV感染の樹立が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS Pathog.* 2014 Oct 23;10(10):e1004417. doi: 10.1371/journal.ppat.1004417. eCollection 2014 Oct.
2. Kato H and Fujita T Autoimmunity caused by

constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Aug 19

3. ○Yoo JS, Kato H, Fujita T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Jun 23;20C:131-138. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.011. [Epub ahead of print] Review.

#### 2. 学会発表

I) Symposium: The 62nd annual meeting of the Japanese society for virology

Location: Yokohama, Japan

Date: 2014/11/10-12

Title: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2

Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita

II) Symposium: The 62nd annual meeting of the Japanese society for virology

Location: Yokohama, Japan

Date: 2014/11/10-12

B型肝炎ウイルス(HBV)感染に対するI型インターフェロンの影響

池田宗太郎, 要祐喜, Yao Wan Ling, 覃勉, 大高木結媛, 加藤博己, 藤田尚志

III) Symposium: 2014 HBV international meeting

Location: UCLA, USA

Date: 2014/09/03-06

Title: Innate immune responses against Hepatitis B Virus in ES2

Wan-Ling Yao, Yuuki Kaname, Sotaro Ikeda, Hiroki Kato, Takashi Fujita

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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・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	
	山崎ちひろ	株式会社フェニックスバイオ	
	柳 愛美	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	
	坂本尚昭	広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻	

**研究要旨** 新たなホストマウスである cDNA-uPA/SCID マウスを用いて、HBV 感染実験を 14 週、20 週間実施した。これまで、14 週間感染マウス肝臓の組織学的解析を行ったところ、HBV 感染マウス肝臓において、炎症細胞の増加、apoptosis の増加、線維化の増加は観察されなかったが、ヒト肝細胞の肥大および 2 核細胞の増加が認められた。今年度は、HBV の 14 週間感染、非感染キメラマウスのマイクロアレイ解析結果から、発現量に差が認められた遺伝子に関して RT-PCR を行った。その結果、HBV 感染により細胞分裂に関する遺伝子発現の低下が見られた。また、9 週間 HBV を感染させたキメラマウスから肝細胞を分離し、ホストマウスへ移植したところ、HBV 感染マウス由来肝細胞の移植後 2 日目の生着は非感染マウス由来肝細胞と同等であったが、ヒトアルブミン濃度が 1 mg/mL 以上は上昇せず(予想置換率<5%)、ヒト肝細胞の増殖能の低下が示唆された。次に、移植したヒト肝細胞の増殖の盛んな時期である 7 週令から HBV 感染を行ったところ、マウス血中のヒトアルブミン濃度には感染、非感染で差はなかった。感染後 12 週目に感染、非感染マウスからコラゲナーゼ灌流法によりヒト肝細胞を分離した。分離肝細胞の FACS 解析を行ったところ、HBV 感染キメラマウス肝細胞において 2 倍体細胞が約半分に減少し、2 核細胞が約 5 倍に増加していた。以上の結果から、cDNA-uPA/SCID ホストマウスにヒト肝細胞を移植したキメラマウスに HBV 感染を行ったところ、線維化、炎症は見られなかったが、HBV 感染が *in vivo* でのヒト肝細胞分裂に影響を与えたことが示唆された。

#### 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

##### HBV感染、非感染キメラマウスヒト肝細胞の継代移植

24年に報告した方法により、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した (肝細胞ドナー ; Hispa

nic, 2歳、女兒、BD Biosciences)。非感染cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスとHBV (Genotype C, 1匹あたり $10^5$  DNA copies接種)を9週間感染させたcDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、cDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスに継代移植を行った( $5 \times 10^5$  cells/匹)。血液を経時的に採取し、血中ヒトアルブミン濃度を平成24年度に報告した方法により測定した。HBV感染キメラマウス由来肝細胞を移植したマウスに関しては、血清中HBVコピー数を同じく平成24年度に報告した方法により測定した。

### 肝細胞増殖期のキメラマウスにおけるHBV感染

これまで、HBV感染はヒト肝細胞の増殖終息期(11週令以降)に行ってきた。肝細胞増殖へのHBV感染の影響を調べるため、ヒト肝細胞移植後4週目(7週令)のcDNA-uPA/SCIDホモキメラマウスにHBVを接種し、19週令まで、マウス血中ヒトアルブミン濃度およびHBVコピー数を測定した。19週令のマウスの肝臓からコラゲナーゼ灌流法により、肝細胞を採取し、顕微鏡下で写真撮影、肝細胞直径を計測した。さらに、FACS Calibur (BD Biosciences)を用いてPloidy解析を行った。

### 定量性リアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現量の定量

昨年度実施したマイクロアレイ解析結果(cDNA-uPA/SCIDホモマウスへのHBVの14週間感染、非感染キメラマウス)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。このうち、上昇した遺伝子hANGPTL4, hTNFSF11, hCCRN4L, hARHGER12、低下した遺伝子hCCL2, hISG20, hCD276, hCCNA2, hCDK1, hCCNG2, hCCNB2のprimerを用いて、14週間感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現量を平成24年度に報告した方法を用いてRT-PCR法によって測定した。primerは、マウスに交差反応しないことを確認した。

### 肝細胞サイズおよびPloidyの解析

肝臓のホルマリン固定・パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色標本を作製した。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、および2核肝細胞の割合をカウントした。

#### (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。キメラマウスを用いた動物実験に関しては、(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

#### HBV感染、非感染キメラマウス肝臓における遺伝子発現

マイクロアレイ解析で上昇した遺伝子hANGPTL4, hTNFSF11, hCCRN4L, hARHGER12、低下した遺伝子hCCL2, hISG20, hCD276, hCCNA2, hCDK1, hCCNG2, hCCNB2のプライマーを用いて、14週間感染、非感染キメラマウス肝臓の遺伝子発現量を解析したところ、上昇した遺伝子に関しては、有意な上昇はみられなかったが、hCCRN4L, hTNFSF11は高い傾向が認められた。低下した遺伝子に関しては、hISG20にみ有意に低下し、hCCNA2, hCDK1, hCCNG2, hCCNB2は低い傾向にあった。

#### cDNA-uPA/SCIDホモおよびヘテロキメラマウスのHBV感染におけるヒト肝細胞の細胞サイズおよび2核細胞の割合

昨年度、HBV感染、非感染14週間のcDNA-uPA/SCIDホモ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結果、一定面積あたりのヒト肝細胞数は非感染マウスがHBV感染マウスに比べて1.52倍多かった。さらに、2核細胞の割合をカウントしたところ、非感染 $3.7 \pm 1.2\%$ 、感染 $6.5 \pm 1.9\%$ であった。HBV感染、非感染20週間のcDNA-uPA/SCIDヘテロキメラマウス肝臓においても同様に調べた結果、一定面積あたりのヒト肝細胞数は非感染マウスがHBV感染マウスに比べて1.37倍多かったが、2核細胞の割合は非感染 $3.2 \pm 0.3\%$ 、感染 $3.3 \pm 0.7\%$ で差は認められなかった。

#### HBV感染、非感染キメラマウスヒト肝細胞の継

## 代移植におけるヒトアルブミン、HBV濃度変化

非感染細胞を継代移植したマウスのヒトアルブミン濃度は、13週令で9匹中7匹が10 mg/mLに達し、高置換となった。一方、HBV感染細胞を継代移植したマウスは、4匹ともヒトアルブミンが1 mg/mLに達しなかった（13週令で0.2-0.8 mg/mL、予想置換率<5%）（図1）。HBVの血清レベルの上昇は1代目よりも緩やかに上昇し、15週令で $10^8$ に達したが、26週令で $10^7$ レベルに低下した（図2）。尚、HBV感染マウス由来肝細胞の移植後2日目の生着は非感染マウス由来肝細胞と同等であった

