

また、ナノミセルは他の mRNA 導入キャリアと比べて、導入に伴う炎症が軽度であり、さらに高いタンパク質発現効率が得られることが分かった。ナノミセルの特徴は、表面が生体適合性ポリマー PEG で覆われているため、生体内環境下で安定に存在することである。一方で、今回用いた他のキャリアでは表面が正に帯電しているため、生体内アニオン性高分子と相互作用し、キャリアの機能低下や毒性を引き起こしたものと考えられた。実際に、我々の以前の DNA 導入に関する報告では、PEG の無いカチオン性複合体が生体内で凝集し、マクロファージの活性化を介した炎症反応を引き起こしたのに対して、PEG を持つナノミセルではこれらの反応が回避され優れた pDNA 導入効率を示した(Mol Ther. 2012;20:1196)。

このように修飾 mRNA とナノミセルを用いたシステムは、導入効率と毒性の観点から優れたシステムであることが分かった。実際に、エリスロポエチンを導入することで造血効果を得られたことから、治療応用に十分な量のタンパク質発現が得られることが明らかとなった。

さらに、前年度の報告にて、肝組織における GFP 発現の分布を、mRNA と DNA のデリバリーで比較したところ、DNA では GFP 陽性細胞の割合は高々20%程度であったのに対して、mRNA ではほぼすべての肝細胞に GFP 発現が得られた。人工キメラ遺伝子を用いた B 型肝炎治療ではほぼすべての肝細胞にタンパク質発現を得ることが重要になることから、今回開発した mRNA デリバリーシステムの応用が期待される。

E. 結論

肝臓への mRNA 導入システムとして、ナノミセルが他のカチオン性ポリマー・脂質に基づくキャリアと比べ、毒性や導入効率の観点で優れたシステムであることが明らかとなった。更に、mRNA にヌクレオシド修飾を行うことで、導入に伴う炎症反応が軽減されるとともに、発現の持続性が向上することが分かった。ナノミセルを用いた修飾 mRNA 導入は、B 型肝炎治療における遺伝子導入システムとして有望である。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1) Z. Ge, Q. Chen, K. Osada, X. Liu, T. A. Tockary,

S. Uchida, A. Dirisala, T. Ishii, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, M. Oba, M. R. Kano, K. Itaka, K. Kataoka, Targeted gene delivery by polyplex micelles with crowded PEG palisade and cRGD moiety for systemic treatment of pancreatic tumors. *Biomaterials* 35 (10) 3416-3426 (2014)

2) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 (28) 18-24 (2014)

3) S. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. Endo, Y. Matsumoto, T. Ishii, K. Kataoka, An injectable spheroid system with genetic modification for cell transplantation therapy. *Biomaterials* 35 (8) 2499-2506 (2014)

4) H. -J. Kim, T. Ishii, M. Zheng, S. Watanabe, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* (DOI: 10.1007/s13346-013-0175-6)

5) Takemoto, K. Miyata, S. Hattori, T. Ishii, T. Suma, S. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka, Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN α -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (24) 6218-6221 (2013)

6) M. Ohgidani, K. Furugaki, K. Shinkai, Y. Kunisawa, K. Itaka, K. Kataoka, K. Nakano, Block/homo polyplex micelle-based GM-CSF gene therapy via intraperitoneal administration elicits antitumor immunity against peritoneal dissemination and exhibits safety potentials in mice and cynomolgus monkeys. *J. Control. Release* 167 (3) 238-247 (2013)

- 7) N. Gouda, K. Miyata, R. J. Christie, T. Suma, A. Kishimura, S. Fukushima, T. Nomoto, X. Liu, N. Nishiyama, K. Kataoka, Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA. *Biomaterials* 34 (2) 562-570 (2013)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) K. Kataoka “Block copolymer micelles as smart nanodevices for drug and gene delivery” 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba ICBS2013, keynote lecture, Mar. 22, 2013
- 2) 片岡一則 「核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計」 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けたストラテジーセミナー 基調講演 2013/4/26
- 3) 片岡一則 「核酸医薬デリバリーのための超分子ナノデバイス～その現状と将来展望～」第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム 招待講演 2013/5/11
- 4) K. Kataoka “Polymeric micellar nanocarriers for gene and oligonucleotide delivery” 16th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT), invited lecture, May 15, 2013
- 5) 片岡一則 「薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ナノ構造設計」 高分子学会 13-1 高分子ナノテクノロジー研究会「医用ナノ高分子材料」 招待講演 2013/6/18
- 6) K. Kataoka “Block copolymer micelles as smart nanocarriers for gene and drug delivery” The 5th Asian Arden Conference, Pharmaceutical Materials Science and Engineering - Characterization and Applications -, keynote lecture, Aug. 6, 2013
- 7) K. Kataoka “Smart supramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery” The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, plenary lecture, Dec. 16, 2013

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした 肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：中西 真 名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨:本研究は、HBV複製の鋳型となるcccDNA、あるいはゲノムDNA内に組み込まれたHBVDNAに対して、HBVDNA配列特異的に作用する人工キメラ遺伝子を設計し、細胞内/個体内においてHBVDNAを切断して不活性化することを目的としている。本研究はこの目的達成のため、人工キメラ遺伝子により生じるHBVDNA切断効果を検証する技術の開発と、細胞内に生じるDNA二重鎖切断による副作用を明らかにする目的で行われた。

A. 研究目的

平成25年度の研究目的は、DNA二重鎖切断の程度に依存した細胞内情報伝達経路の活性化、および細胞反応の解析を行い、ゲノム改変技術により生じる副作用の詳細を明らかにするものである。具体的に、当該技術で最も重篤な副作用と考えられる早期細胞老化誘導機構に焦点をあてて、老化誘導の分子基盤をあきらかにするものである。また、HBVDNA人工キメラ遺伝子を正常細胞に導入した時にDNA二重鎖切断が導入されるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

DNA二重鎖切断の導入モデルとして電離放射線処理を用いた。FUCCIのシステムを用いて、低線量あるいは高線量の放射線を照射したときの細胞周期進行制御、および細胞老化誘導機構について解析を行った。また細胞老化誘導におけるがん抑制電子産物p53やpRbの作用機構を明らかにする目的で、これらに対するレンチウイルスshRNAシステムを用いた。また、HBVDNA人工キメラ遺伝子を正常線維芽細胞に発現させたときのDNA二重鎖切断導入についても検討を行った。

