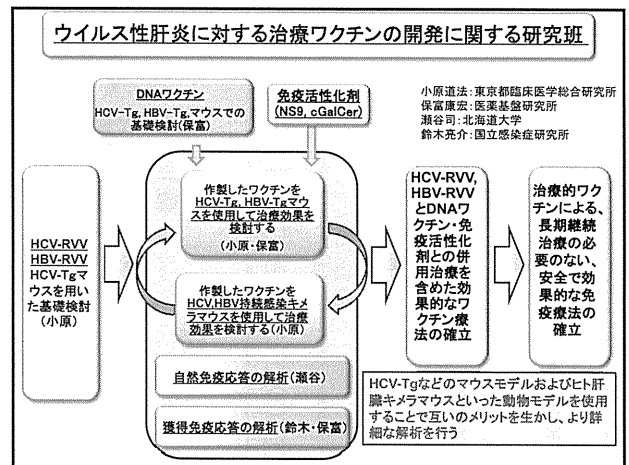


1.26.2012

(H22-肝炎一般-011)

## ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

1. 財団法人東京都医学総合研究所・小原道法
2. 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター・保富康宏
3. 北海道大学大学院・先端生命科学研究院・瀬谷 司
4. 国立感染症研究所ウイルス第二部・鈴木亮介



### 免疫の賦活化によるウイルス性肝炎治療の可能性

- ・ 日本でのC型肝炎ウイルス(HCV)感染者数は約200万人
- ・ 高率に持続感染化し慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症

#### HCV感染後の自然経過

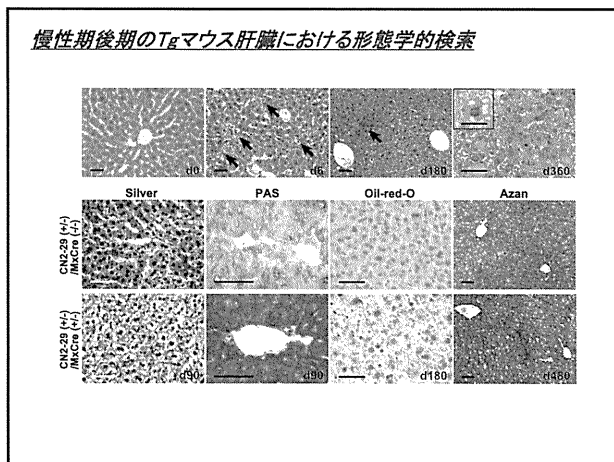
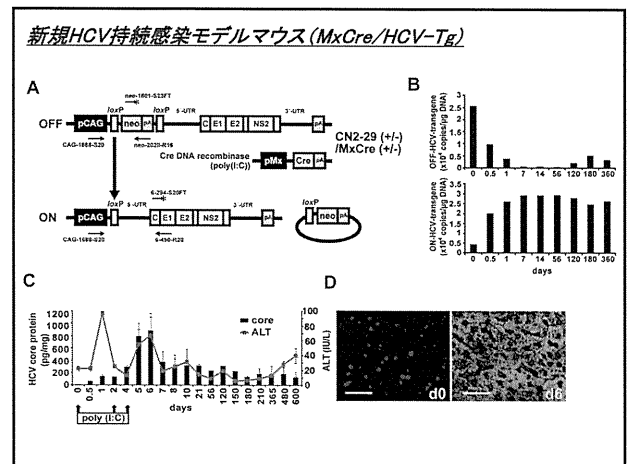
急激性肝炎 → 慢性肝炎 (70-80%) → 肝硬変 (5-7%/年) → 肝臓癌

急激性肝炎 → 自然治癒 (20-30%)

慢性肝炎 → 自然治癒 (肝炎後に自然排除されることがある) → 免疫賦活化による治療の可能性を示唆

持続感染化機序の解明から免疫賦活化による持続感染からの離脱

HCVはヒトとチンパンジーにしか感染しない → 解析が困難 → HCVの持続感染モデル動物の樹立と病態解析



### スイッチング後のマウスでみられた肝細胞癌(HCC)とB細胞リンパ腫

HCC, B cell lymphoma

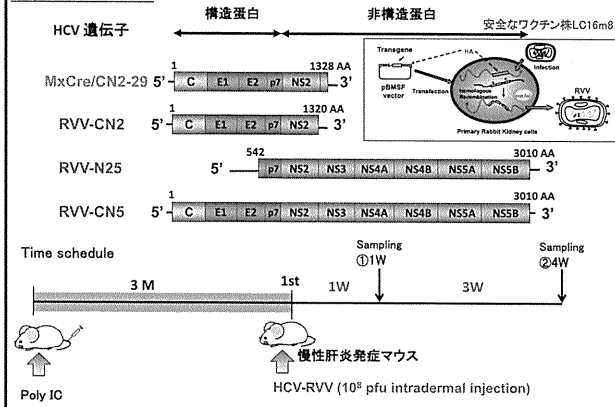
M12, M12, Anti-CD45R

#### Tumor incidence (%)

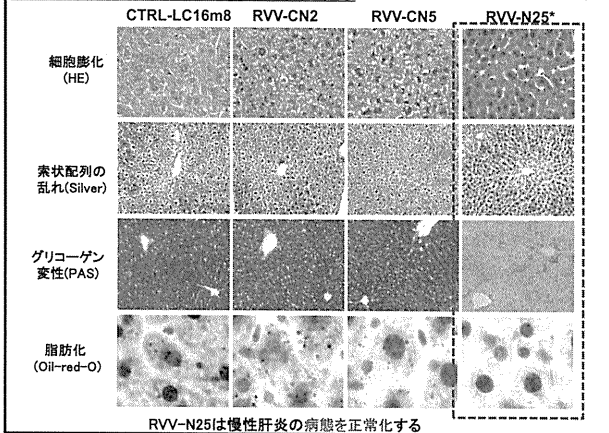
Tumor	sex	Tg(+)	Tg(-)	Tg(+)	Tg(-)
HCC	Male	8.3	0	50.0	9.0
	Female	0	0	0	0
B cell Lymphoma	Male	0	8.3	0	0
	Female	33.3	0	33.3	20.0

(HCC appeared from the age of 17 months... Moriya et al. Nat. Med. 1998)

### HCV遺伝子組換えワクチニアウイルス(HCV-RVV)の構成とワクチネーション

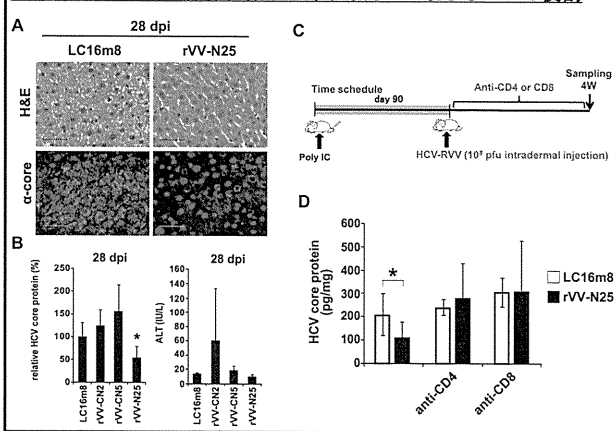


### rVV-N25は慢性肝炎症状を正常化する (7 days p.i.)

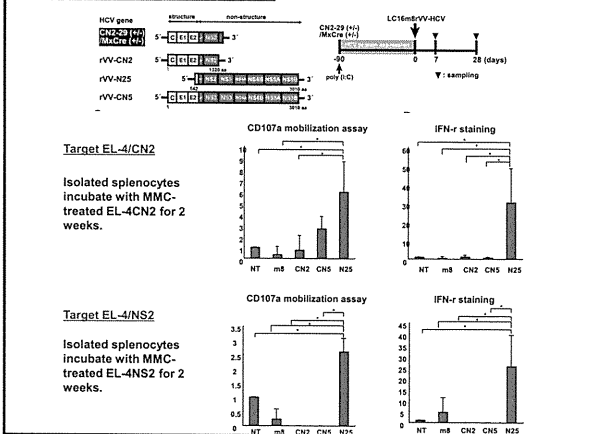


RVV-N25は慢性肝炎の病態を正常化する

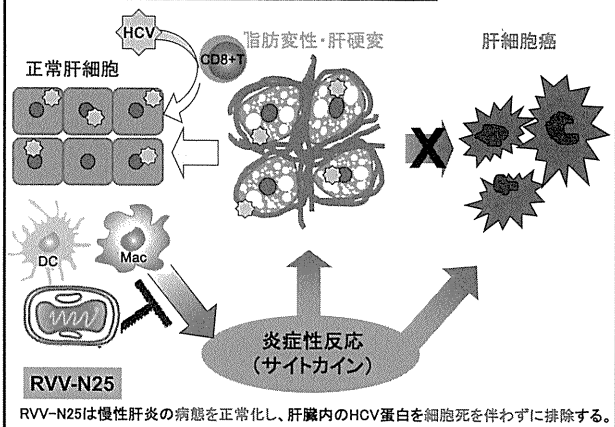
### rVV接種後のマウス肝臓組織の正常化及びCD4およびCD8の役割



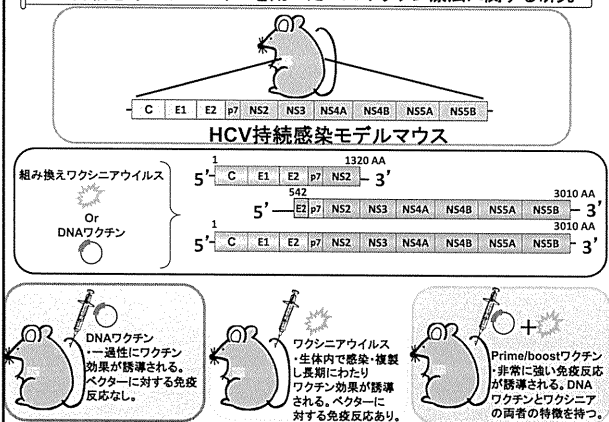
### 細胞障害性T細胞の検出と標的領域



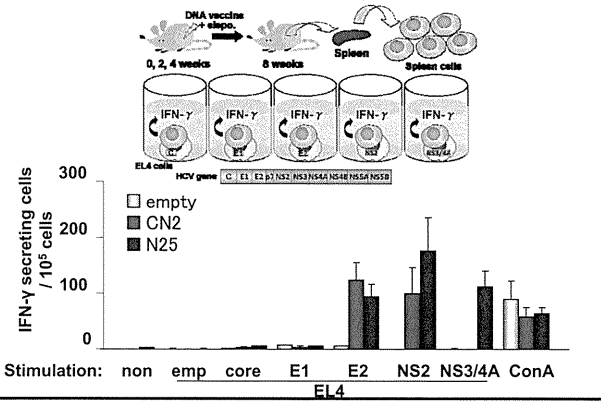
### 本研究の結果から得られた新たな病態メカニズム



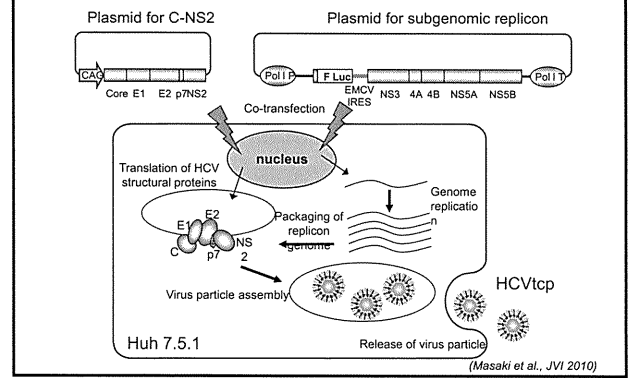
### HCV持続感染モデルマウスを用いたHCVワクチン療法に関する研究



DNA ワクチンにより強い細胞性免疫が誘導された



2種類のプラスミドトランスフェクションによる trans-packaging型HCV粒子(HCVtcp)産生システム



## 平成23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 2年目 40,375,000円

## I. 研究の意義

肝炎・肝がん対策の構築には、疫学、数理疫学、臨床病理学的根拠に基づいた研究が必要である。

- (1) 時代に即応した感染予防対策および肝炎対策を構築する面から、地域・年代ごとの肝炎ウイルス感染状況 (incidence, prevalence) の把握が必要である。
- (2) 肝炎ウイルス感染の自然経過 (長期経過) と予後が明らかではない。
- (3) キャリア率、キャリア数あるいは患者数の現状把握が求められていると同時に、肝がん死亡数を含むこれらの近未来における予測が必要である。
- (4) 肝炎ウイルス検査の機会が拡大したが、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と対策が求められている。
- (5) 医療成績の向上や医療費助成制度等から、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。

