

26. 発明の名称：(発明の名称) C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸

①発明者：小原道法、須藤正幸

②出願日：2008年11月26日

③出願番号：特願 2008-301763

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：高活性な siRNA 配列を同定することに成功した。

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルス感染状況・長期経過と予後調査及び治療導入対策に関する研究課題番号：H22-肝炎-一般-012予定期間：H22年度からH24年度まで研究代表者：田中 純子所属研究機関：広島大学大学院所属部局：医歯薬学総合研究科 疫学・疾病制御学職名：教授年次別研究費(交付決定額)：1年目 40,300,000円**I. 研究の意義**

疫学的、臨床病理学的根拠に基づいたウイルス肝炎・肝がん対策の構築が必要である。

- (1) 2000年以後、肝炎ウイルス検診、献血、医療機関受診時等における肝炎ウイルス検査等の機会が拡大したが、これらを契機に感染が明らかになったキャリアの医療機関受診率は低く、医療機関未受診者および治療導入に至らないキャリアの現状把握ができていない。
- (2) 近年の医療成績の向上や医療費助成制度などから、肝臓専門医による積極的かつ適切な治療を受けることが望ましいが、検査受診後の治療までの円滑な体制整備が確立されていない。
- (3) 肝炎ウイルス感染予防対策および地域における肝炎対策を構築する面から、地域・年齢別肝炎ウイルス感染状況(患者数・キャリア数)に関する成績の把握が必要である。また、感染後の長期経過と予後に関するエビデンスが必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

肝炎、肝がんによる健康被害の抑制と防止、および体制整備を目的として、3つの課題研究を行う。

- (1) 肝炎ウイルス感染状況に関する疫学基盤研究。
- (2) 感染後の長期経過と予後調査に関する研究。
- (3) 治療導入対策に関する研究。

さらに、「キャリアを見出すための検査手順再検証」「微小肝がん早期発見のためのプロトコルの確立」、「全国調査による肝炎ウイルス検査等関連事案の対応と問題点の把握」を含め、本研究によって得られた成果は、いずれもわが国の肝炎、肝がん克服のための施策を立てる上での科学的根拠となるデータとして活用できると期待できる。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(田中純子)

- (1) 研究全体の統括、計画立案および分担研究者との協議および研究開始。
- (2) 2000年以後に得られた二つの大規模集団(初回供血者、節目検診受診者)を元に推計した2005年時点の地域別都道府県別年代別のHBV・HCVキャリア数推計値を資料として提示した。
- (3) HBVキャリアの自然史を解明するために、後ろ向きコホート調査によるデータベースの構築に着手した(山崎研究協力者と共同)。

- (4) 血液透析患者コホート集団約 2700 名について、肝炎ウイルスキャリアの予後調査に着手した。
- (5) 肝がん死亡率が高くかつ、肝炎対策の先進県である広島県と佐賀県を例に、検査後の動向調査および肝炎対策を比較した。
- (6) HCVenv 抗体高力価ヒト血清から作成した HCIG 候補の感染防御能を明らかにするため、in-vitro で感受性を有する HCV genotype1b を接種材料として、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた感染実験を行い、継続観察中である。
- (7) HBV 感染を防御する HBs 抗体価を明らかにするために、HBIG による受動免疫後のヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて HBV 感染実験を行い、感染阻止に至った末梢血中の HBs 抗体価を定量し解析中である。

・研究分担者 (三浦宣彦)

- (1) GIS を用いた肝がんの地理分布に関する要因分析に必要なデータ(①行政区域、鉄道、河川、港等、国土骨核のデータ、②人口集中地域、過疎地域、都市地域、農業地域など人口情報、③公共施設の位置情報、④産業統計など)を収集した。

・研究分担者 (小山富子)

- (1) 「HCV キャリアを見出すための検査手順の再検証」に着手した (田中と共同)。
- (2) 検診により感染が判明した HBV、HCV キャリアの長期予後の解析に着手した (田中と共同)。

・研究分担者 (阿部弘一・酒井明人) 研究協力者 (松崎靖司、杉原潤一)

- (1) 検診などで発見された HBV、HCV キャリアの医療機関への受診率、専門医への受診率、及び抗ウイルス療法受療率等に関する調査を行い、問題点を解析した (阿部：岩手県、酒井：石川県、日野：岡山県、杉原：岐阜県)。
- (2) 肝疾患診療ネットワークにおける抗ウイルス療法実施の把握と検診以外で診断された HBV、HCV キャリアへの治療状況について検討した (阿部)。
- (3) 専門医に年 1 回受診することを柱とした石川県肝炎診療連携を開始した。この連携の参加症例を市町のフォローデータベースと連結し、総合的な解析をおこなった (酒井)。
- (4) 節目・節目外検診での肝炎ウイルス陽性者 1,535 名に対し、医療機関受診や受療内容に関する追跡調査を郵送し、716 人 (46.6%) から回答を得 (現時点)、解析中 (日野)。
- (5) 職域健診における肝炎ウイルス検査実態の把握のために職種・業種別の受診率を調査中 (松崎)。

・研究分担者 (内田茂治)

- (1) 全国の HBs 抗原陽性献血者の検体収集を行い、年代別陽性率、採血地域別陽性率、遺伝子型分布等の解析を実施した。
- (2) 平成 20 年の輸血用血液スクリーニングシステム変更前後の、核酸増幅検査で検出される HBV 陽性献血者ならびに輸血感染例の原因となった供血者の性状の違いを検討した。

・研究協力者 (松崎靖司)

- (1) 患者保存血清による HCV 遺伝子解析を行い、HCV 高浸淫地域における肝炎発症の地域集積性について検討し、42 検体中 12 例 (Genotype 1b) のクラスター形成が確認され、同時感染の可能性が強く示唆された。

・研究分担者 (鳥村拓司) 研究協力者 (熊田卓)

- (1) 微小肝がん早期発見プロトコルの確立のため、発癌前の保存血清を用いて、高感度 AFP レクチ

ン分画測定系と従来の腫瘍マーカー (AFP、PIVKA II) による発癌予測の可能性について検討している (熊田)。また、ソナゾイド造影腹部超音波検査による肝細胞癌の診断は腫瘍肉眼型の予測に有用である事を示した (鳥村)。

- (2) 高齢者 HCV 発癌例 323 例の解析により、特に 70 歳以上女性の C 型肝炎は、ALT 低値、血小板高値であっても肝発がんの超高危険群として経過観察が必要と考えられた (熊田)。

・研究分担者 (相崎英樹)

- (1) 1999 年 4 月から 2009 年 12 月に感染症法により届出された急性 C 型肝炎 723 症例について、発生状況、症状、感染原因等について解析し、急性 C 型肝炎の報告数は減少傾向ではない事、肝機能異常が指摘されるまで診断が難しい症例が多い事、感染原因・経路が不明な症例が過半数を占めている事が明らかとなった。

IV. 23~24 年度の課題

- (1) 目的に掲げた 3 つの課題に関して今年度着手した研究の推進と、新たな展開。すなわち、
 (2) 肝炎ウイルス感染状況に関する疫学基盤研究 (献血者を対象とした肝炎ウイルス関連マーカー陽性者の特性分析、GIS を用いた肝がん死亡の地理的分布の要因解析)
 (3) 感染後の長期経過と予後調査に関する研究 (感染後の予後調査および患者数の推計、HCV キャリアの前方視的追跡調査、HBV キャリアの自然史の検討、血液透析患者における肝炎ウイルス感染の予後調査。肝炎ウイルス陽性者の追跡調査を他県にも拡大等)
 (4) 治療導入対策に関する研究 (全国調査による肝炎ウイルス検査等関連事案の対応の把握、問題点の把握)。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 2000 年以後に得られた二つの大規模集団を用いた自覚症状がないまま潜在する地域別 HBV・HCV キャリア数推計値の資料は、県毎の肝炎対策の基礎資料として有用となる。
 (2) 国内の急性肝炎の発生動向を全体把握できる制度は他国でも類をみず、これらの情報を解析することにより予防対策、啓蒙活動等の行政施策に有用となる。

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 (田中純子)

- (1) Tanaka J, Koyama T, Mizui M, Katayama K, Matsuo J, Akita T, Nakashima A, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Total Numbers of Undiagnosed Carriers of Hepatitis C and B Viruses in Japan Estimated by Age- and Area-specific Prevalence on the National Scale. *Intervirology*. 2010, (in press)
 (2) Tomoguri T, Katayama K, Tanaka J, Yugi H, Mizui M, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Interferon Alone or Combined with Ribavirin for Acute Prolonged Infection with Hepatitis C Virus in Chimpanzees, *Intervirology*, 2010 (in press)
 (3) Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamoti A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* (in press).
 (4) 北本幹也、野田育江、林亮平、松本陽子、井川敦、山田博康、今川勝、岡崎肇、和田崎晃一、門前芳夫、小橋俊彦、中原英樹、板本敏行、田中純子、茶山一彰。肝細胞癌スクリーニングにおける画像診断反復の意義、*広島医学*, 2010, 45: 156-161。

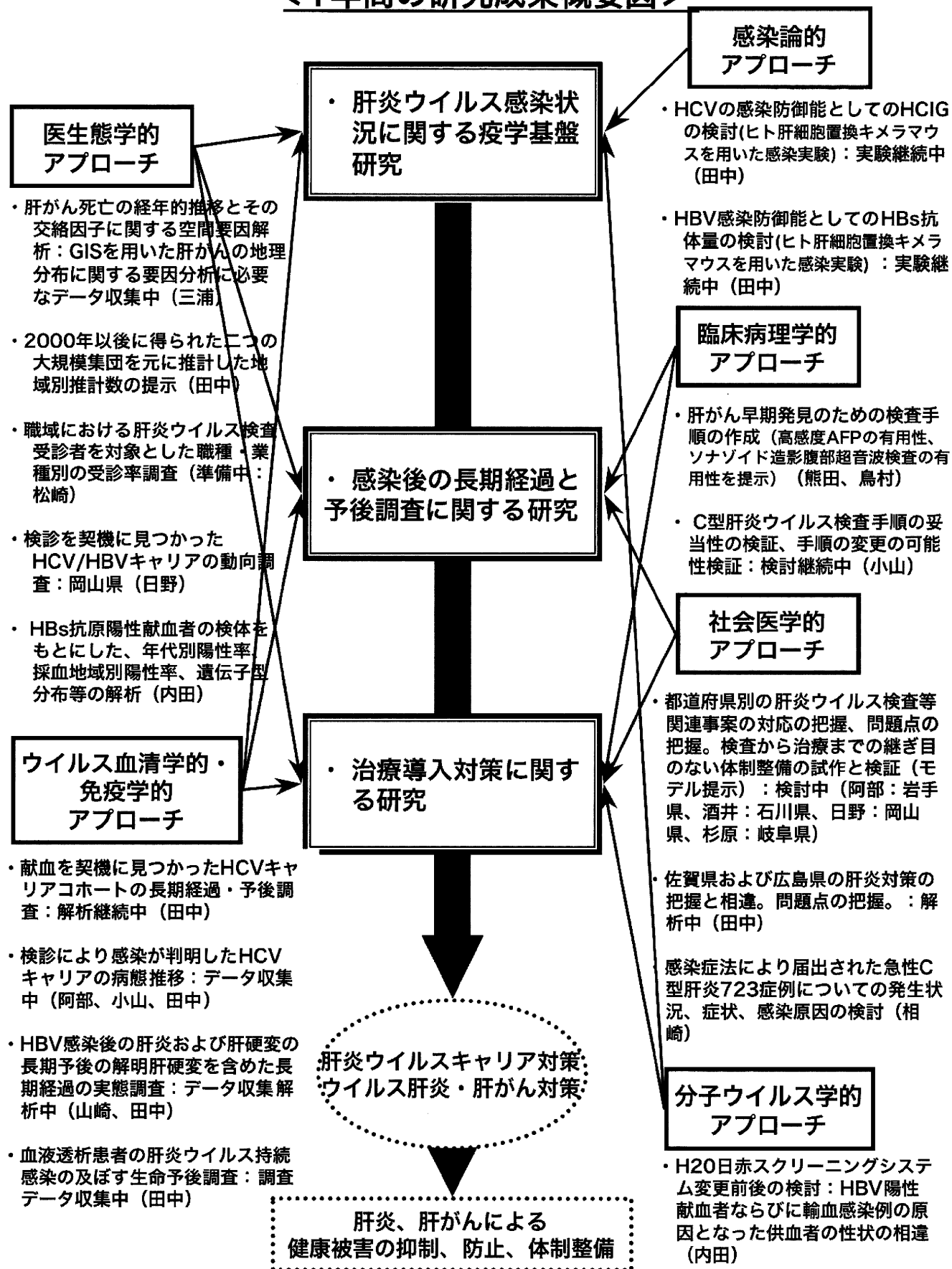
分担研究者 (日野啓輔) (鳥村拓司) (酒井明人)

