

ウイルスの活動性が低い傾向がみられた。すなわち、HBe 抗原陽性率が低く、HBcr 抗原量と HBV DNA 量が低い傾向がみられた。経過観察中の HBs 抗原消失率は HBs 抗原量の低い症例で高い傾向がみられた。

図 2 に HBs 抗原量の低下速度の分布を示した。HBs 抗原量は経過で低下する症例が多く、増えたとしてもその程度は軽度であった。分布を見ると急速低下群と非急速低下群の 2 群に分けることが可能であり、その cut-off 値は $-0.4 \log \text{IU/年}$ であった。表 3 は急速低下群と非急速低下群の背景因子の比較を示す。両群間で年齢の差はなかったが、ウイルスの活動性は急速低下群で有意に低い傾向がみられた。すなわち、急速低下群では HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV DNA 量は全て有意に低かった。また、HBs 抗原消失例は急速低下群のみでみられた。

図 3 に HBV DNA と HBV RNA の in house 測定での標準曲線を示す。DNA と RNA 共に $2.0 \log \text{copies/ml}$ 近くの測定感度が得られた。図 4 は HBV DNA と HBV RNA 標準溶液を実線および破線で示す量で混合し、A~C に示す条件で処理して測定した時の測定値を示す。図 4-A からは DNase 処理が適切に行われ、DNA 量が $9 \log \text{IU/ml}$ 程度にならないと影響が出ないことが明らかになった。図 4-B からは DNase 処理をしないで RT-PCR を行うと RNA と DNA が同時に測定できることが確認された。図 4C からは DNase 処理と RT-PCR を両方行うと、HBV DNA 量が $4.0 \sim 5.0 \log/\text{ml}$ 程度であれば、DNA 量の影響を受けずに HBV RNA 量が測定可能であることを示す。

D. 考察

HBs 抗原量は新規薬物の効果をモニターする時の基本的なマーカーになることが予測される。すなわち、HBs 抗原の陰性化が新規治療薬の目標になると考えられる。そこで、今回は HBs 抗原量とその自然経過での推移を検討した。そのまとめを表 4 に示したが、新規薬物の効果をモニターする場合は HBs 抗原量の自然経過での変化を加味して評価すべきと考えられた。

HBV は DNA ウィルスであるが、その複製過程で一旦 RNA となり DNA に逆転写される。このため逆転写酵素阻害薬である核酸アナログ薬使用時には RNA 遺伝子を持ったウィルス粒子が出現することが報告されている。これまで HBV RNA 単独での測定は可能であったが、高感度で安定した測定系ではなかった。今回我々が作成した HBV RNA 測定系の感度は $2.0 \log \text{copies/ml}$ 程度と良好であり、リアルタイム PCR 法を用いているため

定量範囲も広範囲であった。さらに、DNase による HBV DNA の処理も十分であることが示された。今後は新規薬物の効果モニターに向け、その意義をさらに検討する必要がある。

E. 結論

- 1) HBs 抗原量は幅広い分布を示し、自然経過で不変か低下した。HBs 抗原量の低値と低下速度の増加はウイルスの活動性の低下を示唆した。新規薬物の効果モニターに HBs 抗原量を用いることが推奨されるが、その評価には自然経過を加味する必要がある。
- 2) HBV RNA 量の高感度で特異性の高い測定系を開発した。今後、新規薬物の効果モニターでの意義を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S: Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. *J Gastroenterol* 2012; 47: 1006-1013
- 2) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H: Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2012; 42: 139-149

2. 学会発表

- 1) 森田進、他：HBe 抗原が陰性である慢性 B 型肝炎の発症の因子についての検討。第 48 回日本肝臓学会総会 オープンワークショップ 36 金沢市 2012.6
- 2) 松本晶博、他：B 型肝炎の自然経過例における HBsAg 消失予測と、この予測を用いた核酸アナログ治療例での評価。第 48 回日本肝臓学会総会 シンポジウム 1 金沢市 2012.6
- 3) 梅村武司、他：B 型慢性肝炎患者における血中サイトカインの網羅的検討。第 16 回日本肝臓学会大会 神戸市 2012.10

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

2. 実用新案登録

今回の研究内容については特になし。

3. その他

特になし。

表2 HBs抗原量の低値例と高値例の比較

臨床的特徴	観察開始時HBs抗原量		P
	< 3.2 log IU/ml (n = 49)	≥3.2 log IU/ml (n = 52)	
観察開始時			
年齢	55 (32-83)	45 (15-72)	<0.001
性別(男:女)	32:17	25:27	0.108
肝硬変あり	13 (27%)	6 (12%)	0.075
ALT (IU/L)	28 (10 - 119)	39 (12 - 447)	0.089
HBe抗原陽性	11 (22%)	27 (52%)	0.004
HBcr抗原 (log U/ml)	3.3 (<3.0 - >6.8)	5.5 (<3.0 - >6.8)	<0.001
HBV DNA (log c/ml)	3.7 (<1.7 - 8.3)	6.0 (neg. - >9.5)	0.001
経過観察中			
HBs抗原消失	15 (31%)	5 (10%)	0.012
HCC合併	9 (18%)	5 (10%)	>0.2

表1 HBV DNAとHBV RNAの測定方法

<RT primer>	
HBV SGR: (nt 345-324)	5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'
<PCR primer>	
HBV SGF: (nt 166-187)	5'-ACAACAT CAGGATTCC TAGGAC-3'
HBV SGR: (nt 345-324)	5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'
HBV TMP: (nt 244-269)	5'-FAM-CAGAGCTAGACTCGTGGTG GACTTC-TAMRA-3'
<測定>	
↓	血清検体 200μl
↓	血清からの核酸抽出 QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Kit
↓	DNAse処理 (DNA測定では無し)
↓	reverse transcription (DNA測定では無し)
↓	Realtime PCR QIAGEN Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit 2 step 50 cycle

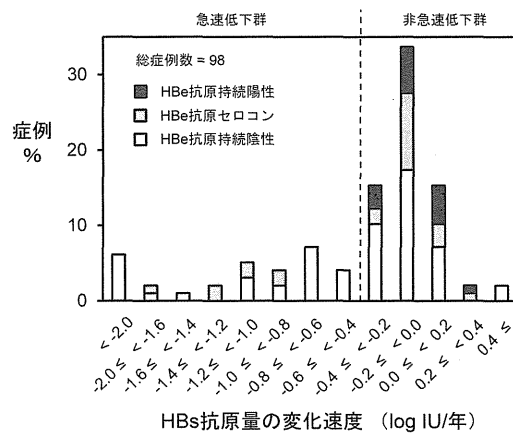


図2 HBs抗原量の変化速度の分布とHBe抗原

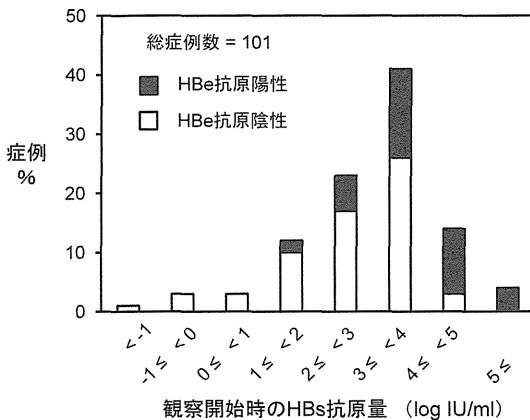


図1 HBs抗原量の分布とHBe抗原

表3 HBs抗原量低下速度による臨床的特徴の比較

臨床的特徴	急速低下 (n = 31)	非急速低下 (n = 67)	P
観察開始時			
年齢	52 (15 - 65)	49 (19 - 83)	0.338
性別(男:女)	17:14	38:29	1.000
肝硬変あり	6 (19%)	13 (19%)	1.000
ALT (IU/L)	27 (10 - 108)	36 (13 - 447)	0.230
HBs抗原	2.8 (-1.0 - 5.0)	3.3 (0.8 - 5.3)	0.001
HBcr抗原	<3.0 (<3.0 - >6.8)	5.1 (<3.0 - >6.8)	< 0.001
HBV DNA	3.7 (<2.1 - >9.6)	4.6 (neg - >9.6)	0.002
経過観察中			
HBe抗原持続	0 (0%)	15 (22%)	0.012
HBs抗原消失	18 (58%)	0 (0%)	< 0.001
HCC合併	2 (7%)	9 (17%)	0.214

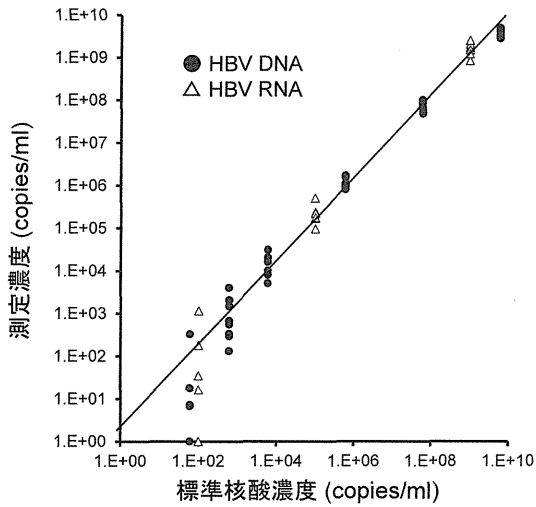


図3 HBV DNAとHBV RNA測定標準曲線

表4 HBs抗原量とその変化の特徴

1. HBVキャリアのHBs抗原量は幅広く分布する。また、その変化は基本的に緩徐である。
2. HBs抗原量の低下はHBV活動性の低下および高い年齢と関連する。
3. HBs抗原量の経時的変化は基本的に低下か不変であり、増加しても軽度である
4. HBs抗原量が低下するとその低下速度も速くなる。このような症例では最終的にHBs抗原消失を達成する。

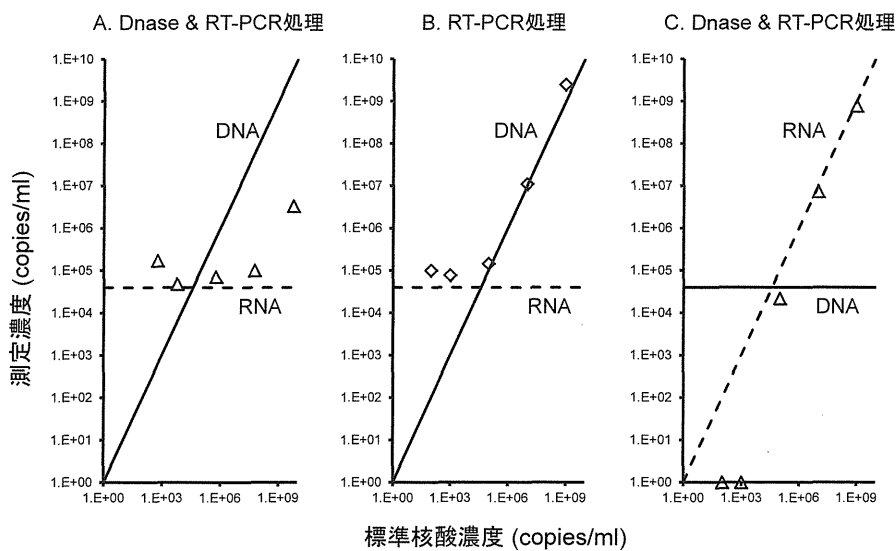


図4 HBV DNAとHBV RNAの標準溶液を混合し条件を変えて測定した成績。実線は標準液中のDNA濃度、破線はRNA濃度を示す。

RNA の品質管理と安定化

研究分担者：星野真一 名古屋市立大学大学院薬学研究科
研究協力者：細田 直 名古屋市立大学大学院薬学研究科

研究要旨：『人工キメラ遺伝子 ZFN を RNA として細胞に導入し、安定かつ高効率に発現させる』ことを本研究の最重要課題と位置づけ、(1) RNA トランスフェクション方法の確立、(2) RNA 末端構造の最適化、(3) トランスフェクションした RNA の細胞内動態、(4) RNA 環状化による安定化について検討を行った。RNA トランスフェクションでは、導入した mRNA は内在性の mRNA と異なる細胞内動態をとるが、プラスミドによる発現導入と異なり細胞集団全体に均一に導入できること、翻訳の効率化には、3' 末端に 30 塩基以上のポリ A 鎖と 5' 末端にアンチリバースキャップアナログを付加した RNA 構造が最適であるという有用な知見が得られた。環状化による安定化と翻訳の効率化に関しては次年度以降にさらなる検討を行なう。

A. 研究目的

現在遺伝子治療においてはプラスミドベクターやウイルスベクターが汎用されている。しかしながら、プラスミドベクターやウイルスベクターで DNA を導入する場合には、組換えにより染色体へ挿入される可能性があり、発ガンの危険性を伴う。ウイルスベクターを用いる場合には、ウイルスが意図しない増殖能を獲得することにより、患者や医療従事者への感染リスクを伴う。RNA による遺伝子導入はこれらリスクが低いと期待されるものの、RNA は細胞内で分解を受けやすく、また、転写を介した増幅効果がないので、発現量が低いという欠点がある。本研究では、1. 細胞内外で安定に存在でき、2. 翻訳効率が良く、3. 細胞毒性の低い、RNA トランスフェクション方法の確立を目指し解析を進めた。

B. 研究方法

RNA 合成において鋳型となるベクターを作製した。レポータとして EGFP を利用した。5' 非翻訳領域に β -globin の mRNA 安定化シス配列を、また高感度で発現タンパク質を検出するために Flag タグを 5 コピー付加した。ポリ A 鎖は最大 100 塩基付加した。これらユニットの 3' 末端を制限酵素により切断したものを鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼにより RNA 合成を行った (図 1)。合成した RNA は HeLa 細胞にトランスフェクションした。

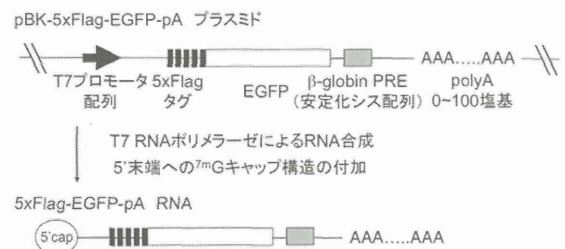


図1 *in vitro* におけるRNA合成

C. 研究結果

1. RNA トランスフェクション方法の確立

HeLa 細胞へのトランスフェクションについて RNA とプラスミドの比較をした (図 2)。RNA を用いた場合はプラスミドと比較して、細胞毒性が低かった。また、総発現量は低いものの、個々の細胞に着目すると、発現量は各細胞でほぼ同程度であることが観察された。RNA を用いることにより細胞集団全体に均一に導入できることが明らかとなった。

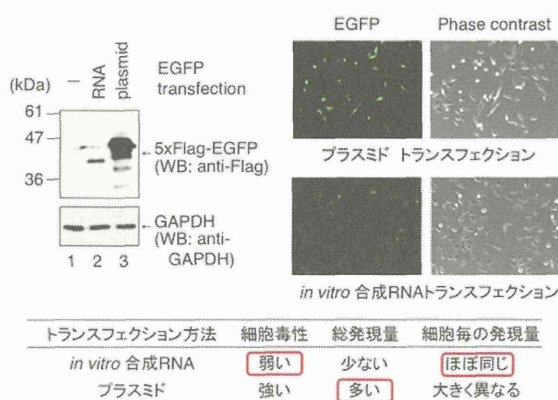


図 2 HeLa 細胞への *in vitro* 合成 RNA のトランスフェクション

2. 3' 末端構造の最適化

真核細胞の mRNA では、3' 末端にはポリ A 鎖が付加され、mRNA の翻訳効率および安定性制御に重要な役割を果たすことが知られている。ポリ A 鎖長と発現効率の相関について検討したところ、ポリ A 鎖長が 30 塩基になるまでは発現量が上昇するものの、それ以上においてさらなる発現上昇は認められなかった。30 塩基以上のポリ A 鎖が必要であることが明らかとなった (図 3)。次に、ポリ A 鎖の位置について検討した。72 塩基のポリ A 鎖にさらに図 3 に示す塩基を付加した RNA を作製したところ、13 塩基以上の付加により、その発現はポリ A 鎖がない

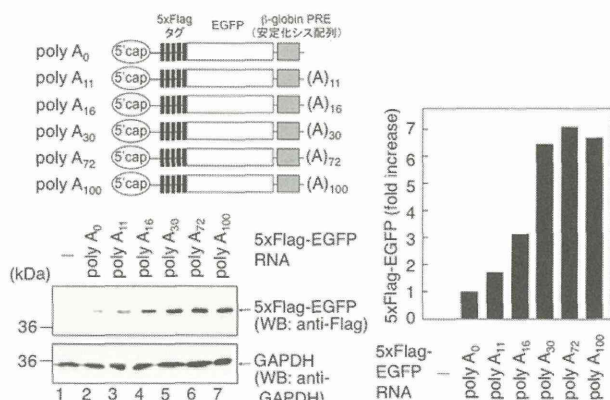


図 3 効率的なタンパク質発現に必要なポリ A 鎖長

場合と同じ程度にまで減少した。

ポリ A 鎖は 3' 「末端」に位置することが、効率的な発現に必要であることが明らかとなった (図 4)。ポリ A 鎖の有無が細胞毒性に及ぼす効果について検証したところ、ポリ A 鎖がない RNA を導入したとき、強い細胞毒性が認められた。ポリ A 鎖は発現量上昇のみならず細胞毒性の軽減にも寄与することが明らかとなった。

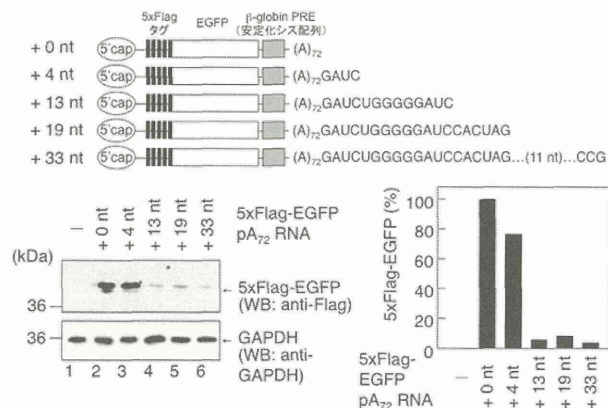


図 4 3' 「末端」のポリ A が効率的なタンパク質発現に必要な

3. 5' 末端構造の最適化

真核細胞の mRNA の 5' 末端にはキャップ構造が付加される。キャップ構造は翻訳開始因子を 5' 末端にリクルートするために必須の構造である。また、キャップ構造結合タンパク質 eIF4E、翻訳開始

因子 eIF4G、ポリ A 鎖結合タンパク質 PABPC1 は三者複合体を形成し、mRNA を環状化させる。この環状化はキャップ構造とポリ A 鎖による相乗的な翻訳効率上昇、mRNA の安定化に寄与する。T7 RNA ポリメラーゼによる RNA 合成では、RNA 合成開始時にキャップアナログを 5' 末端に取り込ませることにより、キャップ構造を付加する。通常のキャップアナログ m⁷G(5')pppG は、7 位のメチル基を除くと、点対称の構造をとるため、ある一定の頻度で、RNA の 5' 末端に逆向きに取り込まれる。そこで、図 4 に示すアンチリバーシキャップアナログ 3'-O-Me-m⁷G(5')pppG の利用を試みた。ポリ A 鎖の有無に関わらず、アンチリバーシキャップ付加による発現上昇が観察された。その効果はポリ A 鎖が付加された RNA の方が顕著であった (図 5)。キャップ構造とポリ A 鎖による相乗的な翻訳効率上昇を支持する結果と考えられる。

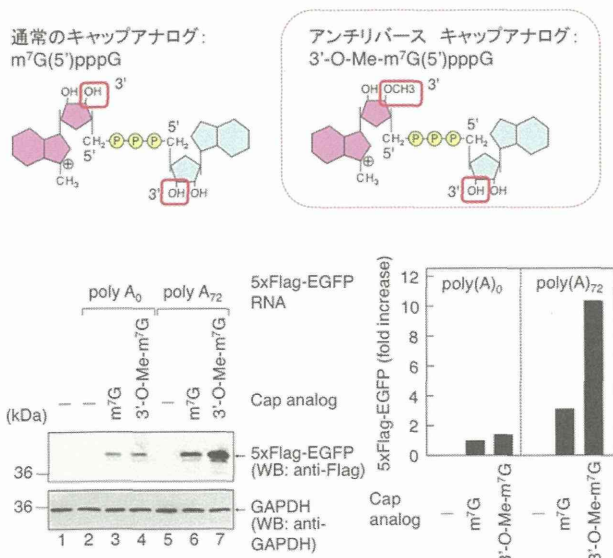


図5 アンチリバーシキャップアナログは効率的な発現に有用

4. トランスフェクションした RNA の細胞内動態

通常 200 塩基程度のポリ A 鎖が転写と共に役して付加される。まず第一段階としてポリ A 分解酵素 Pan2 により約 100 塩基程度まで、第二段階としてポリ A 分解酵素 Caf1 によりポリ A 鎖は完全に分解される。このポリ A 短縮化は mRNA 分解における律速段階であり、翻訳と共に役しておこることを我々のグループでは明らかにしている。トランスフェクションした RNA の分解過程を解析したところ、ポリ A 鎖の短縮化は観察されず、また通常より急速に分解されることが明らかとなった。トランスフェクションした RNA は、転写を経て産生された mRNA とはことなる細胞内動態をたどると推定される。

5. 環状 RNA の作製

前項で示したように、mRNA 環状化は翻訳効率上昇と mRNA 安定化に寄与する。トランスフェクションする RNA を環状型とすることで、細胞内に安定して RNA が保持され、かつ高い発現量を得ることが期待できる。そこで in vitro での環状 RNA の作製を試みた。T7 ポリメラーゼにより合成した RNA をピロフォスファターゼにより脱リン酸化し、相補的オリゴを用い 5' と 3' 末端を近接化させ、T4RNA リガーゼにより連結した (図 6 右側)。しかしながら、この環状化の効率は現状としては 10~20%程度と低く、相補的オリゴおよびリガーゼ反応の最適化が必要である (図 6 左側)。

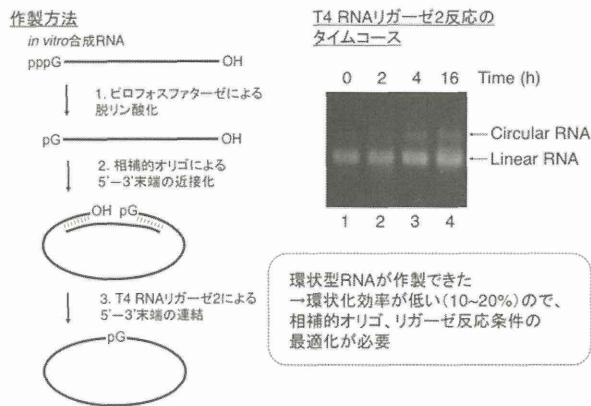


図6 環状型RNAの作製

D. 考察

RNAトランスフェクションは、プラスミドとは異なり転写を経ないため、その発現が細胞周期に依存しない。その結果、トランスフェクション直後からタンパク発現が開始するため、細胞集団全体において均一にタンパク質が発現すると考えられる。RNAを用いることにより安定した治療効果が期待できる。その一方、トランスフェクションしたRNAは、ポリA鎖の短縮化は観察されずまた通常より急速に分解されることから、内在性のmRNAとは異なる細胞内動態をとることが示唆された。RNAを用いた治療では、予期せぬ副反応が引き起こされる可能性があることを念頭におくと同時に、トランスフェクション方法のさらなる改良が必要である。環状RNA作製においては、高収量が達成できる作製方法の開発が望まれる。

E. 結論

RNAトランスフェクションでは、内在性のmRNAとは異なる細胞内動態をとるが、プラスミドによる発現導入と異なり細胞集団全体に均一に導入できること、翻訳の効率化には、3'末端に30塩基以上のポリA鎖と5'末端にアンチリバーシキャップアナログを付

加したRNA構造が最適であるという有用な知見が得られた。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

核内 HBV ゲノムとホストゲノム解析

研究分担者：杉山真也 国立国際医療研究センター研究所
肝炎・免疫研究センター 肝疾患研究部

研究要旨：B 型肝炎患者の肝臓内に存在する cccDNA とインテグレーションされたウイルスゲノムに対して、人工キメラ遺伝子 (ZFN, TALEN) を作用させることで切断と不活を行う。そのために、ZFN もしくは TALEN を評価するための哺乳細胞系を樹立した。それらを用いて HBV ゲノムの切断活性を検証したところ、既に酵母で見られた結果と同様に、約 60-80% の切断活性を確認した。

続いて、人工キメラ遺伝子蛋白質を発現する系の構築を行った。大腸菌で発現条件の検討を進めたところ、その大半が不溶性画分への蓄積を示した。そこで、タグの付加による改善を目的として、Protein S をタンデム結合したところ、一部の人工キメラ遺伝子が可溶性画分への移行を示した。

実際に臨床応用することを想定して、手術切除片を用いて HBVDNA 定量を実施することで、臨床検体中の cccDNA 量が臨床像に依ってどういった変化を示すか検証した。その結果、ウイルス量と相関する傾向を認め、cccDNA 量は約 0.04 コピー/cell であることが明らかとなった。特に、核酸アナログ製剤治療後や HBe 抗原陰性化後には最大で約 3log 程度低下していることが分かった。

A. 研究目的

本研究では、B 型肝炎患者の肝細胞核内に存在する B 型肝炎ウイルスのゲノムを不活化するために、配列特異的な人工キメラ遺伝子を合成し、その特異的な切断反応を利用して HBV ゲノムを不活化する。

人工キメラ遺伝子 (ZFN, TALEN) の合成を担当する分担研究者らから材料を得て、その特異的な活性を哺乳細胞中で観察する実験系を確立することを目的とした。また、投与方法や投与する分子の形態 (DNA, RNA, 蛋白) を検討するために、条件検討を行った。特に最適化が必要な蛋白発現系の確立を優先して行った。

さらに、臨床検体において肝細胞中の HBV ゲノム量が臨床像と沿ってどのように変化するか検討するために外科的切除された肝組織を用いて cccDNA の定量を実施した。

B. 研究方法

(1) HBV を恒常的に発現する細胞株を取得するために、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ複製可能な HBV コンストラクトを作成し、肝細胞株である HuH7 細胞にトランスフェクションした。その後、ハイグロマイシン処理をすることで細胞を選択した。8つの細胞のクローニングし、人工キメラ遺伝子をトランスフェクションした。Cel-I アッセイと PCR で評価法の比較を行った。それらで人工キメラ遺伝子の切断活性を比較し、反応性の良い細胞を選択した。

(2) 人工キメラ遺伝子の蛋白発現系を確立するために、大腸菌での発現を検討した。Protein S タグ、His タグ、GST タグを付加した発現ベクターを構築した。

(3) B 型肝炎患者の手術切除片を用いて、ゲノム DNA の抽出を行った。cccDNA 特異

的なりアルタイム PCR 法を用いて肝臓細胞あたりの cccDNA 量を定量した。

C. 研究結果

(1) 構築した ZFN での HBVDNA 切断活性について哺乳細胞株を用いて、その中の cccDNA に対する切断活性を検証した。その結果、60-80%前後の切断活性を確認した。Cel-I アッセイでは十分な評価が困難であり、特異的なプライマーを用いた増幅効率の比較で簡便に評価できた。

(2) ZFN 蛋白質を大腸菌で発現条件の検討を進めた。低温での蛋白発現系を利用した。その結果、不溶性画分への蓄積が顕著であり、発現遺伝子の改善が必要であった。そこで、His タグ、GST タグ、Protein S を試したところ、Protein S をタンデム結合した誘導蛋白として発現させたところ、一部の ZFN では可溶性画分への目的蛋白の移行を認めた。

(3) 手術切除片を用いて臨床検体中の HBVDNA 量の定量を行った。全 HBVDNA 量は肝臓の腫瘍部と非腫瘍部で約 1 コピー/細胞であったが、cccDNA 量を検討したところ、約 0.04 コピー/細胞であった。

HBe 抗原が陰性化すると cccDNA は約 3log 程度低下することが明らかとなった。また、核酸アナログ製剤治療によっても 1-2.5log/細胞の低下が認められた。

D. 考察

哺乳細胞中での人工キメラ遺伝子のアッセイ系を樹立した。それにより、哺乳細胞ゲノムへの影響を今後評価できると考えられる。

また、人工キメラ遺伝子の蛋白発現系を検討したところ、大腸菌では不溶性画分への蓄積が主であり、宿主を変えるなどの最適化が必要と考えられた。

組織中の cccDNA 量は患者のウイルス量と相関する傾向にあり、この人工キメラ遺伝子の投与を行う場合には、既存の治療が終了した後や HBe 抗原が陰性化した段階で実施することが望ましいと考えられた。

E. 結論

人工キメラ遺伝子の評価系を確立し、治療に応用する際の臨床的なステータスについての情報を得られた。

F. 研究発表 (本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol.* 2012 Dec 18.
- 2) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Jan 15;23(2):503-6.
- 3) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for

HBV-induced hepatocellular carcinoma.

PLoS One. 2012;7(9):e44743.

- 4) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One. 2012;7(6):e39175.
- 5) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 2012 Jun 19;13:47.

2. 学会発表

- 「宿主・ウイルスゲノム解析による C 型肝炎の病態解明にむけて“Host and viral genome analyses on hepatitis C”」杉山真也
ワークショップ B1 国立遺伝学研究所
研究会 NIG Workshop 国立遺伝学研究所
三島 2012 年 3 月 12 日

- 「IL28B 特異的測定系の開発と臨床的意義の検討」杉山真也, 村田一素, 溝上雅史 シンポジウム S1-1 第 77 階日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 神戸商工会議所 神戸 2012 年 6 月 21 日

- 「C 型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用」杉山真也, 平峯智, 西田奈央, 伊藤清顕, 村田一素, 正木尚彦, 井戸章雄, 坪内博仁, 溝上雅史 ワークショップ WS25-3 第 48 回日本肝臓学会総会 ポルテ金沢 金沢 2012 年 6 月 7 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
西山伸宏、 片岡一則	診断-治療一体型 DDS 技術に基づく 新しい抗がん 医療	浦野泰照	実験医学 2012 年増刊号「疾 患克服を目指 した最新ケミ カルバイオロ ジー」	羊土社	東京	2012	128-134
F. Pittella, 片岡一則	Polymeric Micelles for siRNA Delivery	Howard, Kenneth A.	RNA Interference from Biology to Therapeutics (Advances in Delivery Science and Technology)	Springer		2012	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, and Mizokami M.	Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey.	Microbiol Immunol.	in press		2012
Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K.	Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma.	PLoS One.	7(9)	e44743	2012

Nishida N, Sawai H, Matsuura K, <u>Sugiyama M</u> , Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, <u>Mizokami M</u> .	Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean.	PLoS One.	7(6)	e39175	2012
Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, <u>Mizokami M</u> , Hou J.	Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China.	PLoS One.	7(6)	e38241	2012
Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, <u>Mizokami M</u> .	Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt.	J Med Virol.	84(4)	587-95	2012

Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, <u>Sugiyama M</u> , Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, <u>Mizokami M</u> , Tokunaga K.	No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.	BMC Med Genet.	13	47	2012
内田智士, 位高啓史, Q. Chen, 長田健介, 石井武彦, 柴田雅朗, 斯波真理子, 片岡一則	PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses	Molecular Therapy	20(6)	1196-1203	2012
Q. Chen, 長田健介, 石井武彦, 大庭誠, 内田智士, T. A. Tockary, 遠藤泰輔, Z. Ge, 喜納宏昭, 狩野光伸, 位高啓史, <u>片岡一則</u>	Homo-cationer integration into PEGylated polyplex micelle from block-cationer for systemic antiangiogenic gene therapy for fibrotic pancreatic tumors	Biomaterials	33(18)	4722-4730	2012

R. J. Christie, 松本有, 宮田完二郎, 野本貴大, 福島重人, 長田健介, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, 西山伸宏, 片岡一則	Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection	ACS Nano	6(6)	5174-5189	2012
熊谷康顕, 下田真也, 若林里衣, Y. Kunisawa, 石井武彦, 長田健介, 位高啓史, 西山伸宏, 片岡一則, 中野賢二	Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination	Journal of Controlled Release	160(3)	542-551	2012
F. Pittella, 宮田完二郎, 前田芳周, 須磨知也, 渡邊秀美代, Q. Chen, R. J. Christie, 長田健介, 西山伸宏, 片岡一則	Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-convertional polymer hybrid nanoparticles	Journal of Controlled Release	161(3)	868-874	2012
須磨知也, 宮田完二郎, 安楽泰孝, 渡邊秀美代, R. J. Christie, 武元弘泰, 塩山桃子, N. Gouda, 石井武彦, 西山伸宏, 片岡一則	Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG	ACS Nano	6 (8)	6693-6705	2012
内藤瑞, 石井武彦, 松元亮, 宮田完二郎, 宮原裕二, 片岡一則	A phenylboronate-functionalized polyion complex micelle for ATPTriggered release of siRNA	Angewandte Chemie	51 (43)	10751-10755	2012
三條舞, 宮田完二郎, R. J. Christie, 石井武彦, 前田芳周, F. Pittella, 比木茂寛, 西山伸宏, 片岡一則	Dual environment-responsive polyplex carriers for enhanced intracellular delivery of plasmid DNA	Biomacromolecules	13 (11)	3641-3649	2012

遠藤泰輔, 位高啓史, 塩山桃子, 内田智士, 片岡一則	Gene transfection to spheroid culture system on micropatterned culture plate by polyplex nanomicelle: a novel platform of genetically-modified cell transplantation	Drug Delivery and Translational Research	2 (5)	398-405	2012
内田智士, 位高啓史, 内田寛邦, 早川謙太郎, 緒方徹, 石井武彦, 福島重人, 長田健介, 片岡一則	In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle	PLoS ONE	8(2)	e56220	2013
Shimada M, <u>Nakanishi M.</u>	Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases?	Front Oncol..			2013
Liu N, Matsumoto M, Kitagawa K, Kotake Y, Suzuki S, Shirasawa S, Nakayama KI, <u>Nakanishi M,</u> Niida H, Kitagawa M.	Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling.	EMBO J.	31(10)	2365-77	2012
Sato S, Takahashi S, Asamoto M, <u>Nakanishi M,</u> Wakita T, Ogura Y, Yatabe Y, Shirai T.	Histone H1 expression in human prostate cancer tissues and cell lines.	Pathol Int.	62(2)	84-92	2012
Delhase M, Kim SY, Lee H, Naiki-Ito A, Chen Y, Ahn ER, Murata K, Kim SJ, Lautsch N, Kobayashi KS, Shirai T, Karin M, <u>Nakanishi M.</u>	TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2.	Proc Natl Acad Sci U S A.	109(4)	E177-86	2012

<u>Taketomi A</u> , Takeishi K, Mano Y, Toshima T, Motomura T, Aishima S, Uchiyama H, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y.	Total resection of the right hepatic vein drainage area with the aid of three-dimensional computed tomography.	Surg Today	42(1)	46-51	2012
Motomura T, Koga E, <u>Taketomi A</u> , Fukuhara T, Mano Y, Muto J, Konishi H, Toshima T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y.	Efficacy of splenectomy in preventing anemia in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation is not dependent on inosine triphosphate pyrophosphatase genotype.	Hepatol Res.	42(3)	288-95	2012
Yoshizumi T, Shirabe K, <u>Taketomi A</u> , Uchiyama H, Harada N, Ijichi H, Yoshimatsu M, Ikegami T, Soejima Y, Maehara Y.	Risk factors that increase mortality after living donor liver transplantation.	Transplantati on.	93(1)	93-8	2012
<u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Toshima T, Morita K, Hashimoto N, Kayashima H, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y.	The long-term outcomes of patients with hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation: a comparison of right and left lobe grafts.	Surg Today	42(6)	559-64	2012
Harada N, Shirabe K, Ijichi H, Matono R, Yoshizumi T, <u>Taketomi A</u> , Soejima Y, Maehara Y.	Acoustic radiation force impulse imaging predicts postoperative ascites resulting from curative hepatic resection for hepatocellular carcinoma.	Surgery	151(6)	837-43	2012

Matono R, Yoshiya S, Motomura T, Toshima T, Kayashima H, Masuda T, Yoshizumi T, <u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Maehara Y.	Factors linked to longterm survival of patients with hepatocellular carcinoma accompanied by tumour thrombus in the major portal vein after surgical resection.	HPB (Oxford)	14(4)	247-53	2012
Takeishi K, <u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F, Maehara Y	Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway.	J Hepatol.	57(1)	77-83	2012
Toshima T, <u>Taketomi A</u> , Ikegami T, Fukuhara T, Kayashima H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y.	V5-drainage-preserved right lobe grafts improve graft congestion for living donor liver transplantation.	Transplantation.	93(9)	929-35.	2012
Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Kakisaka T, Tsuruga Y, Todo S, <u>Taketomi A</u> .	Analysis of the risk factors for early death due to disease recurrence or progression within 1 year after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma.	World J Surg Oncol	10	107	2012

Ijichi H, Shirabe K, <u>Taketomi A</u> , Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y.	Clinical usefulness of (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma.	Hepatol Res.			2012
Matsumoto A, <u>Tanaka E</u> , Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsunashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H	Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res	42	139-149	2012
Matsumoto A, <u>Tanaka E</u> , Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S:	Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection.	J Gastroenterol	47	1006-1013	2012
<u>Tanaka E</u> , Urata Y	Risk of hepatitis B reactivation in patients treated with tumor necrosis factor-alpha inhibitors.	Hepatol Res	42	333-339	2012

Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, N., <u>Hoshino, S.</u>	Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB.	Oncogene	in press		2013
Ogami, K., Cho, R., <u>Hoshino, S.</u>	Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the non-canonical poly(A) polymerase PAPD7.	Biochem Biophys Res Commun.	in press		2013
<u>Hoshino, S.</u>	Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins.	Wiley Interdiscip Rev RNA	3	743-757	2012
Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, ES., <u>Hoshino, S.</u>	Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis.	Apoptosis	17	1287-1299	2012
Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., <u>Hoshino, S.</u> , Shimada, I.	Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay.	RNA	18	1957-1967	2012
Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, <u>Sugiyama M.</u> Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK.	2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action.	Bioorg Med Chem Lett.	23(2)	503-6	2013