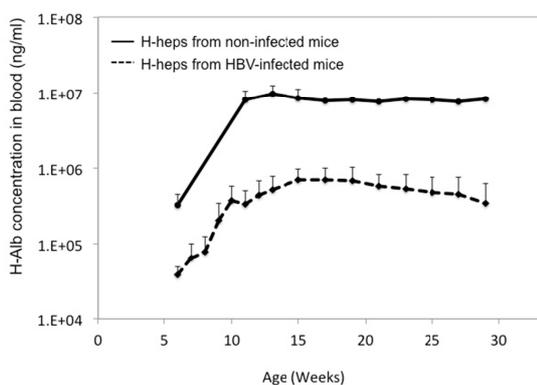


図1 HBV感染、非感染キメラマウス肝細胞の継代移植におけるマウス血中ヒトアルブミン濃度の変化

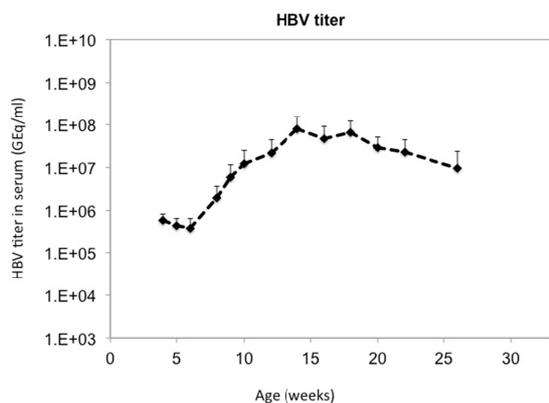


図2 HBV感染キメラマウス肝細胞の継代移植におけるマウス血清中HBVコピー数の変化

## 肝細胞増殖期にHBV感染させたキメラマウスのヒトアルブミン、HBV濃度変化、肝細胞直径およびPloidy解析

7週令にHBV感染させたキメラマウスのヒトアルブミン濃度は、予想に反して非感染キメ

ラマウスと同等に上昇し、高置換となった（図3）。また、HBVの血清中濃度も、増殖終息期に感染させた時と同様に増加し、 $10^9$ レベルに達した（図4）。19週令でコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、肝細胞直径を測定したところ、非感染マウスで $21.0 \pm 2.2 \mu\text{m}$ 、HBV感染マウスで $23.2 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった。FACSによるPloidy解析では、非感染マウスで2N: 82.2%、4N, 2Nx2: 8.5%、HBV感染マウスで2N: 48.4%、4N, 2Nx2: 38.5%であった（図5）。シャーレに播種した肝細胞を用いて2核細胞の割合をカウントしたところ、非感染マウスで $5.8 \pm 3.1\%$ 、HBV感染マウスで $26.7 \pm 5.6\%$ であった。

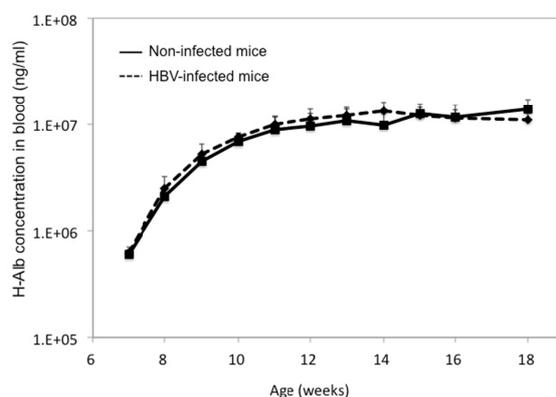


図3 移植後4週目からのHBV感染、非感染キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度の変化

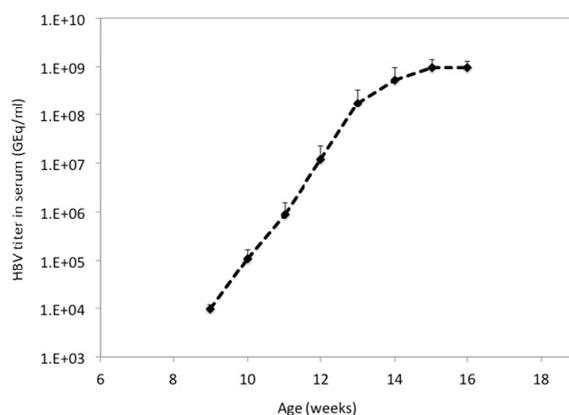


図4 ヒト肝細胞移植後4週目からのHBV感染キメラマウス血清中HBVコピー数の変化

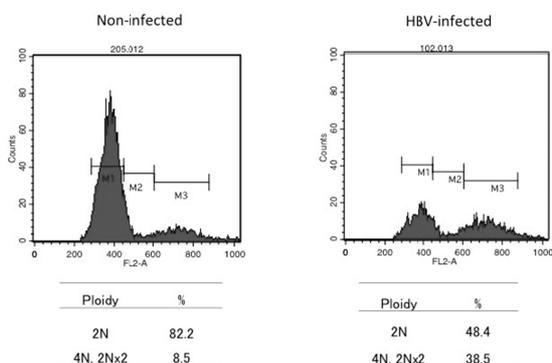


図5 ヒト肝細胞移植後4週目からのHBV感染、非感染キメラマウス(図3)から分離したヒト肝細胞のFACSによるPloidy解析結果

#### D. 考察

これまで、Hepatitis B virus X proteinが、肝細胞の増殖異常を誘導することがいくつかの実験により知られている。HBxを導入したChang cells (ChangX-34 cells)は、中心体が3個出現するという異常が観察され、増殖が阻害される(Chawon Yun et al. Molecular Cancer Research 2:159-169, 2004)。また、HBxトランスジェニックマウスは、肝部分切除後、G1/S移行が阻害され、肝細胞死が誘導されることが知られている(B.-K Wu et al. BBRC 340:916-928, 2006)。しかしながら、ヒトの*in vivo*の肝臓においてもHBVが肝細胞に同様の影響を与えているかどうかは報告がない。

マイクロアレイ解析では、HBV感染、非感染で大きな遺伝子変化は認められなかったが、HBV感染キメラマウス肝臓において、増殖に関する遺伝子低下が観察された。また、14週間および20週間HBVを感染させたキメラマウス肝臓組織において、炎症、apoptosis、線維化の増加は認められなかったが、肝細胞のサイズの増加が観察され、14週間感染マウスにおいては、2核細胞の割合の増加が観察された。また、HBV感染肝細胞と非感染肝細胞を継代移植したところ、肝細胞の生着には差は認められなかったものの、非感染キメラマウスは高置換になったが、HBV感染キメラマウスは低置換に留まった。これらのことから、HBV感染キメラマウスの肝細胞に形態変化がおり、増殖能が低下している可能性が考えられた。

そこで、肝細胞が増殖期にあるキメラマウ

スにHBVを感染させることにより、HBVの肝細胞増殖における影響を調べる実験を行った。予想に反して、非感染、HBV感染キメラマウス間にヒトアルブミンの増加に差は見られなかったが、これらのマウスから分離した肝細胞には大きな差が観察された。HBV感染キメラマウス肝細胞の直径は増加し、2N細胞の割合が約半分に減少していた。また、2核細胞の割合は約5倍程度増加していた。

これらのことから、HBVは*in vivo*のヒト肝細胞に対して、増殖阻害作用を有している可能性が考えられた。今後、増殖中のHBV感染キメラマウス肝細胞の中心体が増加しているかどうか検証したい。

また、このような変化が、インターフェロンなどの投与により可逆的に元に戻るかどうかの実験を行う予定である。

#### E. 結論

キメラマウスのヒト肝細胞は、HBVを感染させることにより、肝細胞サイズ、2核細胞の増加が起こることが明らかとなった。これらのことから、HBV感染はおよび*in vivo*において肝細胞の増殖障害を起こしている可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H.: Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. *Cell Transplant.* (in press)
- 2) Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.: Chimeric Mice with hepatocyte-humanized liver as an appropriate model to study human peroxisome proliferator-activated receptor- *Toxicol Pathol.* (in press)

- 3) Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, Terasaki T.: Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos.*, 2014; 41: 1039-1043.
- 4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Path.* (in press)
- 5) Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S: Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* (in press)
- 6) Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, Horie T: Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of in vivo protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. *Toxicology Research* (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Watashi K, Abe H, Wakita T, Chayama K, Tateno C: Hepatitis B Virus Spread in Primary-cultured Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver. 2014 TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (2014.4, Taipei, Taiwan)
- 2) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世: キメラマウスから分離した初代培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染. 第 50 回 日本肝臓学会 (2014.5, 東京)
- 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Tateno C: In vitro evaluation of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). 第 87 回 組織培養学会 (2014.5, 東京)
- 4) 立野 知世: ヒト肝細胞キメラマウスの改良と応用. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京)
- 5) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美 田中靖人、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV genotype の性状比較. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 6) 山崎ちひろ、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由美子、加国雅和、石田雄二、立野知世: ヒト ALT-1 特異的 ELISA を用いたヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性の検出. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 7) 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるヒト EpCAM の発現. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014.6, 東京)
- 8) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛

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

infected with HBV as hosts. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B-Recent progress in basic and clinical research (2014.11, Hiroshima)

- 20) 山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美、景山豊、岩崎由美子、石田雄二、立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cells" の性状解析．細胞アッセイ研究会シンポジウム (2015.1, 東京)
- 21) 立野知世：ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物．第8回ラットリソースリサーチ研究会 (2015.1, 京都)
- 22) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑：ヒト肝細胞キメラマウス (PXBマウス) における卵胞発育不全．第31回日本毒性病理学会 (2015.1, 東京)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

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

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

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

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

### 研究要旨

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

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

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

#### C. 研究結果

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

ることができなかった。

#### D. 考察

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

#### E. 結論

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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154, 2015

2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 5: 5560, 2014

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

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

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

## 2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

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

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

次世代シーケンサーを用いた B型肝炎ウイルス感染と宿主因子の解析

研究分担者 田原栄俊 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

### 研究要旨

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

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

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

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

血清及び組織から、Qiagen miRNeasy kitを用いて精製し、バイオアナライザー2000 (Agilent)にて、精製したRNAの純度を検定し

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

#### (倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

1 . HBVのウイルス産生を阻害する標的マイクロRNAの同定

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

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

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

#### D. 考察

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

2. HBV排除の治療効果を定量的に評価できるようなマイクロRNAのバイオマーカーの開発  
今回同定したHBVに特異性の高いマイクロRNAについて、HBVウイルス産生機序との関連についても、今後検討する必要がある。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

- Clayton, A., Cocucci, E., Dela Cruz, C.S., Desiderio, D.M., Di Vizio, D., Ekstrom, K., Falcon-Perez, J.M., Gardiner, C., Giebel, B., Greening, D.W., Gross, J.C., Gupta, D., Hendrix, A., Hill, A.F., Hill, M.M., Nolte-t Hoen, E., Hwang, D.W., Inal, J., Jagannadham, M.V., Jayachandran, M., Jee, Y.K., Jorgensen, M., Kim, K.P., Kim, Y.K., Kislinger, T., Lasser, C., Lee, D.S., Lee, H., van Leeuwen, J., Lener, T., Liu, M.L., Lotvall, J., Marcilla, A., Mathivanan, S., Moller, A., Morhayim, J., Mullier, F., Nazarenko, I., Nieuwland, R., Nunes, D.N., Pang, K., Park, J., Patel, T., Pocsfalvi, G., Del Portillo, H., Putz, U., Ramirez, M.I., Rodrigues, M.L., Roh, T.Y., Royo, F., Sahoo, S., Schiffelers, R., Sharma, S., Siljander, P., Simpson, R.J., Soekmadji, C., Stahl, P., Stensballe, A., Stepien, E., Tahara, H., Trummer, A., Valadi, H., Vella, L.J., Wai, S.N., Witwer, K., Yanez-Mo, M., Youn, H., Zeidler, R. & Ghossein, Y.S. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* (2014).
9. Hosoi, T., Inoue, Y., Nakatsu, K., Matsushima, N., Kiyose, N., Shimamoto, A., Tahara, H. & Ozawa, K. TERT attenuated ER stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 378-382 (2014).
10. Hirokawa, T., Shiotani, B., Shimada, M., Murata, K., Johmura, Y., Haruta, M., Tahara, H., Takeyama, H. & Nakanishi, M. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint. *Cancer Res* 74, 3880-3889 (2014).
11. Hirashio, S., Nakashima, A., Doi, S., Anno, K., Aoki, E., Shimamoto, A., Yorioka, N., Kohno, N., Masaki, T. & Tahara, H. Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9, 2117-2122 (2014).
12. Ao, M., Miyauchi, M., Inubushi, T., Kitagawa, M., Furusho, H., Ando, T., Ayuningtyas, N.F., Nagasaki, A., Ishihara, K., Tahara, H., Kozai, K. & Takata, T. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. *PLoS One* 9, e110519 (2014).

## 2. 学会発表

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

SP6800 Spectral Analyzer,Direct Detection of Exosome by SP6800 Spectral Analyzer,CYTO2014,"Ft. Lauderdale, Florida, USA",2014年 5月 19日 ,Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center

3. Hidetoshi Tahara,„Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function",„Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function",International Symposium on Extracellular Vesicles for Biomedical Applications,"Seoul, Korea",2014年 5月 29日,"Clinical Lecture Hall 2, Seoul National Children's Hospital"

4. Hidetoshi Tahara,„Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function",„Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function",KSEV2014 (Korean Society for Extracellular Vesicles),"Seoul, Korea",2014年 5月 30日,"Ewha Campus Complex, Ewha Womans University, Seoul

5. 田原 栄俊,„Liquid Biopsy による疾患の診断と核酸医薬の開発の現状,, (PMDA 職員研修会),東京都,2014年 6月 17日,独立行政法人医薬品医療機器総合機構

6. 田原 栄俊,„小さな巨人「マイクロRNA」によるがん診断およびがん治療戦略,,NPO 法人国際医科学研究会第 8 回フォーラム,東京都,2014年 6月 29日,フクラシア東京ステーション

7. 田原 栄俊,„老化誘導型核酸医薬の開発に向けて,, 「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム,東京都,2014年 8月 21日,学術総合センター

8. 田原栄俊,„Direct detection of extracellular vesicles and exRNA,Direct detection of extracellular vesicles and exRNA,第 1 回日本細胞外小胞学会,広島市,2014年 8月 28日,グランドプリンスホテル広島

9. 福永早央里、塩谷文、嶋本顕、田原栄俊,„老化を調節する microRNA による膵臓がん抑制機構の解析,Functional analysis of senescence-associated miRNA suppresses pancreatic cancer,第 6 回日本 RNAi 研究会,広島市,2014年 8月 28日,グランドプリンスホテル広島

10. 山本佑樹、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊 „細胞老化を誘導する microRNA の網羅的スクリーニング ,High-content screening of senescence-associated microRNAs,第 6 回日本 RNAi 研究会,広島市,2014年 8月 28日,グランドプリンスホテル広島,, , , ,

11. 品末 聡也、岡田 恵、宗岡 美紗、植田 俊樹、佐古 直紀、新田 尚、田原 栄俊,„スペクトル型フローサイトメーター SP6800 によるエクソソームの一粒測定,Direct Detection of Exosome by

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
なし

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

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

研究分担者：丸澤 宏之 京都大学大学院医学研究科 消化器内科学 講師

**研究要旨：**

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

**A. 研究目的**

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

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

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

一方、DNA ウィルスである HBV が肝細胞に感染する際に、宿主側因子にどのように認識され、どのように抗ウ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、DNA ウィルス感染時の自然免疫系による細胞内センサーとして、STING-cGAS 経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。DNA センサーである環状 GMP-AMP シンターゼ (cGAS)からの STING の活性化を介してウイルス DNA が認識されることにより、I 型インターフェロンが誘導され、抗ウイルス応答が作動することがわかってきた。しかしながら、HBV が肝細胞に感染した際に、HBV DNA がどのようにして宿主因子に認識され、抗ウ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、これらの細胞内センサー遺伝子を完全ノックアウトした肝培養細胞系を構築して HBV 感染感受性を検証することにより、HBV 制御の分子機構を明らかにすることにした。この目的を達成するために、同じ研究班に所属する山本卓教授の研究グ

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

## B. 研究方法

### 1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

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

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

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

## 2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

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

## C. 研究結果

### 1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

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

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

## 2. *in vitro* HBV 感染系の樹立；

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

### D. 考察

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

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

### E. 結論

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

### F. 健康危険情報

特記事項なし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

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

### 2 . 学会発表

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

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

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

## H. 知的所得権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

特記事項なし

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

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

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

### 研究要旨

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

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

#### **Host factors affecting HBV life cycle:**

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

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

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

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

Mechanistic Analysis of TSSK2 function on HBV replication.

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

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

Using HepG2-AD38.7 cells in which HBV

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

#### (倫理面への配慮) Ethical

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

### C. 研究結果

#### Host factors affecting HBV life cycle:

- 1- A) We screened 1182 host genes affecting HBV replication covering the following: 1- Kinases (501 genes), 2- Helicases (133 genes), 3- G-protein coupled receptors (380 genes), 4- Cytokine receptors (116 genes), 5- Nuclear receptors (52 genes).  
B) We are currently analyzed by mechanistic analysis.
- 2- Using the human Kinase library, we identified a new pathway suppressing HBV replication.  
A) We found that Testis Specific Serine Kinase 2 (TSSK2) expression was induced in liver cells in response to HBV infection.  
B) TSSK2 kinase suppress HBV replication through its interaction with Superkiller Viralicydic Activity 2-Like (SKIV2L) helicase.  
C) TSSK2 phosphorylates SKIV2L helicase, and this phosphorylation is important for the binding between SKIV2L and HBV-mRNA.  
D) This is followed by SKIV2L mediated HBV-mRNA degradation through the RNA exosome.

### D. 考察

This year in the HBV international meeting, it was

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

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

We are recently planning to use this phenomenon to

- 1- To study its effect on HBV permissiveness of mouse hepatocytes
- 2- To develop a new anti-HBV drug targeting the degradation of HBV-mRN.

### E. 結論

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

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

## F. 健康危険情報

なしです

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

今年はなしです

### 2. 学会発表

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

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

3-

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

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

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

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

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

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

B型肝炎ウイルス粒子形成に係わる宿主因子の同定とウイルス増殖抑制法の開発

研究分担者 坂口 剛正 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

**研究要旨**

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

C. 研究結果

1 . ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport)

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

2 . Alix (ALG2-interacting protein X)

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

3 . Autophagy

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

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

#### 4 . BST2/tetherin/CD317

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

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

#### D. 考察

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

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

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

#### E. 結論

HBV 粒子形成に重要な宿主因子をいくつか同

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

#### F. 健康危険情報

( 分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入 )

#### G. 研究発表

##### 1 . 論文発表

1) Latief MA, Chikama T, Shibasaki M, Sasaki T, Ko J-A, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A, Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy *in vitro*. *Lasers Med. Sci.* 30(1):383-387, 2015

2) 坂口剛正、上田恭子、川端涼子、柿波でウイルス対策 柿タンニンによる強力なウイルス不活化作用、*ニューフードインダストリー* 56(11):17-24, 2014.

##### 2 . 学会発表

(1) 竹中啓、富樫盛典、三宅亮、坂口剛正、秀道広、 $\pi$  環境中ウイルスの迅速検知システム、平成 26 年室内環境学会学術大会、東京、2014

(2) 坂口剛正、B 型肝炎ウイルスの細胞からの放出、厚生労働省 B 型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じた HBV 排除への創薬研究、平成 26 年度 3 班合同班会議、大阪、2014

(3) 福士雅也、川端涼子、坂口剛正、B 型肝炎ウイルス P 蛋白質による全般的な蛋白質合成阻害、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014

(4) Takenaka K, Togashi S, Miyake R, Sakaguchi T, Hide M. Integrated micro-impaction cartridge covered with microporous light-blocking film for low-concentration airborne virus detection. The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences,  $\mu$ TAS 2014 Conference, San Antonio, USA, 2014

(5) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. IFN- $\alpha$ -inducible, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA type-dependent manner. The 13th Awaji international forum on Infection and Immunity. 奈良、2014

(6) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role in restricted production of copyback-type

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

(7) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. Stress granule-like structures are not involved in recognition of Sendai virus infection. IUMS2014 XVI International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014

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

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

## 2. 特許申請

発明の名称：高マンノース型糖鎖分離デバイス

出願人：国立大学法人広島大学、旭化成メディカル株式会社

発明人：堀貫治、黒川洋、平山真、巖倉正寛、水口博義、坂口剛正他

出願番号：特願 2015-21620

出願日：2015年2月5日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

(1) 特許第 5593572 号

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

特許権者：シャボン玉石けん株式会社、国立大学法人広島大学

発明人：川原貴佳、草場麻衣子、坂口剛正

出願番号：特願 2011-509373

出願日：平成 22 年 4 月 16 日

登録日：平成 26 年 8 月 15 日

(2) 特許第 5571577 号

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

特許権者：国立大学法人広島大学、アルタン株式会社

発明人：島本整、沖中泰、坂口剛正、辻徹、中井義昭

出願番号：特願 2010-542140

出願日：平成 21 年 12 月 11 日

登録日：平成 26 年 7 月 4 日

(3) 特許第 10-1426744 号 (韓国)

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

特許権者：シャボン玉石けん株式会社、国立大学法人広島大学

発明人：川原貴佳、草場麻衣子、坂口剛正

出願番号：第 2011-7024542 号

出願日：2011 年 10 月 18 日

登録日：2014 年 07 月 30 日

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

トランスジェニックマウスを用いた B型肝炎の免疫機構の解析

研究分担者 阿部 弘美 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授

### 研究要旨

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

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

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

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

#### (倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

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

着率が有意に高率であった。またPBMCを移入したマウスでは有意にHBV DNAレベルが低下していた。さらに、組織学的検討では、PBMC移入マウスでは肝臓内へのリンパ球の集簇が認められ、肝細胞の細胞死も認められた。これらのことから移入したヒトPBMCによってHBV感染肝細胞を傷害しHBV DNA量が低下したと考えられた。次に、血清中の各種サイトカインの産生レベルを調べたところPBMC移入マウスではコントロールマウスに比較して有意にGranzyme A、IFN- $\gamma$  レベルが上昇していた。さらに本モデルマウスにおけるGranzyme A、IFN- $\gamma$  産生細胞は何か調べるためにフローサイトメトリーにより肝臓内に浸潤したリンパ球の表現型を検討した。その結果、HBV感染マウスでは非感染マウスに比較してヒトPBMCの生着率が2.6倍程度上昇しており、またPBMC移入マウスでのみCD8陽性、テトラマー陽性のHBV特異的CTLが検出された。これらのことから本モデルにおける肝障害はHBV特異的CTLが主役であると考えられた。そこで、有効な治療法が確立していないB型劇症肝炎に対する有効な治療法していないためT細胞を標的とした薬剤であるCTLA4Igを用いてT細胞の活性化を抑制することでHBV感染肝細胞の傷害が抑制できるか否かについて検討を行った。PBMC移入前にCTLA4Igを投与したところヒトアルブミン値の減少やHBV DNA量の減少は認められずCTLA4IgによってHBV感染肝細胞の傷害が阻害された。

#### D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスにB型急性重症肝炎治癒後の患者から得られたPBMCを移入することで、HBV特異的なCTLによるヒトの劇症肝炎を再現するモデルを作製した。

#### E. 結論

本モデルマウスにより免疫学的機序によるウイルス排除によるHBVの持続感染から治癒を目指す治療を開発することが可能となった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes

CN, Chayama K. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat.* 21: e89-97. 2014.

2. Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K, Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther.* 2014; in press.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

提出中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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
Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, <u>Chayama K.</u>	Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA.	J Viral Hep	21	e89-97	2014
Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hisu JT, Chen DS, Yang SS, <u>Chayama K.</u> , Kao JH.	On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy.	Antivir The		in press	2014
Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoaka T, Kawakami Y, Ohishi W, <u>Chayama K.</u>	Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection.	J Infect.	70	47-58	2014
Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H Takaki, M. Matsumoto, <u>K.Chayama, and T. Seya</u>	A MAVS/TICAM-1-Independent Interferon-Inducing Pathway Contributes to Regulation of Hepatitis B Virus Replication in the Mouse Hydrodynamic Injection Model.	J. Innate Immun.	7	47-58	2015
Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, <u>H. Shime, and T. Seya</u>	Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and cytotoxic T cell activation without significant cytokine production in vivo.	Nat Commun.		in press	2015
Maruyama, A., <u>H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya</u>	Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling.	Biochem Biophys Res Commun.		in press	2015

Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, and <u>T. Seya</u>	PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4+ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice.	Immunobiol.	220	74-82	2015
Kasamatsu, J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u>	INAM Plays a Critical Role in IFN- $\gamma$ Production by NK Cells Interacting with Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Stimulated Accessory Cells.	J. Immunol.	193	5199-5207	2014
Ishii, N., K. Funami, M. Tatematsu, <u>T. Seya</u> , and M. Matsumoto	Endosomal Localization of TLR 8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells.	J. Immunol.	193	5118-5128	2014
Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u>	Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models.	Int J Biochem Cell Biol.	53C	329-333	2014
Nakai, M., <u>T. Seya</u> , M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, and H. H Aly.	The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy.	Viral Immunol.	27	285-294	2014
<u>Seya, T.</u>	Measles virus takes a two-pronged attack on PP1.	Cell Host Microbe.	16	1-2	2014
Kumeta H, H. Sakakibara, Y. Enokizono, K. Ogura, M. Horiuchi, M. Matsumoto, <u>T. Seya</u> , and F. Inagaki	The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1.	J Biomol NMR.	58	227-230	2014
Shime, H., A. Kojima, A. Maruyama, Y. Saito, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and <u>T. Seya</u>	Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models.	J. Innate Immun.	6	293-305	2014
Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, <u>Seya 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.	192(6)	2770-2777	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 $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells.	Mol Immunol.	57(2)	100-110	2014
Matsumoto, M., K. Funami, M. Tatematsu, M. Azuma, and <u>T. Seya</u>	Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling.	Methods. Enzymol.	535	149-165	2014
Narita R, Takahasi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, <u>Kato H</u> , Fujita T	A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection	Plos Pathogen	10	10	2014(Oct 23)
<u>Kato H</u> and Fujita T	Autoimmunity caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors	Cytokine Growth Factor Rev.	6	739-43	2014 (Aug 19)
Yoo JS, <u>Kato H</u> , Fujita T	Sensing viral invasion by RIG-I like receptors.	Curr Opin Microbiol	20	131-138	2014 (Jun 23)
Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, <u>Tateno C</u> , Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H.	Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene.	Cell Transplant.	in press		
<u>Tateno C</u> , Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.	Chimeric Mice with Hepatocyte-humanized Liver as an Appropriate Model to Study Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$	Toxicol Pathol.	in press		

Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, <u>Tateno C</u> , Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, Terasaki T.	Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS.	Drug Metab Dispos.	41	1039-1043	2014
Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, <u>Tateno C</u>	Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice.	Am J Path.	in press		
Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, <u>Tateno C</u> , Horie T, Kitamura S, Ohta S	Predictability of plasma concentration–time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver.	Xenobiotica	in press		
Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, <u>Tateno C</u> , Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, Horie T	Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of in vivo protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver.	Toxicology Research	in press		
Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, <u>Yamamoto T</u> , Yamanaka S, Hotta A	Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9	Stem Cell Reports	4	143-154	2015

Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, <u>Yamamoto T</u> , Sakuma T Suzuki K	Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9	Nature Communicat ions	5	5560	2014
Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T <u>Yamamoto T</u>	Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells	Scientific Reports	4	7125	2014
Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, Ishikawa T, Takeda S, Sakuma T, <u>Yamamoto T</u> Mori K	EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step.	Journal of Cell Biology	206	347-356	2014
Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K <u>Yamamoto T</u>	Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system	Scientific Reports	4	5400	2014
Shimamoto A, Yokote K, <u>Tahara</u> <u>H.</u>	Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming.	Front Genet	6	doi:10.3389/fgen e.2015.00010.	2015
Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, <u>Tahara H</u> , Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y.	A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- $\beta$ peptide.	FEBS Lett.	589	84-88	2015
Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, <u>Tahara</u> <u>H</u> , Wauben MH, Witwer KW, Théry C.	Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.	J Extracell Vesicles.	3	26913.	2014

Yuyama, K., Sun, H., Sakai, S., Mitsutake, S., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y. & <u>Igarashi, Y.</u>	Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice.	J Biol Chem	289	24488-24498	2014
Yamasaki, S., Taguchi, Y., Shimamoto, A., Mukasa, H., Tahara, H. & Okamoto, T	Generation of human induced pluripotent stem (Ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF-Beta1 regulation of pluripotency.	PLoS One	9	e87151	2014
Shimamoto, A., Kagawa, H., Zensho, K., Sera, Y., Kazuki, Y., Osaki, M., Oshimura, M., Ishigaki, Y., Hamasaki, K., Kodama, Y., Yuasa, S., Fukuda, K., Hirashima, K., Seimiya, H., Koyama, H., Shimizu, T., Takemoto, M., Yokote, K., Goto, M. & <u>Tahara, H</u>	Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture.	PLoS One	9	e112900	2014
Miyagi, T., Shiotani, B., Miyoshi, R., Yamamoto, T., Oka, T., Umezawa, K., Ochiya, T., Takano, M. & <u>Tahara, H</u>	DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins.	Cancer Sci	105	870-874	2014
Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, <u>Marusawa H</u>	Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence.	J Hepatology	61	492-501	2014
Inuzuka T, Takahashi K, Chiba T, <u>Marusawa H</u>	Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions.	Pathogens	3	377-389	2014

Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, <u>Marusawa H</u>	Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma.	Gastroenterology	146(1)	222-232	2014
Latief MA, Chikama T, Shibasaki M, Sakaki T, Ko J-A, Kiuchi Y, <u>Sakaguchi T</u> , Obana A.	Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy in vitro.	Lasers Med. Sci.	30(1)	383-387	2015
坂口剛正、上田恭子、川端涼子	柿渋でウイルス対策 柿タンニンによる強力なウイルス不活化作用	ニューフェードインダストリー	56(11)	17-24	2014
Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, <u>Abe H</u> , Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes	Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA	J Viral Hepat	21	e89-97	2014
Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, <u>Abe H</u> , Hisa JT, Chen DS, Yang SS, <u>Chayama K</u> , Kao JH.	On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy.	Antivir Ther	In press		