- (5) Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res*, 2010, 40: 347-68.
 (6) Nakano M, Ando E, Kuromatsu R, Torimura T, Sumie S, Takata A, Fukushima N, Kurogi J, Niizeki T, Iwamoto H, Tanaka M, Sata M. Recent progress in the management of hepatocellular carcinoma detected during a surveillance program in Japan. *Hepatol Res* 2010; 40(10):989-996.
 (7) 酒井明人、金子周一、肝疾患の地域連携医療 石川県の取り組み、*肝胆膵*, 61巻5号 p753-761,2010

Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

○研究の目的に従って掲げた3つの研究課題について、多様な分野からのアプローチを行った。(初年度であることから、疫学研究および調査のデータ収集のものを含む。)

<1年間の研究成果概要図>



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1981年(昭56)	11月	24日	広島大学助手(衛生学講座)
1990年(平2)	4月	1日	広島大学助手(衛生学講座)
1991年(平3)	2月	15日	visiting associate professor, Division of Biostatistics, School of Public Health, University of Minnesota, (8月末まで)
1995年(平7)	8月	1日	広島大学講師(衛生学講座)
2002年(平14)	4月	1日	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科講師(疫学・疾病制御学)
2004年(平16)	6月	1日	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 助教授
2007年(平19)	4月	1日	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 准教授 広島大学病院 臨床研究部副部長(併任)
2009年(平21)	3月	1日	広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・吉澤 浩司 広島大学名誉教授

・主な研究課題

- ・肝炎ウイルス感染(B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV))の疫学
- ・肝がんの疫学
- ・医学領域における疫学研究、臨床疫学研究、統計解析

・これまでの研究実績

原著および著書

1. *Interferon Alone or Combined with Ribavirin for Acute Prolonged Infection with Hepatitis C Virus in Chimpanzees, Intervirology, 2010 (in press)*
2. *Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. J Gastroenterol (in press).*
3. *Total Numbers of Undiagnosed Carriers of Hepatitis C and B Viruses in Japan Estimated by Age- and Area-specific Prevalence on the National Scale. Intervirology. 2010, (in press)*
4. Transcatheter chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma and comparison of five staging systems. *Hepatology Research*. 2010, 40: 1082-1091.
5. Regular surveillance by imaging for early detection and better prognosis of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. *Journal of Gastroenterology*. 2010, 45: 105-112.
6. A novel hepatitis B virus surface antigen immunoassay as sensitive as hepatitis B virus nucleic acid testing in detecting early infection. *Transfusion*. 2009.
7. Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004. *Intervirology*, 2008.
8. Titration of Hepatitis B Virus infectivity in the sera of pre-acute and late acute phases of HBV Infection: Transmission experiments to Chimeric Mice with human liver repopulated hepatocytes. *Journal of Medical Virology*, 2008.
9. Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. *Transfusion*, 2008.
10. Comparative study on the morphology and the composition of the otoliths in the teleosts. *Acta Oto-Laryngologica*. 2008.
11. Epidemiological survey of oral lichen planus among HCV-infected inhabitants in a town in Hiroshima Prefecture in Japan from 2000 to 2003. *Oncology Reports*, 2007.
12. Liver disease in hepatitis C virus carriers identified at blood donation and their outcomes with or without interferon treatment: Study on 1019 carriers followed for 5-10 years. *Hepatology Research*, 2007.
13. Perinatal hepatitis B virus infection in Japan, "Congenital and other related infectious diseases of the newborn", Elsevier B. V., 2007.

14. Hepatitis B virus (HBV) screening strategy to ensure the safety of blood for transfusion through a combination of immunological testing and nucleic acid amplification testing - Japanese experience -. *Journal of Clinical Virology*, 2006.
15. National prevention of hepatocellular carcinoma in Japan based on epidemiology of hepatitis C virus infection in the general population. *Intervirology*, 2006
16. Hepatitis C virus infection in 2,744 hemodialysis patients followed regularly at nine centers in Hiroshima during November 1999 through February 2003. *Journal of Medical Virology*, 76, 2005
17. Early dynamics of hepatitis C virus in the circulation of chimpanzees with experimental infection. *Intervirology*, 2005.
18. National Project for the Management of Viral Hepatitis toward Prevention of Hepatocellular Carcinoma in Japan. *International Kilmer Conference Proceedings*. 2004.
19. Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission. *Intervirology*, 47, 2004
20. Sex-and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. *Intervirology*, 47, 2004
21. Association between ENOS gene polymorphism and cardiovascular events in nondiabetic hemodialysis patients: A prospective study. *American Journal of Kidney Diseases*, 2004.
22. Lack of epidemiological evidence for a role of resolved hepatitis B virus infection in hepatocarcinogenesis in patients infected with hepatitis C virus in Japan. *Intervirology*, 2003.
23. Natural histories of hepatitis C virus infection in men and women simulated by the Markov model. *Journal of Medical Virology*, 2003.
24. Effect of polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and apolipoprotein E genes on carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 2003
25. High incidence of extrahepatic manifestations in an HCV hyperendemic area. *Hepatology Research*, 2002.
26. Screening for gastroenterological malignancies in new and maintenance dialysis patients. *Journal of Gastroenterology*, 1999.
27. Epidemiology of hepatitis C virus in Japan. *Intervirology*, 1999.
28. Factors influencing arteriovenous fistula dysfunction in Japanese patients on chronic hemodialysis. *The International Journal of Artificial Organs*, 1999.
29. Ultrasound biomicroscopic study of ciliary body thickness after topical application of pharmacologic agents. *American Journal of Ophthalmology*, 1996.
30. Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. *Journal of Epidemiology*, 6, 1996.
31. Comparison of HCV core antigen activity by ELISA and amount of HCV RNA by branched DNA assay. *International Hepatology Communications*, 1994.

研究課題の実施を通じた政策提言

1. 厚生労働省 肝機能障害の評価に関する検討会委員として参加し肝機能障害の障害認定に寄与した。
2. C型肝炎検診の実施方法の確立に向けた検討 中間報告書, 平成13年度 厚生科学研究費補助金 21世紀型医療開拓推進研究事業「肝がんの発生予防に資するC型肝炎検診の効率的な実施に関する研究」班 (主任研究者: 吉澤浩司), 2001. (2002年から実施された肝炎ウイルス検診のガイドライン)
3. 有効性評価に基づく胃がん検診ガイドライン, 平成17年度 厚生労働省がん研究助成金「がん検診の適切な方法とその評価法の確立に関する研究」班 (主任研究者: 祖父江友孝), 2006.
4. 有効性評価に基づくがん検診ガイドライン作成手順, 平成16年度 厚生労働省がん研究助成金「がん検診の適切な方法とその評価法の確立に関する研究」班 (主任研究者: 祖父江友孝), 2005.
5. 有効性評価に基づく大腸がん検診ガイドライン, 平成16年度 厚生労働省がん研究助成金「がん検診の適切な方法とその評価法の確立に関する研究」班 (主任研究者: 祖父江友孝), 2005.

国外発表

1. Serological epidemiological study about hepatitis B virus infection at nine hemodialysis hospitals in Hiroshima. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association(Saitama, Japan) 2010

2. Comparative global sero-epidemiological study between the birth-cohort prevalence rate of hepatitis C virus and the mortality caused by hepatocellular carcinoma. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association(Saitama, Japan) 2010
3. Experimental transmission of HCV to human hepatocyte transplanted chimera mice to examine the neutralizing activity of HCIG (candidate) fractionated from human pooled plasma with high titer of anti-HCVenv antibody. IPFA/PEI (The 15th Workshop on "Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens") (Austria, Vienna) 2008.
4. Experimental transmission of HBV to susceptible model animals -Summary of the present status and perspectives-. IPFA/PEI (The 15th Workshop on "Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens") (Austria, Vienna) 2008.
5. Minimum infectious doses of HBV required for establishing infection to human hepatocyte transplanted chimera mice. SoGAT XX(Poland, Warsaw) 2007.
6. Liver disease in hepatitis C virus carriers found at the occasion of blood donation and outcomes with or without interferon treatment : A study on 1019 carriers followed for 5-10 years. DDW 2007 (USA, Washington DC) 2007.
7. Chimpanzee Infectious Dose and in vitro Concentration of HBV DNA. SoGAT XIX (Switzerland, Bern) 2006.
8. Epidemiology of Hepatitis B virus (HBV) and Hepatitis C virus (HCV) infection in Japan. The 19th International Symposium/Foundation for Promotion of Cancer Research
9. Incidence rate of HCV infection among voluntary blood donors in Hiroshima. 第14回 国際疫学会 (Nagoya) 1996.

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎治療薬創製基盤技術の開発

課題番号：H22-肝炎-若手-013

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：櫻井 文教

所属研究機関：大阪大学

所属部局：大学院薬学研究科

職名：准教授

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 6, 500, 000 円

I. 研究の意義

- (1) 簡便な C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus; HCV) 感染評価系が存在しない。
- (2) 特にヒト肝臓キメラマウスのヒト肝細胞に HCV ゲノムを導入可能な技術が存在しない。
- (3) インターフェロンとは異なる作用点を有する C 型肝炎治療薬の開発が求められている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 汎用性に優れた HCV 感染評価系基盤技術が開発されれば、抗 HCV 薬の前臨床試験の迅速な推進および新薬開発に大きく貢献できる。
- (2) 新たな作用点を有する抗 HCV 薬を開発することにより、既存の抗 HCV 薬では完治されなかった患者に新たな治療法を提案することが可能となる。
- (3) また新たな抗 HCV 薬と既存の抗 HCV 薬を組み合わせることで、奏効率の向上が期待される。

III. 1 年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

・研究代表者(櫻井文教)

- (1) HCV の受容体である CD81 や SR-BI の高効率なノックダウンに向けて、高効率に RNA 干渉を誘導可能な Short-hairpin RNA (shRNA) 発現 Ad ベクターを開発した。本 Ad ベクターは、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し 2 倍以上の優れた遺伝子発現抑制効果を示した。
- (2) HCV の複製に必須であることが報告された miR-122a を阻害可能なアデノウイルス (Ad) ベクター (miR-122a に対するデコイ RNA 発現 Ad ベクター) を作製した。

・研究分担者(渡利彰浩)

- (1) HCV サブゲノムを Ad ベクターを用いて効率よく発現させることを目的に、テトラサイクリン発現制御システムを融合した 発現制御型 RNA pol I 発現系を新たに開発した。
- (2) 上記のテトラサイクリンによる発現制御型 RNA pol I 系を搭載したファイバー置換型 Ad ベクター

ー (AdF35) ベクター (ファイバー領域を35型アデノウイルスのファイバーに置換されている) を作製するとともに、その遺伝子導入特性を明らかにした。

- (3) 上記Adベクターを用いてHCVサブゲノム発現Adベクターの開発に世界で初めて成功した。HCVサブゲノム発現Adベクターを細胞に感染させたところ、マイナス鎖HCVサブゲノムが発現すること、不活性型RNA pol発現ベクターではHCVサブゲノムが複製されないことを確認した。

IV. 23~24年度の課題

- (1) HCVサブゲノム発現AdベクターをHuh7細胞などに作用させることにより、HCVサブゲノムの発現レベルや発現期間等を詳細に検討する。これにより、AdベクターによるHCVサブゲノム発現系を最適化するとともに、本HCVサブゲノム発現系がHCV複製評価系として使用可能かどうか検証する
- (2) HCVゲノム発現Adベクターを開発する。HCVゲノムは約9.6Kbであることから、通常のAdベクターには搭載不可能である。そこで、ウイルスゲノムのほぼ全てを取り除き、最大36Kbの遺伝子を搭載可能なHelper-dependent Adベクターを利用して、HCVゲノム発現Adベクターを開発する。申請者らは既にHelper-dependent Adベクターの作製に成功している。
- (3) H22年度に開発したshRNA発現Adベクターを基盤として、HCV受容体に対するshRNA発現Adベクターを作製する。本shRNA発現AdベクターによるHCV受容体の発現抑制効率を検討するとともに、HCVの感染にどの受容体の寄与が一番大きいか調べる。
- (4) H22年度の作製したmiR-122aを阻害可能なデコイRNA発現Adベクターを利用して、miR-122aをノックダウンするとともに、miR-122aノックダウン細胞におけるHCVの複製を検討する。

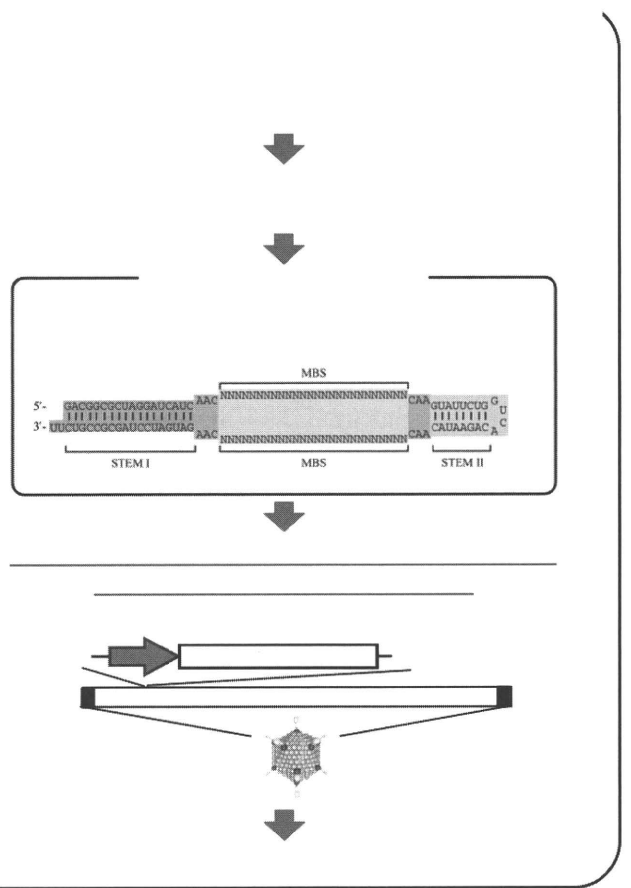
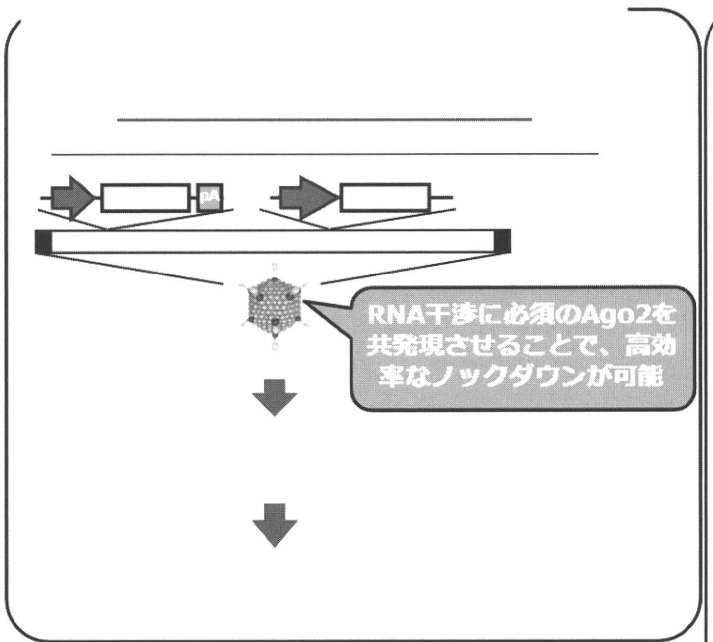
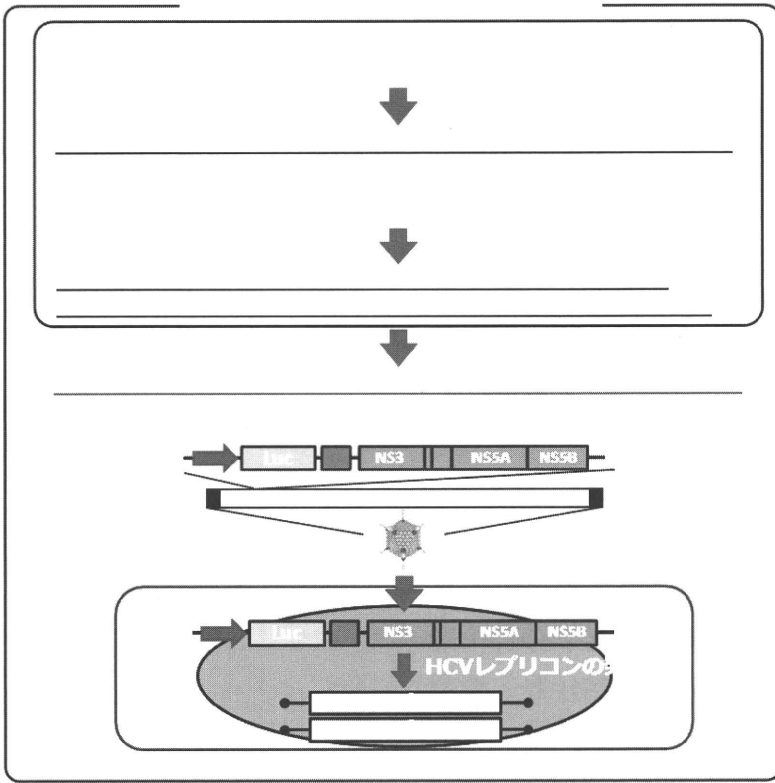
V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 簡便なHCV感染評価系が開発されれば、新規抗HCV薬の前臨床試験が促進され、本邦製薬会社の育成に貢献できる。
- (2) インターフェロンとは異なる作用点を有する治療法を開発することにより、既存の抗HCV薬では治療困難であった患者に治療法を提案することが可能になるとともに、既存の抗HCV薬と組み合わせることで、更なる奏効率の向上が期待でき、HCV感染の根絶に貢献できる。
- (3) 以上、本研究成果は、HCV感染の根絶を通じて、国民の健康増進、完治に伴う医療費の削減、HCV感染者を抱える国々への国際貢献等、厚生労働行政に多大な貢献が期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者、研究分担者ともに、論文発表・ガイドライン・マニュアルの作成は無し。

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 平成 17 年 4 月—平成 22 年 3 月 独立行政法人医薬基盤研究所遺伝子導入制御プロジェクト
研究員
- 平成 16 年 4 月—平成 17 年 3 月 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所第 3 プロジェクト・研究員
- 平成 15 年 4 月—平成 16 年 3 月 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部・研究員
- 平成 13 年 10 月—平成 15 年 3 月 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部・リサーチレジデント
- 平成 13 年 4 月—平成 13 年 9 月 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部・賃金職員

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- 水口 裕之 (大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野・教授)
- 早川 堯夫 (近畿大学薬学総合研究所・所長)
- 形山 和史 (大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野・助教)
- 川端 健二 (独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト・プロジェクトリーダー)
- 八木 清仁 (大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野・教授)
- 近藤 昌夫 (大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野・准教授)
- 橋田 充 (京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野・教授)

・主な研究課題

- (1) 35 型アデノウイルスを基本骨格とした新規アデノウイルスベクターの開発
- (2) マイクロ RNA による遺伝子発現制御能を搭載したアデノウイルスベクターの開発
- (3) プロモーター領域に相同な配列を有する二本鎖 RNA による遺伝子発現活性化 (RNA activation) に関する研究

・これまでの研究実績

下記を含め、これまで原著論文 52 報、総説 15 報、特許 3 件 (うち 2 件成立済み) を発表済み。

1. Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Seki N, Kawabata K, Mizuguchi H. Optimization of a microRNA expression vector for function analysis of microRNA. *J Control Release*. in press
2. Matsui M, Sakurai F, Elbashir S, Foster D, Manoharan M, Corey DR. Activation of LDL receptor (LDLR) expression by small RNAs complementary to a noncoding transcript that overlaps the LDLR promoter. *Chemistry & Biology*. in press.
3. Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Kusuda-Furue M, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.* in press.
4. Suzuki-Kouyama E, Katayama K, Sakurai F, Yamaguchi T, Kurachi S, Kawabata K, Nakagawa S, Mizuguchi H. Hexon-Specific Pegylated Adenovirus Vectors Utilizing Avidin-Biotin Interaction. *Biomaterials*. in press.

5. Matsui H, **Sakurai F**, Katayama K, Kurachi S, Tashiro K, Sugio K, Kawabata K, Mizuguchi H. Enhanced transduction efficiency of fiber-substituted adenovirus vectors by the incorporation of RGD peptides in two distinct regions of the adenovirus serotype 35 fiber knob. *Virus Res.* in press
6. **Sakurai F**, Nakashima K, Yamaguchi T, Ichinose T, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-induced innate immune responses in dendritic cells derived from wild-type and human CD46-transgenic mice: Comparison with a fiber-substituted Ad vector containing fiber proteins of Ad serotype 35. *J Control Release.* in press
7. Yamaguchi T, Kawabata K, Kouyama E, Ishii KJ, Katayama K, Suzuki T, Kurachi S, **Sakurai F**, Akira S, Mizuguchi H. Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:17286-91. (2010).
8. Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, **Sakurai F**, Katayama K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.* 12:501-7. (2010)
9. Ushitora M, **Sakurai F**, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. *J Control Release.* 142:431-7. (2010)
10. Matsui H, **Sakurai F**, Kurachi S, Tashiro K, Sugio K, Kawabata K, Yamanishi K, Mizuguchi H. Development of fiber-substituted adenovirus vectors containing foreign peptides in the adenovirus serotype 35 fiber knob. *Gene Ther.* 16:1050-7. (2009)
11. Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, **Sakurai F**, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced-pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem cells.* 27:1802-11.(2009)
12. Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, Sakurai H, **Sakurai F**, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem Biophys Res Commun.* 379:127-32. (2009)
13. Huang H, **Sakurai F**, Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M, Kawabata K, Mizuguchi H. Suppressing effects of sugar-modified cationic liposome/NF-kappaB decoy complexes on adenovirus vector-induced innate immune responses. *J Control Release.* 133:139-45. (2009)
14. **Sakurai F**, Nakamura SI, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.* 16:297-302. (2009)
15. Suzuki T, **Sakurai F**, Nakamura S, Kouyama E, Kawabata K, Kondoh M, Yagi K, Mizuguchi H. miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Mol Ther.* 16:1719-26. (2008)
16. Nakashima K, **Sakurai F**, Kawabata K, Mizuguchi H. Efficient gene delivery in human and rodent mast cells using adenovirus vectors. *J Control Release.* 129:215-22. (2008)

17. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates. *Mol Ther.* 16:726-33. (2008)
18. Sakurai H, Tashiro K, Kawabata K, Yamaguchi T, Sakurai F, Nakagawa S, Mizuguchi H. Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses. *J Immunol.* 180:4931-8. (2008)
19. Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J Gene Med.* 10:498-507. (2008)
20. Kanagawa N, Koretomo R, Murakami S, Sakurai F, Mizuguchi H, Nakagawa S, Fujita T, Yamamoto A, Okada N. Factors involved in the maturation of murine dendritic cells transduced with adenoviral vector variants. *Virology.* 374:411-20. (2008)
21. Kurachi S, Koizumi N, Tashiro K, Sakurai H, Sakurai F, Kawabata K, Nakagawa S, Mizuguchi H. Modification of pIX or hexon based on fiberless Ad vectors is not effective for targeted Ad vectors. *J Control Release.* 127:88-95. (2008)
22. Murakami S, Sakurai F, Kawabata K, Okada N, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mizuguchi H. Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. *Gene Ther.* 14:1525-33. (2007)
23. Yamaguchi T, Kawabata K, Koizumi N, Sakurai F, Nakashima K, Sakurai H, Sasaki T, Okada N, Yamanishi K, Mizuguchi H. Role of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by serotype 5 adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 18:753-62. (2007)
24. Yamashita M, Ino A, Kawabata K, Sakurai F, Mizuguchi H. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells. *Int J Cancer.* 121:1690-6. (2007)
25. Kawabata K, Tashiro K, Sakurai F, Osada N, Kusuda J, Hayakawa T, Yamanishi K, Mizuguchi H. Positive and negative regulation of adenovirus infection by CAR-like soluble protein, CLSP. *Gene Ther.* 14:1199-207. (2007)
26. Kurachi S, Tashiro K, Sakurai F, Sakurai H, Kawabata K, Yayama K, Okamoto H, Nakagawa S, Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther.* 14:1160-5. (2007)
27. Sakurai F, Akitomo K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors. *Gene Ther.* 14:912-9. (2007)
28. Sakurai H, Sakurai F, Kawabata K, Sasaki T, Koizumi N, Huang H, Tashiro K, Kurachi S, Nakagawa S, Mizuguchi H. Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J Control Release.* 117:430-7. (2007)
29. Koizumi N, Yamaguchi T, Kawabata K, Sakurai F, Sasaki T, Watanabe Y, Hayakawa T, Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced IL-6 production. *J Immunol.* 178:1767-73. (2007)

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎による肝未分化細胞の発生とその発癌への影響に関する研究

課題番号：H22-肝炎-若手-014

予定期間：H22年度からH23年度まで

研究代表者：鈴木 淳史

所属研究機関：九州大学

所属部局：生体防御医学研究所

職名：特任准教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 6,500,000円

I. 研究の意義

- (1) 肝炎における肝未分化細胞（オーバル細胞）の発生機序は不明である。
- (2) 肝癌に対するオーバル細胞の役割は不明である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝炎におけるオーバル細胞の発生機序の解明。
- (2) 肝癌に対するオーバル細胞の役割の解明。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) オーバル細胞が肝細胞から生じることを明らかにした。
- (2) オーバル細胞の発生には Notch シグナルの活性化が重要であることを明らかにした。

・研究分担者なし

IV. 23～24年度の課題

- (1) Notch シグナル制御によるオーバル細胞の発生制御。
- (2) オーバル細胞の機能異常誘導による肝癌の発癌解析。

V. 行政施策への貢献の可能性

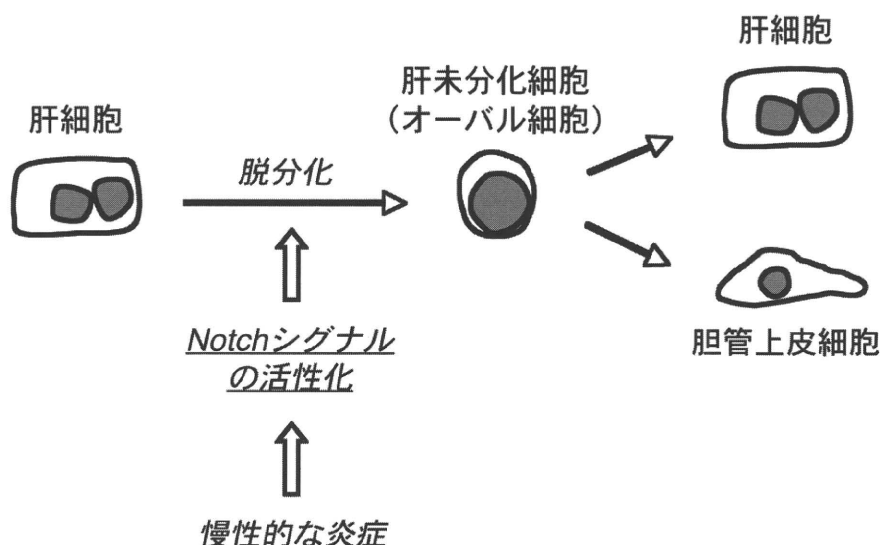
- (1) 肝炎からの発癌を予見して抑えるためのガイドラインの作成

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

なし

Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- ・年月：1997年4月～1998年3月
研究機関：東北大学理学部生物学科
- ・年月：1998年4月～2003年3月
研究機関：筑波大学大学院医科学/医学研究科
- ・年月：2003年4月～2005年3月
研究機関：米国ソーク研究所
- ・年月：2005年3月～2007年3月；2007年4月～2007年9月
研究機関：理化学研究所 発生再生科学総合研究センター
- ・年月：2007年10月～現在
研究機関：九州大学 生体防御医学研究所
- ・年月：2008年6月～現在
研究機関：独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業さきがけ（兼任）

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・指導教員：井出宏之、山本博章（東北大学）
- ・指導教員：深尾立、中内啓光、谷口英樹（筑波大学）
- ・指導教員/共同研究者：Juan Carlos Izpisua Belmonte（米国ソーク研究所）
- ・指導教員/共同研究者：谷口英樹（理化学研究所、横浜市立大学）
- ・共同研究者：中山敬一（九州大学）

・ 主な研究課題

- ・ 研究課題：網膜色素上皮の発生に関する研究（東北大学）
- ・ 研究課題：消化器系器官における組織幹細胞の分離・同定と機能解析（筑波大学）
- ・ 研究課題：ES細胞の未分化性維持機構に関する研究（米国ソーグ研究所）
- ・ 研究課題：腸幹細胞の培養法開発に関する研究（理化学研究所）
- ・ 研究課題：成体マウスからの肝幹細胞の分離とその機能に関する研究、肝幹細胞の分化増殖機構に関する研究、消化器系臓器の発生、再生、癌に関する研究（九州大学）
- ・ 研究課題：肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術（科学技術振興機構）

・ これまでの研究実績

主要論文

1. Onoyama I., Suzuki A., Matsumoto A., Tomita K., Katagiri H., Oike Y., Nakayama K., Nakayama K.I. Fbxw7 controls lipid metabolism and cell fate decision in the liver in mice. *J Clin Invest*, in press.
2. Suzuki A., Sekiya S., Gunshima E., Fujii S., Taniguchi H. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Lab Invest* 90, 1425-1436, 2010.
3. Suzuki A., Sekiya S., Onishi M., Oshima N., Kiyonari H., Nakauchi H., Taniguchi H. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48, 1964-1978, 2008.
4. Suzuki A., Sekiya S., Buscher D., Izpisua Belmonte J.C., Taniguchi H. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing *p19^{ARF}* expression. *Development* 135, 1589-1595, 2008.
5. Oshima Y., Suzuki A., Kawashimo K., Ishikawa M., Ohkohchi N., Taniguchi H. Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132, 720-732, 2007.
6. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-Esteban C., Belmonte J.C. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10294-10299, 2006.
7. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodriguez-Esteban C., Belmonte J.C. Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3, S114-S122, 2006.
8. Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53, 2143-2152, 2004.
9. Suzuki A., Zheng Y.W., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H. Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver. *Hepatogastroenterology* 51, 423-426, 2004.
10. Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5034-5039, 2003.

11. Suzuki A., Iwama A., Miyashita H., Nakauchi H., Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130, 2513-2524, 2003.
12. Suzuki A., Zheng Y.W., Kaneko S., Onodera M., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 156, 173-184, 2002.
13. Suzuki A., Zheng Y.W., Kondo R., Kusakabe M., Takada Y., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H. Flow cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32, 1230-1239, 2000.

特許

1. 発明者：鈴木淳史 「肝臓細胞を作製する方法」、特願 2010-31718 号（2010年2月16日出願）
2. 発明者：谷口英樹、鈴木淳史 「肝臓卵形細胞の取得方法」、特願 2008-039015 号（2008年2月20日出願）
3. 発明者：谷口英樹、鈴木淳史 「腸管細胞のインスリン産生細胞への変換誘導剤、及び糖尿病治療剤」、出願番号：特願 2005-503007（2003年3月7日出願）
4. 発明者：中内啓光、鈴木淳史、谷口英樹、深尾立 「Self-renewing pluripotent hepatic stem cells」、出願番号：PCT10/093311、登録番号：7150990（米国特許）（2002年3月6日出願、2006年12月19日登録）
5. 発明者：谷口英樹、鈴木淳史 「幹細胞及びその分離方法」、出願番号：特願 2002-585616（2001年4月24日出願）

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： 小胞輸送 ESCRT 経路を利用した C 型肝炎ウイルス排除課題番号 : H22-肝炎-若手-015予定期間 : H22 年度から H24 年度まで研究代表者 : 玉井恵一所属研究機関 : 宮城県立がんセンター研究所所属部局 : 免疫学部職名 : 副主任研究員年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 6,500,000 円**I. 研究の意義**

- (1) C 型肝炎ウイルスのライフサイクルは未だ不明な点が多く残る。
 - (2) 現在でも難治性の慢性 C 型肝炎は多数存在し、画期的な治療法の開発が望まれる
- :

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) C 型肝炎ウイルスのライフサイクルを明らかにすることで、新たな治療ターゲットを模索する
 - (2) HCV は小胞輸送経路をもって輸送されることが示唆されており、この経路と HCV の結合を阻害することで HCV 感染の抑制を図る。
- :

III. 1 年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

- 研究代表者

- (1) エクソゾームの放出には小胞輸送分子である Hrs が必須であることを明らかにした。(2010, *BBRC*)
 - (2) HCV の放出には同様に Hrs が必要であることを明らかにした。(論文投稿中)
 - (3) HCV の放出経路はエクソゾーム経路と酷似していることを明らかにした。(論文投稿中)
- :

- 研究分担者(菅村和夫)

- (1) 上記代表者の研究をともに実行し検討している。
- :

- 研究分担者(田中伸幸)

- (1) uPA-NOG マウスに正常ヒト肝細胞を移植することで肝臓をヒト化することに成功している。
- (2) 現在ヒト化肝臓の遺伝子ノックダウンの系を樹立中である。

IV. 23～24 年度の課題

- (1) HCV 由来のタンパクと Hrs を含む ESCRT 経路との会合を明らかにする
- (2) ヒト化肝臓マウスの肝臓をノックダウンする系を樹立し、これまで細胞株で明らかにした HCV と ESCRT 経路との関わりを in vivo にて明らかにする
- (3) HCV と ESCRT 経路との会合を阻害する化学物質を探索する。

:

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HCV のライフサイクルを阻害する薬物を開発することが出来れば、慢性 C 型肝炎治療のための新たな手段となり得る。

:

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

研究代表者 (玉井恵一)

- (1) Tamai K, *Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano S, Ueno Y, Shimosegawa T, and Sugamura K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 27; 399(3): 384-90, 2010.

研究分担者 (菅村和夫・田中伸幸)

: