

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 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
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) ツパイ全ゲノム解析に基づく B型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究
(英語) Research on the development of hepatitis B virus animal infection model based on the whole genome analysis of *Tupaia belangeri*

s

研究開発担当者 小原 道法 (日本語) 公益財団法人東京都医学総合研究所 ゲノム医科学研究分野 シニア研究員
所属 役職 氏名：(英語) Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Senior Researcher Michinori Kohara
実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ツパイ自然免疫応答の解析
開発課題名：(英語) Analysis of innate immune responses in tree shrews
研究開発分担者 (日本語) 熊本大学 教授 押海裕之
所属 役職 氏名：(英語) Kumamoto University Professor Hiroyuki Oshiumi

分担研究 (日本語) 超高感度検出系の確立と血清学的解析
開発課題名：(英語) Development and study of high-sensitive serologic tests for HBV.
研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科 ウイルス学分野 特任助教 村上 周子
所属 役職 氏名：(英語) Nagoya City University Graduate School for Medical Sciences, Specially Appointed Assistant Professor, Shuko Murakami

分担研究 (日本語) 肝細胞を標的とした薬物送達システムの開発
開発課題名：(英語) Development of drug delivery system for targeting hepatocytes
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人北海道大学 特任助教 櫻井遊
所属 役職 氏名：(英語) Hokkaido University, Assistant Professor, Yu Sakurai

分担研究 (日本語) B型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデル・ツパイを用いた免疫治療の開

発に関する研究

開 発 課 題 名 : (英 語) Research of development for imuuno-therapy against HBV by using small animal model tupaia that reproduces continuous infection of hepatitis B virus

研究開発分担者 (日本語) 愛媛大学大学院 消化器・内分泌・代謝内科学 教授 日浅陽一

所属 役職 氏名 : (英 語) Yoichi Hiasa, Professor, Department of Gastroenterology and Metabology, Ehime University Graduate School of Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

〔和文〕

HBV 持続感染ツパイ個体は自然免疫・獲得免疫系が正常であることから、治療ワクチンやアジュバント活性、HBV 蛋白質を標的とした HBV-siRNA や阻害剤の評価などに使用でき、新たな治療法の開発に貢献できる可能性は高い。繁殖体制を確立し、利用者に提供できる環境の確立を目指した。

ツパイの全ゲノム解析及び次世代シーケンサーによる網羅的 mRNA 発現解析を行った。これにより正確なツパイ遺伝子配列が明らかとなり、免疫解析に必要なサイトカインや細胞表面マーカー、レセプター、自然免疫、シグナル分子群から分子 130 種類に対し抗体を作製して解析系の構築を進めた。各遺伝子の相同性を比較すると、ほとんどの分子がマウスよりもヒトのものに近い事が明らかとなった。この遺伝子情報はデータベース化し情報公開を目指している。

HBV に対して自然免疫を維持したまま感受性を持つツパイにおいて飼育管理・繁殖・育成方法を確立した。これまでの繁殖率、離乳率、育成率のいずれも過去の報告を上回るものであった。70 頭の F0 ツパイから約 450 頭の F1 ツパイを得た。平均の産児数は約 3 頭で、離乳率は約 60% であった。さらに F2、F3 ツパイの繁殖を進めている。

ツパイに HBV を感染すると、肝炎を引き起こし、また持続的に感染することが明らかとなり、ヒトにおける HBV 感染モデル動物として有用であることが明らかとなった。持続感染を示したツパイに関してはウイルス側と宿主側因子応答の解明も進めた。また、HBV 接種後の感染評価について、微量の血清で検出可能な超高感度測定系を確立し、HBV-DNA、HBs 抗原、HBcr 抗原などの感染評価と、AST、ALT、アルブミン等の生化学的評価が可能となった。さらに、HBV による肝発癌モデルの作成を目的として、病態進展が早く、肝発癌リスクが高いことが報告されている HBV genotype F 変異株より、感染源を作製した。

HBV 感染時の生体内での自然免疫応答を明らかとするために、ツパイ個体へ HBV を感染させ感染後の自然免疫応答について次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。ツパイ動物モデルでは II 型インターフェロンの産生が肝臓特異的に強く観察された。ウッドチャックを用いた動物モデルでは以前より、II 型インターフェロンを産生する NK 細胞の活性化レセプターの発現上昇が報告されている。ツパイ動物モデルを用いることで、HBV 感染時には肝臓のマクロファージが NK 細胞を活性化させ、II 型インターフェロンの発現を誘導することを解明した。

ナノパーティクル(LNP)の肝実質細胞への移行性(体内動態)および細胞取り込み後のエンドソーム脱出を介した細胞質移行性(細胞内動態制御)を両立可能な新規脂質様材料の開発を行った。血中(pH7.4)では電気的中性を示し、エンドソーム内(pH6.0)では正に帯電する pH 感受性カチオン性脂質 YSK13 を開発した。その結果、従来のシステムと比較して約 10 倍程度の肝実質細胞への siRNA 送達効率化が認められ、世界最高水準の性能を達成した。HBV 持続感染ヒト肝臓キメラマウスにおける LNP による HBV 抑制効果を検証した結果、単回投与により 2 週間以上の持続的な抑制効果が得られ、HBV 治療を行う上で十分な活性を有していることが実証された(特願 2014-217011 号、Yamamoto N, Sato Y et al. *J Hepatol*, 2016)。

HBV が持続感染しているツパイ個体に HBs 抗原及び HBc 抗原を免疫し、その治療効果を検討した。さらに HBs 抗原・HBc 抗原に加えて K3-SPG アジュバント、HBV-siRNA/MEND を併用投与してその排除効果を検討したところ、K3-SPG アジュバント、HBV-siRNA/MEND 併用投与群では血清中の HBV が検出限界以下に低下し続けた。今後さらに多くの遺伝子型の HBV 感染ツパイで治療効果について検証を進めていく。ツパイは、チンパンジーよりも小型で寿命が短く、マウスよりもヒトに近い遺伝情報を持っており、今後 HBV 研究並びに各種治療薬の効果判定に威力を発揮する可能性が期待できる。

〔英文〕

Tupaia is small mammal that is similar in appearance to squirrels. The morphological and behavioral

characteristics of the group have been extensively characterized, and despite previously being classified as primates, recent studies have placed the group in its own family, the Tupaiidae. Genomic analysis has revealed that the genus *Tupaia* is closer to humans than it is to rodents. In addition, tupaia are susceptible to hepatitis B virus and hepatitis C virus. The only other experimental animal that has been demonstrated to be sensitive to both of these viruses is the chimpanzee, but restrictions on animal testing have meant that experiments using chimpanzees have become almost impossible.

In this study, we developed a small animal model *Tupaia belangeri* for hepatitis B virus (HBV) natural infection model. We performed the whole genome analysis, establishment of tools for characterization, characterization of immune response in HBV infected tupaia. Furthermore, we have established the HBV-DNA quantitation, HBs antibody and HBc antibody detection system and high sensitive HBs antigen detection system. Using a tupaia animal model, we revealed that HBV infection induces hepatic IFN- γ expression in early infection. IFN- γ induces the expression of antiviral genes in hepatocytes, including the gene encoding DDX60 RNA helicase, a cofactor of the RNA exosome, which degrades viral RNA. The DDX60 protein promoted cytoplasmic HBV RNA degradation, thereby suppressing viral replication.

We developed the tupaia HBV infection model and this animal infection model could become a powerful tool for hepatitis virus research and in preclinical studies on drug development.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 26件)

1. Mohammad Enamul Hoque Kayesha, Sayeh Ezzikouric, Haiying Chib, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Bouchra Kitabb, Takumi Haraguchib, Rika Matsuyama, Chimène Nze, Nkoguea, Hitoshi Hatai, Noriaki Miyoshi, Shuko Murakami, Yasuhito Tanaka, Jun-ichiro, Takano, Yumiko Shiogama, Yasuhiro Yasutomi, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Interferon- α response is impaired by hepatitis B virus infection in *Tupaia belangeri*. *Virus Research* 2017 237: 47-57.
2. Kayesh MEH, Kitab B, Sanada T, Hayasaka D, Morita K, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Susceptibility and initial immune response of *Tupaia belangeri* cells to dengue virus infection. *Infect Genet Evol.* 2017, S1567-1348(17), 30116-8.
3. Yuko Tokunaga, Yosuke Osawa, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Kenzaburo Yamaji, Daisuke Yamane, Mitsuko Hara, Keisuke Munekata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Tsunekazu Hishima, Soichi Kojima, Kiminori Kimura, and Michinori Kohara. Selective inhibitor of Wnt/b-catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Scientific Reports* 2017, 7(1):325.
4. Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Oshiumi H. Extracellular Vesicles Deliver Host and Virus RNA and Regulate Innate Immune Response. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18: pii: E666.
5. Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Innovative technologies in Nanomedicines: from passive targeting to active targeting/from controlled pharmacokinetics to controlled intracellular pharmacokinetics. *Macromol Biosci*, 2017, 17, 1600179.
6. Takahiro Sanada, Yuichi Hirata, Yutaka Naito, Naoki Yamamoto, Yoshiaki Kikkawa, Yuji Ishida, Chihiro Yamasaki, Chise Tateno, Takahiro Ochiya, and *Michinori Kohara. Transmission of HBV-DNA mediated by ceramide-triggered extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2016 Oct 24;3(2):272-283.

7. Takahisa Kouwaki, Yoshimi Fukushima, Takuji Daito, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Edin J. Mifsud, Chean Ring Leong, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya and Hiroyuki Oshiumi. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. *Front. Immunol.* 2016, 7, 335. Kenji Sugata, Jun-ichirou Yasunaga, Michi Miura, Hirofumi Akari, Atae Utsunomiya, Kisato Nosaka, Yuko Watanabe, Hitoshi Suzushima, Ki-Ryang Koh, Masanori Nakagawa, Michinori Kohara, *Masao Matsuoka. Enhancement of anti-S 1 TLV-1/HTLV-1 immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody. *Scientific Reports* 2016 Jun 2;6:27150.
8. Ryohei Saga, Akira Fujimoto, Noriyuki Watanabe, Mami Matsuda, Makoto Hasegawa, Koichi Watashi, Hideki Aizaki, Noriko Nakamura, Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Eiji Konishi, Takanobu Kato, Michinori Kohara, Haruko Takeyama, Takaji Wakita, *Ryosuke Suzuki. Bivalent vaccine platform based on Japanese encephalitis 1 virus (JEV) elicits neutralizing antibodies against JEV and hepatitis C virus. *Scientific Reports* 2016 Jun 27;6:28688.
9. Leong CR, Funami K, Oshiumi H, Mengao D, Takaki H, Matsumoto M, Aly HH, Watashi K, Chayama K, Seya T. Interferon-stimulated gene 20 kDa protein (ISG20) degrades RNA of hepatitis B virus to impede the replication of HBV in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016 7: 65179-68193.
10. Azuma M, Takeda Y, Nakajima H, Sugiyama H, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Biphasic function of TLR3 adjuvant of tumor and spleen dendritic cells promotes tumor T cell infiltration and regression in a vaccine therapy. *Oncoimmunology* 2016, 5: e1188244.
11. Takashima K Takeda Y, Oshiumi H, Shime H, Okabe M, Ikawa M, Matsumoto M, Seya T. STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation. *BBRC* 2016, 478: 1764-1771.
12. The dataset of proteins specifically interacted with activated TICAM-1. Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Obuse C, Seya T. *Data Brief* 2016, 8:697-699.
13. Oshiumi H, Kouwaki T, Seya T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. *Front. Immunol.* 2016, 7: 200.
14. Chi Hai-Ying, Kiori Nagano, Sayeh Ezzikouri, Chiho Yamaguchi, Mohammad Enamul Hoque Kayesh, Khadija Rebbani, Bouchra Kitab, Hirohumi Nakano, Hiroyuki Kouji, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Establishment of an intermittent cold stress model using *Tupaia belangeri* and evaluation of compound C737 targeting neuron-restrictive silencer factor. *Exp Anim.* 2016, 65(3), 285-92.
15. Naoki Yamamoto, Yusuke Sato, Tsubasa Munakata, Masakazu Kakuni, Chise Tateno, Takahiro Sanada, Yuichi Hirata, Shuko Murakami, Yasuhito Tanaka, Kazuaki Chayama, Hiroto Hatakeyama, Mamoru Hyodo, Hideyoshi Harashima and *Michinori Kohara. Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection. *J. Hepatology* 2016; 64:547-555.
16. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Murakami S, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosoya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M, Moriishi K. Inhibitory effect of CDK9 inhibitor FIT-039 on hepatitis B virus propagation. *Antiviral Res.* 133:156-64, 2016
17. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsuhashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E,

- Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. **Sci Rep.** 6:24767, 2016.
18. Akbar SM, Al-Mahtab M, Jahan M, Yoshida O, Hiasa Y. Novel insights into immunotherapy for hepatitis B patients. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol.** 10(2):267-76, 2016.
 19. Watanabe T, Tokumoto Y, Joko K, Michitaka K, Mashiba T, Hiraoka A, Ochi H, Koizumi Y, Tada F, Hirooka M, Yoshida O, Imai Y, Abe M, Hiasa Y. Effects of long-term entecavir treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients. **Hepatol Int.** 10(2):320-7, 2016.
 20. Kajimoto K, Suemitsu E, Sato Y, Sakurai Y, Harashima H, Liver-specific silencing of Lipin1 reduces fat mass as well as hepatic triglyceride biosynthesis in mice, *Biol Pharm Bull*, 2016, 39, 1653-61.
 21. Sato Y, Note Y, Maeki M, Kaji N, Baba Y, Tokeshi M, Harashima H, Elucidation of the physicochemical properties and potency of siRNA-loaded small-sized lipid nanoparticles for siRNA delivery, *J Control Release*, 2016, 229, 48-57.
 22. Sato Y, Hatakeyama H, Mamoru M, Harashima H, Relationship between physicochemical properties of lipid nanoparticles and the quality of siRNA delivery to liver cells, *Mol Ther*, 2016, 24, 788-95.
 23. Yamamoto N, Sato Y, Munakata T, Kakuni M, Tateno C, Sanada T, Hirata Y, Murakami S, Tanaka Y, Chayama K, Hatakeyama H, Hyodo M, Harashima H, Kohara M, Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection, *J Hepatol*, 2016, 64, 547-55.
 24. Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H, Development of a multifunctional envelope-type nano device and its application to nanomedicine, *J Control Release*, 2016, 244, 194-204.
 25. Tanaka H, Sato Y, Akita H, Harashima H, Cellular environment-responsive nanomaterials for use in gene and siRNA delivery: molecular design for biomembrane destabilization and intracellular collapse, *Exp Opin Drug Deliv*, 2016, 13, 1015-27.
 26. Sato Y, Harashima H, Kohara M. A multifunctional envelope-type nano device containing a pH-sensitive cationic lipid for efficient delivery of short interfering RNA to hepatocytes in vivo, *Methods in Mol. Biol.*, 2016, 1364, 71-8.
 27. 佐藤悠介, 原島秀吉, pH 感受性脂質を基盤とした脂質ナノ粒子の開発と核酸ナノメディシンへの応用, *化学工業*, 2016, 67(11), 21-7.
 28. 真栄城正寿, 佐藤悠介, 原島秀吉, 渡慶次学, マイクロ流体デバイスによる脂質ナノ粒子作製と DDS への応用, *機能材料*, 2016, 36(7), 15-21.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. メカニズムに基づいた安全性の高い siRNA 搭載脂質ナノ粒子の開発と B 型肝炎治療への応用, 口頭, 佐藤悠介, 松井秀樹, 佐藤里咲, 原島秀吉, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/24-27, 国内.
2. 肝臓標的型 siRNA 送達システムの安全性向上に関する検討, 口頭, 佐藤里咲, 佐藤悠介, 松井秀樹, 原島秀吉, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/24-27, 国内.
3. ツパイ周期性寒冷ストレスモデルの樹立と NRSF を標的とした C737 化合物の評価, ポスター, 池 海英, 永野希織, 山口千穂, MEH Kayesh, R Khadija, Bouchra K., 中野洋文, 小路弘行, 小原道法, 小原 (築山) 恭子: 第 39 回日本分子生物学会 11.30-12.2 2016 パシフィコ横浜 (神奈川), 国内
4. 高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 のシアル酸非依存的感染機構, ポスター, 梶原直樹, 野

- 村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、小原道法、芝崎 太： 第 39 回日本分子生物学会 11.30-12.2 2016 パシフィコ横浜 (神奈川県)、国内
5. 肝臓を標的とした siRNA 搭載脂質ナノ粒子の物理化学的性質が siRNA 導入効率に及ぼす影響の評価, ポスター, 佐藤悠介, 野手雄介, ショバキ スレ, 原島秀吉, 第 2 回日本核酸医薬学会, 2016/11/15-17, 国内.
 6. C型肝炎ウイルスに対する治療ワクチンの作製と作用機序の解明, ポスター, 大槻貴博, 徳永優子, 小原道法 : 第 39 回日本分子生物学会 11.30-12.2 2016 パシフィコ横浜 (神奈川県) 、国内
 7. インフルエンザウイルス感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド, 口頭, 斉藤誠, 安井文彦, 棟方 翼, 飛田良美, 小澤 真, 小原恭子, 伊藤利紗, 菅 裕明, 窪田規一, 小原道法 : 第 39 回日本分子生物学会 11.30-12.2 2016 パシフィコ横浜 (神奈川県)、国内
 8. C型肝炎ウイルス感染による脂肪滴蓄積への PLA2G4C の関与, 口頭, M. Ito, M. Fukasawa, M. Kohara, T. Suzuki : 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 10.23-25 2016 札幌コンベンションセンター (札幌)、国内
 9. B型肝炎ウイルス (HBV) 分子クローンをを用いた HBV 持続感染ツパイモデルの確立, ポスター, J. Takana, Y. Shiogama, S. Soma, N. Yamamoto, M. Kohara, Y. Yasutomi : 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 10.23-25 2016 札幌コンベンションセンター (札幌)、国内
 10. Innate immune response to Hepatitis B and C viruses and infections in *Tupaia belangeri*. 口頭, M. E.H. Kayesh, S.Ezzikouri, H. Chi, N. Miyoshi, T. Sanada, N. Yamamoto, A. Matuu, M. Kohara. K. Tsukiyama-Kohara : 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 10.23-25 2016 札幌コンベンションセンター (札幌)、国内
 11. Sanada T., Hirata Y., Naito Y., Yamamoto N., Kikkawa Y., Ishida Y., Yamasaki C., Tateno C., Ochiya T., Kohara M. : Transmission of HBV-DNA mediated by extracellular vesicles. 口頭, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 10.23-25 2016 札幌コンベンションセンター (札幌)、国内
 12. ワクチニアウイルス D1s 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンのカニクイザルでの八章防御効果の検討, 口頭, 宗片圭祐, 安井文彦, 伊藤 靖, 石井孝司, 喜田 宏, 小笠原一誠, 小原道法 : 第 20 回日本ワクチン学会学術集会 10.22-23 2016 京王プラザホテル (東京)、国内
 13. Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally-occurring miR-122 3' variants. , ポスター, Daisuke Y, Sara R. S, Tetsuro S., You L., Masao H., Michinori K., Praveen S., Stanley M. L., : 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 10.11-15 2016 Kyoto, Japan、国内
 14. Amelioration of HCV liver fibrosis by selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling. , ポスター, Tokunaga Y., Osawa Y., Ohtsuki K., Yamaji K., Yamane D., Munekata K., Hara M., Kojima S., Kimura K., Kohara M. : 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 10.11-15 2016 Kyoto, Japan、国内
 15. Optimizing siRNA delivery using specific multifunctional envelope-type nanodevice for liver sinusoidal endothelial cells , ポスター, Shobaki N, Sato Y, Harashima H, Asian conference on nanoscience and nanotechnology AsiaNANO 2016: Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology, 2016/10/10-13, 国内.
 16. Serum DHCR24 auro-antibody as a new biomarker for prognosis of hepatitis C. 口頭, Sayeh Ezzikouri., Kimura K., Kaneko S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. : 第 75 回日本癌学会学術総会 10.6-8 2016 パシフィコ横浜 (神奈川県)、国内
 17. Transcriptome profiling reveals quick immune response in the early stage of HBV infection

in *Tupaia belangeri*. 、ポスター、 Sanada T., Tsukiyama-Kohara K., Yamamoto N., Kayesh MEH., Takano J., Shiogama Y., Yasutomi Y., Kohara M. : 2016 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 9.21-24 2016 ソウル (韓国)、国外

18. Extracellular vesicles play a crucial role in antiviral innate immune response to HBV infection. 口頭、Oshiumi H., Kouwaki T, Fukushima Y, Okamoto M. あわじ感染症・免疫フォーラム, 2016/9/6, 国内.
19. Roles of Iron and fatty acid desaturase in the restriction of lipid peroxidation-sensitive hepatitis C viruses. 、ポスター、 Yamane D., Lemon S.M., Kohara M. : 第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム 9.6-9 2016 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)、国内
20. Pathogenesis and Immuno-therapy of Hepatitis C virus Infection. 口頭、 Tsukiyama-Kohara K., Sekiguchi S., Kimura K., Ohtsuki T., Tokunaga Y., Kohara M. : 10th Vaccine Congress 9.4-7 2016 Amsterdam, the Netherlands、国外
21. Prevention effect of H5N1 HPAI and H1N1 pdm2009 influenza vaccine based on highly attenuated vaccinia virus vector in cynomolgus monkeys. 、ポスター、 Munekata K., Yasui F., Itoh Y., Ishii K., Sakoda Y., Kida H., Ogasawara K., Kohara M. : 10th Vaccine Congress 9.4-7 2016 Amsterdam, the Netherlands、国外
22. Transmission of HBV-DNA mediated by extracellular vesicles. Keystone Symposia Exosomes/Microvesicles: Novel Mechanisms of Cell-Cell Communication. 、ポスター、 *Sanada T., Hirata Y., Naito Y., Yamamoto N., Ishida Y., Yamasaki C., Tateno C., Ochiya T., Kohara M. : 6.19-22 2016 Keystone Resort, Colorado (USA)、国外
23. 新規肝臓特異的 pH 応答性 DDS (MEND/HBV-siRNAmix) を用いた HBV 持続感染の制御、口頭、 *山本直樹、佐藤悠介、棟方 翼、真田崇弘、加国雅和、立野知世、原島秀吉、小原道法 : 第26回ウイルス療法学会総会 5.13-15 2016 名古屋市立大学 (愛知県名古屋市) 、国内
24. B型肝炎ウイルスに対する自然免疫応答におけるエクソソームの役割、口頭、押海裕之、第81回日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会, 2016/5/13, 国内
25. Transmission of HBV DNA mediated by extracellular vesicles. 、ポスター、 Sanada T., Hirata Y., Yamamoto N., Ishida Y., Yamasaki C., Tateno C., Ochiya T., *Kohara M. : 4th JAPAN-TAIWAN Research Symposium on Hepatitis B Virus 4.9-10 2016 台北 Academia Sinica (台湾台北市)、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) ツパイ全ゲノム解析に基づく B型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究
(英語) Research on development of small animal model of HBV infection that reproduces continuous infection of hepatitis B virus

研究開発担当者 (日本語) 保富 康宏
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所
霊長類医科学研究センター センター長
所属 役職 氏名： (英語) Yasuhiro Yasutomi
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition
Tsukuba Primate Research Center, Director

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) HBV 高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析
開発課題名： (英語) Establishment of breeding colony of tree shrews (*Tupaia belangeri*) for HBV chronic infected animal model and analysis of acquired immune systems

研究開発分担者 (日本語) 保富 康宏
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所
霊長類医科学研究センター センター長
所属 役職 氏名： (英語) Yasuhiro Yasutomi
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition
Tsukuba Primate Research Center, Director

分担研究 (日本語) ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価
開発課題名： (英語) Development for immunological assays in *Tupaia belangeri*

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
アジュバント開発プロジェクト
主任研究員
山本 拓也

所属 役職 氏名: (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition
Laboratory of Adjuvant Innovation
Deputy Project Leader
Takuya Yamamoto

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者: 公益財団法人東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクトシニア研究員 小原道法 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)

1. Okamura T., Tsujimura Y., Soma S., Takahashi I., Matsuo K., Yasutomi Y. Simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection and simian human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection result in progression to AIDS in cynomolgus macaques from Asian country origin. *J General Virol* 97;3413-3426,2016
2. Uchihara T., Endo K., Kondo H., Okabayashi S., Shimozawa N., Yasutomi Y., Adachi E., Kimura N. Tau pathology in aged cynomolgus monkeys is progressive suranuclear palsy/corticobasal degeneration - but not Alzheimer disease -like-ultrastructural mapping of tau by EDX-. *Acta Neuropathologica Commun.* 2016 4;118-126,2016
3. Kobayashi M., Koyama T., Yasutomi Y., Sankai T. Male mate choice among captive long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) *Int J Comp Physiol* in press
4. Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Is Required for Alteration in β -Amyloid Precursor Protein Metabolism. *Am J Pathol* 186:1952-1966, 2016.
5. Tajiri K., Yasutomi Y., Aonuma K. Recent advances in the management of autoimmune myocarditis: insights from animal studies. *Curr Pharm Des.* 2016;22:427-439
6. Suzuki S., Mori KI., Higashino A., Iwasaki Y., Yasutomi Y., Maki N., Akari H. Persistent replication of a hepatitis C virus genotype 1b-based chimeric clone carrying E1, E2 and p6 regions from GB virus in a New World monkey. *Microbiol Immunol.* 2016;60:26-34.
7. Yasuyo Fujishiro, Hiroshi Koie, H.Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Chieko Ohno, Kiichi Kanayama, Y.Yasutomi, N.Ageyama. Tracking cells implanted into cynomolgus monkeys (*Macaca*

fascicularis) using MRI. Exp Anim. 2016 Jul 29;65(3):311-8.

8. Tsujimura Y., Yasutomi Y. Allergy vaccines using Mycobacterium secreted antigen and IL-4 antagonist. Methods Mol. Biol. 2016;1403:723-738.
9. Ito H, Ando T, Nakamura M, Ishida H, Kanbe A, Kobiyama K, Yamamoto T, Ishii KJ, Hara A, Seishima M, Ishikawa T. Induction of humoral and cellular immune response to hepatitis B virus (HBV) vaccine can be upregulated by CpG oligonucleotides complexed with Dectin-1 ligand. J Viral Hepat. 2016 Nov 3. doi: 10.1111/jvh.12629. [Epub ahead of print]
10. Kitahata Y, Kanuma T, Hayashi M, Kobayashi N, Ozasa K, Kusakabe T, Temizoz B, Kuroda E, Yamaue H, Coban C, Yamamoto T, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. Circulating nano-particulate TLR9 agonist scouts out tumor microenvironment to release immunogenic dead tumor cells. Oncotarget. 2016 Jul 1. doi: 10.18632/oncotarget.10379. [Epub ahead of print]
11. Mitsuki YY*, Yamamoto T*, Mizukoshi F, Momota M, Terahara K, Yoshimura K, Harada S, Tsunetsugu-Yokota Y. (*contributed equally to this work) A novel dual luciferase assay for the simultaneous monitoring of HIV infection and cell viability. J Virol Methods. 2016 May;231:25-33.
12. Lissina A*, Ambrozak DR, Boswell KL, Yang W, Boritz E, Wakabayashi Y, Iglesias MC, Hashimoto M, Takiguchi M, Haddad E, Douek DC, Zhu J, Koup RA, Yamamoto T*, Appay V. (*co-corresponding authors) Selective Loss of Early Differentiated, Highly Functional PD1high CD4 T Cells with HIV Progression. Immunol Cell Biol. 2016 Jul;94(6):583-92.
13. Kobiyama K, Temizoz B, Kanuma T, Ozasa K, Momota M, Yamamoto T, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Species-dependent role of type I IFNs and IL-12 in the CTL response induced by humanized CpG complexed with β -glucan. Eur J Immunol. 2016 May;46(5):1142-51.
14. 升田 雄士, 山本 拓也. 霊長類モデルによるアジュバントの評価. 次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価. 2017, 336-342

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. B型肝炎ウイルス(HBV)分子クローンを用いた HBV 持続感染ツパイモデルの確立, ポスター, 高野 淳一郎・塩釜 ゆみ子・相馬 祥吾・山本 直樹・小原 道法・保富 康宏, 第64回日本ウイルス学会, 2016/10/23~2016/10/25, 国内.
2. 保富康宏 結核ワクチンの開発 大阪シンポジウム 2016年12月17日 大阪
3. 保富康宏 Novel TB Vaccine シンポジウム 第6回国債結核肺疾患予防連合学術大会 2017年3月22-25日 東京
4. 霊長類カニクイザルを用いた核酸アジュバント in vivo 投与による有効性と安全性の検討, 口頭, 升田 雄士, 夏目 やよい, 小檜山 康司, 水口 賢司, 保富 康宏, 山本 拓也, 石井 健, 日本ワクチン学会(東京), 2016/10/23, 国内

5. Assessment of nucleic acid-based adjuvant activity in non-human primate models *in vivo*, 口頭, Yuji Masuta, Yasuhiro Yasutomi, Takuya Yamamoto, Ken J. Ishii, 第45回日本免疫学会 (沖縄), 2016/12/5, 国内
6. 霊長類カニクイザルを用いた核酸アジュバント *in vivo* 投与による有効性と安全性の検討, ポスター, 升田 雄士, 夏目 やよい, 小檜山 康司, 水口 賢司, 保富 康宏, 山本 拓也, 石井 健, 第11回次世代アジュバント研究会 (大阪), 2017/1/24, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特にございませぬ。

(4) 特許出願
特にございませぬ。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業

(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) ツパイ全ゲノム解析に基づく B型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究

(英語) Research on the development of hepatitis B virus animal infection model based on the whole genome analysis of *Tupaia belangeri*

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人鹿児島大学 教授 小原 恭子

所属 役職 氏名：(英語) Kagoshima University Professor Kohara Kyoko

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) ツパイ免疫学的解析系の確立、HBV-ツパイ実験モデルの確立

開発課題名：(英語) Establishment of tupaia immunology and HBV infection system

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人鹿児島大学 教授 小原 恭子

所属 役職 氏名：(英語) Kagoshima University, Professor, Kyoko Kohara

II. 成果の概要(総括研究報告)

[和文]

本研究では動物感染モデルがチンパンジーのみであるB型肝炎ウイルス(HBV)に自然感染するリスク程度の小型動物ツパイ(*Tupaia belangeri*)をHBV感染動物モデルとして開発した。これまでに、京都医学研の小原道法プロジェクトリーダーや医薬基盤研究所・霊長類センターの保富センター長らと協力し、①次世代シーケンズを用いてツパイの全ゲノムを解析し、②この情報を基にツパイ免疫関連遺伝子の同定と、③その応答解析に必要な実験ツール(免疫系宿主因子のcDNAや特異抗体など)を樹立した。ツパイ全ゲノム情報は、WEB上に公開を予定している。また、③のツールを用いて④HBV感染ツパイの免疫応答を解析した。現在ツパイ全ゲノム情報に基づき、自然免疫ならびに獲得免疫系の解析に重要と考えられるツパイ遺伝子(CD4、CD8など免疫担当細胞マーカー、サイトカイン・ケモカインなど)、約130遺伝子の同定が終了し、遺伝子のプライマーやプローブの作成が終了している。TLRやインターフェロン等の遺伝子定量系を確立して、自然免疫解析系も樹立

した。これらとは別に、HBV-DNAの定量系、HBs抗体、HBc抗体の測定系の確立、また同じ研究班の名古屋市立大学の村上班員によりHBs抗原の高感度測定系も確立して、HBV感染の評価を可能にした。以上の成果により、ツパイにおいてHBV感染やそれによる宿主側の免疫応答の詳細な解析が可能となった。また、これらのツールを用いて基礎的な解析も進み、HBVが慢性感染したツパイでは、IFN- β の誘導が抑制されている事も明らかとなった (Virus Research 2017)。

また、これまでにツパイの飼育・繁殖技術を確立して♀15頭♂10頭から、300頭以上の新生児ツパイを得てきた。さらに、採血法を確立し、HBV感染の指標であるウイルス定量系の確立やALT値の測定も2週間隔で行ってきた。新生仔ツパイ個体にHBV・遺伝子型A2株、B株、C株、D3株、D7株、E株、J株を感染させHBV-DNAを経日的に観察した結果、全てのHBV株はツパイ感染した。HBV-A2株とJ株においてウイルスの力価が高く成り易かった。ウイルス接種法は皮下接種が良い事も明らかとなった。さらに、A2株を新生児に皮下接種すると、高率に持続感染が成立する事も明らかとなった。

一方で、ツパイ個体によりHBVへの感染感受性が異なる事も明らかとなり、HBV感染の陽性率が50%となる系統をすくなくとも2つ見いだした。このような系統を中心に交配を進め、現在F2世代の産仔までが得られている。さらに、治験等に備えて、ツパイの繁殖体制をより拡大し、感染感受性の良い系統を繁殖できるように大量繁殖用ケージの設置を行った。

以上の様に、ツパイをHBV感染モデルとして開発し、抗ウイルス薬やワクチン評価系として高いポテンシャルを持つ事を示した。

[英文]

In this study, we have developed a small animal model *Tupaia belangeri* for hepatitis B virus (HBV) natural infection model. We have collaborated with Dr Michinori Kohara (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) and Dr Yasuhiro Yasutomi (The Primate Center, NIID), and performed ① Whole genome analysis of tupaia using next generation sequencing. ② Identification of immune response genes. ③ Establishment of tools for characterization of immune responses (cDNAs and antibodies for immune regulation genes) and release in the WEB in near future. ④ Characterization of immune response in HBV infected tupaia. Until now, identification of tupaia genes concerning innate immune response and acquired immune responses has been completed. In addition, HBV-DNA quantitation, HBs antibody and HBc antibody detection system and high sensitive HBs antigen detection system (by Dr Murakani, Nagoya-City University) have been established. By using these systems, HBV infection can suppress IFN- β induction in tupaia (Virus Research 2017).

We also established the protocol for breeding of tupaia and get more than 300 babies from 15 female and 10 male tupaia, so far. We established blood collected protocol and chase the viral load and ALT. Tupaia was susceptible for HBV-A2, B, C, D3, D7, E and J strain. HBV-A2 can easily establish persistent infection when injected to newborn tupaia, subcutaneously. We also established at least 2 tupaia lines which can established HBV infection at more than 50% positive rate. We also make large cages for the large scale breeding.

Thus, we have succeeded to develop tupaia HBV infection model and established its protocol for development of anti-viral drugs and vaccine.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： (公財)東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト・小原道法 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 6 件）
1. KAYESH MEH, EZZIKOURI S, CHI H, SANADA T, YAMAMOTO N, KITAB B, HARAGUCHI T, MATUYAMA R, NKOOGUE CN, HATAI H, MIYOSHI N, MURAKAMI S, TANAKA Y, TAKANO J, SHIOGAMA Y, YASUTOMI Y, KOHARA M, TSUKIYAMA-KOHARA K. Interferon- α response is impaired by hepatitis B virus infection in *Tupaia belangeri*. *VIRUS RESEARCH* 2017, 237, 47-57.
 2. KAESH ME, KITAB B, SANADA T, HAYASAKA D, MORITA K, KOHARA M, TSUKIYAMA-KOHARA K. Susceptibility and initial immune response of *Tupaia belangeri* cells to dengue virus infection. *Infect Genet Evol.* 2017, S1567-1348(17), 30116-8.
 3. TOKUNAGA Y, OSAWA Y, OHTSUKI T, HAYASHI Y., YAMAJI K, YAMANE D, HARA M, MUNEKATA K, TSUKIYAMA-KOHARA K, HISHIMA T, KOJIMA S, KIMURA K, KOHARA M. Selective inhibitor of Wnt/b-catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Scientific Reports* 2017, 7(1):325.
 4. EZZIKOURI S, JADID FZ, HAMDI S, WAKRIM L, TSUKIYAMA-KOHARA K, BENJELLOUN S. Supplementing conventional treatment with Pycnogenol® may improve hepatitis C Virus-associated type 2 diabetes: A Mini review. *Journal of Clin. Transl. Hepatol.* 2016, 4(3), 228-33.
 5. KOUWAKI T, FUKUSHIMA Y, DAITO T, SANADA T, YAMAMOTO N, MIFSUD EJ, LEONG CR, TSUKIYAMA-KOHARA K, KOHARA M, MATSUMOTO M, SEYA T, OSHIUMI H. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. *Front. Immunol.* 2016, 7, 335.
 6. REBBANI K, TSUKIYAMA-KOHARA K. HCV-Induced Oxidative Stress: Battlefield-Winning Strategy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, 2016, 7425628.
 7. NKOOGUE CN, HORIE M, FUJITA S, OGINO M, KOBAYASHI Y, MIZUKAMI K, MASATANI T, EZZIKOURI S, MATSUU A, MIZUTANI T, OZAWA M, YAMATO O, NGOMANDA A, YAMAGIWA J, TSUKIYAMA-KOHARA K. Molecular epidemiological study of adenovirus infecting western lowland gorillas and humans in and around Moukalaba-Doudou National Park (Gabon). *Virus Genes.* 2016, 52(5), 671-8.
 8. HAI-YING C, NAGANO K, ESSIKOURI S, YAMAGUDHI C, KAYESH ME, REBBANI K, KITAB B, NAKANO H, KOUJI H, KOHARA M, TSUKIYAMA-KOHARA K. Establishment of an intermittent cold stress model using *Tupaia belangeri* and evaluation of compound C737 targeting neuron-restrictive silencer factor. *Exp Anim.* 2016, 65(3), 285-92.
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
1. ツパイ周期性寒冷ストレスモデルの樹立と NRSF を標的とした C737 化合物の評価
口頭、池海英、永野希織、山口千穂、Kayesh, MEH., Khadija, R., Bouchra, K., 中野洋文、小路弘行、小原道法、小原（築山）恭子、第63回日本実験動物学会総会 2016/5/18、国内
 2. 新規ウイルス感染実験動物 *Tupaia belangeri* の開発、口頭、小原恭子、真田崇裕、小原道法、第12回広島肝臓プロジェクトシンポジウム、2016/6/25、国内
 3. Susceptibility of tupaia cells to dengue virus infection and their initial immune response. 口頭、Kitab, B.,

- Kayesh, MEH, Sanada, T., Hayasaka, D., Morita, K., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. 第53回日本ウイルス学会九州支部総会, 2016/9/2、国内
4. Pathogenesis and Immuno-therapy of Hepatitis C virus Infection. 口頭、Tsukiyama-Kohara, K., Sekiguchi, S., Kimura, K., Ohtsuki, T., Tokunaga, Y., Kohara, M. 10th Vaccine Congress, 2016/9/7、国外
 5. Innate Antiviral Immune Responses to Hepatitis B Virus in *Tupaia belangeri*. ポスター、Kayesh, MEH, Sanada, T., Yamamoto, N., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HBV2016, 2016/9/21、国外
 6. Transcriptome profiling reveals quick immune response in the early stage of HBV infection in *Tupaia belangeri*. ポスター, Sanada, T., Tsukiyama-Kohara, K., Yamamoto, N., Kohara, M. HBV2016, 2016/9/21, 国外
 7. Serum DHCR24 auto-antibody as a new biomarker for prognosis of hepatitis C. 口頭、Ezzikouri, S., Kimura, K., Kaneko, S., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. 第75回日本癌学会 2016/10/7、国内
 8. Hepatitis C virus replication requires ribonucleotide reductase M2 to stabilize NS5B protein. 口頭、Kitab, B., Satoh, M., Sudoh, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HCV2016, 2016/10/12、国内
 9. Innate Antiviral Immune Responses to Hepatitis Viruses in *Tupaia belangeri*. ポスター、Kayesh, MEH, Ezzikouri, S., Chi, H., Sanada, T., Yamamoto N., Kitab, B., Matuu, A., Hatai, H., Miyoshi, N., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HCV2016, 2016/10/12、国内
 10. Innate immune response to Hepatitis C virus or Hepatitis B virus in *Tupaia belangeri* Liver or PBL. 口頭、Kayesh, MEH, Ezzikouri, S., Chi, H., Miyoshi, N., Sanada, T., Yamamoto, N., Matsuu, A., Horie, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23、国内
 11. 新規実験動物モデル「ツパイ」の開発、口演（招待講演） 小原恭子 第39回九州実験動物研究総会 2016/10/29、国内
 12. 肝炎ウイルスの病原性と病態モデル、口演（招待講演） 小原恭子、第12回霊長類医科学フォーラム 2016/11/18、国内
 13. ツパイ周期性寒冷ストレスモデルの樹立とNRSFを標的としたC737化合物の評価、ポスター、池海英、永野希織、山口千穂、Kayesh, MEH., Khadija, R., Bouchra, K., 中野洋文、小路弘行、小原道法+、小原（築山）恭子 第39回日本分子生物学会年会 2016/12/2、国内
 14. インフルエンザウイルス感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド、ポスター、齊藤誠、安井文彦、棟方翼、飛田良美、小澤真、小原恭子、伊東利紗、菅裕明、窪田規一、小原道法 第39回日本分子生物学会年会 2016/12/2、国内
 15. 新規感染動物モデル「ツパイ」の開発、口演（招待講演） 小原恭子 第2回 鹿児島大学感染症制御のためのシンポジウム 2017/1/23、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願