

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

2012年論文を抜粋いたします

研究代表者

- (1) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother*. 2012 Jul 4.

政策提言数

「日常生活の場でウイルス肝炎の伝播を防止するためのガイドライン」(作成中)

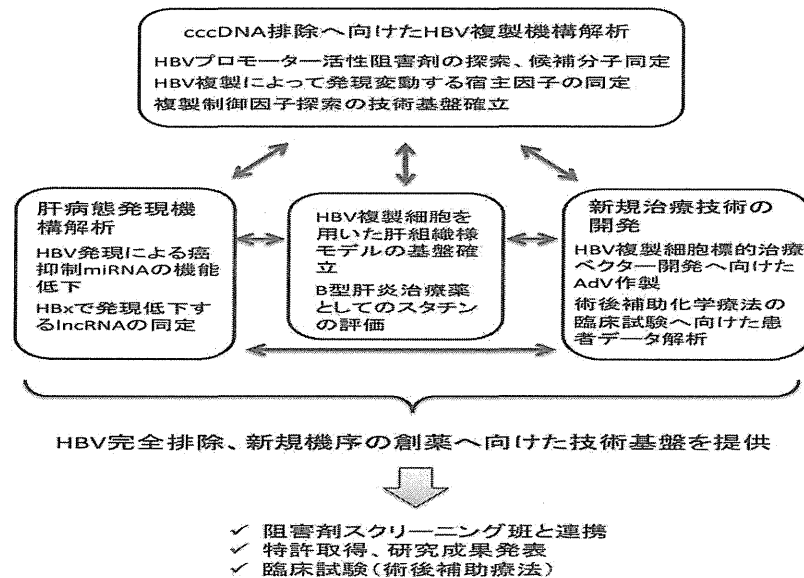
(2)

研究分担者

1. Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2012 Aug 17. doi: 10.1002/hep.26011.
2. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect*. (in press)
3. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7: e48635, 2012
4. Pei Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito I. Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to vector titration. *BBRC* 417: 945-950 (2012).
5. Egawa K, Kitagawa K, Inoue K, Takayama M, Takayama C, Saitoh S, Kishino T, Kitagawa M, Fukuda A. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med*: in press.
6. Ishizawa T, Gumbs AA, Kokudo N, Gayet B. Laparoscopic Segmentectomy of the Liver: From Segment I to VIII. *Ann Surg*. 2012 Dec;256(6):959-64.
7. Ryu Je-Young, A. Siswanto, K. Harimoto, and Y. Tagawa*, Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreatic acini, *Transgenic Res*, in press.
8. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2012 Dec 5. doi: 10.1002/hep.26182
9. 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.

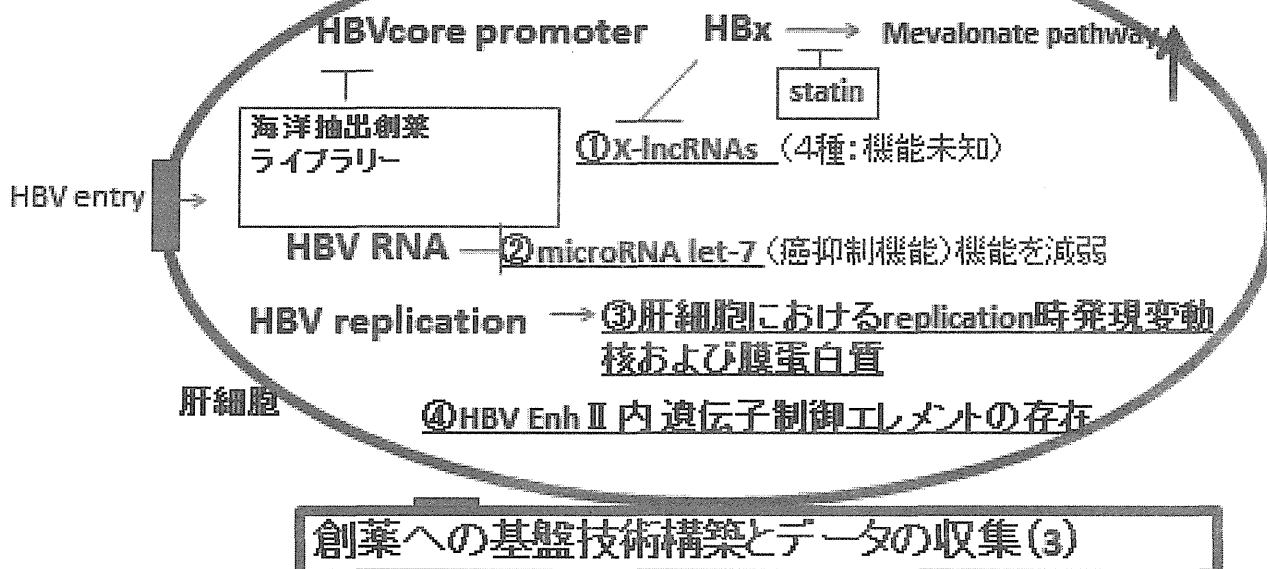
Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

○研究開始時概要



○本年度成果

- 1) 今回得られた薬剤候補物質 創薬へ向けて今回構築された技術;データ
- ① statin
 - ② 海洋抽出ライブラリー
 - ③ H₂O₂細胞から成熟化肝細胞への誘導培養系
 - ④ 核内各HBVDNAフォームを含む密度分画分離技術
 - ⑤ HBV新検出系
- 2) 創薬の薬理作用標的候補
- ① X-lncRNAs
 - ② microRNA let-7
 - ③ HBV複製時発現変動肝細胞核および膜蛋白質
 - ④ HBV Enh2 遺伝子制御エレメント
 - ⑥ HBV複製肝細胞、内皮細胞、星細胞性ネットワーク構造形成
 - ⑦ 肝細胞癌切除症例682例の子後(1997-2011)の解析



HBV 増殖および抑制効果を期待できる薬剤について短時間に検討するとともに、HBV 複製機構の基礎的データを集積し、創薬薬理作用標的を決定し早期創薬をはかる。

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・ 過去に所属した研究機関の履歴

平成4年6月 東京大学医学部附属病院第一内科 医員 (主な共同研究者 小池和彦)
B型肝炎に関する臨床研究、HBV トランスジェニックマウスを用いた研究に従事。
平成7年8月 東京大学医学部附属病院第一内科 文部教官助手 (同上)
平成8年3月 東京大学医学部附属病院第一内科 医員 (同上)
C型肝炎に関する研究、特にHCVと肝発癌に関する研究に従事。分子生物学、電子顕微鏡、薬理学等の技術を用いて解析を行った。
平成11年11月 東京大学消化器内科 助手 (同上)
平成12年10月 東京大学医学部附属病院分院検査部 講師 (同上)
平成13年10月 東京大学医学部附属病院臨床検査部 講師 (同上)
平成14年4月 東京大学医学部附属病院感染制御部 講師 (同上)
ウイルス肝炎に伴う酸化ストレス産生機序、肝臓における代謝異常に関する研究に従事。
平成21年11月 東京大医学部医学系大学院病因病理微生物 感染制御学講座 教授 (同上)
肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用物質の探索を主にC型肝炎について行った。

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

小池和彦

・ 主な研究課題

平成20年度	基盤研究C 代表	C型肝炎ウイルス感染におけるミトコンドリア機能異常の機序の解明 代表	文部科学省
平成20年度	肝炎等克服緊急対策研究事業	肝炎ウイルスの肝外病変の基礎的および臨床的包括研究	厚生労働省
平成20年度	特定領域研究「発がん」	C型肝炎ウイルスによる肝発癌機序の解明 細胞内標的の探索と治療法の開発	文部科学省
平成21年	肝炎等克服緊急対策研究事業	肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究」	厚生労働省
平成22年度	基盤研究 (C)	肝臓からのコレステロール排泄機構の解明	文部科学省
平成24年度	基盤研究 (B)	C型肝炎におけるウイルスと炎症による肝発癌スパイラルの miRNA 解析による解明	文部科学省
平成24年度	厚労科研費(H24-肝炎一般-006)	C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究	厚生労働省

平成20年以前は別記

・ これまでの研究実績

受賞歴

平成11年 ウイルス肝炎財団肝炎研究奨励賞

平成18年 肝臓フォーラム(東部)奨励賞

研究実績

研究原著論文数 英文 78編 (Nature Medicine1998 1編, PNAS 3編, Cancer Res 1編J.C.I2編)

Gastroenterology 2編, Lancet 1編) HBVに関する主なもの14編 J.C.I 1994 Hepatology2編1994、1998 Gastroenterology2001

<森屋>

1. Koyano S, Saito R, Nagai R, Tastuno K, Okugawa S, Okamura N, Moriya K. Molecular characterization of carbapenemase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae in a teaching hospital, Japan. *J Med Microbiol*. 2012 Nov 15
2. Nukui Y, Hatakeyama S, Kitazawa T, Mahira T, Shintani Y, Moriya K. Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among Japanese healthcare workers: seroprevalence and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012 Jan;33(1):58-62.
3. Goto K, Hatakeyama S, Okamoto K, Kitazawa T, Abe K, Moriya K, Koike K, Yotsuyanagi H. Dengue hemorrhagic fever in an adult traveler returning to Japan. *Intern Med*. 2012;51(13):1779-82.
4. Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother*. 2012 Jul 4.
5. Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology*. 2011;81 Suppl 1:11-7.
6. Nagai R, Saito R, Koyano S, Okamura N, Yokota H, Kitazawa T, Moriya K. Evaluation of multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide for the detection of vanA and vanB in vancomycin-resistant enterococci. *Clin Chem Lab Med*. 2011 Apr;49(4):751-2.
7. Kurano M, Iso-O N, Hara M, Ishizaka N, Moriya K, Koike K, Tsukamoto K. LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. Kurano M, *Lipids Health Dis*. 2011 Aug 5;10:134.
8. Koshiyama A, Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Yazawa I, Imai K. Liquid chromatographic separation of proteins derivatized with a fluorogenic reagent at cysteinyl residues on a non-porous column for differential proteomics analysis. *J Chromatogr A*. 2011 Jun 3;1218(22):3447-52. Epub 2011 Apr 4.
9. Saito R, Koyano S, Nagai R, Okamura N, Moriya K, Koike K. Evaluation of a chromogenic agar medium for the detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2010 Dec;51(6):704-6.
10. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol*. 2011 Mar;54(3):432-8.
11. Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection. *Oncology*. 2010 Jul;78 Suppl 1:24-30.

12. Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. *J Med Virol*. 2010 May;82(5):776-92.
13. Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res*. 2010 Jan;40(1):69-82.
14. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol*. 2009 Oct;175(4):1515-24.
15. Saito R, Uetera Y, Saito Y, Okamura N, Moriya K, Koike K. Evaluation of the efficacy of a low temperature steam and formaldehyde steriliser by using biological indicators. *J Hosp Infect*. 2009 Oct;73(2):179-80.
16. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology*. 2009 Aug;50(2):378-86.
17. Ode T, Saito R, Kumita W, Sato K, Okugawa S, Moriya K, Koike K, Okamura N. Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Oct;34(4):347-50.
18. Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatol Res*. 2009 Jul;39(7):657-63.
19. Kumita W, Saito R, Sato K, Ode T, Moriya K, Koike K, Chida T, Okamura N. Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas putida*. *J Infect Chemother*. 2009 Feb;15(1):6-12.
20. Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr*. 2009 May;23(5):480-7.
21. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after living donor liver transplantation: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2008 Nov 11;8:155.

22. Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular basis for the synergy between alcohol and hepatitis C virus in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Mar;23 Suppl 1:S87-91.
23. Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):683-94.
24. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Impact of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage postoperatively after living donor liver transplantation. *Transplant Proc*. 2007 Dec;39(10):3271-5.
25. Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of hepatitis B virus infection in Japanese patients with HIV. *Hepatol Res*. 2008 Mar;38(3):310-4.
26. Saito R, Okugawa S, Kumita W, Sato K, Chida T, Okamura N, Moriya K, Koike K. Clinical epidemiology of ciprofloxacin-resistant Proteus mirabilis isolated from urine samples of hospitalised patients. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Dec;13(12):1204-6.
27. Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*. 2008 Jan 1;122(1):124-31.
28. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis*. 2008 Apr;10(2):110-6.
29. Misawa Y, Yoshida A, Saito R, Yoshida H, Okuzumi K, Ito N, Okada M, Moriya K, Koike K. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in blood cultures. *J Infect Chemother*. 2007 Jun;13(3):134-40.
30. Aono J, Yotsuyanagi H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Iino S, Koike K. Amino acid substitutions in the S region of hepatitis B virus in sera from patients with acute hepatitis. *Hepatol Res*. 2007 Sep;37(9):731-9.
31. Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. A proteomics method revealing disease-related proteins in livers of hepatitis-infected mouse model. *J Proteome Res*. 2007 Jul;6(7):2841-9.

32. Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: a case report. *World J Gastroenterol*. 2007 Feb 14;13(6):964-9.
33. Koike K, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in Japan. *Hepatol Res*. 2007 Jan;37(1):2-5.
34. Saito R, Kumita W, Sato K, Chida T, Okamura N, Moriya K, Koike K. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance associated with qnrA in an Escherichia coli clinical isolate producing CTX-M-9 beta-lactamase in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 May;29(5):600-2.
35. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 30;104(5):1661-6. Epub 2007 Jan 18.
36. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 2007 Feb;81(4):1727-35.
37. Saito R, Sato K, Kumita W, Inami N, Nishiyama H, Okamura N, Moriya K, Koike K. Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Sep;58(3):673-7.
38. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2005 Nov;54(Pt 11):1037-41.
39. Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol*. 2005 Nov;43(5):757-63. Epub 2005 May 31.
40. Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C viral infection: steatohepatitis resembling but distinct from NASH. *J Gastroenterol*. 2005 Apr;40(4):329-36. Review.
41. Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Apr;12(4):520-4.

42. Miyoshi H, Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2004 Jun;39(6):563-9.
43. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology*. 2004 Mar;126(3):840-8.
44. Hatakeyama S, Moriya K, Itoyama S, Nukui Y, Uchida M, Shintani Y, Morisawa Y, Kimura S. Prevalence of measles, rubella, mumps, and varicella antibodies among healthcare workers in Japan. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 Jul;25(7):591-4.
45. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology*. 2003 Oct;38(4):820-8.
46. Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y. Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10237-49.
47. Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Iino S, Kimura S, Koike K. Serum lipid profile of patients with genotype 1b hepatitis C viral infection in Japan. *Hepatol Res*. 2003 Apr;25(4):371-376.
48. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, Miyamura T. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology*. 2002 Dec 20;304(2):415-24.
49. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujimie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K, Norjiri N, Juji T, Hoshino H, Hino K. HBV DNA in serum of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion*. 2002 Dec;42(12):1616-7. No abstract available.
50. Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Apr;17(4):394-400. Review.
51. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology*. 2002 Apr;35(4):937-46.

52. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Kimura S, Iino S, Koike K. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion*. 2001 Sep;41(9):1093-9.
53. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4365-70.
54. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology*. 2001 May;120(6):1564-5.
55. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Frequent beta-catenin aberration in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2001 May 1;20(1):39-51.
56. Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K, Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C: analysis in transgenic mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Mar;281(5):1207-12.
57. Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. The significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma of patients with hepatitis C. *Cancer*. 2000 Jun 1;88(11):2478-86.
58. Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kato T, Nishioka K, Takayama T, Makuuchi M, Iino S, Kimura S, Koike K. Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: frequent involvement of hepatitis B virus. *J Infect Dis*. 2000 Jun;181(6):1920-8. Epub 2000 May 31.
59. Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol*. 1999 Dec;80 (Pt 12):3257-65.
60. Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Matsuura Y, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. *J Med Virol*. 1999 Oct;59(2):141-5.
61. Koike K, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S. Compensatory apoptosis in preneoplastic liver of a transgenic mouse model for viral hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 1998 Dec 25;134(2):181-6.

62. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1065-7.
63. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology*. 1998 May;27(5):1377-82.
64. Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K. Regulation of Fas gene expression in HeLa cells as determined by modified RT-PCR. *Cell Mol Life Sci*. 1998 Feb;54(2):186-90.
65. Maruyama T, Kuwata S, Koike K, Iino S, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Maekawa H, Yamada H, Shibata Y, Milich DR. Precore wild-type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion: no association between genome conversion and seroconversion. *Hepatology*. 1998 Jan;27(1):245-53.
64. Moriya K, Fujie H, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Tsutsumi T, Matsuura Y, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in the liver of transgenic mice. *Jpn J Med Sci Biol*. 1997 Aug-Oct;50(4-5):169-77.
66. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol*. 1997 Jul;78 (Pt 7):1527-31.
67. Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Matsuura Y, Miyamura T. Sialadenitis histologically resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 7;94(1):233-6.
68. Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Iino S. Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):10-3.
69. Moriya K, Matsukura M, Kurokawa K, Koike K. In vivo inhibition of hepatitis B virus gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 5;218(1):217-23.

70. Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Matsuura Y, Suzuki T, Saito I, Iino S, Kurokawa K, Miyamura T. Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J Gen Virol*. 1995 Dec;76 (Pt 12):3031-8.
71. Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Hino K, Kurokawa K, Iino S. Hepatitis C virus genotypes and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1995 Oct 15;76(8):1352-5.
72. Koike K, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Hino K, Kurokawa K, Iino S. Dominant replication of either virus in dual infection with hepatitis viruses B and C. *J Med Virol*. 1995 Feb;45(2):236-9.
73. Moriya K, Yasuda K, Koike K, Ichinose Y, Yotsuyanagi H, Kurokawa K, Iino S. Induction of interstitial pneumonitis during interferon treatment for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 1994 Aug;29(4):514-7.
74. Koike K, Moriya K, Yotsuyanagi H, Iino S, Kurokawa K. Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts. *J Clin Invest*. 1994 Jul;94(1):44-9.
75. Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology*. 1994 Apr;19(4):810-9.
76. Matsuhashi N, Nakagama H, Moriya K, Ohnishi S, Gunji T, Saito T, Sugano K, Imawari M, Takaku F, Minami M, et al. Multiple diffuse hemangiomas of the large intestine. *Gastroenterol Jpn*. 1991 Oct;26(5):654-60.
77. Chiba S, Miyagawa K, Tanaka T, Moriya K, Takahashi K, Hirai H, Takaku F. Tryptophan-associated eosinophilia-myalgia syndrome and pancreatitis. *Lancet*. 1990 Jul 14;336(8707):121.

1) C型肝炎ウイルスによる肝発癌機構の解明

特定領域研究 2006-2007 分担

2) HIV感染によるC型慢性肝炎進行促進機序の解明

萌芽研究 2005

3) 核内レセプターアンタゴニスト投与による肝癌予防と再発制御

基盤研究(C) 2003-2004 代表

4) 強発癌性B型肝炎ウイルスの同定

萌芽的研究→萌芽研究 2001-2002

5) HBV 持続感染におけるホスト側因子と病態との検討

基盤研究(C) 2001-2002

6) C型肝炎ウイルス関連肝発癌において炎症とウイルス蛋白のそれぞれが果たす役割の解明 基盤研究(B)

2001-2002

7) C型肝炎ウイルスによる肝発癌機構の解明

特定領域研究(C)→特定領域研究 2001-2004

8) プロテイン・トランスダクションによるC型肝炎治療法の開発

基盤研究(B) 2000-2001

9) 肝発癌におけるHBVとHCVの共同作用のトランスジェニックマウスを用いた検討

基盤研究(C) 2000-2001 代表

10) 肝発癌制御ワクチンの開発

萌芽的研究 1999-2000

11) 慢性肝炎における肝脂肪化発症の機序とその肝発癌における役割の解明-核内レセプター活性化による癌化機構 基盤研究(B) 1999-2000 分担

12) トランスジェニックマウスを用いたC型肝炎ウイルスによる肝発癌機構の解明

特定領域研究(A) 1998

13) バキュロウイルスを用いたサイトカイン遺伝子導入によるウイルス肝炎治療法の開発

基盤研究(B) 1998-1999

14) C型肝炎におけるシェーグレン症候群発症機序のトランスジェニックマウスを用いた解明

基盤研究(C) 1997-1998

15) トランスジェニックマウスを用いたC型肝炎ウイルスによる肝発癌機構の解明

重点領域研究 1997

16) 発癌におけるC型肝炎コア蛋白の遺伝子発現修飾作用とその細胞内結合蛋白の同定

基盤研究(C) 1996

17) B型肝炎ウイルスX蛋白の癌化・アポトーシス作用とp53蛋白との関連の解明

基盤研究(C) 1996

18) C型肝炎ウイルス トランスジェニックマウスを用いた肝炎治療法・ワクチンの開発

基盤研究(A) 1996-1997

19) トランスジェニックマウスを用いた C 型肝炎ウイルスによる肝発癌・肝炎発症機構の解明 一般研究(C) 1994-1995

20) B型肝炎肝発癌モデルを用いたアンチセンスオリゴヌクレオテドによる遺伝子治療

重点領域研究 1995

21) C型肝炎ウイルスコア蛋白の細胞同期進行中の細胞内局在の変化とその肝発癌への関与 一般研究(C) 1994

22) B型肝炎ウイルス X 遺伝子の肝発癌における細胞周期促進とアポトーシス誘発作用の解析 一般研究(C)

1993

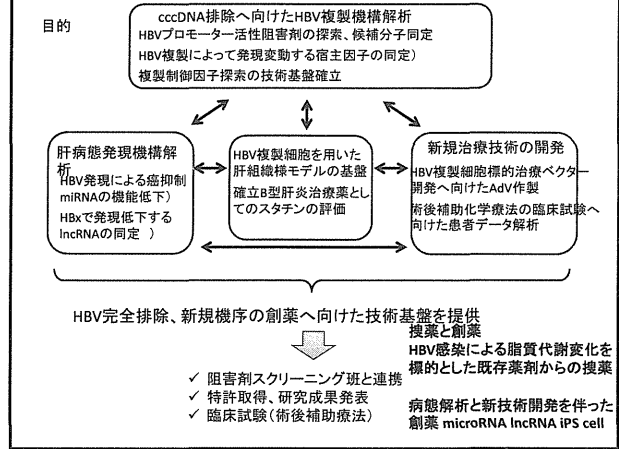
23) トランスジェニックマウスを用いた B型肝炎ウイルス X 遺伝子による肝発癌機構の解析

がん特別研究 1993

B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究代表者: 森屋恭爾 (東京大学 医学部附属病院)

- 斎藤 泉 (東京大学 医科学研究所)
- 小池和彦 (東京大学 医学部附属病院)
- 國土典宏 (東京大学 医学研究科外科学)
- 鈴木哲朗 (浜松医科大学 医学部感染症学)
- 北川雅敏 (浜松医科大学 医学部分子生物学)
- 朝比奈浩浩 (東京医科歯科大学 分子肝炎制御学)
- 森石恒司 (山梨大学医学工学研究部微生物学)
- 田川陽一 (東京工業大学 生命理工学研究科)
- 福原宗介 (大阪大学 微生物病研究所)



Statin等既存HBV阻害剤の検討 森屋
HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature 1991

H24研究成果: HBx遺伝子発現transgenic mouse
肝臓においてMevalonate pathwayを含めた複数の脂質関連代謝経路変化をpathway解析において見出した
Statin耐用試験Chimera mouseで終了

今年度以降
statinはHBV発癌抑制効果が期待できる
StatinによるHBx遺伝子発現transgenic mouse
発癌抑制検討とともに
ヒト肝臓組織での
mevalonate pathway解析を目指す

1) Statin Use and Reduced Cancer-Related Mortality
Nielsen S.F., Nordestgaard B.G., Bojesen S.E.
N Engl J Med 2012; November 8, 367:1792-1802

2) Statins and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. Tsan YT, Lee CH, Wang JD, Chen PC.
J Clin Oncol. 2012

3) The mevalonate pathway regulates microRNA activity in Caenorhabditis elegans. Shi Z, Ruvkun G
Proc Natl Acad Sci USA. 2012

Group	No. at Risk	Statins + HBV	Statins - HBV	HBV + Statins	HBV - Statins
0	4118	2142	2022	2056	2062
2	3610	1920	1690	1640	1670
4	3110	1770	1470	1420	1440
6	2610	1570	1270	1220	1240
8	2110	1370	1070	1020	1040
10	1610	1170	870	820	840

HBVによる宿主miRNA (let-7g) 機能の減弱 小池
—レポーターアッセイによる検証

let-7g reporter

CMV promoter → Firefly luciferase → 3' 非翻訳領域 (microRNAに相補的な配列) → poly A

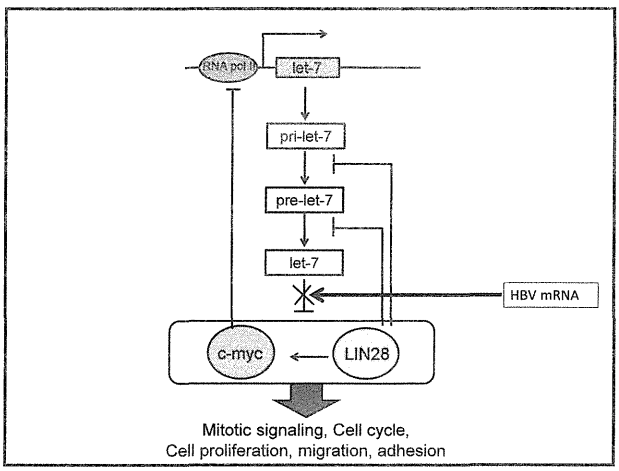
抑制

microRNA

相補的配列

Relative reporter activity

HBV-RNA存在下においてlet-7の機能が減弱する



長鎖ノンコーディングRNAを標的とした肝がん機構の解明 北川雅敏 (浜松医大)

研究目標: 本研究ではHBV X protein (HBx)により発現が撹乱される長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)を同定、機能解析し、未だに未知である肝がんや再活性化機構を解明し、診断/治療薬の創成を目指す。

H24年度研究成果: Hu7細胞において、HBxの発現により発現変動する lncRNAをマイクロアレイで解析し、RT-PCRで確認したところ、有意に発現低下が見られる4種の機能未知のlncRNA (Xd-lncRNA1-4)を見出した(図1)。

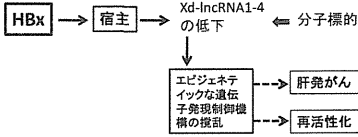
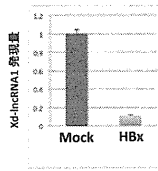


図1. HBxによるXd-lncRNA1の発現低下



今後の計画: Xd-lncRNA1-4はがん抑制能や再活性化抑制に関与する可能性が高い。よって、今後はHBV複製細胞系および患者サンプルを用いて発現の解析を行なう。さらにXd-lncRNA1-4のノックダウンによる形質転換への影響を解析し、機能/発現制御機構を明らかにし、Xd-lncRNAを分子標的とした診断/治療薬の創成に繋げる。

方法と対象 園土典宏 肝細胞癌切除後の予後とHBcAb

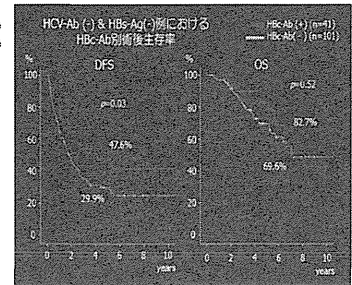
1997年から2011年に肝切除を行った肝細胞癌患者 1486症例

初発 肝細胞癌 (肝内胆管癌を除く) → 682例
Ablationなどの再発療法を術前に行っていない

肝切除症例データベースを作成
生存率への寄与因子の解析を行った

肝がんウイルス marker別の術後全生存期間、無再発生存期間を比較

- ✓ HCV(+ vs. HBV(+ vs. nBnC
- ✓ HBc-Ab(+ vs (-)
- ✓ HCV(+ 症例におけるHBc-Ab(+ vs (-)
- ✓ HBV(+ 症例におけるHBc-Ab(+ vs (-)
- ✓ nBnC症例におけるHBc-Ab(+ vs (-)
- ✓ HBV(+ vs nBnC & HBc-Ab (+)



HBVコアプロモーターを制御する化合物探索と 感染による変動分子の探索 森石

レポーター細胞

Core プロモーター エンハンサー

ルシフェラーゼ

化合物ライブラリ (高活性抽出物など)

能力 殖芽大 田中環一先生

HBV

HepG2

HepG2.2.15 (感染)

Probe electrospray ionization質量分析法(ESI-MS)

協力 山梨大学医学部 有田周先生

非侵襲的に、高感度に、迅速に、脂質成分などのMS解析が可能

HepG2と HepG2.2.15の構成脂質の比較

PC TAG

HepG2

HepG2.2.15

成果: 高純Liosino sp. 抽出物にHBVコアプロモーターを抑制する活性を同定

次年度以降: スクリーニングを継続し、抑制活性を指標に化合物を同定し、ウイルス増殖およびプロモーター上のヒストン制御などを解析

成果: 感染によってトリアシルグリセリド(TAG)画分が変化していた

次年度以降: TAG分子を同定し、発がんマーカー分子候補として検討

HBV感染に関連する宿主因子の同定 福原

SILAC

HepG2 cells grown in Light isotope-containing media

HepG2 2.15 cells grown in Heavy isotope-containing media

Harvest & Lyse cells

Purification of protein in nucleus or membrane fraction

nucleus

membrane

nucleus	membrane
2.15-G2 SERPINA3 GTF3C1 UTP20 ALDH1B1 RRP12 SLU11 DVK15 RBM28 TPR	2.15-G2 GORDL MAP4 CEB2 CKAP5 DFD1 APOB E2F1 HSPA4 AFP SLC1A5 ATP1B3 SUC2 EIF5B LSS GNAO1 TMEM43 GSR UBX1 DNAT1

MS

SILAC法を用いてHBV感染細胞の核および膜画分で発現が変動している宿主因子を探索

現在 Taqman arrayにて確認中。

HBV遺伝子型依存的な複製、遺伝子発現調節 鈴木

HBV遺伝子型Cは遺伝子型Aに比べ複製効率、コア/プレゲノム転写活性が高い

遺伝子型A, Cの違いはenhancer II/core promoterに起因するのではないか

遺伝子型A-base

遺伝子型C-base

遺伝子型CのEnhII/coreで上昇 (遺伝子型AのEnhII/coreで低下)

HBV Enh II 内 遺伝子制御エレメントの存在

Element	Type A	Type C
EnhI	~800	~1200
blk	~800	~1200
NRE	~800	~1200
EnhII	~1200	~800
core	~1200	~800

HBV複製細胞特異的に治療用プレリコンを導入する 非増殖型アデノウイルスベクターの開発 斎藤

Creリコンビナーゼ

HBVシールドゲノム

治療用遺伝子

HBV Pro

HBVプロモーター依存的Cre発現

感染細胞内のHBV

HBVポリメラーゼ

環状シールドゲノム複製増幅

治療用遺伝子

強毒用遺伝子

- 1) HBVの全遺伝子、Pol、Large S、Small S、PreCore、Core、X遺伝子を各々発現するアデノウイルスベクター(AdV)を作製した。
- 2) HBV複製機構検討に必要なmiRNAを念頭に、AdVのウイルス関連RNA(VA RNA)を欠失した新規ベクター作製法の開発に成功した(特許申請中) また各遺伝子に対するVA欠失AdVを作製した。
- 3) AdVの遺伝子発現を確認を目的とした、各々を独立して検出可能なqPCR用プライマーを作製し、ELISAの作成を開始した。
- 4) polの機能解析目的に、Polのアミノ酸を変えずにPreS1、PreS2とS遺伝子の開始コドン破壊したS非発現Polを作製した。

次年度: HBVゲノムのCoreや他領域をGFPなどと置換したHBVシールドゲノム作製用切り出し発現型AdVの作製を行い各々のHBV遺伝子発現AdVをトランスに供給してHBVシールドゲノムの複製効率を検討する。

肝組織様培養によるHBV増殖系の開発 田川

肝細胞構造を有した高肝機能肝臓モデル

H24成果 HBV持続感染株HuH HB AeおよびHBV-DNAをトランスフェクションしたヒト肝癌細胞株HuH7.5.1細胞を内皮細胞ネットワークに播種した肝組織を構築したHBV-DNA導入やHBV粒子感染における条件やアッセイ系を確立した

緑: PECAM1(+) 管腔構造を有した内皮細胞ネットワーク

赤: アルブミン(+) ヒトES細胞由来肝細胞

ヒトES細胞/iPS細胞 内皮細胞

分化誘導 マトリゲル上で培養

IVL^{hES}: human ES cell-derived *in vitro* Liver model
cccDNAの安定形成系および効率よい*in vitro* HBV感染・増殖系確立 最終目的

HBV増殖培養系におけるcccDNAレベルの解析 朝比奈

協力 東海大学 紙谷聡英先生 東京大学 中内啓光先生

Self renewal Hepatic progenitor cells

Active Proliferation Hepatic progenitor cells

HBV cccDNA ?

成果 ヒトiPS細胞から肝幹・前駆細胞への細胞分化度を調節できる培養系確立した HBx遺伝子を網羅的にアラニン置換した発現プラスミド・シリーズを構築

Cholangiocytes Mature hepatocytes

小葉構造維持のため細胞はTurn overしている

HBV cccDNA

分化度の異なる細胞種による、cccDNA保存の状態を解析する
宿主側の遺伝子発現動態の変化を網羅的に解析する

分化誘導を制御することによるcccDNAの抑制および分化度の異なる細胞を標的とした治療法の開発の基盤とする

1細胞からでもコロニーを形成

1) 今回得られた薬剤候補物質 3) 創薬へ向けて今回構築された技術、データ

① statin ①ヒトiPS細胞から成熟化肝細胞への誘導培養系
② 海洋抽出ライブラリー ②核内各HBV DNAアームを含む密度分離技術
③ HBV複製肝癌細胞、内皮細胞、星細胞株ネットワーク構造形成
④ HBV複製子adeno virus vector:新検出系
⑤ 肝細胞癌切除症例682例の予後(1997-2011)の解析
⑥ HBV感染によるTAG変化

2) 創薬の薬理作用標的候補

① X-IncRNAs
② microRNA let-7
③ HBV複製時発現変動肝細胞核および膜蛋白質
④ HBV Enh2 遺伝子制御エレメント

HBV entry

HBVcore promoter HBx → Mevalonate pathway

海洋抽出創薬ライブラリー

① X-IncRNAs (4種:機能未知)

② microRNA let-7 (癌抑制機能)機能を減弱

③ 肝細胞におけるreplication時発現変動核および膜蛋白質

④ HBV Enh II 内 遺伝子制御エレメントの存在

⑤ TAG 量変化

肝細胞

創薬への基盤技術構築とデータの収集(3)

発表No. 12

B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究代表者: 森屋恭爾 (東京大学 医学部附属病院)

齋藤 泉 (東京大学 医科学研究所) 特許申請中1件
小池和彦 (東京大学 医学部附属病院)
國土典宏 (東京大学 医学研究科外科学)
鈴木哲朗 (浜松医科大学 医学部感染症学)
北川雅敏 (浜松医科大学 医学部分子生物学)
朝比奈靖浩 (東京医科歯科大学 分子肝炎制御学)
森石恒司 (山梨大学医学工学研究部微生物学)
田川陽一 (東京工業大学 生命理工学研究科)
福原崇介 (大阪大学 微生物病研究所)

班員合計 論文数2012年100報以上ガイドライン担当2名特許申請中1件

工程表 研究代表者 森屋恭爾 平成24年度目標ほぼ達成

24 25 26 27 28 29~31(年度)

cccDNA排除へ向けたHBV複製機構解析 30%/100%

薬剤 screening 40%/100%

肝癌発現機構解析 30%/100%

HBV増殖モデルの開発 30%/100%

治療技術の開発 50%/100%

B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発を目指した包括的研究

利益相反について

利益相反の有無等(平成24年度)

H24-B創-肝炎一般-012森屋恭爾は利益相反無

B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究代表 森屋恭爾

100万円をこえる寄付金 MSD 田辺三菱

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野）」研究班の研究代表者として参加しているか（ア又はイに記載）

H24-B創-肝炎-一般-012森屋恭爾は

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していません。

型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究

研究代表 森屋恭爾

合同研究班会議開催状況

他の研究班と合同での研究班会議開催状況（平成24年度）

H24-B創-肝炎-一般-012森屋恭爾は

ア 他の研究班と合同で研究班会議を開催していない。

単独班会議 2012年8月2日 12月4日実施

本年度予定2013年7月5日 12月予定

型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究^{①①①}

研究代表 森屋恭爾

平成 24 年度 B 型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-013

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：田中靖人

所属研究機関：公立大学法人名古屋市立大学

所属部局：大学院医学研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額):1年目 208,000,000 円

I. 研究の意義

B型肝炎ウイルス(HBV)根絶を目指したB型肝炎創薬実用化研究を効率良く推進するためには、HBV持続感染を再現する培養細胞評価系を開発し、HBV感染感受性・増殖機構から病態メカニズムの解明、レセプターの同定、薬剤スクリーニング等を効率的に実施できる簡便なシステムを構築することが重要である。

II. 研究の目的、期待される成果

すでに作成済の複製クローンや感染源を最大限活用し、(1)最適なヒト肝細胞の選択(初代肝細胞、肝細胞株、iPS細胞由来肝細胞)、(2)新規培養システムの構築(3次元培養)、(3)ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明(microRNA、脂質代謝、トランスポーター、免疫反応)、(4)HBV感染感受性環境の構築(HBVライフサイクル解明から創薬)により、できるだけ早期にHBV持続感染感受性培養細胞評価系を完成させ、B型肝炎創薬実用化研究の推進を目指す。また、(5)生体多光子励起イメージングを駆使して、*in vitro/in vivo*におけるHBVウイルス動態の可視化、さらに感染経路、感染細胞への免疫応答について実体的な解析により、免疫応答を誘導・調節する画期的な治療法の開発につながることを強く期待される。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(田中靖人)

a) 組換えDNA実験に関する大臣申請用の書類を作成・分担者へ配布。b) 1.2倍長のHBV plasmid(HBV genotype A~C)及び肝細胞株を各分担施設に分配(MTA)。c)キメラマウス由来の肝細胞を用いた3次元培養系の構築。d) microRNA解析、リポミクス解析のための研究計画を立案。HBV感染の有無でキメラマウス由来の肝細胞を培養し、解析用の肝細胞(凍結)を準備・提供。

・研究分担者

(1)最適なヒト肝細胞の選択(調、水口、石田)

水口:ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞への遺伝子導入効率を検討(約10%)。HBV発現アデノウイルスベクターの作製(70%以上の導入効率)。ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞を移植したキメラマウスの作製:血中ヒトアルブミン濃度は、これまでの10倍以上高く、世界最高水準。石田:ヒト肝細胞キメラマウスより分離したヒト肝細胞を用いたHBV感染培養モデルの評価。20日間以上にわたって持続感染が成立するだけでなく、感染性ウイルス粒子が上清中に放出された(キメラマウスで感染確認)。調:九州大学に

おける小児肝良性腫瘍に対する肝切除で得られる非腫瘍部正常肝細胞を研究目的で使用するために、倫理審査申請書を提出。

(2) 新規培養システム(3次元培養)の構築 (小原、松永、村上)

松永:肝細胞長期培養のためのスフェロイド形成を用いた3次元培養法の確立及び機能解析。Cell-able plateを用いた肝細胞3次元培養により、肝細胞マーカー発現が長期間維持された。**小原**:3次元培養により肝機能を維持し、平面培養に比較して5-10倍効率よくHBVを60日以上にわたり感染・増殖させることに成功した。**村上**:キメラマウス肝細胞による3次元培養系において、HBV感染患者血清を感染。効率的に感染・複製可能な感染源を同定した。

(3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明 (落谷、中西、深澤、石井、石川、高岡)

落谷:キメラマウス由来ヒト肝細胞・培養上清及び凍結ヒト肝細胞・培養上清(HBV感染・非感染)の供与を受け、細胞からはmicroRNA回収/精製、培養上清からは、超遠心によるエクソソーム分画の回収/精製し、3D-GeneによるmicroRNAアレイ解析を実施中。**中西**:上記と同じサンプルセットを用いて、リピドミクス解析を開始。陰イオン交換カラムを用いて総脂質を中性脂質群、塩基性脂質群、酸性脂質群に分画。トリプル四重極型質量分析計では微量脂質成分を特異的に分析し、イオントラップ型質量分析計では量的に多い脂質成分を網羅的に分析した。**深澤**:HBV産生による宿主細胞における脂質代謝変動の解析:コレステロール代謝関連薬剤に加え、リポタンパク質リパーゼ阻害剤が有意にHBV分泌阻害。PPAR α アンタゴニストによってHBV分泌上昇。**石井**:2光子励起顕微鏡を用いることで、肝臓内の免疫細胞の動態血流、肝細胞傷害を生きたマウス個体内で可視化することに成功した。**高岡**:1.2倍長のHBV plasmidをTransfectionする系においては、IFN遺伝子発現に関わる自然免疫認識分子としてRIG-Iが主要な役割を担っていた。

(4) HBV感染感受性環境の構築 (渡士、石川、土方、池田、坂本)

渡士:HBV複製を効率的に行う細胞株(クローン株)を樹立(HepG2.2.15.7及びHepAD38.7-Tet細胞)。親株よりcccDNA量が約3-10倍に上昇した。**石川**:HBV粒子の可視化技術(脂溶性蛍光色素を用いてウイルス粒子膜を標識)を用いたHBV細胞内侵入機構の解析。HBs粒子はエンドサイトーシスによって細胞質内に取込まれた。**土方**:市販の凍結ヒト肝細胞からヒト肝幹細胞様の細胞をクローン化することに成功し、効率良くHBV感染が可能な細胞を得るために複数の細胞株を構築。**池田**:ヒト不死化肝細胞PH5CH8細胞やLi23細胞に対するエレクトロポレーション法による遺伝子導入効率を検討。**坂本**:全長にわたりアミノ酸を網羅的に置換したX蛋白発現系を構築し、培養細胞での発現を確認した。

IV. 平成25~28年度の課題

(1) **最適なヒト肝細胞の選択**:キメラマウス由来のヒト肝細胞(石田)、ヒト胎児肝細胞、小児由来の正常肝細胞(調)、ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞、インテグレーション・フリーヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞(水口)、不死化した各種肝細胞(土方、池田)におけるHBV感染・複製効率を検討し、最適な細胞を選択する。**HBV感染培養ヒト肝細胞におけるHBVライフサイクルの解析**。さらに、肝障害免疫不全マウスへの移植を行い、効率的なHBV感染動物モデルを構築するとともに、キメラマウスの肝細胞を灌流して、日本人由来の初代肝細胞を大量に作成する。

(2) **新規培養システム(3次元培養)の構築**:肝非実質細胞と肝細胞との3次元共培養系構築とHBV感染維持との関連を明らかにする(松永)。**細胞間ウイルス伝達や再感染を阻害する因子の同定**。肝細胞にsiRNA、miRNAをこれまでの100倍の高効率で導入し対象因子を阻害できるDDSを開発、同定された

感染複製に必要な宿主因子の制御による HBV cccDNA の排除をめざす(小原)。

(3) ヒト肝細胞の機能を保持する環境因子の解明:HBV 持続感染に寄与する microRNA(落谷)、リポドミクス解析、脂質代謝(中西、深澤)、サイトカイン・ケモカイン発現(石川)を明らかにして、HBV 感染防御や免疫応答を誘導・制御する新しい創薬標的の創出及び新規の薬効評価系の確立(高岡、石井)。各種遺伝子改変細胞ライブラリーを作成し、より効率の高い HBV 感染・増殖が見られる培養細胞株を選別する。肝臓の生体イメージング系を活用して、蛍光標識された肝炎ウイルスの感染、マクロファージや T 細胞などの種々の免疫細胞を蛍光標識したリポーターマウスを用いることで、HBV 感染細胞に対する免疫応答をイメージング解析する(石井)。

(4) HBV 感染感受性環境の構築:抗 HBV 効果をもつ化合物や生理活性物質のスクリーニングを行い、単独での抗 HBV 効果、既存の逆転写酵素阻害剤との併用効果、薬剤耐性株に対する効果を検討(渡士)。HBV 粒子の可視化技術を用いた HBV の細胞内侵入機構、複製機構の解析:ウイルスレセプターの同定、HBV 複製機構の解明を試みる。HBV の細胞内侵入阻害、複製阻止に関する新たな治療法の確立を目指す(石川、田中)。新たに樹立したヒト肝幹細胞様細胞を用いて、新規培養系を開発し、HBV の生活環のすべてを効率良く再現する(土方)。高効率な感染増殖に関連する HBV 遺伝子・アミノ酸構造決定:HBX 蛋白の機能ドメインの探索と分子標的化合物の開発(坂本)。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1)HBV 持続感染を再現する培養細胞系を用いた薬剤感受性及び毒性評価(低コスト化実現)
- (2)HBV 根絶を目指した個別化医療の実現(医療費削減)
- (3)B 型肝炎治療薬に関する多くのシーズが創出できると予想され B 型肝炎創薬実用化研究が推進

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Watanabe T, Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulation systemic chemotherapy. *Hepatology Res*. 2012 in press.
2. Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Fuminaka S, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat*. 2012 in press.
3. Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheijen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arai S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, and Yoshizato K. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. *Lab Invest*. 2012 in press.
4. Ishikawa T. Immunoregulation of hepatitis B virus infection -rationale and clinical application-. *Nagoya J Med Sci*. 74(3-4): 217-232, 2012.
5. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*. 2012 in press.
6. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Taguchi YH. Comprehensive miRNA Expression Analysis in Peripheral Blood Can Diagnose Liver Disease. *PLoS One*. 7(10): e48366, 2012.