C. 研究結果

FUCCIのシステムを用いて電離放射線照射後の細胞周期進行をタイムラプスイメージングで解析したところ、高線量の場合細胞はDNA複製後、分裂期を回避してG1期に移行し、その後細胞周期を停止して老化することが分かった。この分裂期回避には、p53依存的なp21

の発現誘導が重要な役割を果たしていることが分かった。誘導されたp21はCdk1およびCdk2の活性抑制を介してAPC/C(Cdh1)の早期活性化を誘導し、これにより分裂期に必要なタンパク質群の分解を促進していた。一方、分裂期回避にはpRb依存的な分裂期タンパク質の転写抑制も同じく重要であることが示された。興味深いことに、活性型のCdhとpRbをG2期の細胞に一過性に発現誘導するだけで細胞老化が誘導されることが分かった。

一方、HBVDNA人工キメラ遺伝子を正常細胞に導入してもDNA二重鎖切断は起こらなかった。しかしながら、長期間の発現や、高レベルでの発現で果たしてDNA二重鎖切断が起きるかどうか今後解析する必要がある。

D. 考察

DNA二重鎖切断が多く起こった場合、あるいは修復困難な二重鎖切断であった場合等では、高率に分裂期回避が起こり、細胞老化が誘導される可能性が示唆された。このことは、人工キメラ遺伝子の発現が過度であったり、また長期であった場合には細胞老化が誘導される危険性を示唆しており、今後人工キメラ遺伝子の発現条件の検討が必要と考えられた。

E. 結論

重度なあるいは修復しがたいDNA二重鎖切断が起こると細胞老化が高率に誘導されることが分かった。このことは人工キメラ遺伝子の発現が適切に調節されるべきものであることを示していた。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1)Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, Nakanishi M. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. Nature. 12488.2013

2)Shimada M, Nakanishi M. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? Front Oncol. 3:8.2013

3)Hamajima N, Johmura Y, Suzuki S, Nakanishi M. Saitoh S. Increased Protein Stability of CDKN1C Causes a Gain-of-Function Phenotype in Patients with IMAGE Syndrome. PLoS One. Sep 30; 8 (9):e75137.2013

4)Nishigaki M, Kawada Y, Misaki T, Murata K, Goshima T, Hirokawa T, Yamada C, Shimada M, Nakanishi M. Mitotic phosphorylation of MPP8 by cyclin-dependent kinases regulates chromatin dissociation. Biochem Biophys Res Commun. 432(4):654-9.2013

5)Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M. Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. Int J Oncol.; 42(6):1951-60.2013

2. 学会発表

2013年10月17日～18日

The 10th Nikko International Symposium 2013

Translational Epigenomics

栃木県自治医科大学

中西 真

2013年11月19日～23日

第3回日仏がんワークショップ

Ubiquitylation/deubiquitylation circuit of histone H3 at K23 couples maintenance DNA methylation with DNA

フランストゥールーズ

中西 真

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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/TALEN 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、昨年度（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）トランスフェクトした RNA の細胞内動態、（4）環状化による RNA の安定化について検討を行った。本年度においては、（1）トランスフェクトした RNA の細胞内分解経路を解明することで RNA 安定化を図るとともに、（2）RNA への翻訳因子繫留による翻訳の効率化について検討した。その結果、細胞内在性 mRNA の分解とは異なり人工合成 mRNA がエキソソームによる分解経路で分解されることを見出し、エキソソーム siRNA を同時にトランスフェクトすることで人工合成 mRNA を安定化できること、および翻訳終結因子 eRF3、RNA 結合蛋白質 PABP を繫留することで翻訳を効率化できることを明らかにした。

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。一方、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、転写を介在した増幅効果がないため発現量が低いという欠点がある。本研究では、1. 細胞内において人工合成 mRNA を安定に維持し、2. 細胞内における発現効率を向上させる方法の確立を目指し解析を進めた。

B. 研究方法

昨年に引き続き、EGFP をレポーターとして人工合成 mRNA を合成した。EGFP ORF の 3' 非翻訳領域(3'UTR)には 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、3'末端には 72 塩基のポリ A 鎖を付加した。RNA への繫留実験では、3'UTR に Ms2 結合部位を導入した。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トした。

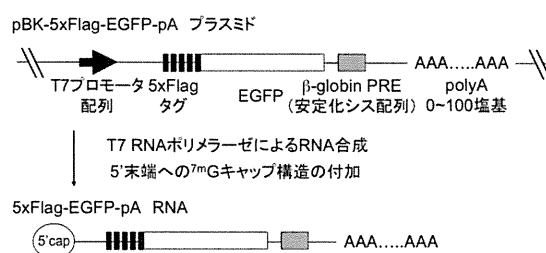


図1 *in vitro* におけるRNA合成

C. 研究結果

1. 細胞内における人工合成 mRNA 分解経路の解明

細胞内において mRNA は翻訳と共役する形で 3'末端ポリ A 鎖の分解が起こり、その後 5'末端キャップ構造の切断と 5'→3'方向への分解

が進行する (図1左)。人工合成 mRNA も翻訳阻害剤シクロヘキシミドで安定化することから翻訳依存的に分解すると考えられるが、ポリ A 鎖分解は観察されず、ポリ A 鎖長によって mRNA の安定性は影響をうけなかった。また、ドミナントニガティブ変異体を用いたポリ A 鎖分解酵素の阻害によっても影響をうけないことから、ポリ A 鎖非依存的に分解されることが明らかとなった。一方、3'→5'分解に関わるエキソソーム-SKI 複合体をノックダウンすると RNA の安定化が観察された (図2)。以上の結果から、細胞内 mRNA が 5'→3'方向に分解されるのは対照的に、トランスフェクトした人工合成 mRNA はエキソソームによる 3'→5'分解経路で分解されることを明らかにすることができた (図1右)。従って、ZFN/TALEN RNA を細胞に導入する際に、エキソソーム-SKI 複合体の構成因子に対する siRNA を同時に導入することで RNA を安定化することが技術的に可能となった。

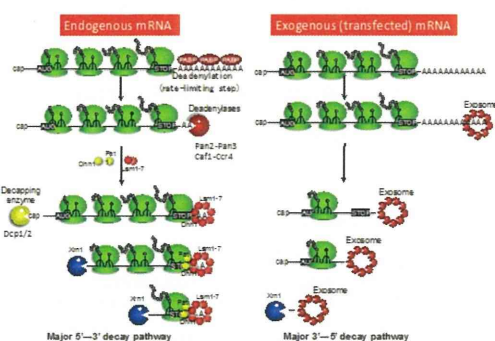


図1 本研究で明らかにした人工RNA分解経路

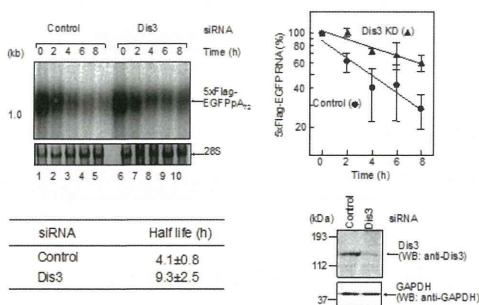


図2 エキソソームDis3のノックダウンによる人工合成mRNAの安定化

2. 人工合成 mRNA 翻訳の効率化

mRNA の 3'UTR には翻訳を促進するシス配列が存在する。これまで β グロビン 3'UTR に存在する PRE (pyrimidine rich element) が一般的によく知られており、翻訳の活性化に用いられてきた。PRE には α CP がトランスの因子として結合し、mRNA の翻訳を効率化する (図3(1))。本研究では、人工合成 mRNA の 3'UTR に λ フェージの Ms2 配列を挿入し、これに Ms2 と融合した各種翻訳関連因子を繫留させることにより、人工合成 mRNA の翻訳効率に与える影響を検討した (図3(2))。人工 RNA の 3'末端にポリ A 鎖を付加すると翻訳効率は7倍に増加するが、さらにポリ A 鎖結合蛋白質 PABP を繫留すると16倍に増大した (表1)。また、PABP と結合して翻訳を効率化する翻訳終結因子 eRF3 を繫留すると30倍の活性化が観察された。一方、翻訳開始因子 eIF4E ではこのような効率化はみとめられなかった。以上の結果より、PABP および eRF3 の繫留が人工合成 mRNA の翻訳効率化に有効であることが明らかとなった。

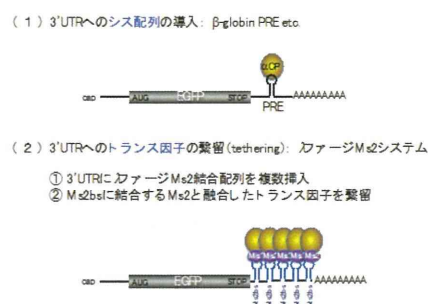


図3 RNA3'UTRへの各種因子繫留によるRNA翻訳の効率化

PolyA (nt)	Strategy	EGFP protein (fold increase)
0	—	1
72	—	7.1
72	Tethering eIF4E	8.4
72	Tethering PABPC1	16.2
72	Tethering eRF3	3.1
72	Tethering eRF3(N)	8.3
72	Tethering eRF3(C)	30.0
72	KD Dis3	6.6
72	KD Xrn1	6.4
72	KD Dis3+Xrn1	4.4
72	KD Ski2	6.2
72	KD Ski2+Mtr4	2.3
72	KD Mtr4	3.1

表1 翻訳活性化のまとめ

3. ZFN, TALEN の細胞内発現量の評価

これまでの研究では、ZFN, TALEN の代わりに EGFP を用いて RNA の安定性と翻訳の効率化について評価してきたが、実際に ZFN, TALEN の RNA について安定性と細胞内発現量の評価をおこなった。ZFN の細胞内における半減期は約 7 時間であり、コントロールとして用いた EGFP(3.8 時間)に比べて約 2 倍の安定性を確認した。また TALEN の RNA については半減期 4.5 時間であり、同様に EGFP と比較して安定であることがわかった。一方で、ZFN, TALEN の発現量を蛋白質レベルで比較すると EGFP に比べて 10 分の 1 のオーダーであり、翻訳効率が低いことが明らかとなった。

D. 考察

細胞内において mRNA はポリ A 鎖分解酵素による 3'末端ポリ A 鎖の短縮化を第一段階として 5'→3'方向へ分解されるのに対し、トランスフェクトした人工合成 mRNA はエキソソームにより分解されることを明らかにした。外から導入した人工合成 mRNA は核ヒストリーを経ないため、ポリ A 鎖に PABP が十分量結合していないなど正常な RNP の構造をとることができず異常として認識され分解されることが推定される。PABP を繫留することで翻訳がさらに活性化されることもそのような考えを支持している。ZFN, TALEN の RNA では、安定性に問題がなかったものの翻訳効率がコントロールとして用いた EGFP の RNA に比べて一桁低い値であった。実際に細胞内で ZFN, TALEN がウイルス DNA を切断するうえで不十分な量であるか否かについては DNA 切断評価系を用いて検討をしてみないと分からないが、PABP や eRF3 の繫留をはじめとする改善策を講じておくことが必要である。

E. 結論

細胞内 mRNA がポリ A 鎖分解酵素によるポリ A 鎖短縮化を第一段階として分解されるのに対して、人工合成 mRNA はポリ A 鎖分解酵素に依存せず、エキソソームによって分解されることを証明し、エキソソームのノックダウンによって人工合成 mRNA を安定化できることをはじめて明らかにした。また、PABP や eRF3 を繫留することにより翻訳を活性化できることも見出した。これらは ZFN, TALEN によるウイルス疾患治療に限らず、RNA によるワクチン開発や iPS 細胞の作製などに広く応用できる重要な知見である。

F. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

(1) Hashimoto Y., Kumagai N., Hosoda N., Hoshino S. (2014) The processed isoform of the translation termination factor eRF3 localizes to the nucleus to interact with the ARF tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.

(2) Ogami K., Hosoda N., Funakoshi N., Hoshino S. (2014) Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene* 33, 55-64.

(3) Saito S., Hosoda N., Hoshino S. (2013) Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells. *J Biol Chem* 288, 17832-17843.