## 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た3つの課題を示す。

a 肝炎ウイルス感染状況に関する疫学基盤研究。

- (1) 肝がん死亡の経年的推移の数理疫学的要因分析による肝がん死亡近未来予測が期待できる。
- (2) 社会での存在状態別に4分類したキャリア数の把握が期待できる (感染を知らずに潜在するキャリア。感染を知って治療しているキャリア (患者)。感染を知ったが医療機関未受診あるいは継続受診に至っていないキャリア。新規感染によるキャリア数。)
- (3) 肝炎ウイルスキャリア率の実態把握とハイリスク集団を対象とした新規感染の状況把握。
- (4) 現行のHBワクチンによるHBs抗体獲得率の把握。
- (5) 献血者を対象とした肝炎ウイルス関連マーカー陽性者 (HCV, HBV) / NAT 検査陽性者の特性分析 (新規把握数と地理的広がり prevalence, incidence) が期待できる。
- (6) HCV キャリアを見出すための検査手順の妥当性の検証と簡便化を目指した改定の可否。

b 感染後の長期経過と予後調査に関する研究。

- (1) 献血を契機に見つかったHCVキャリア集団の肝病態・長期予後の把握。
- (2) 肝炎および肝硬変の長期予後の解明 (マルコフモデルを用いた年推移率の提示)
- (3) 早期肝癌 根治療法後の「平均的」経過を元にした医療経済指標の算定。
- (4) 微小肝がん早期発見のためのプロトコルの提示。

## c 治療導入対策に関する研究。

- (1) 全国大規模調査による肝炎ウイルス検査後の陽性者に対する状況、肝炎関連事案の対応と問題点の把握が期待できる。
- (2) 研究班パイロット地区での治療現場の現状把握と治療の推進。検査後、治療までの継ぎ目のない体制整備のモデル提示が期待できる。

これらの成果は、肝炎肝がん克服のための施策を立てる上での資料として活用できるものと期待できる。

### Ⅲ. 2年間の研究成果

- ・代表者(田中純子) 研究全体の統括、研究者との協議、研究進捗状況の確認、全国調査の実施。
  - (1) これまでに得た出生年別 HBV, HCV キャリア率を用いて、肝がん死亡の将来予測の数理モデル (Age-Period-Cohort model) を構築した。1940-2005 年の死亡に関して age, period, cohort の効果による実測数の再現が可能となり将来予測の準備が整った。
  - (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 年時点の地域別年代別 HBV・HCV キャリア数と率は、肝炎対策の資料として提示した。
  - (3) 産婦人科を有する病院・医院を対象とした広島県全数調査により 2010 年度に分娩した妊婦 14,366 人における年齢階級別 HBs 抗原/HCV 抗体陽性率を示しこれまでの資料と比較した。
  - (4) 後ろ向きコホート調査成績を元にマルコフモデルを用いた解析を行い、無治療の場合の HCV キャリアおよび HBV キャリアの病態推移 (自然史) を推定している (HCV: 岩手検診受診者集団、HBV: 虎ノ門 hospital)。HBV に関する住民 cohort についてはデータ収集中。
  - (5) 健保組合観察母集団 77.2 万人、観察期間 2009.1-2010.12 における診療記録 (レセプト) 解析を行い、数々の制限はあるものの、肝疾患関連患者数 (HBV・HCV、慢性・急性、肝炎・肝硬変・肝臓) の推計を進めている。患者調査との比較を行う予定。
  - (6) ハイリスク集団の一つである、血液透析患者コホート集団約 2700 名についての予後調査を行い、肝炎ウイルス感染の有無と死因に関する解析を行った。
  - (7) 全国 47 都道府県を対象に公費助成による肝炎ウイルス検査で「感染している可能性が高い」と判定されたキャリアに対する調査を開始した。受診率や受療率の把握が期待できる。
  - (8) HBV 感染初期と感染後期の血清の感染力の相違についてヒト肝細胞置換キメラマウス (PXB マウス) を用いた感染実験を行い、logit 解析による MID50 をそれぞれ提示した。
  - (9) HBIG 受動免疫後の PXB マウスを用い HBV 感染阻止に至った末梢血中 HBs 抗体価を定量。
- ・分担(三浦宣彦) GIS を用いた肝がんの地理分布に関する要因分析を試みている。
- ・分担(小山 富子) (1) 県域における肝炎ウイルス (HBV, HCV) の出生年別にみたキャリア率、感染既往率を集計し、今後の肝炎対策を方向付けるための基礎となる資料として提示した。
  - (2) 「HCV キャリアを見出すための検査手順」の妥当性を検証するために、広く民間の検査所も含めた多施設の参加を得た共同研究体制を確立し、データの収集解析を進めている。HCV 抗体および HCV core 抗原の測定について簡便化を目指した改定の可否についての中間結果を提示する。
- ・分担(池田 健次) 虎ノ門病院を受診した肝臓症例の解析から、わが国における肝臓診断の動向を示し、肝臓のサイズと個数による段階的進行過程を示した。肝臓の段階的進行過程を元に、反復治療の実態と QOL および医療経済評価指標の算出を進めている。
- ・分担(相崎英樹) 1999 年 4 月から 10 年間に届出された急性 C 型肝炎 723 症例の解析を行い、発生状況が減少していないこと、過半数は感染原因が不明であること等を提示した。

- ・**分担（内田茂治）** HBs 抗原陽性献血者の検体収集を行い、年代別地域別陽性率、遺伝子型分布等の解析をした。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についてスクリーニングシステム変更（平成 20 年）前後で検討し評価した。  
(2)平成 22 年度の HBs 抗原陽性献血者検体 3,690 本のうち HBV-DNA 陽性 1,658 検体の遺伝子型の解析を行い平成 18 年のデータと比較し HBV 感染の経年動向を提示した。
- ・**分担（日野啓輔・阿部弘一・酒井明人）協力（松崎靖司、杉原潤一）** 公的補助による検査で発見された HBV、HCV キャリアの医療機関・専門医受診率、抗ウイルス療法受療率等に関する調査を行い問題点を提示した。  
(2)専門医に年 1 回受診することを柱とした画期的なデータベース登録：石川県肝炎診療連携を開始した。連携の参加症例を従来の市町のデータベースと連結し総合的に解析を行った。
- ・**分担（鳥村拓司）協力（熊田卓）** 高感度 AFP の発癌予測の可能性について提示し、ソナゾイド造影腹部超音波検査との組み合わせによる微小肝がん早期発見プロトコル確立をめざしている。

#### IV. 平成 24 年度の課題

- (1) 肝炎ウイルス感染状況に関する疫学基盤研究では、肝がん死亡数の将来予測、検査手順の妥当性の検討、一般・ハイリスク集団における prevalence および incidence 算出の疫学調査を進める。
- (2) 感染後の長期経過と予後調査、治療導入対策に関する研究では、全国規模の調査により医療機関受診率、未受診率など算出し対策の方向性を探る。キャリア 4 分類の推計数（患者等）を試み、無治療 HCV・HBV 感染の病態推移により肝炎ウイルス検診の有効性/効果評価の検討を行う。
- (3) 企画から実施まで複数年必要とした本班の疫学調査研究により得た成果等の公表を進める。

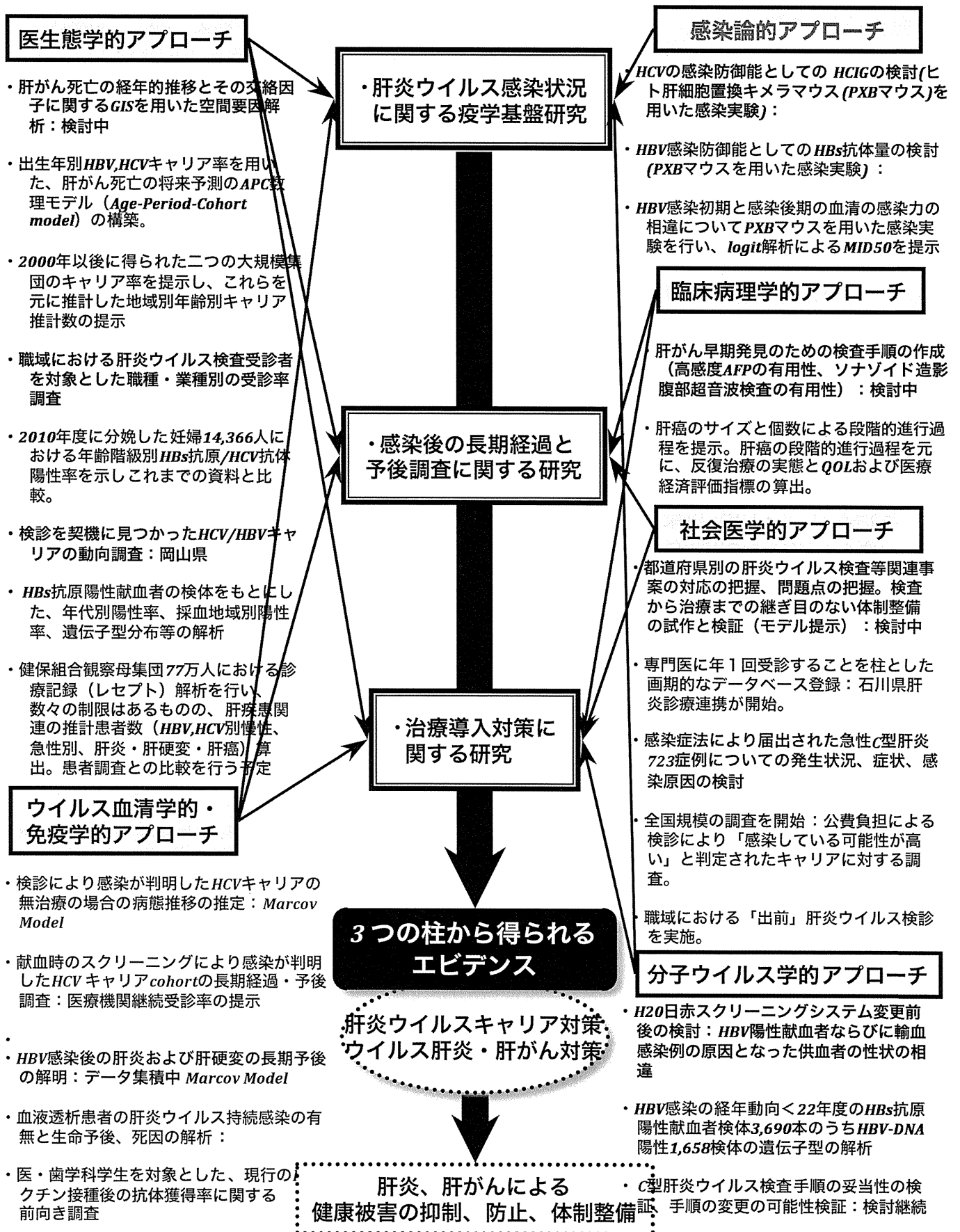
#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 肝がん死亡の将来予測や 4 分類したキャリアの推計数、また潜在する地域別 HBV・HCV キャリア数推計値の資料は、肝炎対策の基礎資料として有用となる。
- (2) 全国調査による検査陽性者の予後調査により、医療機関受診率や受療状況が把握できる。
- (3) 献血者を対象とした HBV・HCV 感染動向や急性肝炎の発生動向に関する情報を解析することにより感染予防対策や啓蒙活動等への行政施策に有用となる。
- (4) 肝癌の段階的進行過程を元にした医療経済評価は検診の費用対効果分析の資料となり得る。

#### VI. 本研究の成果（発表論文・ガイドライン・マニュアル等）

- 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*;54:185-195, 2011.
- (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*;54:229-232, 2011.
- (3)[Tanaka J](#), Infectivity of HBV. IPFA/PEI International Workshop on “Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens”, Dublin, 2011.
- ([内田茂治](#)) [Furui S](#), [Hoshi Y](#), [Murata K](#), [Ito K](#), [Suzuki K](#), [Uchida S](#), [Satake M](#), [Mizokai M](#), [Tadokoro K](#). Prevalence of amino acid mutation in hepatitis C virus core region among Japanese volunteer blood donors. *J.Med.Virol*;83:1924-29, 2011.
- ([池田健次](#)) [Ikeda K](#), [Kobayashi M](#), [Kawamura Y](#), [Imai N](#), [Seko Y](#), [Hirakawa M](#), [Hosaka T](#), [Sezaki H](#), [Akuta N](#), [Saitoh S](#), [Suzuki F](#), [Suzuki Y](#), [Arase Y](#), [Kumada H](#). Stage progression of small hepatocellular carcinoma after radical therapy: comparisons of radiofrequency ablation and surgery using the Markov model. *Liver Int.* 2011 ; 31(5):692-9.
- ([熊田卓](#)) [Kumada T](#), [Toyoda H](#), [Kiryama S](#), [Tanikawa M](#), [Hisanaga Y](#), [Kanamori A](#), [Tada T](#), [Tanaka J](#), [Yoshizawa H](#). Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2011. Apr;46(4):536-44.
- ([相崎英樹](#)) [Yamamoto M](#), [Aizaki H](#), [Fukasawa M](#), [Teraoka T](#), [Miyamura T](#), [Wakita T](#), [Suzuki T](#). The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus, *J Gen.Virol.* 2011;92;2082-7

Ⅶ. Ⅲ (2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

1981年(昭56)11月	広島大学助手(衛生学講座)
1991年(平3)2月	visiting associate Professor, Division of Biostatistics, School of Public Health, University of Minnesota, USA
1995年(平7)8月	広島大学講師(衛生学講座)
2002年(平14)4月	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	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	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～現在	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(前・広島大学医学部教授)

### ・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、理論疫学研究
- ・肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究
- ・輸血用血液の安全性に関する研究
- ・B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究
- ・新たながん検診手法の有効性の評価
- ・フィブリノゲン納入医療機関における投与の記録保存の実態に関する研究
- ・肝炎ウイルスの汎流行時期と肝がん死亡との関連性解明に関するグローバル血清疫学
- ・わが国におけるC型肝炎ウイルス持続感染者集団の予後予測に関する研究
- ・肝炎ウイルスの持続感染に起因する慢性肝疾患の病態解明に関する研究
- ・血液透析患者集団におけるB型およびC型肝炎ウイルス感染の実態把握と感染防止策の構築
- ・肝がん多発県における病因論的肝がん対策樹立に関する調査研究
- ・死亡小票と血清疫学からみた慢性肝疾患死亡と肝炎ウイルス持続感染に関する研究
- ・慢性肝疾患の地理的分布と病因ウイルスとの関連性に関する疫学的研究

### ・これまでの研究実績

原著および著書

1. *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. 54:185-195, 2011*
2. *Interferon Alone or Combined with Ribavirin for Acute Prolonged Infection with Hepatitis C Virus in Chimpanzees, Intervirology, 54:229-232, 2011.*
3. *Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. J Gastroenterol 2011. Apr;46(4):536-44.*



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. *Intervirolgy*, 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. *Intervirolgy*, 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. 厚生労働省肝炎推進会議委員として参画した。
2. 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画。「肝機能障害の障害認定」に寄与した。
3. 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)
4. 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.
5. 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.
6. 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.

#### 発表

1. *Infectivity of HBV. IPFA/PEI International Workshop on "Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens", (Dublin), 2011.*

2. *Study on hepatitis viral infection among feneral population in Cambodia. Asian Pacific Association for the Study of the Liver, (BANGKOK), 2011*
3. *Evaluation of strategies for pandemic influenza (H1N1) control and prevention in Japan based on a total number survey in a closed area simulated by mathematical models. IEA World Congress Of Epidemiology, (Edinburgh, UK) 2011.*
4. *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*
5. *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*
6. *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.*
7. *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.*
8. *Minimum infectious does of HBV required for establishing infection to human hepatocyte transplanted chimera mice. SoGAT XX (Poland, Warsaw) 2007.*
9. *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.*
10. *Chimpanzee Infectious Dose and in vitro Concentration of HBV DNA. SoGAT XIX (Switzerland, Bern) 2006.*
11. *Epidemiology of Hepatitis B virus (HBV) and Hepatitis C virus (HCV) infection in Japan. The 19th International Symposium/Foundation for Promotion of Cancer Research*
12. *Incidence rate of HCV infection among voluntary blood donors in Hiroshima. 第14回 国際疫学会 (Nagoya) 1996.*

**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 班**  
(H22-肝炎一般-012)

田中 純子  
広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 疫学・疾病制御学

- 分担研究者
- 小山 富子 岩手県予防医学協会
  - 日野 啓輔 川崎医科大学 内科学
  - 三浦 真彦 埼玉医科大学 保健医療福祉学部情報科学
  - 阿部 弘一 岩手医科大学 内科学
  - 池田 健次 虎の門病院 消化器科
  - 鳥村 拓司 久留米大学 医学部内科学
  - 相崎 英樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部
  - 酒井 明人 金沢大学附属病院 光学医学科診療部
  - 内田 茂治 日赤 中央血液研究所 核酸増幅検査部
- 協力研究者
- 黒田 卓 岐阜市立病院 消化器内科
  - 杉原 潤一 岐阜県総合医療センター 消化器内科
  - 松崎 靖司 東京医科大学 茨城医療センター 消化器内科
  - 松倉 晴道 大阪府立赤十字血液センター 医薬製造部
  - 山崎 一美 長崎県済良院病院
  - 高橋 和明 東芝中央病院 研究部
  - 吉原 正治 広島大学保健管理センター
  - 片山 恵子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学

肝炎等克服緊急対策研究事業  
肝炎ウイルス感染後の長期経過・予後調査及び治療導入対策に関する研究 班

**a. 肝炎ウイルス感染状況に関する疫学基盤研究**

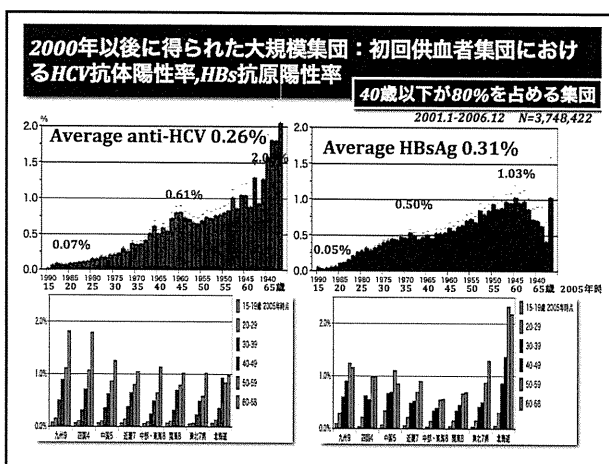
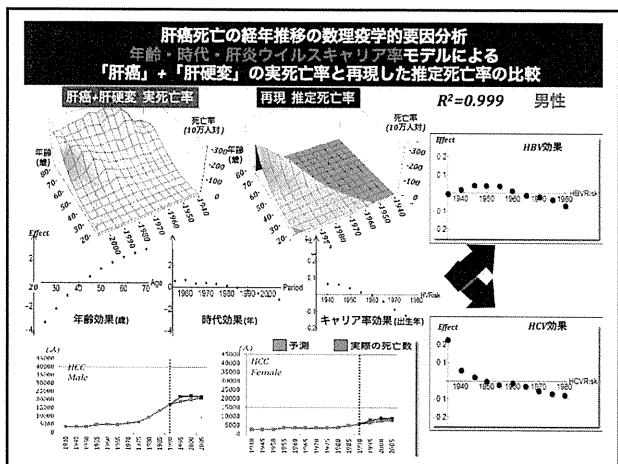
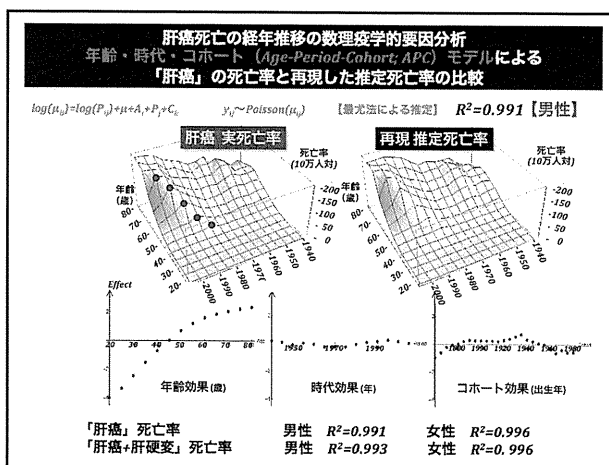
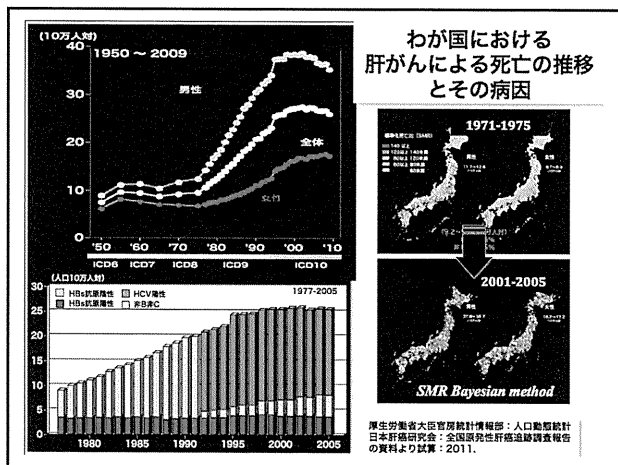
- 肝癌死亡の動向、数理疫学的要因分析と近未来の将来予測
- HBV、HCVキャリア率の出生年別実態把握
- HBV、HCVキャリア数（社会での存在状態別に4分類）  
➤キャリア数、患者数、未受診のキャリアの把握
- 肝炎ウイルスキャリア率の実態把握（妊婦集団）（新規感染の動向）
- HBV感染防御に関する研究（HBワクチンによるHBs抗体獲得率）
- HBV感染防御に関する研究（HBIG受動免疫後のHBV感染動態）
- HCV検査手順の検討

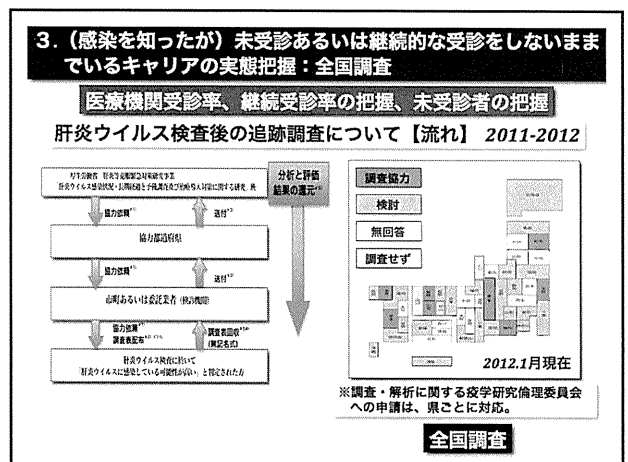
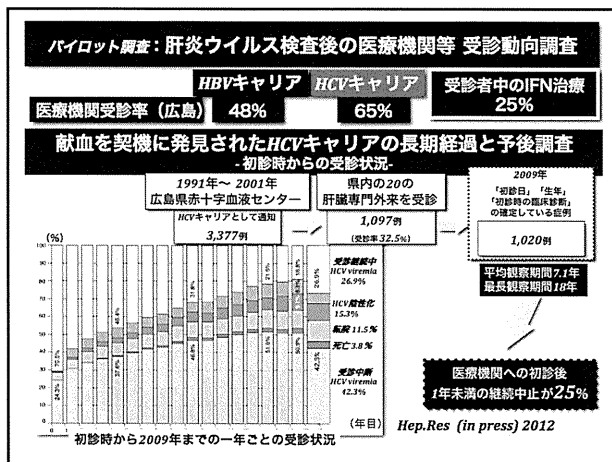
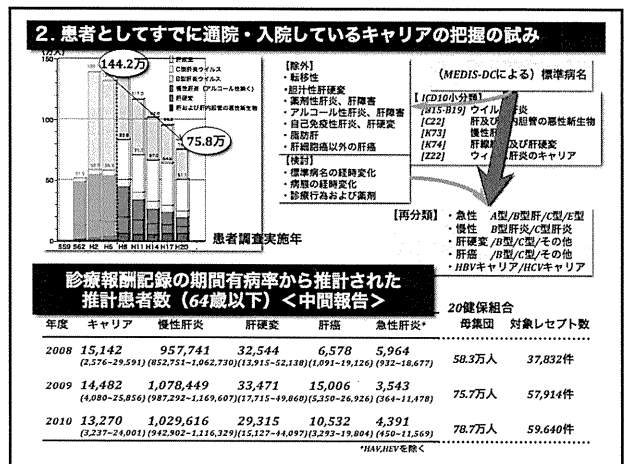
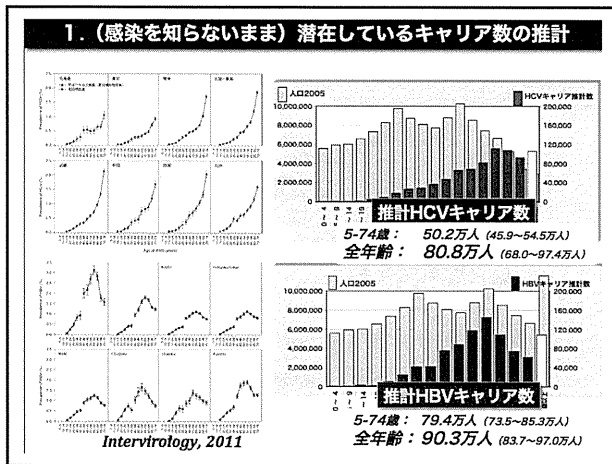
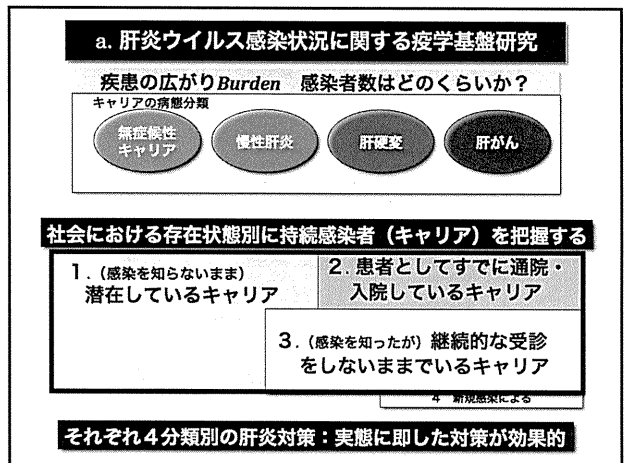
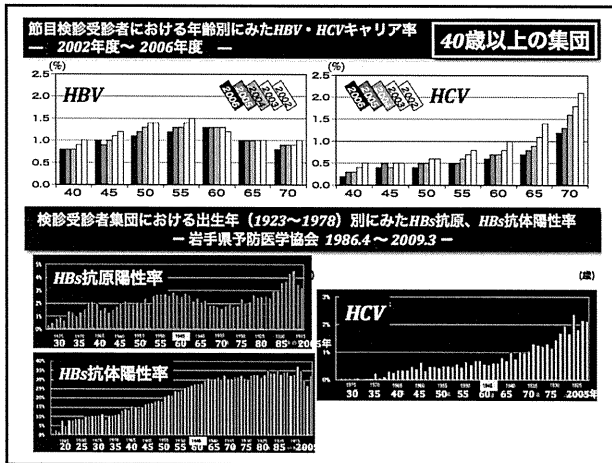
**b. 感染後の長期経過と予後調査に関する研究**

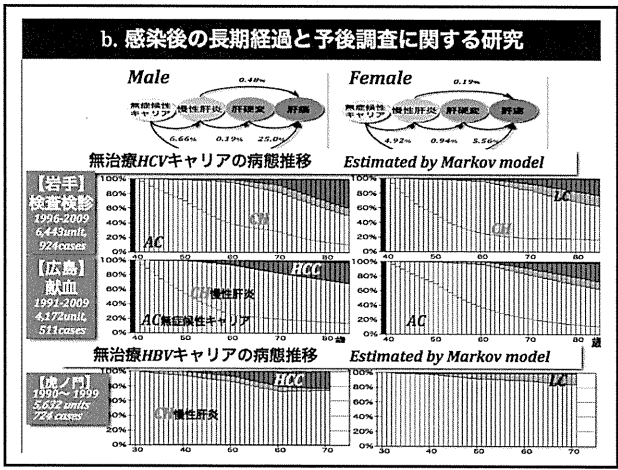
- 献血を契機に見いだされたHCVキャリアの長期予後
- 公費補助による検査で見つかったキャリアの予後調査
- 肝炎・肝硬変の長期予後の解明（HBV、HCVキャリアの自然経過、数理疫学モデルによる年推移率の提示）
- 血液透析患者における予後と肝炎ウイルス感染状況

**c. 治療導入対策に関する研究**

- 早期肝癌根治療法（標準的治療）の医療経済
- 肝がん早期発見のためのプロトコル







肝炎等克服緊急対策研究事業  
 肝炎ウイルス感染後の長期経過・予後調査及び治療導入対策に関する研究 班

**a. 肝炎ウイルス感染状況に関する疫学基礎研究**

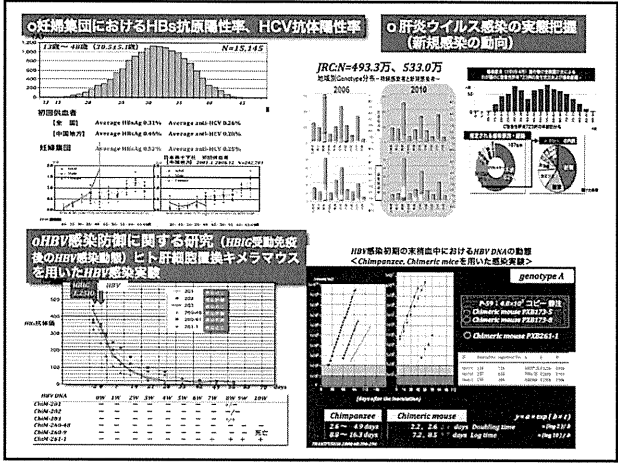
- 肝癌死亡の動向、数理疫学的要因分析と近未来の将来予測
- HBV、HCVキャリア率の出生年別実態把握
- HBV、HCVキャリア数（社会での存在状態別に4分類）
  - ▷ キャリア数、患者数、未受診のキャリアの把握
- 肝炎ウイルスキャリア率の実態把握（妊婦集団）（新規感染の動向）
- HBV感染防御に関する研究（HBワクチンによるHBs抗体獲得率）
- HBV感染防御に関する研究（HBIG受動免疫後のHBV感染動態）
- HCV検査手順の検討

**b. 感染後の長期経過と予後調査に関する研究**

- 献血を契機に見いだされたHCVキャリアの長期予後
- 公費補助による検査で見つかったキャリアの予後調査
- 肝炎・肝硬変の長期予後の解明（HBV、HCVキャリアの自然経過、数理疫学モデルによる年推移率の提示）
- 血液透析患者における予後と肝炎ウイルス感染状況

**c. 治療導入対策に関する研究**

- 早期肝癌根治療法（標準的治療）の医療経済
- 肝がん早期発見のためのプロトコル



**○ HCV検査手順の検討**

C型肝炎ウイルス検査の指針

1: HCV抗原検査の検討  
 2: HCV抗体検査の検討

**○ 血液透析患者における予後と肝炎ウイルス感染状況**

**○ 早期肝癌根治療法（標準的治療）の医療経済**

1. 小症で発見されるのが型の肝癌では、「標準療法」後も再発に対する反復治療が避けられない。

2. 3年以上前に治療開始した症例で長期経過をみると、50%生存期間8.3年で、平均5.8回の肝臓治療を行い、計131日間の入院、肝臓治療費391万円を要していた。

3. 最終的に死に至った症例であると、初回肝切除高行例・初回RFA高行例での肝臓治療入院日数はそれぞれ197日・152日で、肝臓治療費は627万円・491万円であった。

**○ 肝がん早期発見のためのプロトコル**

- ・ 高感度AFP-L3%による肝細胞癌の発症予測
- ・ 造影超音波検査とプロモヒストMRIによる肝細胞癌の検出能の検討

## 平成 23 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：大阪大学大学院

所属部局：薬学研究科分子生物学分野

職名：准教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 6,500,000 円 2年目 6,175,000 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・発現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) 簡便に HCV ゲノムを導入・発現させることが可能なベクターを開発出来れば、汎用性に優れた HCV 感染評価系基盤技術の開発、ひいては抗 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. 2 年間の研究成果

・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。
- (3) (2) で作製したデコイ RNA 発現 Ad ベクターを用いて HCV レプリコンを高効率に抑制することに成功した (現在投稿中)。

：

・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 (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。
- (4) HCV サブゲノム発現 Ad ベクターを用いて HCV 評価系を作製した。抗 HCV 薬インターフェロンを添加することにより濃度依存的な HCV 複製阻害効果が確認されたことから、本評価系は抗 HCV 薬評価系として有用であることを確認した。
- (5) HCV サブゲノム発現 Ad ベクターとヒト iPS 細胞由来の肝細胞を用いることで、新たな HCV 感染評価系を作製した。HCV サブゲノム発現 Ad ベクターによりヒト iPS 細胞由来肝細胞において HCV プラス鎖、マイナス鎖 RNA が産生されること、およびインターフェロンにより濃度依存的な HCV 複製阻害効果が表れることを明らかにした。

#### **IV. 平成 24 年度の課題**

- (1) H23 年度までに作製した Ad ベクターをもとに小動物 HCV 感染モデル系を作製し、抗 HCV 薬の in vivo 評価系としての有用性を検証する。
- (2) HCV フルゲノム発現 Helper-dependent Ad ベクターを作製し、Huh7 細胞などを用いた in vitro HCV 評価系、モデルマウスなどを用いた in vivo HCV 評価系の構築を目指す。
- (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) miR-122 に対するデコイ RNA 発現 Ad ベクターを改良して、更なる HCV 抑制効果を得るとともに、in vivo における有用性を検討する。

:

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) HCV ゲノムを簡便に導入・発現可能なベクターは簡便な HCV 感染評価系の開発へとつながり、ひいては新規抗 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)**

- (1) Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press.

上記に加え、現在下記の論文を投稿中。

Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K, Mizuguchi H. Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. Submitted.

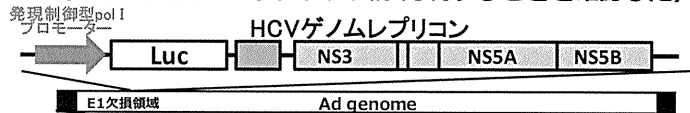
### Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

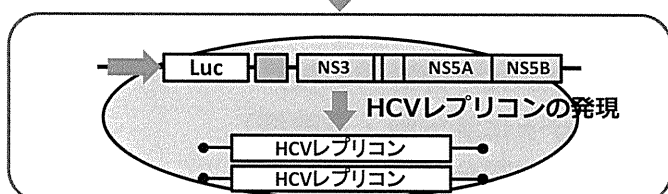
#### ① HCVサブゲノム発現Adベクターの開発

**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!**

(マイナス鎖HCVサブゲノムが発現することを確認した)



iPS細胞由来肝細胞を含む培養細胞に遺伝子導入

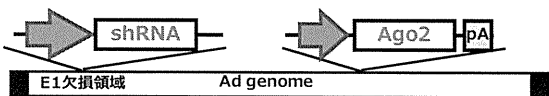


HCVサブゲノムを簡便に発現させることに成功!

HCVサブゲノム発現Adベクターを用いた簡便なHCV複製評価系の開発へ!

#### ② 効率よくHCV受容体をノックダウン可能なshRNA発現Adベクターの開発

高効率なRNA干渉を誘導可能なshRNA発現Adベクターの開発に成功した



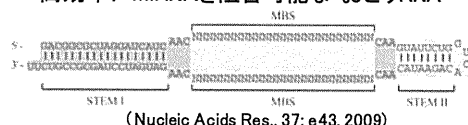
RNA干渉に必須のAgo2を共発現させることで、高効率なノックダウンが可能

HCV受容体 (CD81) のノックダウンに成功!

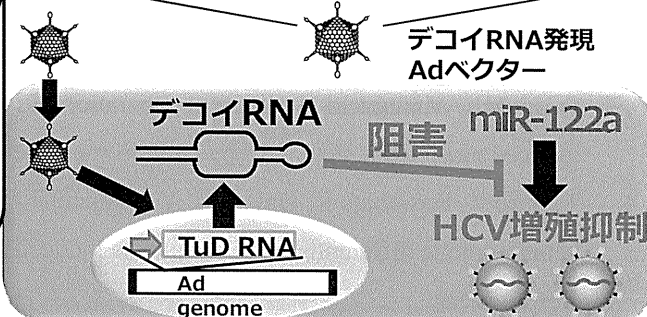
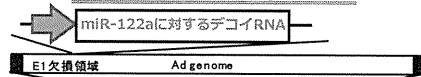
HCV感染阻害による治療法の開発  
HCV感染機構の解明

#### ③ miR-122aを阻害可能なデコイRNA発現Adベクターの開発

タフデコイRNA  
高効率にmiRNAを阻害可能な“おとりRNA”



miR-122aに対するデコイRNAを発現するAdベクターを開発!



## ●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) 核酸医薬を利用した遺伝子発現制御に関する研究

### ・これまでの研究実績

下記を含め、これまで原著論文 64 報、総説 17 報、著書 3 報、特許 4 件 (うち 2 件成立済み) を発表済み。

1. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K. Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press.
2. Iguchi K, Sakurai F, Tomita K, Katayama K, Yamaguchi T, Kawabata K, Tagawa M, Kawabata M, Shirakawa T, Mizuguchi H. Efficient antitumor effects of carrier cells loaded with a fiber-substituted conditionally replicating adenovirus on CAR-negative tumor cells. *Cancer Gene Ther.*, in press.
3. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. *Mol. Ther.*, in press.
4. Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.* in press.

5. Yu D, Sakurai F, Corey DR. Clonal Rett Syndrome cell lines to test compounds for activation of wild-type MeCP2 expression. *Bioorg Med Chem Lett*. 21: 5202-5. (2011).
6. Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*. e21780. (2011).
7. Machitani M, Katayama K, Sakurai F, Matsui H, Yamaguchi T, Suzuki T, Miyoshi H, Kawabata K, Mizuguchi H. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release*. 154: 285-9. (2011).
8. Shimizu K, Sakurai F, Machitani M, Katayama K, Mizuguchi H. Quantitative analysis of the leaky expression of adenovirus genes in cells transduced with a replication-incompetent adenovirus vector. *Mol Pharm*. 8: 1430-5. (2011).
9. Motegi Y, Katayama K, Sakurai F, Kato T, Yamaguchi T, Matsui H, Takahashi M, Kawabata K, Mizuguchi H. An effective gene-knockdown using multiple shRNA-expressing adenovirus vectors. *J Control Release*. 153: 149-53. (2011).
10. Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Hayakawa T, Yagi K, Mizuguchi H. Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res*. 158: 154-60. (2011).
11. Katayama K, Furuki R, Yokoyama H, Kaneko M, Tachibana M, Yoshida I, Nagase H, Tanaka K, Sakurai F, Mizuguchi H, Nakagawa S, Nakanishi T. Enhanced in vivo gene transfer into the placenta using RGD fiber-mutant adenovirus vector. *Biomaterials*. 32: 4185-93. (2011).
12. Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Matsui H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin Cancer Res*. 17: 2807-18. (2011).
13. Matsui M, Sakurai F, Elbashir S, Foster DJ, Manoharan M, Corey DR. Activation of LDL receptor expression by small RNAs complementary to a noncoding transcript that overlaps the LDLR promoter. *Chem Biol*. 17: 1344-55. (2010).
14. 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*. 150: 94-101. (2011).
15. 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*. 32: 1724-30. (2011).
16. 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, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther*. 19: 400-7. (2011).
17. 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).
18. 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*. 155: 48-54. (2011).
19. 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: