

201321001A

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 満屋 裕明

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発	1
満屋 裕明	
II. 分担研究報告	
1. B型肝炎ウイルス感染に対する新規の治療薬の研究・開発	19
満屋 裕明	
2. PK/PDの解析と毒性評価に関する研究	23
小田切 優樹	
3. 臨床試験データマネージメント	31
新保 卓郎	
4. 候補化合物の生体内での抗HBV効果の評価と HBVゲノム変異の動態解析	35
榎本 信幸	
5. HBVの逆転写酵素の阻害作用を有する核酸誘導体の設計と合成	39
原口 一広	
6. 逆転写酵素阻害剤等のスクリーニング法開発・耐性ウイルスに対する 効果判定に関する研究	51
児玉 栄一	
7. 新規抗HBV薬の1次・2次評価に関する研究	57
田中 靖人	
8. 前臨床試験並びに第I/IIa相臨床試験に関する研究 ～新規抗HBV感染症治療薬の臨床開発に向けて～	61
伊藤 俊之	
9. 創薬化合物の新規性についての研究・解析及び前臨床試験移行 諸条件の検討・解析及びマーケットリサーチに関する研究	65
助永 義和	
10. 肝炎ウイルスのポリメラーゼ・逆転写酵素の結晶構造解析	67
尾曲 克己	
11. HBV逆転写酵素の構造学的研究	71
安武 義晃	
12. 核酸アナログの合成	77
井本 修平	
13. 新規化合物の抗ウイルス活性の評価に関する研究	81
青木 学	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	85
IV. 研究成果の刊行物・別刷	91

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業
総括研究報告書

B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発

研究代表者 満屋 裕明 熊本大学血液内科学・膠原病内科学・感染免疫診療部 教授

研究要旨：本研究は、現在世界で広く用いられている HBV の核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) である entecavir (ETV) 等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロファイルが ETV 等とは異なり、耐性発現の出現を許さない（又は著しく遅延させる）新規薬剤をデザイン・合成・同定し、臨床開発へと進めようとするものである。本研究ではこれまでに、4'-置換-β-L-2'-デオキシリボヌクレオシド、4'位にアジド基を有するヌクレオシド等の化合物を新規に合成し、約 100 種類を超える新規化合物について *in vitro* での抗 HBV 活性、抗 HIV-1 活性、細胞毒性を評価、既存の薬剤と同等の抗 HBV 活性を有する複数の化合物を見出している。それらのうち 2 種類は ETV に耐性を示す HBV に対しても活性を保持することを確認しており、更なる最適化の対象としている。またその作業に必須となる HBV 逆転写酵素 (RT) の構造生物学的解析は、HBV-RT タンパク質が不溶性画分となることから発現系自体が未だ確立されていないが、発現させる RT 領域、宿主細胞および付加するタグ等の検討により可溶性の RT タンパク質の取得に成功している。RT 活性部位の詳細な構造の情報により新規化合物のデザイン・合成やリード化合物の最適化が容易になるだけでなく、新規化合物の作用機序と耐性出現の詳細なメカニズム解析が可能となると期待される。更に本研究では、HBV-RT を阻害するリード化合物が得られて最適化で一定の成功をみた時点以降は、小動物（肝炎モデルマウス等及びラットやビーグル犬や霊長類）を用い、新規化合物の薬物動態特性を LC-MS/MS 等を駆使し詳細に明らかにし、また B 型肝炎モデル動物による PK-PD モデリングを行い、前臨床試験・臨床試験へと進める。そのために必要となる薬剤耐性 HBV 感染キメラマウス 6 種類を作成、また肝障害モデル動物を用いて、生化学的、病理組織学的方法による肝機能評価法を確立し、更には臨床試験実施体制・実施支援体制や臨床試験データマネージメントの確立・整備に着手している。HBV の耐性発現に抵抗し、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規薬剤の開発は、HBV 感染症患者の病態コントロールを改善し、その結果患者の QOL 改善と医療・対費用効果の改善にも大きく貢献すると期待される。またそのような新規 HBV 阻害剤が開発・臨床応用されれば、HBV 感染症の診療領域にもたらされるインパクトは日本と世界で極めて高いものとなると強く期待される。

研究分担者

小田切 優樹・崇城大学薬学部・教授

新保 卓郎・国立国際医療研究センター・
臨床研究センター・医療情報解
析研究・部長

榎本 信幸・山梨大学大学院医学工学総合
研究部・第一内科消火器内科
学・教授

原口 一広・日本薬科大学薬学部・教授
児玉 栄一・東北大学病院内科感染症科・
創薬科学・助教

田中 靖人・名古屋市立大学大学院医学研
究科・肝臓病学・教授

伊藤 俊之・国立国際医療研究センター・
臨床研究支援部・部長

助永 義和・国立国際医療研究センター・
臨床研究センター・知財開発室
長

尾曲 克己・名古屋市立大学大学院医学研
究科・助教

安武 義晃・産業技術総合研究所 生物プロ
セス研究部門・主任研究員

井本 修平・崇城大学薬学部・准教授

青木 学・熊本保健科学大学・講師

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染者は世界に 2~3 億人、本邦でも 150 万人程度存在すると考えられており、そのうち 20~30%が急性肝炎を発症、更に数%が持続感染し、慢性肝炎、肝硬変、肝がんへと進展する。一方、B 型肝炎に対する治療薬としては、インターフェロンの他、ラミブジン、アデフォビル、エンテカビル (entecavir: ETV) の 3 剤の核酸アナログ製剤が本邦で承認されており、HBV の持続的な増殖抑制および

肝炎の鎮静化や肝発がんの抑制などが報告され一定の成果を上げている。しかし長期投与により耐性ウイルスが出現、治療効果が減弱すると共に、そのような耐性ウイルスが他の治療薬に対する耐性発現を容易にするなど治療上の大きな問題となっている。本研究では、現在世界で広く用いられている HBV の核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTIs) である ETV 等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロフィールが ETV 等とは異なり、耐性発現の出現を許さない (又は著しく遅延させる) 新規薬剤をデザイン・合成・同定し、臨床開発へと進めることを目的とする。

新規抗ウイルス剤の開発において、human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) では十分な感染増殖を支持する培養細胞を用いた測定系が確立されており、1987 年に初めて AZT が臨床に導入されて以来、5 つのクラス、計 20 種類を優に越える薬剤がこれまでに開発されている。また hepatitis C virus (HCV) においてもレプリコンアッセイ法の確立により、テラプレビル等の有用な薬剤の開発に繋がっている。しかし HBV では、high-throughput の薬剤評価系が確立されておらず、新規抗 HBV 剤の開発において大きな障壁の一つとなっている。そこで本研究では従来用いられている HBV を強制発現させた肝癌細胞株 HepG2.2.15 細胞による測定系を更に改善、もしくは全く新しい high-throughput の抗 HBV 剤スクリーニングシステムの開発を平行して行なう。また新規抗 HBV 剤の開発を困難にしているもう一つの問題として、未だ HBV の逆転写酵素 (RT) の結晶構造が得られていないことが上げら

れるが、結晶構造解析等の構造生物学的手法を駆使した HBV-RT 活性部位の微細構造解析を本研究において併せて進める。新規に合成される化合物の抗 HBV 活性の評価データと構造生物学的解析より得られる知見を基に、更に継続して化合物をデザイン・合成すると共にリード化合物の最適化を加速させる。

In vitro における最適化で一定の成功を見た場合は、各遺伝子型の HBV および薬剤耐性 HBV 変異株を感染させたモデルマウスにて検討を行なうと共に、小動物（ラットやビーグル犬や霊長類）での前臨床試験段階での検討を進める。また本研究では、製薬企業への早期導出を前提に初期開発を進めるが、最も有望な化合物については要に応じて GMP レベルの bulk を得て Phase 1、或は Phase 2a の実施を視野に入れた開発・研究を進める。

B. 研究方法

1. 新規化合物の合成（原口、井本）

1) 4'-置換-β-L-2'-デオキシリボヌクレオシドの合成については、デオキシアデノシン誘導体およびデオキシシチジン誘導体を得ることが出来た。2) 3'-ハロゲン置換型 BCA の合成については、次年度までに最終目的化合物を合成予定である。3) 4'-フルオロメチル-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成については、5種類の4'-フルオロメチル-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成を行った。4) 4'-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成については、2種類の4'-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成を行った。5) シクロプロピルビニルヌクレオシドの合成については、次年度

までに最終目的化合物を合成予定である。

6) 二重結合を有するアシクロ型核酸誘導体の合成については、entecavirが開環した構造のリン酸化誘導体を得ることが出来た。7) 4'位にアジド基を有するヌクレオシドの合成については、4'-アジド-2'-デオキシグアノシンおよび塩基をアデニン、チミン、イノシン、2,6-ジアミノプリンに置換した化合物の合成を行った。

2. 新規化合物の抗 HBV 活性、抗 HIV-1 活性、細胞毒性の評価および測定系の改善、新規測定系の開発検討

（満屋、田中、児玉、青木）

1) *In vitro* における新規化合物の抗 HBV 活性の評価：96-well plate にて新規化合物を 10%FCS+ DMEM で 1 μM から段階希釈し、次に持続的に HBV を産生する HepG2.2.15 細胞を 1×10^5 /ml で播種、37°C、5% CO₂ の条件下で 6 日間培養した。培養上清中の DNA を抽出・精製し、HBV DNA 量を real-time PCR で検出、IC₅₀ 値を算出した。

2) 化合物の細胞毒性の検討：細胞はヒト CD4+T 細胞である MT-2 細胞を用い、MTT assay にて評価を行なった。化合物非存在下で培養した細胞溶解液と比較し CC₅₀ 値を算出した。

3) *In vitro* における新規化合物の抗 HIV-1 活性の評価：逆転写酵素は HBV がウイルス RNA から cDNA を合成するために必須の酵素である。HIV も逆転写酵素を有し、2つの逆転写酵素は互いに相同性がある事が知られているが、事実、抗 HIV 剤として使用されてきたラミブジンが抗 HBV 逆転写酵素阻害活性を有することが分かり、抗 HBV 剤として臨床で使用されてきた。この

ことから、新規化合物については、両ウイルスに対する活性を評価する。

MT-2 細胞と実験室野生 HIV-1 株である HIV-1_{LAI} を用い、MTT assay にて評価を行なった。化合物非存在下で培養した細胞溶解液と比較し IC₅₀ 値を算出した。

4) *In vitro* における新規化合物の entecavir (ETV) 耐性 HBV に対する活性の評価：スクリーニングにおいて抗 HBV 活性が ETV と同等であった化合物について、1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株と ETV 耐性株 1 種類 (genotype Ce) をトランスフェクトした HuH-7 細胞に化合物を添加し、細胞内のウイルス複製に与える影響を Southern blotting で確認した。

5) 細胞内でのリン酸化効率の改善効果の検討：細胞内での化合物のリン酸化効率を改善するために、HepG2.2.15.7 細胞にヘルペスウイルスリン酸化酵素 (herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: HSV-TK) を導入した。これにより 1 リン酸化されないと効果を示さないテノフォビルのような薬剤であっても、リン酸化体を合成することなく活性の検討が可能である。これによりスクリーニングにおけるヒット薬剤の検出向上が期待できる。

3. 野生株および薬剤耐性 HBV 感染キメラマウスの作製とキメラマウスを用いた抗 HBV 活性等の評価 (田中)

1) 1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株について、薬剤耐性変異株 7 種類：ETV 耐性 4 種類 (genotype Ae: 1 種類、genotype Bj: 1 種類、genotype Ce: 2 種類)、ラミブジン耐性 1 種類 (genotype Ce)、アデホビル耐性 1

種類 (genotype Ce)、ラミブジン+アデホビル耐性 1 種類 (genotype Ce) を作成し、これを Huh-7 細胞に transfection して得られたウイルス粒子を含む培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種した。

2) HBV 野生株と ETV 耐性変異株を感染させたキメラマウスに HBV-DNA 量の抑制効果を示した化合物を投与して、抗 HBV 効果や肝傷害の有無を検討した。

4. HBV 逆転写酵素の構造生物学的解析 (尾曲、安武)

1) バキュロウイルス発現系：HBV ポリメラーゼ領域の terminal protein (TP) と逆転写領域 (RT) をトランスファーベクターに挿入し、相同組み換えによりリコンビナントバキュロウイルスを作製した。その後、昆虫細胞に感染させ目的タンパク質の発現を確認した。

2) コムギ細胞発現系：GST と His タグを付加したベクターに RT 領域全長、RT の N 末端と C 末端を切断したもの (RT Δ NC) を導入し、目的タンパク質の発現を確認した。

3) 大腸菌および *Rhodococcus erythropolis* を用いた発現系：Pol 遺伝子のオリジナルコドンおよびバクテリアに最適化したものを複数種類作成した。様々な長さのフラグメント、またそれらを別の蛋白質と融合させた蛋白質、また活性残基に変異を入れた蛋白質等の発現を確認した。

4) ϵ RNA の発現： ϵ RNA は、HBV 粒子内にパッケージされる全長 RNA (pgRNA) の 5' 末端側に存在する領域で、Pol はまずこの領域を認識し、逆転写のためのプライミング反応を行うことが知られている。したが

って、Pol との共発現や、精製 Pol との間の結合アッセイ等に使用するため εRNA の取得を行った。

5. 候補化合物の前臨床、臨床試験に関するシステムの構築・整備と生体内での評価 (小田切、伊藤、新保、榎本)

1) 肝機能の評価法の確認及び確立: B 型肝炎モデル動物の代替としてアセトアミノフェン (APAP) 誘発急性肝障害モデルマウス及び四塩化炭素 (CCl₄) 誘発慢性肝障害モデルラットを作成し、生化学的、病理組織学的方法を用いて評価を行った。

2) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備: リード化合物獲得後の前臨床試験並びに第 I/II a 相臨床試験などの臨床開発の円滑な実施に備えるため、臨床試験プロトコル作成支援体制の確立、多施設共同試験実施体制の構築並びに Phase I 実施体制の整備を行なった。

3) 臨床試験データマネジメントに関して: データマネジメント業務の標準化のために、Standard Operating Procedure やマニュアルの整備を行った。また品質管理体制の強化のために、品質保証部門の設置等を行った。

4) HBV 治療の現状と HBV 変異体の動態解析: 核酸アナログを投与した症例において、臨床的ウイルス反応性、ならびに核酸アナログ投与後の発癌リスクについて検討した。また核酸アナログ未投与 HBV 感染症例における HBV ゲノムの核酸アナログ自然耐性変異の有無について、次世代シーケンサーを用いた deep sequence により検討した。

6. 創薬化合物の新規性についての検討(助永)

新規性調査については、アメリカ化学会の CAS が提供する電子情報サービス SciFinder 解析ソフトを使用して、構造より検索を行う。前臨床試験移行諸条件検討・解析は製薬企業の創薬経験に基づく未公開ノウハウ及び ADMET 因子より、更に核酸アナログに特化した抽出を行う。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。開発中の化合物の臨床試験導入に際しては、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。また必要最小限数の動物使用となるように配慮する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。他方で臨床応用に必要な検討事項についても検討して、同時に大手製薬企業へのライセンス化を図る。

C. 研究結果および D. 考察

1. 新規化合物の合成およびその抗 HIV-1 活性、抗 HBV 活性、細胞毒性の評価

1) ①新規に合成されたヌクレオシド誘導体 67 種類(分子量:239.2-455.3)について、MT-2 細胞を標的細胞とした MTT assay 法により野生株 (HIV-1_{LAI}) に対する抗 HIV-1 活性を評価した結果、23 化合物が野生 HIV-1 株に対し 0.0001 から 0.9104 μM の

IC₅₀ 値を示した。また同方法を用いてヒト T 細胞由来の細胞株である MT-2 細胞およびヒト肝癌由来の細胞株である Huh-7 細胞に対する細胞毒性を評価した結果、52 化合物は CC₅₀ 値が 100 μM を超え、明らかな細胞毒性を示さなかった。これらの化合物のうち、化学構造特性や抗 HIV-1 活性、細胞毒性を考慮した上で 15 化合物を選択、抗 HBV 活性を検討した結果、2 つの化合物において既存の薬剤と同程度の抗 HBV 活性を確認した。Southern blotting を用いた測定においても 2 種類の化合物はともにウイルス複製を抑制し、IC₅₀ 値は ETV と同等であった。また、ETV 耐性株に対する抗ウイルス効果も良好であった。②研究分担者原口博士のグループにより合成された 21 種類の新規核酸アナログについて、adenine analog である KMA-35-52, -36-177, -XL-52 は EC₅₀ 値が 0.019 ~ 0.046 μM の抗 HBV 活性を示し、細胞毒性も良好であった (HepG2 細胞に対する CC₅₀ 値が 100 μM 以上であった)。またデオキシリボースの 4' 位に fluoromethyl を付加した guanine analog である SK13-092b は EC₅₀ 値が 0.004 μM を示し高い抗 HBV 活性を認めたが、CC₅₀ 値が 3.3 ~ 2 μM と比較的強い細胞毒性を有することが判った。また ETV analog である TOM-II-20 は、ETV とほぼ同程度の抗 HBV 活性を示し、細胞毒性は ETV よりも軽度であった。③研究分担者井本博士のグループにより合成された(1)アシクロ型 ETV 誘導体 6 種類は、抗 HBV, HIV 活性共に IC₅₀ 値が 1 μM 以上で細胞毒性も 100 μM 以上であった。(2)アルケンを有するアシクロ型ヌクレオシド誘導体 10 種類は、リン酸付加体の 1 種類で抗 HIV 活性が 0.26

μM であったが、抗 HBV 活性は 1 μM 以上であった。(3)C4 位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体 7 種類は、抗 HBV, HIV 活性が共に見られた。抗 HBV 活性については IC₅₀ 値が 0.0027~0.09 μM (ETV は 0.00036 μM)、抗 HIV 活性は 0.00028~0.54 μM (AZT は 0.032 μM) であった。また CC₅₀ 値は 3.8~>100 μM であった。

既存の薬剤と同程度の抗 HBV 活性を示す化合物を複数同定しており、これらの化合物については薬剤耐性 HBV 変異体に対する活性やミトコンドリア障害の程度を更に評価する必要がある、良好であればリード化合物として抗ウイルス活性を更に高めるように再デザイン・最適化を行う必要があると思われる。

2) 細胞内でのリン酸化効率の改善効果の検討：ヘルペスウイルスリン酸化酵素 (herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: HSV-TK) で効率よくリン酸化され、かつヘルペス DNA polymerase の良好な基質となる抗 HSV 剤の acyclovir (ACV) と brivudine (BVdU) を検討した。ACV では 100 μM まで HBV-DNA の産生量はほとんど変化せず、BVdU ではやや上昇傾向が見られた。またどちらの薬剤も細胞毒性は見られなかった。今回使用した抗 HSV 薬 2 剤に関しては、抗 HBV 効果は見られなかった。

2. 野生株および薬剤耐性 HBV 感染キメラマウスの作製とキメラマウスを用いた抗 HBV 活性等の評価

1) 1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株について、薬剤耐性変異株 7 種類：エンテ

カビル耐性 4 種類 (genotype Ae: 1 種類、genotype Bj: 1 種類、genotype Ce: 2 種類)、ラミブジン耐性 1 種類 (genotype Ce)、アデホビル耐性 1 種類 (genotype Ce)、ラミブジン + アデホビル耐性 1 種類 (genotype Ce) を作成し、これを Huh-7 細胞に transfection して得られたウイルス粒子を含む培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種した。キメラマウスに接種した HBV 薬剤耐性変異株の培養上清 7 種類のうち、現在までに 6 種類の感染を確認した。

2) HBV を感染させたキメラマウスに 2 種類の化合物を ETV と同様の用量である 0.02 mg/kg で投与した結果、いずれの化合物も野生株と ETV 耐性株の双方において HBV-DNA 量を抑制する効果が認められた。キメラマウスに野生および薬剤耐性変異 HBV を感染させた肝炎モデルは、新規の薬剤開発には、非常に有用な動物モデルであることが確認された。

3. HBV 逆転写酵素の構造生物学的解析

1) バキュロウイルス発現系: TP 領域はタンパク質の発現が確認され、また可溶性であることを確認した。しかし、RT 領域は発現が少なく、更に遠心前後でのタンパク質量の減少が著しいため不溶性の可能性が考えられた。

2) コムギ細胞発現系: GST-RT と His-RT は共に目的タンパク質の発現を確認出来たが、His-RT は遠心後の収量の減少が見られ、不溶性である可能性が考えられた。一方、GST-RT は収量に変化が見られず、可溶性である可能性が考えられた。また RT Δ NC においても同様の結果が得られた。

この GST-RT、GST-RT Δ NC はアミノ酸配列の解析より、目的とする HBV RT 領域であることが確認できた。今後は得られたタンパク質の活性を測定すると共に、結晶構造解析を行うために収量の改善を行う必要がある。

3) 大腸菌および *Rhodococcus erythropolis* を用いた発現系: Pol- Δ -8 を大腸菌シャペロンと共精製することが可能であったため、結晶化および構造解析を行ったが、pol に相当する構造を確認出来なかった。また幾つかのフラグメントで可溶性の発現を確認しており、今後用いるタグを検討するなど、結晶化を行う量の確保を検討する。

4) ϵ RNA の発現: RNA は細胞内で速やかに分解されるので、RNase による分解耐性が高い tRNA^{Lys} の一部を ϵ RNA に入れ替えたキメラ (teRNA^{Lys}) を作成し、teRNA^{Lys} の発現を確認した。

4. 前臨床、臨床試験に関するシステムの構築・整備と生体内での評価

1) 肝機能の評価法の確認及び確立: APAP 誘発急性肝障害モデルマウスでは、健常マウスと比較し AST, ALT の著しい上昇が見られた。また CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラットでは、EVG 染色により肝の線維化が確認された。B 型肝炎モデル動物に応用可能であることを確認した。

2) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備: 国立国際医療研究センター臨床研究センター (NCGM) 内に、臨床医、生物統計家、データセンター長やメディカルライター等をメンバーとして組織横断的に構成されるプロトコール作成

ユニットを設置し、試験的運用を行った。また多施設共同試験実施体制の構築のため、NCGM 中央事務局の設置並びに試験的運用並びにコーディネーター部門の整備を行なった。NCGM 内での Phase I 実施体制の整備のため、東京大学医学部附属病院の Phase I 病棟の見学を行った。

3) 臨床試験データマネジメントに関して：Standard Operating Procedure (SOP) 作成のための会議を開催、9種類の新規の SOP およびマニュアルを作成し、周知を行った。またデータセンター内に品質保証部門を設置し、品質管理の体制構築を進めた。

4) HBV 治療の現状と HBV 変異体の動態解析：①対象とした山梨大学通院中の 411 例において、核酸アナログ投与によるウイルス消失率は 1 年目から 4 年目まで階段状に上昇が見られたが、4 年で 94% に達し、以降プラトーになった。HCC 発症率は、核酸アナログ投与開始後、毎年 10-30% に新たに認め、5 年以上経過しても 20-30% に認めた。②PreS2 欠失が混在する症例は、Asc16.7%、CH56%、LC62% と肝病態の進展につれその割合が増大した。③ラミブジン (L180M、M204V/I)、エンテカビル (L180M or M204V/I+T184A or S202G or M250V)、アデフォビル (A181T、N236T) に対する自然耐性変異は、特に活性中心である M204V/I に加え M250I は HCC 群で 55%、inactive 群で 42% の症例に 1% 弱の比率ではあるものの有意な変異型の混在を認めた。

現行の核酸アナログ製剤が肝発癌に対して十分な抑制効果を持っていない可能性が示唆された。

5. 創薬化合物の新規性についての検討(助永)

合成された化合物の特許を含めた新規性調査を行った結果、複数の新規リード化合物が発見された。その中で目標の活性 kinetics に近い候補が得られており、更に新規リード化合物を集積し、その群分けリード化合物の最適化誘導体から医薬品候補が期待される。

E. 結論

新規化合物の *in vitro* における抗 HBV 活性、抗 HIV-1 活性、細胞毒性を評価し、既存の薬剤と同程度の抗 HBV 活性を示す複数の化合物を同定した。それらの中で 2 種類の化合物は薬剤耐性 HBV に対しても活性を維持することが分かった。長期服薬における慢性の副作用の軽減の 1 つとして新規化合物のミトコンドリア DNA に対する作用の有無について更に評価を行い、また抗ウイルス活性の更なる改善に向け化合物の最適化を進めていく必要がある。また HBV RT の微細構造や化合物との結合を解析するためのタンパク質発現系の構築では、細胞種やタグの検討により可溶性のタンパク質が得られるなど前進が見られている。今後は X 線結晶構造解析に要する一定量のタンパク質を得るための更なる発現系の改善が必要である。今後も新規化合物のデザイン・合成・同定を継続しつつ、結晶構造解析学等を駆使しながら、野性株と薬剤耐性変異株の HBV RT における薬剤開発に必須な活性部位の微細構造を世界に先駆けて発信する。

また医薬品候補化合物獲得後の前臨床試験の評価法の確立並びに第 I/IIa 相臨床試験など臨床開発の実施に向けた準備も整いつつある。

HBV の耐性発現に抵抗し、発現しても他薬剤との交差耐性を示さない新規薬剤の開発は、HBV 感染症患者の病態コントロールを改善し、その結果患者の QOL 改善と医療・対費用効果の改善にも大きく貢献すると期待される。そのような新規 HBV 阻害剤が開発・臨床応用されれば、HBV 感染症の診療領域にもたらされるインパクトは日本と世界で極めて高いものとなると高く期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

研究代表者

満屋 裕明 :

特になし

研究分担者

小田切 優樹 :

1. Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, T G Chuang V, **Otagiri M**, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm.* (2014) *in press*

2. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu

N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirono S, **Otagiri M**, Maruyama T. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. *PLoS One.* (2014) 9(2):e87919.

3. Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, **Otagiri M**. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int.* (2013) 353892.

4. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* (2014) 9(1):e85216.

5. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* (2014) 1840(3):1152-62.

6. Chuang VT, **Otagiri M**. Photoaffinity labeling of plasma proteins. *Molecules.* (2013) 18(11): 13831-59.

7. Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M,

- Maruyama T, Ando Y, **Otagiri M**. Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci.* (2013) 93(25-26):1017-22.
- 8 Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko KI, Iwata H, Kotani S, Nakajima M, Ishima Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clin Exp Nephrol.* (2013) *in press*
9. Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci.* (2013) 102(10):3852-9.
10. Nishijima M, Kato H, Fukuhara G, Yang C, Mori T, Maruyama T, **Otagiri M**, Inoue Y. Photochirogenesis with mutant human serum albumins: enantiodifferentiating photo-cyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate. *Chem Commun.* (2013) 49(67):7433-5.
11. Altaf A, Aldawsari H, Banjar MZ, Anraku M, Iohara D, **Otagiri M**, Uekama K, Hirayama F. Preparation of soluble stable C₆₀/human serum albumin nanoparticles via cyclodextrin complexation and their reactive oxygen production characteristics. *Life Sci.* (2013) 93(7):277-82.
12. Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(8):1584-91.
13. Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5435-43.
14. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5465-72.
15. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, **Otagiri M**, Maruyama T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* (2013) 345(2):271-83.
16. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, **Otagiri M**, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide.* (2013) 30:36-42.
17. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, **Otagiri M**. Albumin domain

II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta*. (2013) 1830(4):2917-23.

18. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. (2013) 83(4):582-92.

19. Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, **Otagiri M**, Kawai K. Pharmacokinetic alteration of (99m)Tc-MAG3 using serum protein binding displacement method. *Nucl Med Biol*. (2013) 40(3):366-70.

20. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int*. (2013) 83(3):446-54.

21. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos*. (2013) 41(1):141-8.

1. 新保卓郎 3. 診療ガイドラインの社会的意義と問題点 3) ガイドライン作成の社会的意義と評価および法的側面: 信頼されるガイドラインへ 日内会誌 2013;102: 2307-2312

榎本 信幸 :

1. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, **Enomoto N**, Tsubuki M, Moriishi K. Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One*. 2013 Dec 17;8(12):e82299.

2. Maekawa S, **Enomoto N**. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2014 Jan;49(1):163-4.

3. Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa S, Sano K, Ichikawa T, **Enomoto N**. Association of splenic MR elastographic findings with gastroesophageal varices in patients with chronic liver disease. *J Magn Reson Imaging*. 2013 Nov 14.

4. Tsuchiya K, Asahina Y, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, **Enomoto N**, Izumi N. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for

新保 卓郎 :

- advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2014 Jan 15;120(2):229-37.
5. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, **Enomoto N**. Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression. *J Virol*. 2013 Dec;87(23):12541-51.
 6. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, **Enomoto N**, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2013 Jul 17.
 7. Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa T, Sano K, Ichikawa S, Araki T, **Enomoto N**. MR-based measurements of portal vein flow and liver stiffness for predicting gastroesophageal varices. *Magn Reson Med Sci*. 2013;12(2):77-86.
 8. Ichikawa S, Ichikawa T, Motosugi U, Sano K, Morisaka H, **Enomoto N**, Matsuda M, Fujii H, Araki T. Presence of a hypovascular hepatic nodule showing hypointensity on hepatocyte-phase image is a risk factor for hypervascular hepatocellular carcinoma. *J Magn Reson Imaging*. 2014 Feb;39(2):293-7.
 9. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, **Enomoto N**, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepatol Res*. 2013 Apr 5.
 10. Saibara T, **Enomoto N**, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K. Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon-alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res*. 2013 Apr 19.
 11. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, **Enomoto N**, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2013 Oct;58(4):1253-62.
 12. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, **Enomoto N**. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepat*. 2013 Apr;20(4):281-9.
 13. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, **Enomoto N**, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M,

Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2013 Mar;85(3):449-58.

14. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, **Enomoto N.** Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2013 Aug;43(8):865-75.

原口 一広 :

1. Kubota Y, Kaneda Y, **Haraguch K,** Abe H, Shuto S J, Hamasaki T, Baba M, Tanaka H. Synthesis of Novel 4'-C-Methyl-1',3'-dioxolane pyrimidine nucleosides and evaluation of its anti-HIV-1 activity, *Tetrahedron*, 2013, 69, 10884-10892.
2. Duraffou S, Drillien R, **Haraguch K,** Balzarini J, van den Oord J J, Andrei G, Snoeck R. KAY-2-41, a novel nucleoside analogue inhibitor of orthopoxviruses in vitro and in vivo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, 58, 27-37.

児玉 栄一 :

1. Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku,

Stefan G. Sarafianos, and **Eiichi N. Kodama.** Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45:908-915, 2013.

2. Kazuki Shimane, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Nobutaka Fujii, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan Sarafianos, and **Eiichi Kodama.** HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:4035-4038, 2013
3. Eleftherios Michailidis, Emily M Ryan, Atsuko Hachiya, Karen A Kirby, Bruno Marchand, Maxwell D Leslie, Andrew D Huber, Yee T Ong, Jacob C Jackson, Kamalendra Singh, **Eiichi N Kodama,** Hiroaki Mitsuya, Michael A Parniak and Stefan G Sarafianos. Hypersusceptibility Mechanism of Tenofovir-Resistant HIV to EFdA. *Retrovirology* 10:65 doi:10.1186/1742-4690-10-65, 2013
4. Atsuko Hachiya, Aaron Reeve, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Ong, Karen Kirby, Maxwell Leslie, Shinichi Oka, **Eiichi Kodama,** Lisa Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, and Stefan Sarafianos. Evaluation of combinations of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine with clinically used antiretroviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 4554-4558, 2013.

5. Kirby KA, Michailidis E, Fetterly TL, Steinbach MA, Singh K, Marchand B, Leslie MD, Hagedorn AN, **Kodama EN**, Marquez VE, Hughes SH, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effects of substitutions at the 4' and 2' positions on the bioactivity of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:6254-64, 2013.
6. Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, **Eiichi N Kodama**, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* in press 2013
7. Fusako Miyamoto and **Eiichi N Kodama**. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*, 19:1827-34, 2013
- 田中 靖人 :
1. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, **Tanaka Y**, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One*. 2014;9(2):e86449.
2. Wong DK, Kopaniszen M, Omagari K, **Tanaka Y**, Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF. Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response. *J Infect Dis.* in press.
- 青木 学 :
1. Yedidi RS, Garimella H, **Aoki M**, Aoki H, Desai DV, Chang SB, Davis DA, Fyvie WS, Kaufman JD, Smith DW, Das D, Wingfield PT, Maeda K, Ghosh AK and Mitsuya H. Conserved hydrogen-bonding network of P2 bis-tetrahydrofuran containing HIV-1 protease inhibitors (PI) with protease active site amino acid-backbone aid in their activity against PI-resistant HIV. *Antimicrob Agents Chemother* 2014. *In press*.
2. Maeda K, Desai DV, **Aoki M**, Nakata H, Kodama EN, Mitsuya H. Delayed **emergence** of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antivir Ther.* 2013. *In press*.
3. Yedidi RS, Maeda K, Fyvie WS, Steffey M, Davis DA, Palmer I, **Aoki M**, Kaufman JD, Stahl SJ, Garimella H, Das D, Wingfield PT, Ghosh AK, Mitsuya H. P2' Benzene Carboxylic Acid Moiety Is Associated with Decrease in Cellular Uptake: Evaluation of

Novel Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors Containing P2 bis-Tetrahydrofuran Moiety.

Antimicrob Agents Chemother 2013 Oct;57(10):4920-7.

2) 学会発表 (国際学会のみ記載)

研究分担者

小田切 優樹 :

1. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. Kaori Watanabe, Yu Ishima, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
2. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidative and anti-inflammatory modulator, against acetaminophen-induced acute liver failure. Ryota Tanaka, Hitoshi Maeda, Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Toru Maruyama, **Masaki Otagiri** (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
3. Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. Shigeru Ogaki, Kazuaki Taguchi, Hitoshi Maeda, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
4. Mechanism of enhanced cysteinylolation of Cys34 in human serum albumin in chronic liver disease. Kohei Nagumo, Tadashi Imafuku, Naoyuki Yamada, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
5. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. Hiroshi Watanabe, Azusa Kodama, Ryota Tanaka, Hisae Tanaka, Victor Tuan Giam Chuang, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
6. Safety and pharmacokinetic evaluation after a massive intravenous infusion of hemoglobin-encapsulated liposome (Hemoglobin-vesicles) in cynomolgus monkeys. Kazuaki Taguchi, Hiroshi Watanabe, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, **Masaki Otagiri** (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
7. Preclinical studies of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier in non-human primate. Kazuaki Taguchi, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, **Masaki Otagiri** (The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

8. Artificial red cells (hemoglobin-Vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics. Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Horoshi Azuma, **Masaki Otagiri**, Koichi Kobayashi (The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)
9. Albumin –Thioredoxin Fusion Protein is Effective in Suppressing Lung Injury. **Masaki Otagiri** (9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Orlando, 2013/5/12-15)
10. Development of recombinant serum albumin. **Masaki Otagiri** (The International Liver Congress 2013 48th annual meeting of the European association for the study of the liver, Amsterdam, the Netherlands, 2013/4/24-28)

児玉 栄一 :

1. Fusako Miyamoto, Fumiko Tomiyama, Kumi Kawaji, Mitsuo Kaku, **Eiichi Kodama**. Profile of a novel HIV reverse transcriptase inhibitor. NIH Tohoku University JSPS Symposium, Sendai, Japan, May 9-11, 2013

田中 靖人 :

1. Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Matsuura K, **Tanaka Y**, Poovorawan Y. The variation of human leukocyte antigens (HLA) associated with chronicity and viral clearance in HBV infected Thai patients. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. June 6-10, 2013.

Singapore.

2. Wong D, Watanabe T, **Tanaka Y**, Seto WK, Lee CK, Fung J, Lin CK, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in the Chinese. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. June 6-10, 2013. Singapore.
3. Muroyama R, kumar V, Goto K, Kowatari N, Li W, Nakagawa R, Tateishi R, **Tanaka Y**, Mizokami M, Omata M, Koike K, Matsuda K, Kato N. Mica might have opposite effects on hepatocarcinogenesis between BHCC and C-HCC. 2013 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai.
4. Iio E, **Tanaka Y**, Watanabe T, Ikehara Y, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Gotoh M, Joh T, Mizokami M, Narimatsu H. A new liver fibrosis marker WFA+-H1-12 is useful for an evaluation of the prognosis in liver cirrhosis patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
5. Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, **Tanaka Y**, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus

infection in Japanese adults. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし