

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(地球規模保健課題解決推進のための研究事業) 成果報告書

基本情報

事業名：(日本語) 地球規模保健課題解決推進のための研究事業 日米医学協力計画
(英語) Research Program on the Challenges of Global Health Issues: U.S.-
Japan Cooperative Medical Sciences Program

補助事業課題名：(日本語) 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性肝炎に関する研究
(英語) Research on viral hepatitis through U.S.-Japan Cooperative
Medical Sciences Program

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 副所長 脇田 隆字
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases, Deputy Director-
General, Dr. Takaji Wakita

実施期間：平成28年5月16日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性肝炎の研究・米側との専門協議
(英語) Research on viral hepatitis through U.S. - Japan Cooperative Medical
Sciences Program

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所 副所長 脇田 隆字
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Infectious Diseases, Deputy Director-General,
Dr. Takaji Wakita

I. 成果の概要 (総括研究報告)

1. 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性肝炎の研究・米側との専門協議

A型肝炎疫学調査ではスリランカのA型肝炎流行に関する疫学調査について報告した。現在日本のA型肝炎抗体陽性率調査のための倫理申請をおこなっており、承認され次第7,000サンプル以上の血清をもちいて調査を進める予定である。台湾では同性愛者においてA型肝炎の流行があり、同一株が日本でも検出されている。今後の動向に注意が必要と考える。アジア各国におけるB型肝炎ワクチン接種に関してはWPROのERP委員会を通じて動向を把握している。この地域では高い接種率が維持されている。B型肝炎新規治療法の開発ではサイクロスポリン誘導体について報告した。C型肝炎研究ではDAAの組み合わせ、新たなレセプターの同定などをおこなった。E型肝炎ウイルスに対しては抗ウイルス活性を持つ化合物のスクリーニングを進

めている。H28年11月にはボストンで米国側の研究者と意見交換、情報共有をした。

2. B型肝炎関連肝発癌の研究

HBVのpreS-2領域の塩基配列が、宿主のmicroRNAの一種で癌抑制機能を持つlet-7を吸着し、その機能を攪乱する可能性があることをみいだした。HBV large S mRNAが発現するトランスジェニックマウスを作製し、DENを用いた化学物質による肝発癌系で観察すると、large S mRNAのlet-7吸着作用が肝発癌促進的に働くことをin vivoで確認した。さらに、B型肝炎ウイルスのenvelopを用いたbio-nanoparticleに核酸を封入することによって、肝細胞特異的にlet-7を含めた小分子核酸をデリバリーをすることを可能とした。

3. 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性肝炎に対する新規治療法開発に関する研究

B型肝炎ウイルス持続産生細胞株、NTCP発現細胞株を使用して、沖縄植物、中国生薬のスクリーニングを行い、抗ウイルス効果が見られる抽出物を複数得ることが出来た。現在共同研究を行っている薬学部教授のもとで成分の単離を試みており、成分別に抗ウイルス効果を検討する予定である。

4. 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性肝炎の病態解析に関する研究

肝発がんの病態の基盤となる炎症と免疫について研究を行った。肥満およびインスリン抵抗性と肝臓の炎症に関連する2分子を明らかにした (Cell Rep 14(10):2362-74, 2016. 1. Diabetes 65(10):2966-79, 2016.)。また、肝がんを標的とする細胞性免疫にかかわる抗原を示し、その抗腫瘍活性を検討した (Gastroenterology (in press) PLoS One 12(1):e0170291, 2017.)。

5. 日米医学協力計画を基軸としたウイルス性肝炎の疫学解析および新規治療法開発に関する研究

B型慢性肝炎患者に対するフェーズIII臨床試験において、HBs/HBc抗原治療ワクチンは、ペグインターフェロンと比較して、抗ウイルス効果と肝炎の進行抑制効果が優位であった。そのメカニズムとしては、HBc抗原に特異的な免疫反応の持続が重要であった。ネパールにおいてはE型肝炎ウイルスのエピデミックの疫学的、分子学的調査を行った。

6. 日米医学協力計画を基軸としたC型肝炎の免疫病理学的研究

今年度は、C型慢性肝炎に対するDAA治療を行った症例で、投与前、経過中、終了後の免疫細胞頻度を解析し、抗HCV作用と免疫系の変動との関連性を検討した。Genotype 1型2例 (SOF/LDV 12週)、Genotype 2型1例 (SOF+RBV 12週)を対象とし、末梢血中の樹状細胞サブセット、T細胞、NK細胞を解析した。全例で経過中速やかにHCVは陰性化し、SVR12を達成した。樹状細胞サブセットの頻度は治療中から増加する経過を認め、終了後も維持された。T細胞、NK細胞は著明な変化を認めなかった。DAA治療によって樹状細胞が回復することから、DAAによる速やかなHCV排除は免疫系の回復効果も期待できることが示唆された。

1. In a hepatitis A epidemiological survey, we reported on an epidemiological investigation of hepatitis A in Sri Lanka. For Japanese HAV surveillance, we have filed an ethics application for the surveillance of hepatitis A antibody prevalence, and we are planning to test over 7,000 serum samples as approved. In Homosexual groups in Taiwan, there is an outbreak of hepatitis A, the same strain is also detected in Japan. It is necessary to pay attention to future trends in Japan. Regarding vaccination against hepatitis B in Asian countries, high inoculation rates are maintained. We exchanged opinions and shared information with researchers in the US.

2. We found that the nucleotide sequence of the preS2 region of HBV is a kind of microRNA of the host and may adsorb let-7, a cancer suppressor. In transgenic mice model expressing HBV large S mRNA with chemical hepatocarcinogenic system using DEN, it was confirmed that the let-7 adsorption action of large S mRNA promoted liver carcinogenesis.
3. Screening of Okinawa plants and Chinese herbal medicines was performed using a HBV replicating and NTCP-expressing cell lines. We identified plural extracts showing antiviral effect.
4. We studied inflammation and immunity which are the basis of hepatic carcinogenesis. Two molecules were associated with obesity, insulin resistance and liver inflammation (Cell Rep 14 (10): 2362-74, 2016.1. Diabetes 65 (10): 2966-79, 2016.). We also demonstrated antigens involved in cellular immunity targeting liver cancer and examined their antitumor activity (Gastroenterology (in press) PLoS One 12 (1): e 0170291, 2017.).
5. A phase III clinical trial in chronic hepatitis B showed better antiviral and liver protection capacity of a therapeutic vaccine containing HBsAg/HBcAg than pegylated interferon and sustained effect was due to continuation HBcAg-specific immunity. The cause underlying HEV epidemic in Nepal was accomplished by epidemiological and genetic study.
6. In the case of DAA treatment for chronic hepatitis C, the frequency of immune cells was analyzed before, after, and after treatment, and the relationship between anti-HCV action and fluctuation of the immune system were examined. Dendritic cells, T cells and NK cells were analyzed. In all cases, HCV became negative and SVR 12 was achieved. The frequency of the dendritic cells was increased during the treatment and was maintained. T cells and NK cells showed no significant changes. Since DAA treatment restores dendritic cells, it was suggested that prompt HCV elimination by DAA could also be expected to have a recovery effect of the immune system.

II. 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 0件、国際誌 18件)

1. Dahanayaka NJ, Kiyohara T, Agampodi SB, Samaraweera PK, Kulasooriya GK, Ranasinghe JC, Semage SN, Yoshizaki S, Wakita T, Ishii K. Clinical Features and Transmission Pattern of Hepatitis A: An Experience from a Hepatitis A Outbreak Caused by Two Cocirculating Genotypes in Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Oct 5;95(4):908-914.
2. Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, Iwamoto M, Tsukuda S, Takeuchi JS, Miyake T, Sugiyama M, Ogasawara Y, Park SY, Tanaka Y, Kusuhara H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol.* 2017 Apr;66(4):685-692.
3. Chen CL, Huang JY, Wang CH, Tahara SM, Zhou L, Kondo Y, Schechter J, Su L, Lai MM, Wakita T, Cosset FL, Jung JU, Machida K. Hepatitis C virus has a genetically determined lymphotropism through co-receptor B7.2. *Nat Commun.* 2017 Jan 9;8:13882.

4. Koizumi Y, Ohashi H, Nakajima S, Tanaka Y, Wakita T, Perelson AS, Iwami S, Watashi K. Quantifying antiviral activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 21;114(8):1922-1927. doi: 10.1073/pnas.1610197114. Epub 2017 Feb 7. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 6; . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 21;114(12):E2540-E2541.
5. Yamagiwa Y, Asano M, Kawasaki Y, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Mizokami M, Masaki N. Pretreatment serum levels of interferon-gamma-inducible protein-10 are associated with virologic response to telaprevir-based therapy. *Cytokine*. 2016 Dec;88:29-36.
6. Sugiyama M, Kanto T*. Dual blockade of hepatitis C virus entry at a gatekeeper of hepatocytes: Not only a preventive, but also therapeutic target of claudin 1. *Hepatology*. 2016 Sep;64(3):979-82.
7. Sekiba K, Yamagami M, #Otsuka M, Suzuki T, Kishikawa T, Ishibashi R, Ohno M, Sato M, Koike K. Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Apr 29;486(2):521-525.
8. Takata A, Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Koike K. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let-7. *Sci Rep*. 2016;6:23237.
9. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Yamagami M, Ohno M, Takata A, Shibata C, Ishibashi R, Koike K. MicroRNAs and liver disease *J Hum Genet*. 2017; 62(1):75-870.
10. H Nakagawa, E Mizukoshi, E Kobayashi, T Tamai, H Hamana, T Ozawa, H Kishi, M Kitahara, T Yamashita, K Arai, T Terashima, N Iida, K Fushimi, A Muraguchi, S Kaneko. Association Between High-avidity T-cell Receptors, Induced by Alpha Fetoprotein-derived Peptides, and Anti-tumor Effects in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* (in press)
11. K Kaji, E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, K Fushimi, H Nakagawa, K Yamada, T Terashima, M Kitahara, S Kaneko. Cellular Immune Responses for Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized by T Cells 3 in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 12(1):e0170291, 2017.
12. F Zhuge, Y Ni, M Nagashimada, N Nagata, L Xu, N Mukaida, S Kaneko, T Ota. DPP-4 inhibition by linagliptin attenuates obesity-related inflammation and insulin resistance by regulating M1/M2 macrophage polarization. *Diabetes* 65(10):2966-79, 2016.
13. K Kimura, M Tanida, N Nagata, Y Inaba, H Watanabe, M Nagashimada, T Ota, S Asahara, Y Kido, M Matsumoto, K Toshinai, M Nakazato, T Shibamoto, S Kaneko, M Kasuga, H Inoue. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Rep* 14(10):2362-74, 2016.
14. Akbar SM, Al-Mahtab M, Jahan M, Yoshida O, Hiasa Y. Novel insights into immunotherapy for hepatitis B patients. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;10(2):267-76.
15. Akbar SM, Al-Mahtab M, Khan SI, Raihan R, Shrestha A. 5Immune Therapy for Hepatitis B. *Ann Trans Med* 2016;4:335
16. Akbar SM, Al-Mahtab M, Hiasa Y. Designing Immune therapy for chronic hepatitis B. *J Clin Exp Hepat* 2014;4: 241-246
17. Al-Mahtab M, Akbar SM, Aguilar JC, Uddin MH, Khan MS, Rahman S. Therapeutic potential of a combined hepatitis B virus surface and core antigen vaccine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Int*. 2013;7(4):981-9.
18. Shrestha A, Lama, Karki S, Sigdel DR, Rai U, Rauniyar SK, Al-Mahtab M, Takahashi A, Arai M, Akbar SM, Mishiro S. Hepatitis E epidemic, Biratnagar, Nepal 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):711-713.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 渡士幸一、志村聡美、Michael Peel、Ann Sluder、河合文啓、岩本将士、杉山真也、朴三用、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字、B型肝炎ウイルス感染を阻害する新規 macrocycles の同定と、

- NTCP 依存性胆汁酸取り込み抑制を欠失した選択的阻害剤の創出、第26回抗ウイルス療学会、名古屋市立大学（2016. 5. 13-15）口頭発表 国内
2. Tomoko Date, Nanako Aihara, Noriyuki Watanabe, Hideki Aizaki, Masaya Sugiyama, Masashi Mizokami, William IV Delaney, Guofeng Cheng, Takaji Wakita. **Infectious Genotype 4a Hepatitis C Virus in Cell Culture**. APASL STC. Kaohsiung, Taiwan, June 10-12, 2016 ポスター 国外
 3. Takaji Wakita. HCV Virology. APASL STC. Kaohsiung, Taiwan, June 10-12, 2016 口頭発表 国外
 4. Koichi Watashi, Satomi Shimura, Michael Peel, Ann Sluder, Fumihiro Kawai, Masashi Iwamoto, Senko Tsukuda, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Masaya Sugiyama, Sam-Yong Park, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita. Strategy for hepatitis B and D virus entry inhibition without affecting bile acid transport. 2016 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (Seoul, Korea), Sep21-24, 2016 口頭発表 国外

(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