

- Gastroenterol** 2013. DOI 10.1007/s00535-013-0814-1.
- 2) Abe T, Hashiguchi A, Yamazaki K, Ebinuma H, Saito H, Kumada H, Izumi N, Masaki N, Sakamoto M. Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens. **Pathol Int** 2013 Jun;63(6):305-10. doi: 10.1111/pin.12064.
 - 3) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsuhashi 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; Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. **Hepatology** 2013 Jul 29. doi: 10.1002/hep.26635. [Epub ahead of print]
 - 4) Tamada Y, Yatsuhashi H, Masaki N, Nakamuta M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H, Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H. Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. **Gut** 61(5):765-73, 2012.
 - 5) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. **Hepatol Res** 2012 Oct;42(10):958-965.
 - 6) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. **Hepatology** 2012 Oct;56(4):1448-56.
 - 7) Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Ito K, Masaki N, Mizokami M. Increase in platelet count based on inosine triphosphatase genotype during interferon beta plus ribavirin combination therapy. **J Gastroenterol Hepatol** 2012 Sep;27(9):1461-6.
 - 8) Miyagi Y, Nomura H, Yamashita N, Tanimoto H, Ito K, Masaki N, Mizokami M, Shibuya T. Estimation of two real-time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA during PEG-IFN plus ribavirin therapy by HCV genotypes and IL28B genotype. **J Infect Chemother** 2012 Jul 21. [Epub ahead of print]
 - 9) Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamuta M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, Honda M, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Taniai M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsuhashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci

- for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. **Am J Hum Genet** 2012 Oct 5;91(4):721-728.
- 10) Narahara Y, Kanazawa H, Sakamoto C, Maruyama H, Yokosuka O, Mochida S, Uemura M, Fukui H, Sumino Y, Matsuzaki Y, Masaki N, Kokubu S, Okita K. The efficacy and safety of terlipressin and albumin in patients with type 1 hepatorenal syndrome: a multicenter, open-label, explorative study. **J Gastroenterol** 2012 Mar;47(3):313-20. Epub 2011 Oct 25.
- 11) Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. **Hepatol Res** 2011;41(10):936-945.
- 12) Yoshida H, Shiratori Y, Kudo M, Shiina S, Mizuta T, Kojiro M, Yamamoto K, Koike Y, Saito K, Koyanagi N, Kawabe T, Kawazoe S, Kobashi H, Kasugai H, Osaki Y, Araki Y, Izumi N, Oka H, Tsuji K, Toyota J, Seki T, Osawa T, Masaki N, Ichinose M, Seike M, Ishikawa A, Ueno Y, Tagawa K, Kuromatsu R, Sakisaka S, Ikeda H, Kuroda H, Kokuryu H, Yamashita T, Sakaida I, Katamoto T, Kikuchi K, Nomoto M, Omata M. Effect of vitamin K2 on the recurrence of hepatocellular carcinoma: A randomized, placebo-controlled, double-blind phase II/III study. **Hepatology** 2011;54(2):532-540.
- 13) Aiba Y, Nakamura M, Joshita S, Inamine T, Komori A, Yoshizawa K, Umemura T, Horie H, Migita K, Yatsushashi H, Nakamuta M, Fukushima N, Saoshiro T, Hayashi S, Kouno H, Ota H, Muro T, Watanabe Y, Nakamura Y, Komeda T, Shimada M, Masaki N, Komatsu T, Yagura M, Sugi K, Koga M, Tsukamoto K, Tanaka E, Ishibashi H; The PBC Study Group in NHOSLJ. Genetic polymorphisms in CTLA4 and SLC4A2 are differentially associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. **J Gastroenterol** 2011;46(10):1203-1212.
- 14) Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. The rs8099917 polymorphism, determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy in Japanese patients than other SNPs associated with IL28B. **J Clin Microbiol** 2011;49(5):1853-60.
- 15) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. **J Hepatol** 2011;54(3):439-448. [Epub 2010 Sep 19]
- 16) Sako A, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Masaki N, Matsuda S. Acute hepatitis B in Japan: The incidence, clinical practices and health policy. **Hepatol Res** 2011;41(1):39-45.
- 17) Yano K, Tamada Y, Yatsushashi H, Komori A, Aribu S, Ito K, Masaki N, Mizokami M, Ishibashi H, Japan National Hospital Acute Hepatitis Study Group. Dynamic epidemiology of acute viral hepatitis in Japan. **Intervirol** 2010;53(1):70-75.
- 18) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N,

- Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Genet** 2009;41 (10):1105-1109. [Epub 2009 Sep 13.]
- 19) Nozaki Y, Fijita K, Yoneda M, Wada K, Shinohara Y, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Mizoue T, Masaki N, Nagashima Y, Tearuchi Y, Nakajima A. Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol** 2009;51(3):548-556.
- 20) Nozaki Y, Yanase M, Masaki N. Usefulness of positron emission and computed tomography scan in early evaluation of treatment response in gastrointestinal stromal tumor. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2009 Apr 9. [Epub ahead of print]
- 21) Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, Takii Y, Koyabu M, Yokoyama T, Migita K, Daikoku M, Aribu S, Yatsushashi H, Takezaki E, Masaki N, Sugi K, Honda K, Adachi H, Nishi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Komatsu T, Saito A, Saoshiro T, Harada H, Sodeyama T, Hayashi S, Masumoto A, Sando T, Yamamoto T, Sakai H, Kobayashi M, Muro T, Koga M, Shums Z, Norman GL, Ishibashi H. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. **Hepatology** 2007;45(1):118-127.
- 22) Masaki N, Imamura M, Kikuchi Y, Oka S. Usefulness of elastometry in evaluating the extents of liver fibrosis in hemophiliacs coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. **Hepatol Res** 2006;35(2):135-139.
- 23) Abe K, Li T-C, Ding X, Win KM, Shrestha PK, Quang VX, Ngoc TT, Taltavull TC, Smirnov AV, Uchaikin VF, Luengrojanakul P, Gu H, El-Zayadi AR, Prince AM, Kikuchi K, Masaki N, Sata T, Takeda N. International collaborative survey on epidemiology of hepatitis E virus in 11 countries. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 2006;37(1):90-95.
- 24) Nakajima A, Usui M, Huy Tran T-T, Hlaing NKT, Masaki N, Sata T, Abe K. Full-length sequence of Hepatitis B virus belonging to genotype H identified in a Japanese patient with chronic hepatitis. **Jpn J Infect Dis** 2005;58:244-246.
- 25) Sawada K, Masaki N, Hayashi S, Zeniya M, Ishikawa T, Takahashi H, Ohnishi K, Fukunaga K, Hara N, Yamamoto T, Hada T, Toda G. Immunomodulatory effects of selective leucocytapheresis as a new adjunct to interferon-alpha2b plus ribavirin combination therapy: a prospective study in patients with high plasma HCV viraemia. **J Viral Hepatitis** 2005;12(3):274-282.
- 26) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. **J Hepatol** 2005;42:386-392.
- 27) Ding X, Li T-C, Hayashi S, Masaki N, Huy Tran T-T, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K. Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. **Hepatol Res** 2003;27:169-173.
- 28) Masaki N, Fukushima S, Hayashi S. Lower Th-1/Th-2 ratio before interferon therapy may favor long-term virological responses in patients with chronic hepatitis C. **Dig Dis Sci** 2002;47(10):2163-2169.

1 年目研究課題

平成25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型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究

課題番号：H25-B創-肝炎-一般-18

予定期間：H25年度からH27年度まで

研究代表者：村上善基

所属研究機関：大阪市立大学

所属部局：大学院医学研究科肝胆膵病態内科学

職名：准教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 41,600,000円

I. 研究の意義

(1)本邦におけるHBV感染患者は全人口の1.5%と推定される。HBVに感染すると高率に慢性化し慢性肝炎、肝硬変になり、肝細胞癌に至る。HCVと異なりHBVは線維化を経ずに肝細胞癌を発症する事がある。

(2)慢性B型肝炎の治療はウイルスを排除するには十分ではない。その原因として複製経路が複雑であり、十分に生態系が明らかになっていないこと、簡便にウイルスの複製モデルがないことが問題である。

II. 研究の目的、期待される成果

(1)HBVはDNAウイルスであるが他のDNAウイルスに比べ変異率が高い。次世代シーケンサーを用いてHBV全領域を対象に微量な変異型ウイルスを検出する。

(2)ウイルスタンパクの立体構造と既存の抗ウイルス薬との親和性を検出し、次世代シーケンサーにて検出した変異型ウイルスをタンパク構造の観点から薬剤耐性があるか否かを判定する。

(3)ウイルスの複製経路は複雑で、現在の薬剤では治療効果が十分ではない。治療効果を向上するために複数の複製ポイントを同時に攻撃する薬剤を開発する。

(4)ウイルスタンパクの立体構造解析をもとにタンパクの酵素活性ドメインと既存の薬剤バンクに登録されている低分子化合物との親和性を評価し、新規の抗ウイルス薬を同定する。

(5)簡便にウイルスの複製をモニターするためにPXB細胞を使ったin vitro実験系を構築する。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(村上善基)

(1)大阪市大病院より慢性B型肝炎患者40例よりの血清よりHBVDNAを抽出しPCRにてHBVの全ゲノムを増幅し、次世代シーケンサー解析のセットアップを行った。

(2)ウイルスタンパク解析のためAccession No. AB246344のHBVDNAのDNA polymerase、preC/C領域の塩基配列とHIVのRT領域の塩基配列のアライメントを作成した。

・研究分担者(梅山秀明)

(1)in silico screeningにてDNA polymerase領域を標的とした新規抗HBV薬候補を7種、preC/C領域を標的とした新規抗ウイルス薬候補を5種提供した。

・研究分担者(熊田卓)

(1)HBVキャリアを3年以上経過観察し、発癌した919例の抗ウイルス療法を行った症例と行わな

かった症例の肝癌、肝疾患関連死亡率、全死亡率について検討した。この結果をもとに各臨床情報と関連するウイルス変異の同定を試みるためのプラットフォームを作成した。

研究分担者(河田則文)

(1) 大阪市立大における慢性 B 型肝炎のインターフェロン核酸アナログ製剤による抗ウイルス効果を評価し、本研究の解析対象となる臨床サンプルの収集を行った。

・ 研究分担者(田口善弘)

(1) 次世代シーケンサーの解析方法の構築(次世代シーケンサー解析結果のアライメント方法、技術的な変異とウイルス学的変異の鑑別)

・ 研究分担者(田守明博)

(1) 実臨床にて核酸アナログ製剤による抗ウイルス効果を評価した。

(2) 本研究の解析対象となる臨床サンプルの収集システムを構築した。

・ 研究分担者(棚橋俊仁)

(1) 大阪市立大学提供された慢性 B 型肝炎患者血清から抽出したウイルスゲノム 2 検体を用いイリミナ社 MiSeq によってディープシーケンスを実施した。各々 1000 万リード解析デプスは 60 万前後を確保した。HBV の薬剤応答に関与する変異を同定するためのデータ取得システムを構築した。

・ 研究分担者(豊田秀徳)

(1) 大垣市民病院において慢性 B 型肝炎のインターフェロン、核酸アナログ製剤の効果を評価し、本研究の解析対象となる臨床サンプルの収集システムを構築した。

・ 研究分担者(榎本大)

(1) B 型肝炎ウイルス感染症に対する PEG-IFN の抗ウイルス効果を解析

(2) B 型肝炎ウイルス感染症に対するエンテカビルの抗ウイルス効果を解析

・ 研究分担者(本多隆)

(1) 名古屋大学付属病院にて慢性 B 型肝炎の治療効果別に HBV の Core 領域の塩基配列を決定した。

(2) さらに治療効果と関係する core 以外の領域の変異を明らかにするための検体収集を行った。

・ 研究分担者(矢野嘉彦)

(1) 神戸大学付属病院にて高発癌危険群の臨床サンプル収集システムを構築した。

(2) 本研究の解析比較対象となるインドネシア人の未治療臨床サンプルの収集システムを構築した。

・ 研究分担者(岩館満雄)

(1) 次世代シーケンサーによって得られたクローン別蛋白解析をする、タンパク構造解析より低分子化合物の *in silico* screening を行うために情報のインフラ整備を行った。

IV. 平成 26~28 年度の課題

(1) 年間 100 例程度の慢性 B 型肝炎患者より採取した血清中の HBVDNA のクローンのカタログ化を 0.1%程度存在しているクローンまで行う。変異クローン別に HBV の DNA polymerase、preS/S、preC/C、X 領域タンパクごとに立体構造を同定し、ラミブジン、アデフォビル、エンテカビル、テノフォビルそれぞれとの親和性を評価しデータベース化する。

(2) ウイルスタンパクの酵素活性ドメインを標的とする低分子化合物を DNA polymerase、preS/S、preC/C、X 領域タンパクそれぞれに複数個同定し、*in vitro* 実験系で抗ウイルス活性と細胞毒性を明らかにし、治療効果のある化合物セットを選択する。

(3)数種の新規抗ウイルス薬候補を in vivo 実験系で pharmacodynamics を明らかにし非臨床試験を行い、その結果を臨床第一相試験の下準備とする。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1)治療前にウイルス遺伝子を解析することによって治療選択の最適化を行うことができ、耐性株の出現を減らすことが期待できる。

(2)in silico screening によって新規治療薬を検索し HBV の多くの複製ポイントを制御する HBV のカクテル療法を提供することによってより効果の高い治療効果が期待できる。

(3)in silico screening によって得られた薬剤は既存のデータベースをもとにするために物質を最初から合成する必要がなく創薬コストの大幅なカットが期待できる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1)現在2論文投稿中である。

Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi Y-h, and Azuma T. High-throughput Analysis of miRNA Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma using Next Generation Sequencing. RNA in submission

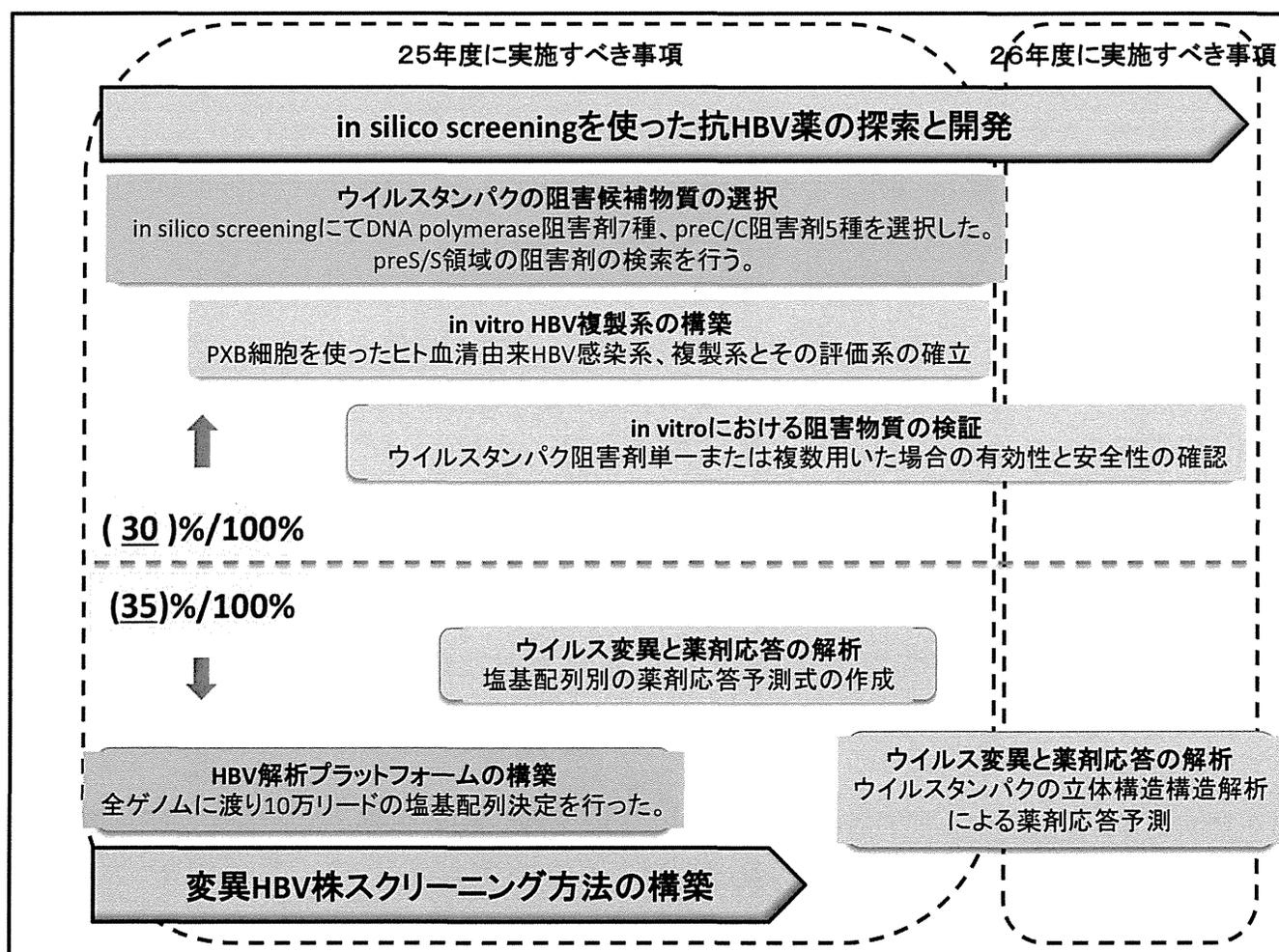
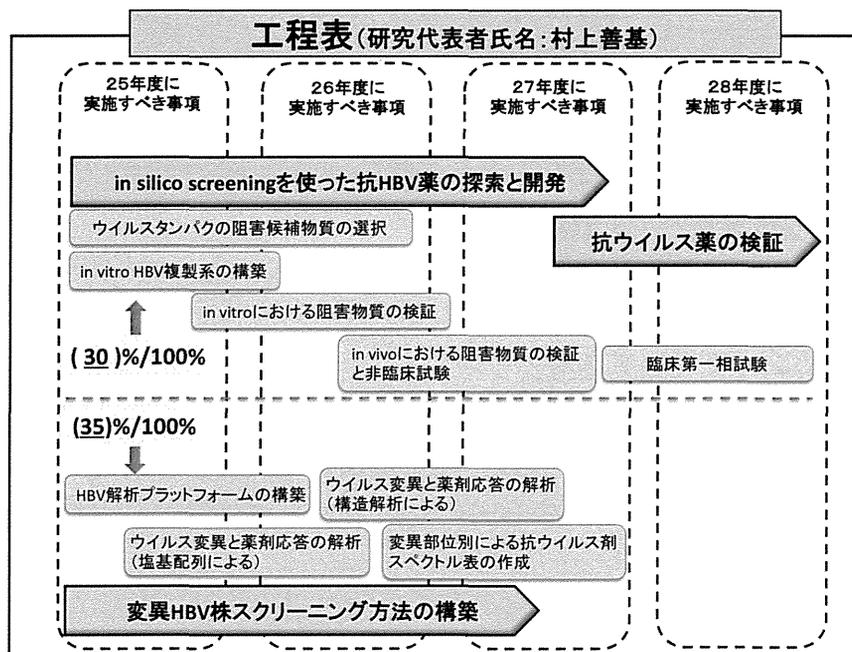
Okada R, Tanahashi T, Iwamoto A, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yoshida M, Azuma T, Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant Helicobacter pylori characterize the unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy in submission

(2)学会・研究会発表

1. Dewiyani W, 矢野嘉彦, 内海孝子, Laura Y, RHanggoro R, Wasityastuti W, Maria L, 岡田理菜, 棚橋俊仁, 東健, 林祥剛. Detection of drug resistant mutations of hepatitis B virus in Indonesians using next-generation sequencing. 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-11日(神戸国際会議場、神戸)
2. 棚橋俊仁, 岩本彰, 吉田幸生, 菊池馨, 慶田喜秀, 吉田優, 東健. 次世代シーケンサーを用いたクラリスロマイシン耐性ヘリコバクターピロリ菌の全ゲノム解析. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013年9月4-5日(神戸国際会議場、神戸)
3. 田口善弘, 棚橋俊仁, 吉田香奈子, 伊丹沙織, 松本佳也, 東健, 村上善基. ヒト肝臓がんの miRNA-seq 解析. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013年9月4-5日(神戸国際会議場、神戸)
4. 矢野嘉彦, 岡田理菜, 棚橋俊仁, Widasari D, 東健. 次世代シーケンサーによる B 型肝炎ウイルス薬剤耐性領域の変異解析. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013年9月4-5日(神戸国際会議場、神戸)
5. 吉田香奈子, 棚橋俊仁, 伊丹沙織, 松本佳也, 村上善基, 田守昭博, 河田則文, 岡田理菜, 東健, 田口善弘. 慢性 B 型肝炎治療効果予測方法の診断. 次世代シーケンサー第三回研究会 2013年9月4-5日(神戸国際会議場、神戸)

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

全計画行程を上段、今年度の詳細成果と達成度を下段に示す。



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1995-1999 京都府立医科大学大学院・医学研究科・病理学第一専攻（芦原司教授）
B型肝炎ウイルスに関するウイルス学と分子生物学的研究に従事
- 1999-2001 フランス国立保険医学研究所（INSERM U-370）（Christian Brechot 教授）
HBV の遺伝子の宿主遺伝子組み込みと肝発癌のメカニズムの解析に従事
- 2002-2004 国立福井病院・消化器科医長
肝外細胞における HBV に遺伝子の組み込みに関するウイルス学的研究に従事
- 2004-2007 京都大学ウイルス研究所・ヒトがんウイルス研究部門（下遠野邦忠教授）
マイクロ RNA と肝発癌、慢性肝疾患に関する研究に従事
- 2007-2012 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター・疾患ゲノム疫学解析分野・
産学官連携准教授
マイクロ RNA と肝発癌、抗ウイルス機能解析に従事
- 2012-現在 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学・病院講師（2013 より准教授）
HBV の遺伝子解析と構造解析、マイクロ RNA による慢性肝疾患治療に従事

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

下遠野邦忠（元京都大学ウイルス研究所・教授）、岡上武（元京都府立医科大学消化器内科・教授）
永井良三（自治医科大学・学長）、谷口維昭（東京大学生産技術研究所・特任教授）、落谷孝広（国
立がん研究センター・分野長）、黒田雅彦（東京医科大学・分子病理学・主任教授）、芝清隆（が
ん研究所・蛋白創製研究部・部長）

・主な研究課題

- ・肝疾患進展における miRNA の役割解析についての研究
- ・肝細胞癌、肝硬変における核酸創薬線維化過程における星細胞の関与の研究
- ・慢性ウイルス性感染に対する miRNA を用いた治療法の開発
- ・肝疾患における新規バイオマーカーの開発

・これまでの研究実績

村上 善基

学術論文(2013-2011)

Motoyama H, Kawada N, Komiya T, Le Thuy, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, and Yoshizato K. Cytoglobin, the newest globin in mammals, is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Lab Invest 2013 Dec 2 Epub ahead of print

Enomoto M, Morikawa H, Murakami Y, Tamori A and Kawada N. Adjuvant epoetin- β with peginterferon- α and ribavirin in Japanese ribavirin-intolerant relapsed patients with chronic hepatitis C genotype 2. Hepatol Res 2013 Oct 11. Epub ahead of print

○Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Yamamoto K, Murakami Y. Impact of HBV Integration into Liver Tissue on the Efficacy of Peginterferon and Ribavirin Therapy in HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients *J Clin Gastroenterol*. 2013 Jul 8. PMID: 23842217

Murakami Y, and Tanahashi T. Analysis of circulating microRNA by microarray in liver disease. *Methods Mol Biol*. 2013;1024:173-82. Humana Press 2013

○Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T and Iizasa H. Chapter 13 MicroRNAs and Oncogenic Human Viruses. *MicroRNAs: Key Regulator of Oncogenesis*. Springer in press

○Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Yamamoto K, Murakami Y. Impact of HBV Integration into Liver Tissue on the Efficacy of Peginterferon and Ribavirin Therapy in HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients *J Clin Gastroenterol* 2013 Jul 8 Epub ahead of print

Taguchi Yh, Murakami Y. Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers. *PLoS ONE* 2013; 8: e66714

Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y. Association between Hepatic Steatosis and Hepatic Expression of Genes Involved in Innate Immunity in Patients with Chronic Hepatitis C. *Cytokine* 2013 Aug;63(2):145-50.

Kanai M, Otsuka Y, Otsuka K, Sato M, Nishimura T, Mori Y, Kawaguchi M, Hatano E, Kodama Y, Matsumoto S, Murakami Y, Imaizumi A, Chiba T, Nishihira J, Shibata H. A Phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin in cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2013; 71: 1521-30

Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis *BMC Cancer*. 2013;13:99

Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y. Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Biomarkers*. 2013;18:82-7.

○Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, and Y-h Taguchi. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS ONE*. 2012; 7: e48366

Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 883-895

Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the *IL28B* gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J Med Virol.* 2012 ; 84: 61-70.

Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically-resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the *IL28B* gene. *J Med Virol.* 2011; 83: 1559-1564

Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One.* 2011; 6: e19799

Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Impact of genetic polymorphisms near the *IL28B* gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2011; 83: 1203-1211

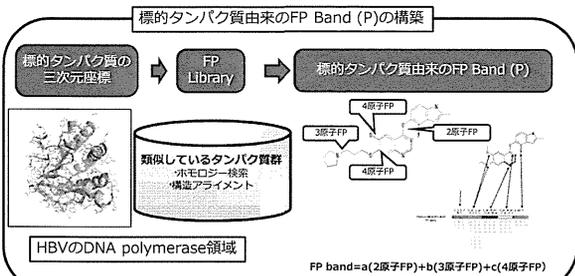
Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. *PLoS One.* 2011; 6: e16081.

発明特許(2013-2011)

1. テスト体液サンプルの分類方法 村上善基 PCT/JP2013/054571 (出願日 2013-2-23)
2. テスト体液サンプルの分離方法 村上善基 特願2012-37586 (H24-2-23)

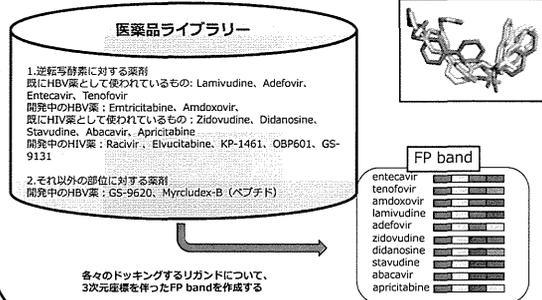
ウイルスタンパク構造解析

変異株ごとによるウイルス産生蛋白立体構造解析 (FAMS法による)



薬剤の構造解析

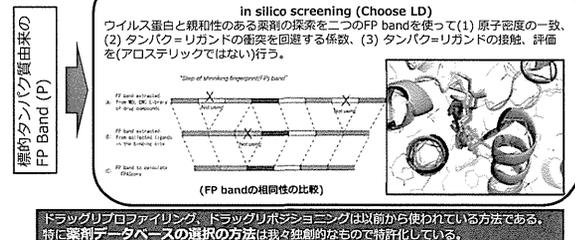
リガンド由来のFP Band (L)の構築



ウイルスタンパクと薬剤の構造解析

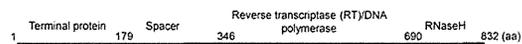
リガンド由来のFP Band (L)

リガンドドッキングの実行



DNA polymeraseを標的とする薬剤候補

HBV polymerase gene



各領域別(N-terminal, RT, RNaseH)の阻害剤候補の探索を試みた。

N-terminalを対象にしたin silico screening

Rank/Score	Model	Model & Ref	Similarity	Percentage	Method	QV	Enthalpy	Entropy	Free Energy
1/1	04030101	Ref Model	0.825423	100.00%	Ref	0.008	-4.711	0.139	-4.572
2/1	04030101	04030101	0.825423	100.00%	Ref	0.008	-4.711	0.139	-4.572

N-terminalを阻害する低分子化合物を検索するためのタンパクモデルができなかった。

RTを対象にしたin silico screening

Rank/Score	Model	Model & Ref	Similarity	Percentage	Method	QV	Enthalpy	Entropy	Free Energy
1/1	04030101	Ref Model	0.825423	100.00%	Ref	0.008	-4.711	0.139	-4.572
2/1	04030101	04030101	0.825423	100.00%	Ref	0.008	-4.711	0.139	-4.572

RTを阻害する低分子化合物を検索するためのタンパクモデルが得られた。

DNA polymeraseを標的とする薬剤候補

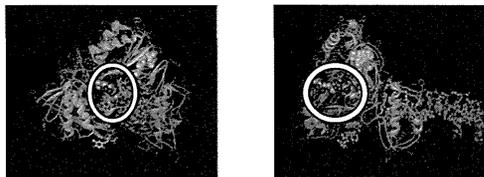
Reverse transcriptaseを対象にしたin silico screening

(1) 基質と競合阻害物質のin-silico screening探索過程で、対になるRNA塩基がプリンリングの場合。

物質名	商品名	結合度
Zidovudine	Retrovir®	954.429

(2) 基質と競合阻害物質のin-silico screening探索過程で、対になるRNA塩基がピリミジンリングの場合。

物質名	商品名	結合度
Didanosine	Videx®	865.258

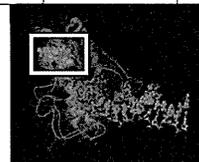


DNA polymeraseを標的とする薬剤候補

Reverse transcriptaseを対象にしたin silico screening

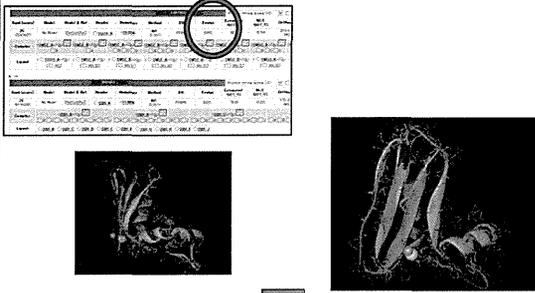
(3) induced-fitでDNA合成の3'-5'結合に重要な活性部位アミノ酸残基の移動を生じる阻害剤結合部位へのin-silico screening探索過程で得られた阻害物質

物質名	商品名	結合度
Efavirenz	Sustiva®	468.836
Nevirapine	Viramune®	439.557
Delavirdine	Rescriptor®	567.065
etravirine	Intelence®	795.356
Rilpivirine	Edurant®	477.467



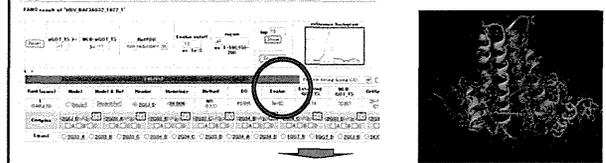
DNA polymeraseを標的とする薬剤候補

C-terminalを対象にしたin silico screening

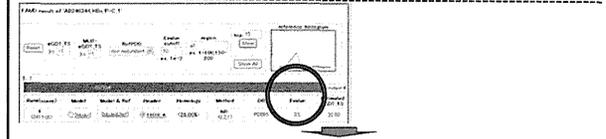


C-terminal (RNaseH):信頼度が低いalignmentならモデリングが可能

preC/CとHBXを標的とする薬剤候補



preC/Cを阻害する低分子化合物を検索するための良好なタンパクモデルが得られた。



HBXを阻害する低分子化合物を検索するためのタンパクモデルができなかった。

薬物動態、安全性試験

薬剤候補の中から安全性、薬物動態を確認する。

1) in vitro screeningの系

- 薬効動態の観察
- PXB細胞にHBVを感染させ、上清中のHBVDNA、HBsAgのモニターを行う。
- 候補薬剤の至適濃度の決定、複数の薬剤の組み合わせによる薬効の確認
- 安全性試験
- 細胞増殖、細胞死などを確認する。

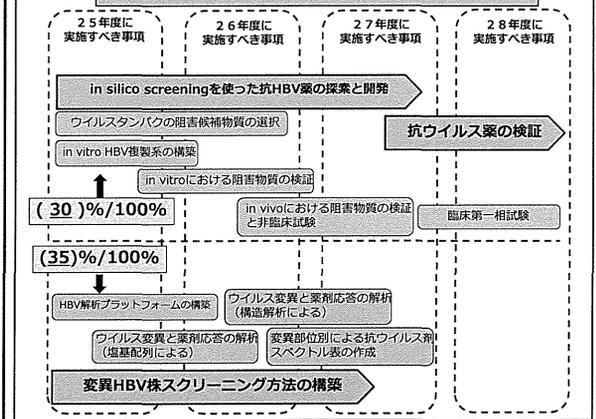
2) in vivo screeningの系

小動物を使った安全性、薬物動態
humanized chimeric uPA mouseを使った薬効動態

今年度の成果と今後の予定

- 慢性B型肝炎患者血清より次世代シーケンサーを用いてHBV全ゲノムで0.1%程度の頻度で見られるマイナークローンを検出することが可能であった。
- in silico screening系でDNA polymerase領域の阻害候補薬剤を同定した。
- 全ゲノムを対象にした薬剤耐性株の検出を行い、治療効果予測系を確立する。
- DNA polymeraseの候補薬剤のスクリーニングを行なう。
- preC/C領域とS領域タンパク重合を抑制物質の同定をin silico screeningによって同定する。
- Enamine社提供の約220万化合物に対してin silico screeningを行い、HBV関連タンパク阻害物質を平行して同定する。

工程表 (研究代表者氏名: 村上善基)



利益相反について

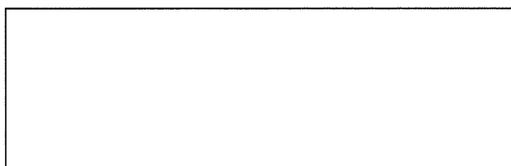
利益相反の有無等(平成25年度)

- ア 利益相反の有無 無
- イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

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）

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ない。

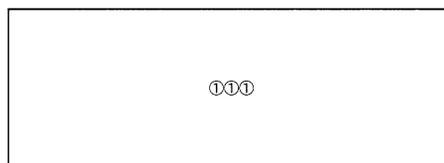


合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況（平成25年度）

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。

①①①



平成25年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：エクソソームを介したHBV感染及び発がんメカニズム解明と治療戦略

課題番号：H25-B創-肝炎-一般-019

予定期間：H25年度からH27年度まで

研究代表者：落谷孝広

所属研究機関：国立がん研究センター

所属部局：研究所・分子細胞治療研究分野

職名：分野長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 40,300,000 円

I. 研究の意義

(1) B型肝炎ウイルス(HBV)に対する治療としては、核酸アナログ製剤が主流であるが、薬剤耐性株の出現と長期間服用の副作用が問題となっていて、新規治療法が臨まれている。

(2) HBVによる感染伝播や発がんメカニズムは必ずしも明らかにされておらず、新しい創薬研究が望まれている。

(3) 最近、細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームに関心が集まり、複数のウイルス種の感染機構やウイルス依存的疾患発症メカニズムにエクソソームが仲介することが報告されている。しかしながら、HBVとエクソソームとの関わりは未解明のままである。

(4) HBV感染時に、NK細胞、NKT細胞、DC等の自然免疫系が抑制され、感染拡大につながり、また逆に、HBV慢性肝炎では、免疫系の過剰な活性化が誘導され、肝障害の増悪化やがん化につながることもある。従って、HBV感染細胞から放出されるエクソソームが、それらの免疫系細胞に作用して感染を制御している可能性が大きい。

(5) 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の感染、伝播、薬剤耐性、ならびに発がんメカニズムに、エクソソームがどのように関係しているかを解明することは緊急の研究課題である。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 細胞外分泌顆粒であるエクソソームによるHBV感染、免疫細胞制御、星細胞の活性化、および薬剤耐性メカニズム解明

(2) エクソソームによる発がんメカニズム解明

(3) HBV感染培養系を用いたエクソソームによる感染機構の解明とエクソソーム阻害による感染防御の検討

(4) HBV感染肝細胞の分泌するエクソソーム内のHBV関連タンパク質および宿主因子の同定、を実施することで、エクソソームを起点としたHBV感染とそれに由来する肝臓疾患の防御の創薬研究

(5) 上記を目標に、最終的にエクソソームを阻害する新規HBV治療薬を開発する。

Ⅲ. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) HBV-X タンパク質を発現するヒト肝細胞の分泌するエクソソームを分離・精製する事に成功した。
- (2) (1) で準備したエクソソームを、ヒト不死化星細胞の培養系に導入する系を樹立した。
- (3) (1) のエクソソームのプロテオーム解析に着手した。
- (4) (1) のエクソソームを分担研究者に供与するための大量培養系を開始した。

・研究分担者(仁科 博史)

- (1) 肝臓が内包する免疫非依存的な異常肝細胞排除機構の存在を見出した (論文準備中)
- (2) HBV 感染エクソソームに含まれる宿主因子を同定に向けて、網羅的質量分析法の構築を開始した。

・研究分担者(宮島 篤)

- (1) HBV 感染エクソソームに含まれる因子の機能解析に向けて、肝臓中の免疫細胞のセルソータによる分離法を確立した。
- (2) NK 細胞は HBV 感染への関与が示唆されている。マウス NK 細胞の新たなサブセットを見いだした (論文投稿中)。
- (3) HBV 感染エクソソームに含まれる宿主因子の肝線維化に及ぼす影響を評価するために、肝星細胞の分離培養系とその他の非実質細胞との共培養系の構築を開始した。

・研究分担者(梅村 武司)

- (1) 血清中の HBV RNA の定量系を確立して臨床検体で測定した。
- (2) HBV 感染エクソソーム内の HBV-DNA、HBV-RNA、HBs 抗原の定量を行えるようにするために検討を開始した。

:

Ⅳ. 平成 26～28 年度の課題

- (1) 初年度に解析をしたHBV感染による疾患エクソソームが、実際のHBV感染患者の血清中に存在することを梅村らが10症例程度の臨床検体を用いて検証する。
- (2) 落谷、仁科、宮島らは、疾患エクソソームに特徴的な分子群の予備的な解析を行ない、数個の標的候補分子の選択に従事する。ここで用いられる系は、全て *in vitro* の培養系であり、すでに落谷らによって確立されているエクソソームの分泌抑制の系等を駆使することで、感染性や細胞のトランスフォーム (初期のがん化) に関する知見を収集する。
- (3) マウス肝臓構成細胞の初代培養系を用いて HBV 感染エクソソームに含まれる因子の機能解析を開始する
- (4) HBV 感染エクソソーム内の HBs 抗原の定量をするために高感度 HBs 抗原測定法の改良を行い、定量を行う。(梅村)

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 厚生労働省の検討会においてB型肝炎予防・治療のための資料となることが期待される

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、
知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

現在、特に無し

VII. III(1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

本班は、研究開始から間もないため、研究全体像を示す概要図にとどめる



●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

- 1987年3月：日本学術振興会特別研究員
- 1988年9月：大阪大学細胞工学センター文部教官助手 (松原健一教授)
- 1991年4月：米国ラホヤがん研究所・ポストドクトラルフェロー (Bill Stallcup 教授)
- 1992年11月：国立がんセンター研究所分子腫瘍学部 主任研究員 (寺田雅昭 名誉総長)
- 1993年5月：同 細胞遺伝研究室長
- 1998年6月：国立がんセンター研究所がん転移研究室 独立室長
- 2003年4月：広島大学 非常勤講師
- 2005年4月：早稲田大学生命理工学部 客員教授 (兼任)
- 2008年4月：東京工業大学生命理工学部 客員教授 (兼任)
- 2010年11月：国立がん研究センター研究所分細胞治療研究分野 分野長
- 2012年4月：昭和大学歯学部客員教授、星薬科大学客員教授

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大阪大学時代：松原謙一大阪大学美代教授

海外留学時代：米国ラホヤがん研究所 (当時) William Stallcup 教授

国立がんセンター時代：寺田雅昭名誉総長

・主な研究課題

肝細胞と肝炎ウイルスの分子生物学的研究

神経細胞の分化を制御するプロテオグリカンの生理作用 (NG2 の機構解析)

FGF4 の生理学的作用解析

アテロコラーゲンによる核酸医薬デリバリー技術の開発

siRNA, miRNA によるがん治療法の開発

ES 細胞、間葉系幹細胞の肝細胞分化と細胞治療

ラット ES 細胞の樹立とノックアウトラット技術の開発

国内外に於けるエクソソームの研究者として、がん転移とエクソソームの役割、さらにはエクソソーム内のマイクロ RNA を用いた疾患バイオマーカーの研究では多くの業績を有する。

・これまでの研究実績

B型肝炎ウイルスの主題培養肝細胞への感染系の確立 (PNAS, 1988)

核酸医薬デリバリーとしてアテロコラーゲンを開発 (Nat Med, 1999; Nuc Acids Res, 2004; PNAS, 2005)

FGF 4 の生理作用に血小板産生作用を発見 (PNAS, 1994; J Clin Invest, 1995; Nat Genet, 1995)

ES 細胞や間葉系幹細胞から肝細胞を分化誘導する (Hepatology, 2003; Hepatology, 2005;

Hepatology, 2005; Hepatology, 2007; Stem Cells, 2008)

乳がん細胞の薬剤耐性を制御する ribophorinII を発見 (Nat Med, 2008)

ratLIF クローニングとラット ES 細胞の樹立 (Oncogene, 1999; PLoS ONE, 2008)

東レ (株) と血清中の microRNA 解析法の開発 (2010年10月プレスリリース)

エクソソームががん転移に関係する事を証明 (Cancer Sci, 2010; JBC, 2010; JBC, 2013)

受賞歴、表彰歴

昭和63年 井上財団研究奨励賞

平成7年 国立がんセンター 田宮賞

平成12年 日経BP技術賞 バイオ医学部門賞

平成15年 再生医療学会賞

平成16年 再生医療学会賞

平成18年 日本人工臓器学会 オリジナル賞

平成19年 IFAT国際学会優秀演題賞受賞

平成20年 BMS Award受賞

平成22年 日本薬物動態学会ベストポスター賞

エクソソームを介したHBV感染及び発がんメカニズム解明と治療戦略

解決すべき問題点

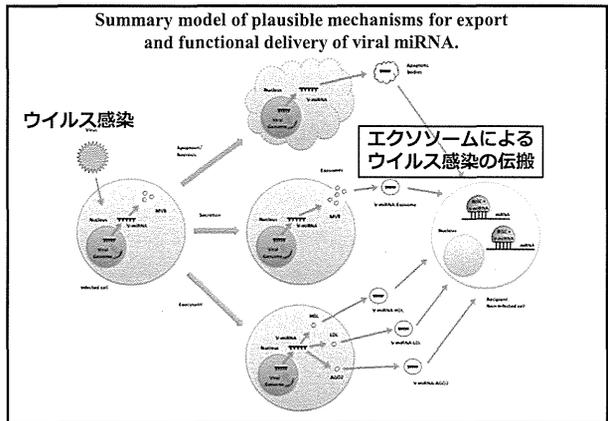
1. 細胞外分泌顆粒であるエクソソームによるHBV感染、免疫制御、線維化、薬剤耐性メカニズム解明
2. エクソソームによる発がんメカニズム解明

解決手段

1. HBV感染培養系を用いたエクソソームによる感染機構の解明とエクソソーム阻害による感染防御の検討
2. HBV感染肝細胞の分泌するエクソソーム内のHBV関連タンパク質の解明と肝線維化、発がん関連分子の同定

エクソソームによる新規HBV感染機構及び肝硬変、発がんメカニズム解明

HBV感染による肝臓疾患制御の新しい創薬の起点



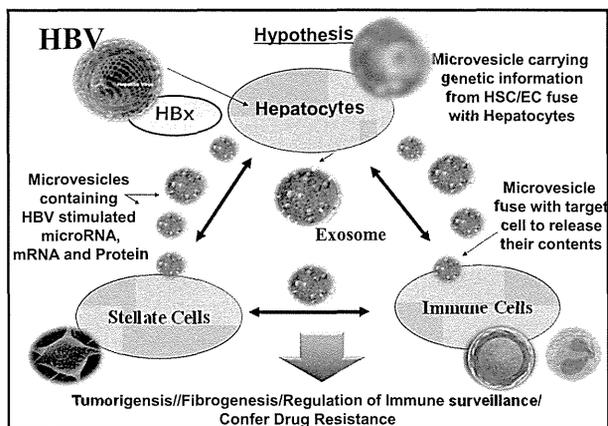
分担内容

梅村研究室
HBV感染肝細胞の分泌するエクソソーム内のウイルスマーカーを測定して病態を明らかにする。

宮島研究室
肝臓を構成する細胞の発生・分化

仁科研究室
新規的免疫抑制因子の同定

HBV感染肝細胞に由来するエクソソームの性状(プロテオーム)解析、機能解析



下野野班(分担)で作成したHepa細胞

HepG2 control culture at high density

HepG2 culture after a 2 week-treatment

HBx

HBx-Hepa-CD63-GFP cells

Exosome

- 1年間の研究成果 (平成25年12月開始~)**
- ・研究代表者(落谷 孝広)
 - (1)HBV-Xを発現するヒト肝細胞の分泌するエクソソームの分離・精製に成功した。
 - (2) (1)で準備したエクソソームを、ヒト不死化星細胞の培養系に導入する系を樹立した。
 - (3) (1)のエクソソームのプロテオーム解析に着手した。
 - (4) (1)のエクソソームを分担研究者に供与するための大量培養系構築を開始した。
 - ・研究分担者(仁科 博史)
 - (1)肝臓が内包する免疫非依存的な異常肝細胞排除機構の存在を見出した(論文準備中)
 - (2)HBV感染エクソソームに含まれる宿主因子の同定に向けて、網羅的質量分析法の構築を開始した。
 - ・研究分担者(宮島 篤)
 - (1)HBV感染エクソソームに含まれる因子の機能解析に向けて、肝臓中の免疫細胞のセルソータによる分離法を確立した。
 - (2)NK細胞はHBV感染への関与が示唆されている。マウスNK細胞の新たなサブセットを見いだした(論文投稿中)。
 - (3)HBV感染エクソソームに含まれる宿主因子の肝線維化に及ぼす影響を評価するために、肝星細胞の分離培養系とその他の非実質細胞との共培養系の構築を開始した。
 - ・研究分担者(梅村 武司)
 - (1)血清中のHBV RNAの定量系を確立して臨床検体で測定した。
 - (2)HBV感染エクソソーム内のHBV-DNA、HBV-RNA、HBs抗原の定量を行えるようにするために検討を開始した。