2. 学会発表

野木森拓人、細田直、星野真一：B 型肝炎治療を目指した mRNA トランスフェクションによる高効率遺伝子発現系の確立、日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会、日

本薬学会東海支部合同学術大会 2013、2013
年 11 月 10 日（鈴鹿）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - (1) エキソソーム不活性化による人工合成 RNA の細胞内安定化法
 - (2) 翻訳因子繫留による人工合成 RNA からの遺伝子発現効率化法
に関して特許申請中
2. 実用新案登録
3. その他

人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした 肝臓内HBVDNA不活化を目指した新規治療法の開発

研究分担者：武富紹信 北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I

研究要旨： 本研究は肝内の HBV DNA を不活化し、肝炎、肝硬変、肝発癌の病因を除去する方法論を確立することが目的である。北海道大学消化器外科学分野 I の役割は、a) ヒト細胞ソースを提供する、b) 前記細胞を用いて新規治療法の効果を検証する、ことである。目標達成のためには、HBV 感染肝癌患者の切除組織を用いた検討(1-4)が必要である。

1) 癌の初代・継代培養、2) 非癌部の初代・継代培養、3) 癌細胞の株化、4) 上記の細胞を凍結保存後に再培養可能なリソースとする。

本検討に用いた切除組織は書面で同意を得た症例のみを対象とし、北海道大学の臨床研究に関する倫理委員会の承認の下で行った。H24 年度より 1), 2) を行い、癌部、非癌部の一部の細胞種の初代培養に成功した。われわれのルーチンの protocol により、切除組織から癌細胞のみならず、非癌部細胞の初代培養も可能であることが確認された。H25 年度からは、HBV 感染癌細胞、HBV 感染非癌部肝細胞の至適培養条件の検討に着手した。B 型肝炎細胞癌、ウィルス非感染肝細胞癌において、非癌部組織から肝細胞を単離、培養し、10 週目まで肝細胞を含む単離細胞群を維持することに成功した。

今後は肝細胞の収率、純度を上げ、細胞内の HBV DNA の推移を評価し、感染肝細胞を保持する方法を確立し、新規治療の効果を判定し得るリソースを提供する。また、培養経過中に感染が維持されなくなった肝細胞と感染細胞の免疫学的、分子生物学的特徴を比較し、ウィルス排除を支持する細胞環境を見出したい。さらに、組織幹細胞の単離培養、凍結保存・再培養、および、肝細胞への分化、HBV 感染などを検討する。

A. 研究目的

必要な時に必要な量の viable な B 型肝炎ウィルス(HBV)感染細胞を、安定的に供給することが分担課題のゴールである。その方策として、1)回収率、生存率の高い細胞分離、初代培養法、2) 障害性を極小化した凍結保存および融解法、3) 得られた感染細胞の不活化、4) 肝細胞に分化し得る幹細胞の分離、凍結保存、再培養、の方法論を検討し、確立する。具体的には以下の項目を検討する。

- HBV 感染肝細胞の分離、初代培養、および、凍結保存・再培養
- HBV 感染検体の肝非実質細胞の分離、初代培養、および、凍結保存・再培養
- HBV 感染検体由来の肝細胞(a)の不活化
- HBV 感染検体の癌部組織の初代培養と株化
- HBV 感染検体由来の組織幹細胞の分離、同定、培養、および、凍結保存・再培養
- 組織幹細胞の肝細胞への分化誘導

上記誘導肝細胞を用いた HBV 感染肝細胞の作製

B. 研究方法

目標達成のために HBV 感染肝癌患者の手術(切除)組織を用いて、癌部、非癌部組織の分離、初代培養を行った。本検討に用いた切除組織は、術前に書面で同意を得た症例のみを対象とし、北海道大学の臨床研究に関する倫理委員会の承認の下で行った。

[通常の初代培養]

切除肝は切除後直ちに冷生食に浸漬し、可及的速やかに処理を開始した。組織は原発性肝癌取扱い規約に従って、約 1cm 厚に割を入れ、癌部、非癌部を 5mm 角以上、1 個以上を採取した。組織片は氷冷生食に浸漬し、直ちに細胞培養室に搬送した。

組織片は常法のようにコラゲナーゼを主とするプロテアーゼで消化、金属メッシュでシングルセル化した。通常の DMEM 液に非働化 FBS (10%)、F12 栄養液、抗生物質を添加したものを基本培地とし、必要に応じて成長因子を添加した。12 種類の培養条件を検討し、24

時間以内に培養皿に付着する細胞数が多い条件を絞り込み、培養を継続した。細胞外基質コーティング済培養皿を使用した。

[温阻血障害の軽減、修復]

血流を遮断後に切除され、摘出される病変部位および周囲の非癌部組織は分離培養処理を行う段階で、高度の温阻血状態に曝露されている。大動物正常肝においても2時間以上の温阻血では、再(灌流)酸素化後に高度の細胞死を招き、線維化、肝硬変、脂肪化のある肝臓ではさらに高度の障害を呈することが知られている。肝炎の非癌部肝組織が正常肝よりも温阻血障害を受けやすいことは明らかである。

われわれは、肝移植における易傷害性肝グラフトの温阻血および冷保存障害の軽減あるいはグラフト修復を目的とした臓器保存・修復法を開発している。細断組織を市販の臓器保存液(UW液)あるいは独自に作成した臓器修復液に浸漬後に、分離培養を試みた(パイロットスタディー)。UW群ではUW液に冷蔵浸漬のみとし、修復液群では酸素を溶存させた氷冷修復液に30分浸漬後、25℃で30分静置した。

C. 研究結果

[通常の初代培養]

切除肝組織の癌部組織、非癌部組織から細胞の分離、培養に成功した。また、血管成分の単離、培養にも成功した。血流遮断から組織の氷冷までに3時間以上を要した症例では、生細胞はほとんど培養できなかった。その後の検討も含め、細胞死の大部分は単離時および最初に培養皿に播いた段階までに起こり、培養1日目時点で接着した細胞は、その後には細胞死に陥りにくかった。

形態的に肝細胞と考えられる細胞を同定し得たが、2週以上の培養により同定が困難となった。周囲に点在する繊維芽細胞様細胞が旺盛に増殖し、培養皿の大部分を占めるようになり、肝細胞が見出せなくなるのが原因であった。この時点で肝細胞は駆逐されたと考えられた。

しかし、興味深いことに2% DMSOを添加して培養を続けると、繊維芽細胞様細胞は著明に減少し、その隙間から当初観察された肝細胞と思われる細胞が再び出現した。繊維芽細胞様細胞の増加に伴って、本処置を繰り返すことにより、10週目の観察時まで、同様の所見が再現された。

一度、接着した肝細胞はコラーゲンサンドイッチや3D培養のような、特殊な方法を用いなくても、簡便に培地交換のみで長期間維持できることが示唆された。

[温阻血障害の軽減、修復]

UW液：細断直後から氷冷 UW液に浸漬した組織片を同様に処理したが、細胞の回収量は増加しなかった。氷冷 UW液への単純浸漬は温阻血と単離操作によるストレス、復温、再酸素化によるストレスに対して、細胞保護効果を発揮しなかった。

自作臓器灌流修復液：細断直後から酸素溶存氷冷自作液に浸漬し、30分間室温に復温させた後に組織片を同様に処理すると、細胞の回収量は増加した。通常の方法(生食)およびUW液浸漬では、24時間後には培養皿に接着する細胞がほとんどなく、多くは一部が緩く接着するのみであり、しっかりと接着するには72時間程度必要であった。一方、酸素化自作液で処理した場合には、24時間の時点で多数の細胞がしっかりと接着していた。本検討は初代培養が可能かを明らかにすることが主目的なので、生細胞数を正確にカウントはしていないが、72時間の時点での生細胞数は通常法の3-5倍程度であった。

D. 考察

血流遮断から分離培養までの温阻血時間が3時間を超えると、修復不可能な肝障害、細胞障害が生じ、UW液、修復液などを用いても回収される細胞数を増やすことはできないと考えられた。臓器保存の経験から、この温阻血許容時間は非癌部肝組織の状態によって大きく異なると考えられ、肝硬変では許容時間は短く、生細胞の単離が困難であろう。一方、軽度の線維化、脂肪化、あるいは

は、ほぼ正常の肝臓においては、許容時間は長く、生細胞の回収数も多いと考えられる。

肝細胞の見え隠れは、マーキング部位や顕微鏡写真を考慮すると、当初から観察されていた細胞がそのままの位置、形態で存在していると考えられた。周囲に繊維芽細胞様細胞が存在しない肝細胞はほとんど無く、逆に長期間培養し得た肝細胞の周囲には必ず繊維芽細胞様細胞が存在していた。一般に純度の高い肝細胞の維持は困難だが、繊維芽細胞を定期的に DMSO で deletion するだけで、肝細胞を長期間維持できる可能性が示唆された。

UW 液は臓器保存の分野においても、高度の温阻血臓器をその後に冷保存する場合に、保護効果を発揮しないことが知られており、今回の検討では、3 例行ったが、3 例とも温阻血時間は 2 時間を超えていたため、保護効果を発揮できなかったことは想定範囲内である。

自作修復液は酸素化しないで使用する場合でも強い臓器保護効果を発揮することを preliminary 実験で確認している。通常、ラット心臓の冷保存移植を行うと、24 時間程度が生着し得る限界時間だが、本液は 48 時間でも全例が生着した。一方、ラット肝の冷保存、心停止ラット肝の冷保存においても臓器保護効果をj確認している。

本研究においても肝のエネルギー状態、イオン環境を修復し、単離、復温、再酸素化、による障害を軽減し、細胞の生着率を向上させると推測された。

E. 結論

ヒト切除肝組織から肝細胞および非実質細胞を培養し、10 週以上にわたって生細胞を維持し得た。一定限度以内の温阻血障害に対しては、組織片の低温酸素化修復が可能であり、回収可能な細胞数が増加する可能性がある。細胞修復法を併用し、肝細胞、非実質細胞、あるいは、幹細胞を効率よく分離、培養するために、低温酸素化修復が有効と考えられた。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

1. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T,

Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.

2. Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, Taketomi A. Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium. *World J Surg Oncol*. 2013 Oct 5;11:259.
3. Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2314-25
4. Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, Taketomi A, Ikegami T, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y. Human early liver regeneration after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma: special reference to age. *Scand J Surg*. 2013 Jun 1;102(2):101-5.
5. Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, 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*. 2013 May;43(5):481-7.
6. Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular

carcinoma. World J Surg Oncol. 2013 Mar 2;11:52.

7. Taketomi A, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. Surg Today. 2013 Mar;43(3):289-92
 8. Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. Pathobiology. 2013;80(3):146-54.
2. 学会発表
1. 横尾 英樹, 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信, 大腸癌多発肝転移に対する外科切除のタイミング 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 2. 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 若山 顕治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信, 肝門側からの展開困難な血管合併切除を要する左葉系肝門部胆管癌に対する術式の工夫 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 3. 若山 顕治, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 中西 一彰, 嶋村 剛, 藤堂 省, 武富 紹信, 下大静脈/右心房腫瘍栓を有する肝細胞癌に対する肝切除 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 4. 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 若山 顕治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信, 当科における門脈再建法、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 5. 柿坂 達彦, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信, 肝細胞癌リンパ節転移症例に対する治療法の検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 6. 川俣 太, 蒲池 浩文, 永生 高広, 西原 広史, 田原 宗徳, 神山 俊哉, 藤堂 省, 武富 紹信, 細胞内の局在に着目した肝外胆管癌における Mesothelin 発現の免疫組織学的検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 7. 大畑 多嘉宣, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 神山 俊哉, 武富 紹信, 肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 の有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 8. 若山 顕治, 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信, 肝尾状葉腫瘍切除における 3D 画像によるシミュレーションの有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 9. 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 若山 顕治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 山下 健一郎, 神山 俊哉, 武富 紹信, 左葉系切除を要する高度進行胆道癌に対する Transparenchymal glissonean approach を用いた血行再建法、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 10. 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 蒲池 浩文, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 三浦 信明, 西村 紳一郎, 藤堂 省, 武富 紹信, 血清中糖鎖の網羅的解析による肝細胞癌新規バイオマーカーの開発、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 11. 大畑多嘉宣, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 神山 俊哉, 武富 紹信, 第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、9 月 5 日-6 日、2013
 12. 皆川のぞみ, 崎浜秀康, 小林希, 小原美都, 柴崎晋, 若山顕治, 柿坂達彦, 敦賀 陽介, 本間重紀, 横尾 英樹, 蒲池 浩文, 川村秀樹, 高橋典彦, 神山俊哉, 武富 紹信, 第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、9 月 5 日-6 日、2013
- 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

新規治療法の効果判定マーカーとその特性

研究分担者：田中榮司 信州大学医学部内科学第二講座 教授

研究協力者：松本晶博 信州大学医学部附属病院肝疾患相談センター 准教授

研究要旨：本研究班は肝細胞内 HBV cccDNA の不活化が可能な新規薬物の開発を目指している。この開発の過程において、*ex vivo* ないし *vivo* における新規薬物の効果をモニターする方法が必要である。通常の抗ウイルス薬では血中の HBV DNA 量の測定が有用であるが、これは肝細胞内の HBV cccDNA 量を必ずしも反映しない。これまでの研究で、HBs 抗原、HBcr 抗原 (HB コア関連抗原)、HBV RNA などが HBV cccDNA 量をモニター可能なマーカーとして報告されているが、その臨床的意義は不明な点も多い。本年度は、昨年度測定系を確立した HBV RNA を中心に、その臨床的意義を HBV DNA との比較で検討した。

HBV RNA の臨床的意義の検討では核酸アナログ治療例を含む B 型慢性肝炎例 546 例を対象とした。HBV RNA の測定では前処置で DNAase 処理と逆転写の両方を行い、HBV DNA の測定では両方とも行わず、得られた DNA をリアルタイム PCR 法で測定した。PCR 用のプライマーは HBV 遺伝子の S 領域で選定した。測定感度はおよそ 2.0 log copies/ml であった

核酸アナログ治療を行った B 型慢性肝炎例の経過では、核酸アナログ投与開始後 HBV DNA 量は急速に低下したのに対し HBV RNA の低下は緩徐であった。この結果、核酸アナログ投与前は DNA 優位であったものが、投与中は RNA 優位となった。さらに、耐性変異が出現した場合や核酸アナログを中止した場合は RNA 優位から DNA 優位に戻った。すなわち、核酸アナログがその効果を発揮している時は HBV RNA 優位であり、核酸アナログの効果が無い時は HBV DNA 優位となる関係が示された。各種病態における HBV DNA/HBV RNA 量比を B 型慢性肝炎 546 例で検討した結果でも前期の関係が確認された。

上記の結果より、HBV DNA 量と RNA 量の同時測定は新しい抗 HBV 薬の効果を評価する上で有用であり、特に両者の比は HBV の成熟段階を評価するのに役立つ可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究班は肝細胞内 HBV cccDNA の不活化が可能な新規薬物の開発を目指している。この開発の過程において、*ex vivo* ないし *vivo* における新規薬物の効果をモニターする方法が必要である。通常の抗ウイルス薬では血中の HBV DNA 量の測定が有用であるが、これは肝細胞内の HBV cccDNA 量を必ずしも反映しない。このため、今回のプロジェクトでは肝細胞内の HBV cccDNA 量をモニター可能な新しいマーカーが必要となる。これまでの研究で、HBs 抗原、HBcr 抗原 (HB コア関連抗原)、HBV RNA などがその候補としてあげられているが、その臨床的意義は不明な点も多い。

本年度は、昨年度測定系を確立した HBV RNA を中心に、その臨床的意義を HBV DNA との比較で検討した。

B. 研究方法

HBV RNA の臨床的意義検討では核酸アナログ治療例を含む B 型慢性肝炎例 546 例を対象とした。

In house の HBV DNA と HBV RNA の測定方法を

表 1 に示した。RNA のみの測定では DNAase 処理と逆転写の両方を行い、DNA のみの測定では DNAase 処理と逆転写の両方とも行わず、RNA と DNA の同時測定では DNAase 処理を行わず逆転写処理のみを行った。PCR 用のプライマーは HBV 遺伝子の S 領域で選定した。測定感度は HBV DNA と RNA 共におよそ 2.0 log copies/ml であった (図 1)。

HBV DNA 量はリアルタイム PCR 法 (ロシュ)、HBs 抗原量は CLEIA 法 (シスメックス)、HBcr 抗原量は CLEIA 法 (富士レビオ) で測定した。

本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

図 2 ラミブジン (LAM) 投与開始後の HBV DNA 量、HBV RNA 量、HBcr 抗原量、HBc 抗原量の推移を示す。HBV DNA 量は LAM 投与開始後速やかに低下したのに対し、HBV RNA 量は一過性に軽度上昇後、緩徐に低下した。このため、LAM 投与前は HBV DNA 優位であったものが、投与中は HBV RNA 優位となった。HBcr 抗原量と HBc 抗原量は

HBV RNA 量と類似した動きを示し緩徐に低下した。

図3は核酸アナログ治療を行ったB型慢性肝炎例(50歳、男性)の経過を示す。HBV DNA量はLAM投与開始後急速に低下し、中止後急速に再上昇した。再度LAMを投与するとHBV DNA量は急速に低下したが、その後耐性が出現して再上昇した。そこで、アドフォビル(ADV)を追加投与すると再度低下した。HBV RNAの動きをDNAと比較すると、核酸アナログ薬投与時の低下は緩徐で有り、この結果HBV DNA量との比が逆転するのが分かる。すなわち、核酸アナログがその効果を発揮している時はHBV RNA優位であり、核酸アナログの効果が無い時はHBV DNA優位となる関係が明らかである。

図4は各種病態におけるHBV DNA/HBV RNA量比の分布をみたものである。核酸アナログ薬治療前はHBV DNA優位であり、治療中(耐性株非出現時)はHBV RNA優位となることが明確である。さらに、耐性株出現時や中止後はHBV DNA優位に戻った。

D. 考察

今回の研究では、核酸アナログ薬治療と関連した様々な状況でHBV DNA量とRNA量の比が特徴的に変化することが明らかになった。すなわち、核酸アナログ薬が有効に作用している期間中はHBV RNA優位となり、非投与時や耐性株出現などで効果がない時期にはHBV DNA優位となる。この結果より、HBV DNA量とRNA量の同時測定は新しい抗HBV薬の効果を評価する上で有用であることが示唆された。

HBVの増殖過程において、コア粒子とヌクレオキャプシドを形成したプレジェノムRNAがDNAに逆転写されて、初めてHBs抗原を含むエンベロープをかぶり血中にビリオンとして放出される。しかし、核酸アナログ投与下においてはこの状況は大きく変化する。すなわち、核酸アナログ薬は基本的に逆転写酵素阻害薬であり、プレジェノムRNAからDNAへの逆転写を強力に阻害する。このため、血中のHBV DNA量は急激に低下するが、同時に、DNAに逆転写されないRNA遺伝子を持ったヌクレオキャプシドがエンベロープをかぶり血中へ放出されるようになる。この結果、核酸アナログ薬が有効な期間はHBV RNAが優位となり、そうでない

期間はHBV DNAが優位になること考えられる。

HBV cccDNAの不活化を目指す新薬では多種の方面からその効果を検討する必要がある。今回検討したHBV DNAとRNA量の比はHBVの成熟段階を評価するのに有用である可能性が示唆された。

E. 結論

1. HBV DNA量とRNA量の同時測定は新しい抗HBV薬の効果を評価する上で有用である。
2. 特に両者の比はHBVの成熟段階を評価するのに役立つ可能性が示唆された。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E: Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res* 2013 (in press)
- 2) Tanaka E, Matsumoto A: Guidelines for avoiding risks resulting from discontinuation of nucleoside/nucleotide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res* 44: 1-8, 2014

2. 学会発表

- 1) 松本晶博、他：高感度HBV RNA定量系によるB型慢性肝炎核酸アナログ治療例の病態解析。第49回日本肝臓学会総会 シンポジウム4、東京、2013.6
- 2) 松本晶博、他：B型慢性肝炎の核酸アナログ治療中止におけるシークエンシャル療法の検討。第17回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション2、東京、2013.10

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

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 CAGGATTCTAGGAC-3'
 HBV SGR: (nt 345-324) 5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'
 HBV TMP: (nt 244-269) 5'-FAM-CAGAGTCTAGACTCGTGGTG
 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

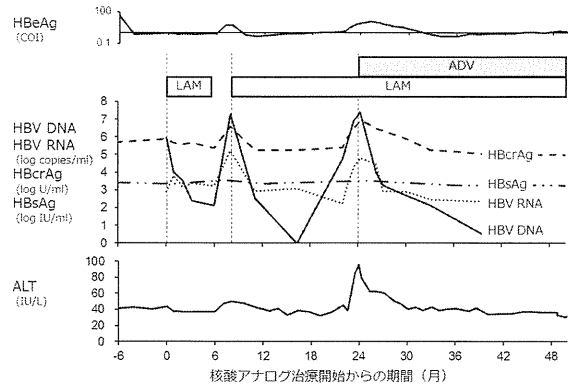


図3 核酸アナログ薬治療例 (genotype C) でのHBV核酸量および抗原量の推移

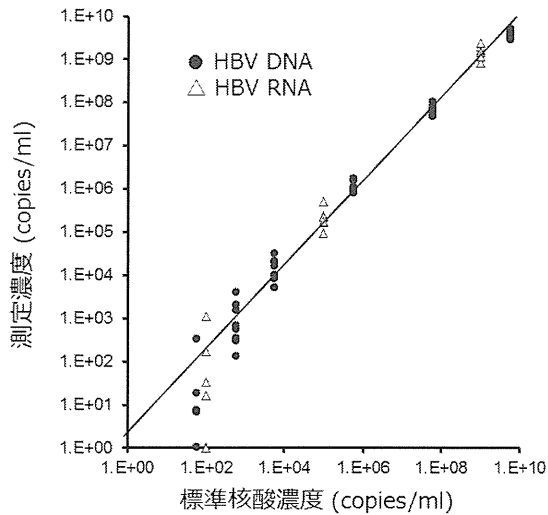


図1 HBV DNAとHBV RNA測定の標準曲線

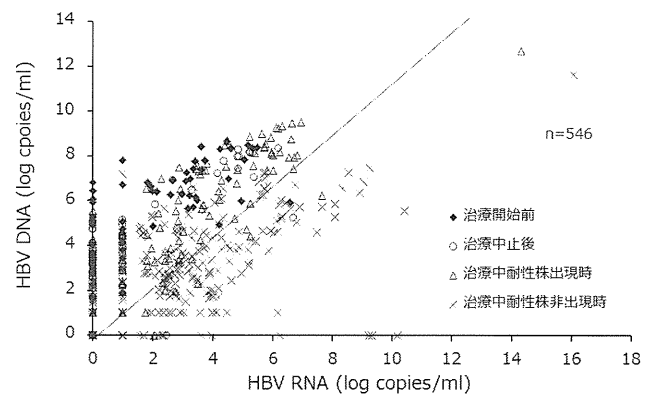


図4 各種核酸アナログ薬治療状況でのHBV DNA量 / HBV RNA量比率の分布

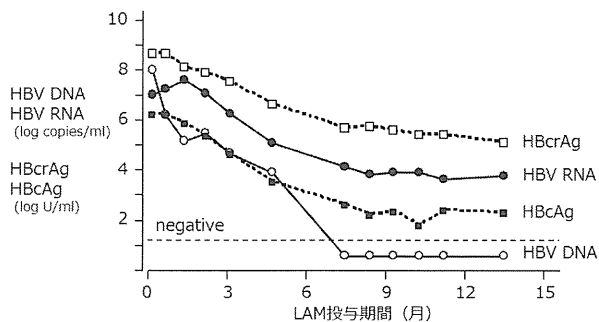


図2 LAM投与開始からのHBV核酸量および抗原量の経時的推移

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
松本有、野本貴大、藤加珠子、H. Cabral、村上真美、R. J. Christie、H. -J. Kim、T. Ogura、宮田完二郎、西山伸宏、山嵜達也、 <u>片岡一則</u>	Intravital real-time confocal laser scanning microscopy for the in situ evaluation of nanocarriers, in Cancer targeted drug delivery: An elusive dream	Y. -H. Bae, R. J. Mrsny, K. Park	Cancer Targeted Drug Delivery An Elusive Dream	Springer	New York	2013	607-620
宮田完二郎、R. J. Christie、須磨知也、武元弘泰、内田寛邦、西山伸宏、 <u>片岡一則</u>	Fine-Tuning of Repeating Aminoethylene Units in Poly(aspartamide) Side Chains for Enhanced siRNA Delivery	C. Scholz, J. Kressler	Tailored Polymer Architectures for Pharmaceutical and Biomedical Applications (ACS Symposium Series, Vol. 1135)	American Chemical Society.	Washington, D.C	2013	189-196
石井武彦、 <u>片岡一則</u>	ミセルを用いたターゲットティング	寺田弘、中川晋作、辻孝三、牧野公子、絹田精鎮、西野敦	応用が広がるDDS ー人体環境から農業・家電までー	NTS	東京	2013	56-65
宮田完二郎、 <u>片岡一則</u>	薬剤・核酸医薬送達に向けた高分子ナノ材料設計	山本昌	非経口投与製剤の開発と応用 ー一次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指してー	シーエムシー出版	東京	2013	251-257

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, <u>Mizokami M</u>	Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey	Microbiol Immunol	57(2)	122-9	2013
Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, <u>Sugiyama M</u> , Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, <u>Mizokami M</u>	Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication	J Viral Hepat	20(4)	E27-36	2013
Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, <u>Mizokami M</u> , Miyakawa Y, Koike K	High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B.	Clin Infect Dis	57(7)	935-42	2013

Michikawa T, Inoue M, Sawada N, Sasazuki S, Tanaka Y, Iwasaki M, Shimazu T, Yamaji T, <u>Mizokami M</u> , Tsugane S	Plasma levels of adiponectin and primary liver cancer risk in middle-aged Japanese adults with hepatitis virus infection: a nested case-control study	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev	22 (12)	2250-7	2013
Trinks J, <u>Sugiyama M</u> , Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Gimenez E, Weissenbacher MC, <u>Mizokami M</u> , Oubina JR.	In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behaviour regarding its parental genotypes	J Gen Virol	94Pt 12	2724-8	2013
Kusumoto S, Tanaka Y, <u>Mizokami M</u> , Ueda R	Is antiviral prophylaxis necessary to prevent hepatitis B virus (HBV) reactivation in patients with HBV-resolved infection receiving rituximab-containing chemotherapy?	J Clin Oncol	31 (35)	4480	2013
Khan A, Al Balwi MA, Tanaka Y, Hajeer A, Sanai FM, Al Abdulkarim I, Al Ayyar L, Badri M, Saudi D, Tamimi W, <u>Mizokami M</u> , Al Knawy B	Novel point mutations and mutational complexes in the enhancer II, core promoter and precore regions of hepatitis B virus genotype D1 associated with hepatocellular carcinoma in Saudi Arabia	Int J Cancer	133 (12)	2864-71	2013
Kusumoto S, Tanaka Y, <u>Mizokami M</u> , Ueda R	Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved HBV infection following rituximab-containing chemotherapy	Hepatology		Epub ahead of print	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, <u>Sugiyama M</u> , Murata K, <u>Fukuhara T</u> , Matsuura Y, Hayashi N, <u>Mizokami M</u> , Takehara T.	Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus	Hepatology	57	1705-1715	2013
Katoh H, Okamoto T, <u>Fukuhara T</u> , Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y.	Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation	J Virol	87	489-502	2013
<u>Fukuhara T</u> , Matsuura Y.	Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection.	J Gastroenterol	48	169-176	2013
Z. Ge, Q. Chen, 長田健介、X. Liu, T. A. Tockary, 内田智士、A. Dirisala, 石井武彦、野本貴大、藤加珠子、松本有、大庭誠、狩野光伸、位高啓史、片岡一則	Targeted gene delivery by polyplex micelles with crowded PEG palisade and cRGD moiety for systemic treatment of pancreatic tumors.	Biomaterials	35 (10)	3416-3426	2014
F. Pittella, H. Cabral, 前田芳周、P. Mi, 渡邊 秀美代、武元弘泰、H. -J. Kim, 西山伸宏、宮田完二郎、 <u>片岡一則</u>	Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles.	J. Control. Release.	178 (28)	18-24	2014
内田智士、位高啓史、野本貴大、遠藤泰輔、松本有、石井武彦、 <u>片岡一則</u>	An injectable spheroid system with genetic modification for cell transplantation therapy.	Biomaterials	35 (8)	2499-2506	2014
武元弘泰、宮田完二郎、服部翔太、石井武彦、須磨知也、内田智士、西山伸宏、 <u>片岡一則</u>	Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN α -associated immune response.	Angew. Chem. Int. Ed.	52 (24)	6218-6221	2013

扇谷昌宏、古垣浩一、新海健太郎、Y. Kunisawa、位高啓史、片岡一則、中野賢二	Block/homo polyplex micelle-based GM-CSF gene therapy via intraperitoneal administration elicits antitumor immunity against peritoneal dissemination and exhibits safety potentials in mice and cynomolgus monkeys.	J. Control. Release	167 (3)	238-247	2013
N. Gouda、宮田完二郎、R. J. Christie、須磨知也、岸村顕広、福島重人、野本貴大、X. Liu、西山伸宏、片岡一則	Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA.	Biomaterials	34 (2)	562-570	2013
Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, <u>Nakanishi M</u>	Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication.	Nature	1248 8		2013
Shimada M, <u>Nakanishi M</u>	Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases?	Front Oncol	3 : 8		2013
Hamajima N, Johmura Y, Suzuki S, <u>Nakanishi M</u> , Saitoh S	Increased Protein Stability of CDKN1C Causes a Gain-of-Function Phenotype in Patients with IMAGE Syndrome.	PLoS One	Sep 30; 8 (9)	e75137	2013
Nishigaki M, Kawada Y, Misaki T, Murata K, Goshima T, Hirokawa T, Yamada C, Shimada M, <u>Nakanishi M</u>	Mitotic phosphorylation of MPP8 by cyclin-dependent kinases regulates chromatin dissociation.	Biochem Biophys Res Commun	432 (4)	654-9	2013
Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, <u>Nakanishi M</u> , Okada M, Tashiro S	Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil induced DNA damage in esophageal cancer cell lines.	Int J Oncol	42(6)	1951-60	2013
Hashimoto, Y., Kumagai, N., Hosoda, N., <u>Hoshino, S.</u>	The processed isoform of the translation termination factor eRF3 localizes to the nucleus to interact with the ARF tumor suppressor	Biochem Biophys Res Commun		in press	2014
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	33	55-64	2014
Saito, S., Hosoda, N., <u>Hoshino, S.</u>	Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells	J Biol Chem	288	17832-17843	2013
Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, <u>Taketomi A</u> , Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S	Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase.	Carcinogenesis	35(2)	272-81	2014
Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, <u>Taketomi A</u>	Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium	World J Surg Oncol	11(1)	259	2013

Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, <u>Taketomi A</u> , Nishimura S, Todo S.	Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis.	Hepatology.	57(6)	2314-25	2013
Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, <u>Taketomi A</u> , Ikegami T, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y.	Human early liver regeneration after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma: special reference to age.	Scand J Surg	102(2)	doi: 10.1177/14574 96913482250	2013
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	43(5)	481-7	2013
Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, <u>Taketomi A</u>	Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma.	World J Surg Oncol.	11(1)	52-8	2013
<u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y	A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma.	Surg Today.	43(3)	289-92	2013
Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, <u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Maehara Y, Oda Y.	Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma.	Pathobiology	80(3)	146-54	2013
Hagiwara S, Kudo M, Osaki Y, Matsuo H, Inuzuka T, Matsumoto A, <u>Tanaka E</u> , Sakurai T, Ueshima K, Inoue T, Yada N, Nishida N	Impact of peginterferon alpha-2b and entecavir hydrate combination therapy on persistent viral suppression in patients with chronic hepatitis B	J Med Virol	85	987-995	2013
Morita S, Joshita S, Umemura T, Katsuyama Y, Kimura T, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kamiyo A, Yamamura N, <u>Tanaka E</u> , Ota M	Association analysis of toll-like receptor 4 polymorphisms in Japanese primary biliary cirrhosis	Hum Immunol	74	219-222	2013
Ikeda K, Izumi N, <u>Tanaka E</u> , Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B	Hepatol Res	43	596-604	2013
Joshita S, Shirahata K, Yazaki Y, Okaniwa S, Nakamura Y, Kimura T, Noami S, Horigome R, Yagi H, Ito N, Yamazaki A, Akahane Y, Umemura T, Yoshizawa K, <u>Tanaka E</u> , Ota M	Cutaneous sarcoidosis in a chronic hepatitis C patient receiving pegylated interferon and ribavirin therapy	Hepatol Res	43	801-807	2013