

A.

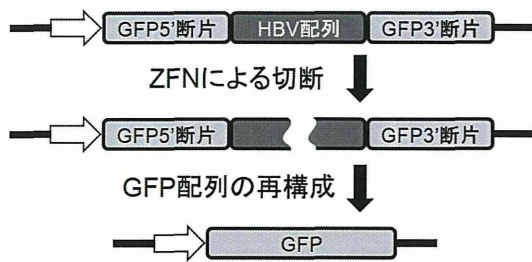


図 1 pEGxxFP プラスミド

ZFN による配列特異的切断により GFP を発現。

を作製した(*ChemMedChem* 2006; 1, 439)。ポリ
 Δ 一溶液と mRNA 溶液を混合することで粒径
 約 50 nm のナノデバイスを調整した。

3. マウス肝臓へのナノデバイスの投与

mRNA もしくは pDNA を 10 μ g 含むナノデ
 バイス溶液 1.8 ml を、Balb/c マウス(♀、8 週齢)
 の尾静脈より 5 秒間で投与した。この方法はハ
 イドロダイナミクス法と呼ばれ、静水圧の一過
 的な上昇により肝臓へ効率的に核酸を送達す
 ることができる。

4. ZFN による切断の検出

ZFN による配列特異的な切断により、GFP
 遺伝子を発現する pDNA (pEGxxFP)を用いて、
 切断活性の評価を行った(図 1)。この pDNA で
 は互いに重複配列を有する GFP 遺伝子の 5'及
 び 3'断片の間に ZFN の標的となる HBV 配列を
 配置した。HBV 配列の切断が起きると、相同
 組み換えもしくは単鎖アニーリングにより
 GFP 遺伝子配列が再構成され、切断の検出が可
 能となる。この pDNA を ZFN 発現 mRNA と合
 わせてマウス肝臓へ導入した。

C. 研究結果

1. 塩基修飾の最適化

これまでに報告されている様々な組成の
 mRNA の塩基修飾の中から 6 種類を候補とし
 て、培養細胞にレポーター mRNA を導入する
 実験を行い、それぞれの mRNA 導入効率、免
 疫原性を調べた。そこで安全かつ効率的な
 mRNA 導入が可能な塩基修飾の候補として、
 (i)100%の C を 5mC に置換したもの(5mC

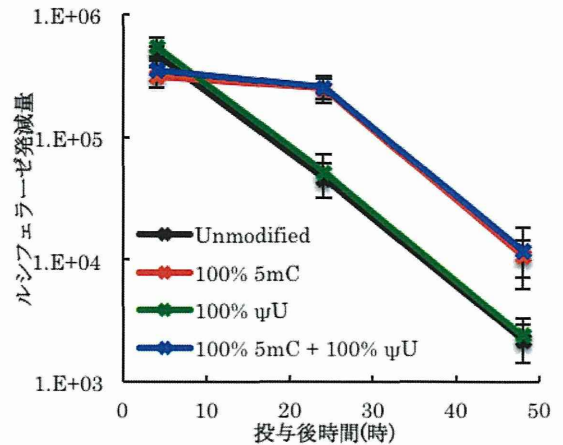


図 2 肝臓への mRNA 導入効率

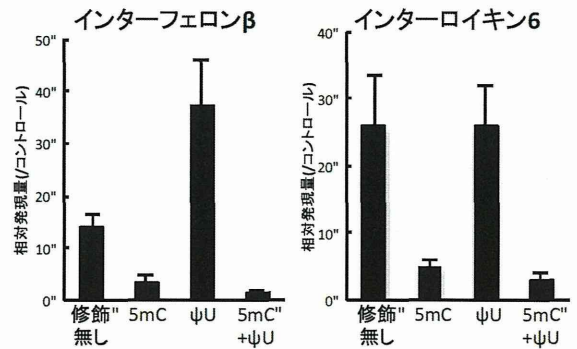


図 3 mRNA 投与 4 時間後の肝臓での炎症性因子の産生

mRNA)、(ii)100%の U を ψ U に置換したもの(ψ U
 mRNA)、及び(iii)100%の C と U の両方を 5mC、
 ψ U に置換したもの(5mC + ψ U mRNA)の 3 種類
 を選定し、以下の肝臓への *in vivo* 導入の候補
 とした。

ルシフェラーゼ発現 mRNA をレポーターと
 して肝臓での mRNA 導入効率を調べたところ、
 5mC mRNA 及び 5mC + ψ U mRNA で高い
 mRNA 導入効率を示した(図 2)。更に、投与 4
 時間後の肝臓での炎症性分子の産生を定量
 PCR 法にて調べたところ、5mC + ψ U mRNA で
 最も効果的に炎症反応が制御されていた(図 3)。
 2. 肝臓における ZFN による HBV ゲノム配列の
 切断

続いて、5mC + ψ U mRNA をナノデバイスに
 搭載し、実際に HBV ゲノム配列を標的とした
 ZFN のマウス肝臓への導入を行った。配列特

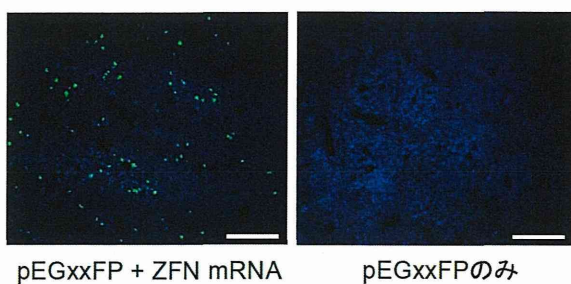


図 4 肝臓での HBV 配列の配列特異的切断
ナノデバイスを用いて ZFN mRNA を導入。
pEGxxFP(図 1)を同時に投与し切断活性を評価。

異的な切断活性の評価には、切断に伴って GFP を発現する pDNA (pEGxxFP)を用いた(図 1)。

すると、pEGxxFP と ZFN 発現 mRNA を、ナノデバイスを用いて導入した群で、肝組織中の広い領域において GFP 発現細胞が観られた(図 4)。一方で、pEGxxFP のみを投与した群ではほとんど GFP の発現が観られなかった。従って、肝臓において ZFN が HBV 配列を特異的に切断したことが示された。また、キャリアを用いずに ZFN 発現 mRNA を導入した場合は、このような配列特異的な切断は観られなかったことから(データ省略)、ナノデバイスのような適切な mRNA キャリアの必要性が示された。

D. 考察

mRNA デリバリーは、安全性の観点から ZFN をはじめとした配列特異的 DNA 切断酵素の治療を目的とした導入において注目されている。実際に、細胞移植治療において移植前に *ex vivo* で配列特異的 DNA 切断酵素を導入して遺伝子改変を行う場合、しばしば mRNA デリバリーが用いられている。一方で、*in vivo* での配列特異的 DNA 切断酵素の導入に mRNA デリバリーを用いた報告はほとんどないが、これは効果的な *in vivo* mRNA デリバリーが技術的に困難なためと考えられる。そこで、我々は肝臓への安全かつ効率的な mRNA 導入を可能とするためのシステム開発を行ってきた。

前年度までの研究で、肝臓への mRNA 導入において、我々が独自に開発したナノデバイス

を用いることで、既存の mRNA キャリアの投与や mRNA 単独投与と比較して、投与後の炎症反応を制御して、高効率に mRNA を導入することに成功した。更に今年度、ナノデバイスに搭載する mRNA の塩基修飾組成の最適化も行った。

そこで、最適化された組成の mRNA をナノデバイスに搭載して、実際に肝臓へ ZFN を導入したところ、肝臓で HBV 配列を特異的に切断することに成功した(図 4)。mRNA デリバリーによる *in vivo* での配列特異的 DNA 切断酵素の導入という点で、世界に先駆けた成果である。

今回、切断により GFP を発現するレポータープラスミドを用いた評価を行った。一方で、HBV はその感染過程で宿主肝細胞ゲノムへ組み込まれるほか、ゲノム外で完全 2 本鎖 DNA(cccDNA)として存在することが知られている。今後ゲノムへ組み込まれた配列や、cccDNA 中の配列に対する ZFN による配列特異的な切断活性を検討する。

E. 結論

最適化された塩基修飾組成を持つ mRNA を独自に開発したナノデバイスに搭載し ZFN の導入に用いたところ、マウス肝臓において HBV ゲノム配列を特異的に切断することに成功した。本システムは、ウイルスゲノム切断による B 型肝炎の根治的治療に極めて有望である。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表
 - 1) M. Baba, K. Itaka, K. Kondo, T. Yamasoba, K. Kataoka, Treatment of neurological disorders by introducing mRNA in vivo using polyplex nanomicelles. J. Control. Release 201 41-48 (2015) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.01.017)
 - 2) K. Hayakawa, S. Uchida, T. Ogata, S. Tanaka, K. Kataoka, K. Itaka, Intrathecal injection of a therapeutic gene-containing polyplex to treat spinal cord injury. J. Control. Release

- 197 1-9 (2015) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.10.027)
- 3) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8 (9) 8979-8991 (2014) (DOI: 10.1021/nn502125h)
 - 4) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (35) 12396-12405 (2014) (DOI: 10.1021/ja506194z) Selected as Spotlights of JACS
 - 5) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.041)
 - 6) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014) (DOI: 10.1002/marc.201400049)
 - 7) A. Dirisala, K. Osada, Q. Chen, T. A. Tockary, K. Machitani, S. Osawa, X. Liu, T. Ishii, K. Miyata, M. Oba, S. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka, Optimized rod length of polyplex micelles for maximizing transfection efficiency and their performance in systemic gene therapy against stroma-rich pancreatic tumors. *Biomaterials* 35 (20) 5359-5368 (2014) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.037)
 - 8) K. Nagata, K. Itaka, M. Baba, S. Uchida, T. Ishii, K. Kataoka, Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *J. Control. Release* 183 27-34 (2014) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.021)
 - 9) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.016)
 - 10) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014) (DOI: 10.1038/ncomms4545)
2. 学会発表
 - 1) K. Kataoka, "Block copolymer micelles as smart nano carriers for targeted drug delivery." 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014 (PSWC), Keynote lecture, Apr. 16, 2014
 - 2) K. Kataoka, "Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanosystems from functionalized block copolymers." ISACS15

- Challenges in Nanoscience, Plenary lecture,
Aug. 18, 2014
- 3) K. Kataoka, “Block copolymer micelles as smart nanosystems for drug targeting” The 1st International Symposium on Translational Nanomedicine, Keynote lecture, Jan. 9, 2015
 - 4) 片岡一則 「ナノ DDS 技術による均質・高付加価値な難病治療・再生医療の実現」 第3回 国際先端生物学・医学・工学会議(ICIBME 2015) 2015年1月15日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

特許出願 2 件

- 1) 「タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成物」 位高啓史、片岡一則、池上賢、内田智士、内田寛邦、長田和也 特願 2014-90634 平成 26 年 4 月 24 日
- 2) 「mRNA送達用組成物」 片岡一則、位高啓史、石井武彦、内田寛邦、内田智士、馬場美雪 PCT/JP2014/53190 2014/2/12

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 不活化を目指す新規治療法の開発

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。DNA 二重鎖切断は細胞にとり最も重篤な影響を及ぼすことが分かっており、適切な DNA 損傷応答機構を活性化し、DNA 修復を完了しなければ細胞死が誘導される。このため、本研究では人工キメラ遺伝子導入による DNA 損傷応答活性化の有無、および細胞生存率を中心に解析を行う。

A. 研究目的

平成 26 年度の研究目的は、平成 25 年度に確認した 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再確認するとともに、HBV 遺伝子挿入トランスジェニックマウスを用いて、ゲノム改変技術により生じる副作用の詳細を個体レベルで明らかにするものである。具体的には、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検討した。さらに、HBV 感染ヒト初代培養肝細胞や、HBV 遺伝子挿入トランスジェニックマウスを用いて人工キメラ遺伝子誘導による副作用について検討した。

B. 研究方法

ヒト正常線維芽細胞およびヒト初代培養肝細胞に、人工キメラ遺伝子を導入した後に起こる、DNA 損傷応答活性化、具体的には、ATM リン酸化、Chk1 リン酸化、Chk2 リン酸化、gH2AX の有無について、ウェスタンブロット法、および免疫染色法にて解析した。また、HBV 遺伝子挿入トランスジェニックマウスを用いて人工キメラ遺伝子を東京大学において

開発されたミセル化 DDS により導入し、その後肝臓および腎臓における DNA 損傷応答活性化について解析した。

C. 研究結果

ヒト正常線維芽細胞に人工キメラ遺伝子を導入しても、平成 25 年度の結果どおり DNA 損傷応答機構の活性化は見られなかった。またヒト初代培養肝細胞を用いた実験では、HBV 遺伝子挿入細胞においても人工キメラ遺伝子導入による DNA 損傷応答活性化は認められなかった。一方、HBV 遺伝子挿入トランスジェニックマウスを用いた実験では、HBV 遺伝子マウスの腎臓において gH2AX および Chk1 リン酸化を認め、見かけ上 DNA 損傷応答機構が活性化されているように見られた。現在この結果が、特異的に人工キメラ遺伝子が腎臓組織に影響を及ぼし DNA 二重鎖切断を導入しているのか、非特異的な DNA 損傷、あるいは DNA 損傷応答は不活性化の状態であるが、マーカーのみ非特異的なシグナルとして検出されているのかを解析中である。

D. 考察

HBV 挿入ヒト初代培養肝細胞を用いた実験で、人工キメラ遺伝子導入にもかかわらず DNA 損傷応答活性化が、我々の方法において検出できなかったのは、一つは感度の問題が考えられる。これについてはもう少し高感度の解析法について検討している。また人工キメラ遺伝子導入によるゲノム編集が非常に速い反応で行われている可能性も示唆される。これについては、その他の方法によりゲノム編集が実際起こっているのか検出していく予定である。一方、腎臓組織においてみられる見かけ上の非特異的な DNA 損傷応答活性化についてさらに解析していく必要があると考える。

E. 結論

人工キメラ遺伝子導入による副作用、とりわけ DNA 二重鎖切断の非特異的導入については、ヒト正常線維芽細胞、ヒト初代培養肝細胞、および HBV 遺伝子導入トランスジェニックマウス肝臓組織において見られなかった。しかしながら、HBV 遺伝子切断の効果も検出できなかったため、今後さらに高感度、あるいは別の方法を用いた DNA 損傷応答活性化についての解析を行う予定である。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

Murata K, Sato S, Haruta M, Goshima T, Chiba Y, Takahashi S, Sharif J, Koseki H, Nakanishi M, Shimada M.

Physical interaction between MPP8 and PRC1 complex and its implication for regulation of spermatogenesis.

Biochem Biophys Res Commun. 2015

Asano E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, Ozaki Y, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M.

Genotyping Analysis for the 46 C/T Polymorphism of Coagulation Factor XII and the Involvement of Factor XII Activity in Patients with Recurrent Pregnancy Loss.

PLoS One. 2014 9(12):e114452.

Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S,

Nakanishi M.

Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction.

Mol Cell. 2014 55(1):73-84.

Hirokawa T, Shiotani B, Shimada M, Murata K, Johmura Y, Haruta M, Tahara H, Takeyama H, Nakanishi M.

CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint.

Cancer Res. 2014 74(14):3880-9.

Oseto K, Suzumori N, Nishikawa R, Nishikawa H, Arakawa A, Ozaki Y, Asai H, Kawai M, Mizuno K, Takahashi S, Shirai T, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Kajiyama H, Kikkawa F, Sugiura-Ogasawara M.

Mutational analysis of FOXL2 p.C134W and expression of bone morphogenetic protein 2 in Japanese patients with granulosa cell tumor of ovary.

J Obstet Gynaecol Res. 2014 40(5):1197-204.

Goshima T, Shimada M, Sharif J, Matsuo H, Misaki T, Johmura Y, Murata K, Koseki H, Nakanishi M.

Mammal-specific H2A variant, H2ABbd, is involved in apoptotic induction via activation of NF- κ B signaling pathway.

J Biol Chem. 2014 289(17):11656-66.

2. 学会発表

平成 26 年 5 月 13 日

IIAS conference 2014 in Kyoto, Japan

Molecular coupling between DNA replication and maintenance DNA methylation

京都市木津川国際高等研究所

中西 真

平成 26 年 5 月 15 日

2014KSBMB Annual Meeting

Regulation of maintenance DNA methylation by histone H3 ubiquitylation

韓国ソウル

中西 真

平成 26 年 6 月 26 日

37th JSBG シンポジウム

Molecular mechanisms underlying induction

of cellular senescence
愛知県大府市長寿研
中西 真

平成 26 年 9 月 26 日
第 73 回日本癌学会学術総会
A time lag between activations of 2 distinct
DNA damage response determines senescence
induction
横浜市パシフィコ横浜
中西 真

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録
特になし

3. その他

RNA の品質管理と安定化

分担研究者：星野真一 所属先 名古屋市立大学大学院薬学研究科
 研究協力者：細田 直 所属先 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 の形で細胞に導入し、安定かつ高効率に発現させる』ことを本分担研究の最重要課題と位置づけ、これまでに (1) RNA 末端構造を最適化すると同時に、(2) トランスフェクトした RNA の分解経路を解明することで RNA を安定化する技術を開発し、(3) RNA への翻訳因子の繫留により翻訳を効率化する技術を開発した。本年度においては、とくに RNA の安定化技術開発に主眼をおき RNA 分解経路の全容解明を行なった。その結果、細胞内 mRNA と同様に人工合成 mRNA も翻訳と共役して分解されるが、細胞内 mRNA がポリ A 鎖分解に依存して分解されるのに対して、人工合成 mRNA は非依存性であり、エンドヌクレアーゼによる分解を起点として分解されることを明らかにした。また、細胞内 mRNA は翻訳終結因子複合体 eRF1-eRF3 が分解を引き起こすのに対して、人工合成 mRNA においてはその相同因子である GTPBP1/2-Dom34 が分解を引き起こすことも新たに見出した。GTPBP1/2-Dom34 は eRF1-eRF3 と同様にリボソームに結合する因子であり、3' -5' 分解に関わるエキソソーム-Ski 複合体やエンドヌクレアーゼと複合体を形成することから、翻訳中のリボソームにこれらの分解因子をリクルートすることで人工合成 mRNA を分解しているものと考えられる。以上のように、これら人工合成 mRNA の分解に関わる因子を標的として特異的に阻害することで、合成 mRNA を特異的に安定化することが可能となった。

A. 研究目的

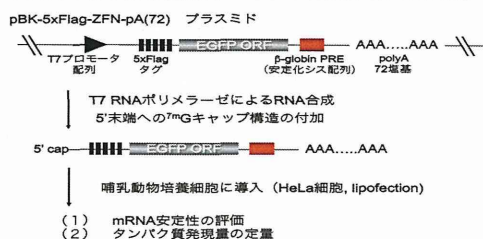
現在遺伝子治療においてはプラスミドベクターやウイルスベクターが汎用されている。しかしながら、プラスミドベクターやウイルスベクターで DNA を導入する場合には、組換えにより染色体へ挿入される可能性があり、発ガンの危険性を伴う。ウイルスベクターを用いる場合には、ウイルスが意図しない増殖能を獲得することにより、患者や医療従事者への感染リスクを伴う。一方、RNA による遺伝子導入はこれらリスクが低いと期待されるものの、RNA は細胞内で分解を受けやすく、また、転写を介した増幅効果がないため発現量が低いという欠点がある。本研究では、1. 細胞内において人工合成 mRNA を安定に維持し、2. 細胞内に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

EGFP をレポーターとして T7 RNA ポリメラー

ゼにより人工合成 mRNA を合成した。EGFP ORF の 3' 非翻訳領域(3' UTR)には β -globin mRNA の安定化シス配列を、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。また、5' 末端にはアンチリバーシキャップアナログを付加した (図 1)。合成した RNA は HeLa 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクトし、mRNA の安定性はノザンプロット法により解析した。また、タンパク質間の結合は、免疫沈降- ウェスタンブロット法により解析した。

図 1 *in vitro* 転写による mRNA の合成と安定性の評価



C. 研究結果

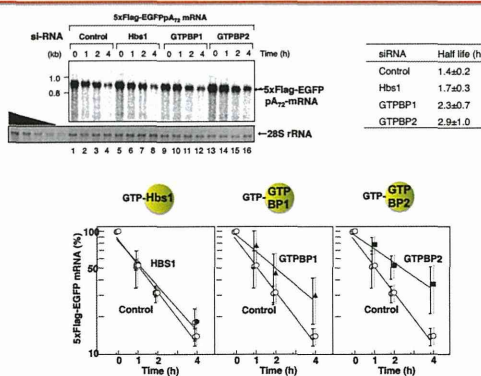
これまでの研究成果から、人工合成 mRNA の分解機構として以下のことを明らかにした。

- (1) 細胞内 mRNA と同様に翻訳阻害剤シクロヘキシミドによって安定化が観察され、翻訳依存的に分解される。
- (2) 細胞内 mRNA と異なり、ポリ A 鎖分解が観察されず、ポリ A 鎖長によって安定性が影響をうけない。すなわちポリ A 鎖非依存的に分解される。
- (3) 細胞内 mRNA においてはマイナーな 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安定化が観察される。

すなわち、人工合成 mRNA は翻訳依存的にエキソソーム-Ski 複合体によって分解される。

このような分解機構は、終止コドンのない異常な mRNA を分解する機構として知られる NSD (non-stop decay) との類似性を示している (図 3)。NSD においては、終止コドンのないため、リボソームが 3' 末端ポリ A 鎖を翻訳しポリリジン合成して mRNA の 3' 末端でストールする。そこに、Hbs1-Dom34 とよばれる翻訳因子がエキソソーム-Ski 複合体をリクルートし、mRNA の 3' 末端から 3' -5' 方向に分解が進行する。そこで、人工合成 mRNA においても Hbs1-Dom34 が関与する可能性について検討した。siRNA を用いたノックダウン実験の結果、予想に反して Hbs1 の関与は見られなかったが、Hbs1 と相同な GTPBP1/2 と Dom34 が分解に関わることが明らかとなった (図 2)。

図2 GTPBP1/2のノックダウンによって人工合成mRNAは安定化する



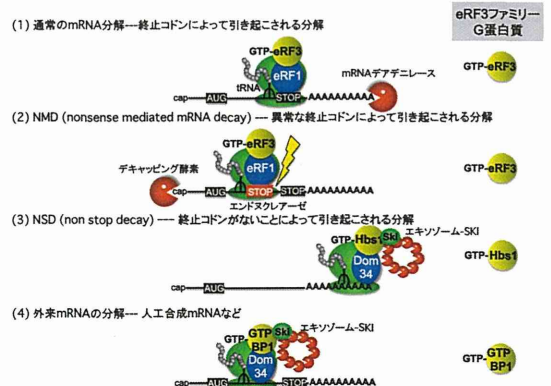
また、エキソソームだけでなく新規のエンドヌクレアーゼが分解に関わること、エキソソーム-Ski 複合体や GTPBP1/2 と Dom34 と分子複合体を形成することを免疫沈降実験により明らかにした。

D. 考察

以上の結果から、人工合成 mRNA は、細胞内 mRNA と同様翻訳に依存して分解されるが、合成 mRNA に特異的な分解機構によって分解されることを明らかにした。

図 3 に示す通り、細胞内において通常の mRNA は翻訳終結と共役して eRF1-eRF3 がポリ A 鎖分解酵素 (デアデニレーズ) を活性化し、ポリ A 鎖分解に依存して mRNA 分解が進行する (Funakoshi et al., GenesDev 2007)。また、ナンセンス変異をもつ異常な mRNA は、ナンセンス変異という異常な終止コドン上での翻訳終結と共役して eRF1-eRF3 がエンドヌクレアーゼによる分解を起点として分解が進行する。終止コドンのない mRNA は、3' 末端まで翻訳したリボソームに eRF1-eRF3 と相同な Hbs1-Dom34 がエキソソーム-Ski 複合体をリクルートし、分解が進行する (Saito et al., JBC 2013)。人工合成 mRNA においても翻訳依存性がみられ、翻訳中のリボソームに eRF1-eRF3 と相同な GTPBP1/2-Dom34 が結合し、エンドヌクレアーゼと共にエキソソーム-Ski 複合体をリクルートすることで分解が進行すると考えられる。

図3 細胞内mRNAおよび人工合成mRNAの分解機構の比較



E. 結論

以上のように、人工合成 mRNA は細胞内 mRNA と類似の翻訳依存的な分解を受け、翻訳終結因子 eRF1-eRF3 と相同な GTPBP1/2-Dom34 が分解開始において中心的役割をはたしているという mRNA 分解全般に共通するメカニズムが明らかになった一方で、GTPBP1/2 や新規エンドヌクレアーゼといった特異的な因子が関わる固有の分解機構をもつことを証明することに成功した。したがって、本研究で実証したようにこれらの特異性因子を siRNA を用いたノックダウンをはじめとする手法により阻害することで、人工合成 mRNA を安定化することが可能になった。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

(1) Yamagishi, R., Hosoda, N., Hoshino, S. (2014) Arsenite inhibits mRNA deadenylation through proteolytic degradation of Tob and Pan3. **Biochem Biophys Res Commun.** 455, 323-331.

(2) 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.** 445, 639-644.

(3) 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.

(4) 尾上耕一、星野真一：がん抑制遺伝子産物 Tob による mRNA 分解を介したがん抑制と学習記憶の調節、ファルマシア特集号『RNA 研究が切り開く薬学フロンティア』51 : 27-31 (2015)

2. 学会発表

星野真一：細胞内における人工合成 mRNA の分解機構、第 135 回日本薬学会年会、2014 年 3 月 26 日 (神戸)

星野真一：mRNA ポリ A 鎖調節および品質管理を介した高次生命機能の制御、第 3 回 CCR4-NOT 研究会、2014 年 3 月 14 日 (仙台)

星野真一：人工キメラ遺伝子 ZFN 安定発現系の構築、平成 26 年度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) 班会議、2014 年 12 月 25 日 (東京)

Fukushima, M., Wakita, E., Hosoda, N., Hoshino, S.: Control of mRNA deadenylation by apoptosis signal regulating kinase (ASK1), 4th Zing Nucleic Acids Conference, 2014 年 12 月 5-9 日 (メキシコ、カンクン)

Hashimoto, Y., Nakamura, Y., Hoshino, S.: A sRF3-targeted novel regulatory system in gene expression and apoptosis, Joint Australia and Japan RNA Meeting、2014 年 11 月 2-5 日 (オーストラリア、シドニー)

星野真一：mRNA 分解の分子メカニズムと遺伝子発現調節、自然科学研究機構生理学研究所／統合バイオサイエンスセンター部門公開セミナー、2014 年 9 月 12 日 (岡崎) 招待講演

星野真一：mRNA 分解機構の解明と人工合成 mRNA の安定化、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014、2014 年 9 月 9 日 (東京) 招待講演

西浦 久達、野木森 拓人、川島 生、細田 直、星野 真一：eRF3 ファミリーに属する G タンパク質 GTPBP1 の機能解析、

第 16 回日本 RNA 学会年会、 2014 年 7 月 23-25 日 (名古屋)

福島 真、脇田 恵里、細田 直、星野 真一：ストレスキナーゼ Ask1 による mRNA ポリ A 鎖分解の制御、第 16 回日本 RNA 学会年会、 2014 年 7 月 23-25 日 (名古屋)

稲垣 佑都、成瀬 貴文、細田 直、星野 真一：脊髄小脳変性症の原因遺伝子 Ataxin-2 は mRNA デキャッピングを促進する、第 16 回日本 RNA 学会年会、 2014 年 7 月 23-25 日 (名古屋)

野木森 拓人、西浦 久達、川島 生、細田 直、星野 真一：B 型肝炎の治療を目指した人工合成 mRNA の安定化・高効率発現系の確立、第 16 回日本 RNA 学会年会、 2014 年 7 月 23-25 日 (名古屋)

山岸 良多、杉山 遥、富田 一範、成瀬 貴文、細田 直、星野 真一：ストレス時の mRNA 安定化とストレス顆粒形成の分子機構、第 16 回日本 RNA 学会年会、 2014 年 7 月 23-25 日 (名古屋)

種類：特許

番号：特願 2014-107562

出願年月日：平成 26 年 5 月 23 日

国内外の別：国内

2. 実用新案登録

3. その他

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：人工合成 mRNA を細胞内において安定化させる方法

発明者：星野真一、細田直、野木森拓人

権利者：名古屋市立大学

種類：特許

番号：特願 2014-98133

出願年月日：平成 26 年 5 月 9 日 (12 月 26 日追加出願)

国内外の別：国内

名称：人工合成 mRNA の翻訳効率化方法

発明者：星野真一、細田直、野木森拓人

権利者：名古屋市立大学

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： 分担研究者（武富）の役割は、a) 肝細胞癌切除症例の臨床経過と試料の集積、予後解析、b) 切除肝組織からの初代培養法の確立、c) 初代培養細胞を用いた HBV 感染に対する新規治療法の効果検証、である。目標達成のためには、まず、HBV 感染症例の切除肝組織を用いて、1) 癌の初代培養、2) 非癌部細胞の初代培養、3) 前記細胞を凍結保存後の再培養、を実現しなければならない。

H25 年度までにヒト組織、臨床情報集積のためのシステムを構築した。また、1), 2) を肝炎ウイルス非感染症例、感染症例で行い、初代培養に成功した。H26 年度はヒト初代培養の件数を積み重ね、至適培養条件の検討をラット肝の細断組織片を用いて行った。ヒト肝では温阻血が 2 時間以内の症例では初代培養が可能であり、成熟肝細胞、線維芽細胞が得られた。培養経過とともに小型 (30-40 μm) で N/C 比が高く、敷石状に旺盛に増殖する細胞集団が得られた。このコロニーを選択的に培養すると、様々な大きさ、形状、分裂速度の細胞が出現し、前駆細胞あるいは多能性細胞の一種と考えられた。ラット肝でも同様の結果が得られた。この小型細胞および分化した細胞を免疫染色したが、同定には至らなかった。

ヒト、ラットの肝から分化能を有する小型細胞を分離、培養する条件を見出した。この小型細胞は同時に得られる線維芽細胞とともに凍結融解、再培養が可能であり、研究用の細胞リソースとなることが解った。肝前駆細胞からの分化誘導、あるいは、線維芽細胞からの direct re-programing、あるいは、線維芽細胞から iPS 細胞を作成するための凍結細胞ストック集積のためのシステムを構築し得た。今後、小型細胞から肝細胞への分化誘導と HBV 感染性の確認、あるいは、HBV 感染成熟肝細胞の不死化等の方法を探索し、genome に integrate された HBV を切り出す新規治療法の効果を検討する系を確立する予定である。

A. 研究目的

分担課題の目的は、a) 肝細胞癌切除症例の臨床経過と試料の集積、予後解析、b) 切除肝組織からの初代培養法の確立、c) ヒト肝細胞を用いた HBV 感染に対する新規治療法の効果検証、である。必要な時に必要な量の HBV 感染細胞を安定的に供給するためには、以下の何れかの方法が必要である。

- 1) 肝細胞あるいは肝細胞へ分化させ得る細胞を効率よく回収する、
 - a) 線維芽細胞、b) 肝前駆細胞
- 2) 肝細胞を前駆細胞に戻し増殖させる
- 3) 上記細胞の凍結融解・再培養、
- 3) 上記細胞から肝細胞を得る
- 4) 上記細胞から HBV 感染細胞を得る

B. 研究方法

ヒト切除肝からの初代培養条件の検討

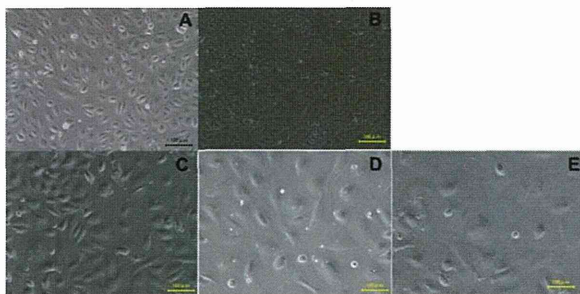
術前に書面にて承諾を得た患者を対象とし、切除肝組織の一部を培養した。肝断面の門脈断端から血液を wash out 後に、コラゲナーゼ灌流、コラゲナーゼ・プロナーゼ消化、濾過、低速遠心を繰り返して肝細胞 rich な細胞懸濁液を得た。灌流が困難な症例では、2-3mm 角に細断した組織をハサミで細切し、洗浄後に同様に処理し、細胞懸濁液を得た。分散された懸濁液をメッシュ濾過し（大きさで選別）、遠心 (90~350 x g) を繰り返して、各フラクションを培養した。同様の検討をラット肝臓でも行い、同様の所見が得られた。

C. 研究結果

[初代培養の成否] 合計 7 例の細胞分離、培養を行い、5 例で生細胞を分離、培養、維持する

ことに成功した。手術中の血管遮断開始から摘出までが2時間を超えた症例では生細胞を得ることはできなかった。一方、摘出後直ちに組織塊を臓器保存液に浸漬処理した症例では、B型肝炎症例にもかかわらず生細胞が多数培養できた。非肝炎症例（肝血管腫）では少量の組織から肝細胞を培養できた。

[初代培養細胞の性質] ある種の培養液によって細胞を20週以上に渡って維持し得た。培養中には線維芽細胞とともに数種類の細胞が増殖した。線維芽細胞の増殖抑制下で2週以上培養すると、小型の細胞（30-40 μm ）が旺盛に増殖した（図A, B）。線維芽細胞に囲まれた小型細胞を除去すると、速やかに大型（80-120 μm ）で不均一な細胞で埋められた。また、小型細胞を選択的に培養すると（図C）、やや大きい（40-60 μm ）不均一な細胞が緩徐に増殖した（図D, E）。これらの細胞は、線維芽細胞との共存によって増殖が加速された。



[初代培養細胞の凍結保存、再融解、再培養] 前記の小型細胞、線維芽細胞は凍結保存後に再融解し、培養することが可能であった。同様の所見はラット初代培養でも観察された。

D. 考察

ヒト切除肝からの初代培養の成否は血管遮断（温阻血）時間が深く関与することが示された。温虚血時間が比較的短い、肝外側区切除症例が適切と考えられた。また、安定的に多数の細胞を回収するためには、摘出肝の障害を軽減する何らかの修復法が必要と考えられた。実際、分離作業に入る前に、肝冷保存あるいは灌流保存用の液を細胞洗浄に使用すると、生細胞の回収率が向上することが示唆された。

初代培養細胞は数種類の細胞の混合状態であり、培養環境により増殖様式が大きく異なっていた。小型細胞は線維芽細胞の存在下で増殖が促進されたが、線維芽細胞の除去により増殖速度が減速し、細胞のサイズも漸増した。つまり、線維芽細胞は小型細胞の増殖と分化を制御することが示唆された。iPS細胞からの肝細胞誘導においては、Activin A, FGF2, BMP4 が関与し、肝芽細胞から肝細胞への分化には HGF, OSM が関与することが知られている。今後、小型細胞をマーカーの免疫染色や RT-PCR で確認すると共に、これらの分化誘導物質によって増殖させることも検討していきたい。

線維芽細胞、小型細胞は共に凍結ストックからの再培養が可能であったことは、肝細胞研究への利用が期待される結果である。線維芽細胞は iPS 細胞を誘導する細胞源となり、iPS 細胞から肝細胞を誘導する方法も解ってきた。一方、線維芽細胞に 2 因子を導入するダイレクトリプログラミングによって、肝細胞（様）細胞を誘導できることも報告されている。それゆえ、何れかの方法を用いれば、線維芽細胞の凍結ストックから肝細胞を得ることができる。

本（分担）課題のゴールを考慮すると、iPS や i-Hep から作成した肝細胞に HBV を感染させるよりも、究極的には HBV が integrate された肝細胞を増やし、ストックしたい。今後は成熟肝細胞を初代培養し、1) 添加因子によって増殖させる、2) 少数混在する前駆細胞を選択的に増殖させる、あるいは、3) 成熟肝細胞を不死化する、等の方法を探索し、integrate された HBV 遺伝子を切り出す、新規治療の効果を判定し得る細胞リソースを構築していく予定である。

E. 結論

ヒト、ラットの肝から分化能を有する小型細胞を分離、培養する条件を見出した。小型細胞は同時に得られる線維芽細胞とともに凍結融解、再培養が可能であり、ヒト肝細胞を誘導し得る細胞リソースになり得ると考えられた。

今後、小型細胞から肝細胞への分化誘導と HBV 感染性の確認、あるいは、HBV 感染成熟肝

細胞の不死化等の方法を探索し、genome に integrate された HBV を切り出す新規治療法の効果を検討する系を確立する予定である。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表： 欧文

1. Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Orimo T, Wakayama K, Kamachi H, Tsuruga Y, Yamashita K, Shimamura T, Todo S, **Taketomi A**. Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatology Res*. 2014 Nov 10. doi: 10.1111/hepr.12451.
2. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Ishikawa T, Kobayashi N, Kimura T, Yamashita K, Kamiyama T, Shimamura T, **Taketomi A**, Todo S. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today*. 2014 Nov 2.
3. Alam MT, Nagao-Kitamoto H, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, **Taketomi A**, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*. 2014 Oct 5. doi: 10.1111/cas.12549.
4. Sakai H, Kado S, **Taketomi A**, Sakane F. Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels. *J Biol Chem*. 2014 Sep 19;289(38):26607-17. doi: 10.1074/jbc.M114.590950. Epub 2014 Aug 11.
5. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N, Eguchi S, Fujiwara T, Ohdan H, Nagano H, **Taketomi A**, Kitagawa Y, Shimada M, Ku Y, Yanaga K, Shirabe K, Ikegami T, Mizokami M, Takeuchi M, Maehara Y. Outcomes of living donor liver transplantation for hepatitis

C virus-positive recipients in Japan: results of a nationwide survey. *Transpl Int*. 2014

Aug;27(8):767-74. doi: 10.1111/tri.12329.

6. 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. doi: 10.1093/carcin/bgt343.
2. 学会発表
- 1) **武富紹信**：「肝細胞癌に対する分子標的治療～外科医はどう使いこなすか～」．第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、京都、ランチョンセミナー（バイエル薬品）．
 - 2) **武富紹信**：「HCCに対する肝移植後管理」．第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月11日、和歌山、教育セミナー．
 - 3) **武富紹信**：「データベース報告：NCDデータに基づいた肝切除術におけるリスク評価」．第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山、パネルディスカッション．
 - 4) **武富紹信**：「肝胆膵がん」．第52回日本癌治療学会総会、2014年8月28日、横浜、Meet in PAL．
 - 5) **武富紹信**：「肝胆膵癌の標準治療」．第52回日本癌治療学会総会、2014年8月29日、横浜、教育セッション．
- 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 を破壊可能な新規薬物の開発を目指すため、肝細胞内の cccDNA 量をモニター可能なマーカーが必要である。これまでの研究で、HBs 抗原、HBcr 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、HBs 抗原に注目し、その高感度化と高感度化による臨床的意義を検討した。

新規 HBs 抗原測定系である SHQ 法を開発し、その性能を従来法、HQ 法と比較検討した。対象は従来法で HBs 抗原が消失し、その後長期間経過観察可能であった 25 例である。HBs 抗原は従来法、HQ 法、SHQ 法の 3 種類で年 1 回測定した。

SHQ 法は従来法に比較して 92% の患者で HBs 抗原の長期検出が可能であり、その最長期間は 11 年であった。同様に、HQ 法との比較では 64% の患者でより長期検出が可能であり、その最長期間は 9 年であった。SHQ 法が HQ 法に比較しても検出能力で優れてい症例ではそうでない症例に比較し肝硬変例が多い傾向がみられた (81% vs. 0%)。

以上の結果から、新規 HBs 抗原検出法である SHQ 法は、既存の測定系の中で最も高感度であり、微量の HBs 抗原検出に優れていた。さらに、HBs 抗体の存在下においても検出可能であることから、HBV cccDNA を破壊する新規薬物の効果判定に有用である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 を破壊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、HBs 抗原に注目し、その高感度化と高感度化による臨床的意義を検討した。

B. 研究方法

図 1 に現在使用されている CLEIA 法による測定系の感度と定量域を図 1 に整理した。今回開発中の SHQ 法は HQ 法の改良型であり、0.001 IU/ml の感度を目標としている。

図 2 に測定原理を示した。HQ 法と SHQ 法では、検体の前処理に海面活性剤を用いて HBs 抗原が含まれる球形粒子、管状粒子、Dane 粒子、不完全粒子などの脂質二重膜を破壊する。これにより、外側エピトープに加え、通常は隠されていて反応できない内側エピトープも利用して測定を行う。ビーズ固相抗体と ALP 標識抗体を用いて HBs 抗原を挟み、これを検出するサンドイッチ法であるが、SHQ では HQ に比べ使用する抗体の種類が多くなっている。

SHQ 測定系の臨床的意義の検討では、通常の HBs 抗原測定系にて HBs 抗原が消失した 25 例

を対象とした。対象症例の臨床的背景を表 1 に示す。性別では男性が 2/3 を占め、年齢の中央値は 58 歳と比較的高齢である。ゲノタイプは C が圧倒的に多く、肝硬変の合併が 16%、核酸アナログ使用例が 12%にみられた。HBs 抗原消失からの観察期間の中央値は 77 ヶ月で、最長 148 ヶ月であった。

HBs 抗原の測定は保存血清を用いて測定し、通常法、HQ 法、SHQ 法の 3 種類の測定系を比較検討した。

C. 研究結果

3 種類の HBs 抗原測定法による HBs 抗原消失時期別パターンを表 2 に示した。パターン 1 は従来法、HQ 法、SHQ 法で同時に消失した症例で 2 例 (8%) にみられた。パターン 2 は、従来法で最初に消失し、その後 HQ 法と SHQ 法で同時に消失した症例で 7 例 (28%) にみられた。パターン 3 は、従来法、HQ 法、SHQ 法の順で消失した症例で 7 例 (28%) にみられた。パターン 4 は、従来法と HQ 法が同時に消失し、その後 SHQ 法が消失した症例で 9 例 (28%) にみられた。通常法で陰性化した後に SHQ 法で陰性化するまでの期間は、パターン 1 を除くと 8~11 年と長期におよんだ。SHQ 法は従来法に比較して 92%の患者で長期の検出が可能であった。同様に、HQ 法との比較では 64%患者でより優れていた。各パターンの代表例を図 3 に示した。

表 3 に各消失パターン別の背景因子の比較を示した。SHQ 法が HQ 法に比較しても検出能力で優れていたパターン 3 と 4 では肝硬変例が多い傾向がみられた (0% vs. 81%)。また、年齢の中央値はパターン 4 が 54 歳であったのに対し、他のパターンでは 60 歳以上であった。

D. 考察

HBs 抗原は脂質 2 重膜上に存在し、膜の外側と内側の両側に抗原決定基が存在する。従来法による HBs 抗原測定ので外側の抗原決定基しか使用しないが、HQ 法および SHQ 法では両側の抗原決定基を使用可能である。これは、従来

法では、その測定に際し脂質 2 重膜は破壊しないのに対し、HQ 法および SHQ 法ではこれを破壊するため両側の抗原を使用することが可能となる。HQ 法では、固相抗体は内側と外側のエピトープに対するものを両方使い、ALP 標識抗体は外側のエピトープに対するもののみを用いた。一方、SHQ 法では、固相抗体と ALP 標識抗体共に、内側と外側のエピトープに対する抗体を用い、その種類を増やした。

HQ 法と SHQ 法は共に前処理で界面活性剤を使用するため、HBs 抗原が HBs 抗体と複合体を形成していてもこれを検出することが可能である。この点は、今回のような HBs 抗原消失例での測定では有利であり、HBs 抗原をより長期に検出することが可能になる。

従来法に比較し HQ 法が長期検出の観点で優れていたのは 56%と半数以上であった。従来法と SHQ 法との比較では、92%とほとんどの症例で SHQ 法の方がより長期の検出が可能であり、その期間の差は最長で 11 年であった。

HQ 法と SHQ 法の比較では SHQ 法の方が 64%で優れていた。SHQ 法の方が優れていたパターン 3 と 4 では肝硬変が 81% (13/16) にみられたのに対し、差の無かったパターン 1 と 2 では肝硬変例はなかった (0/9)。すなわち、肝硬変例で SHQ 法の性能がより発揮される傾向がみられた。しかし、その理由は不明である。

以上の結果から、SHQ 法は微量の HBs 抗原の検出に優れていること、さらに HBs 抗体の存在下においても検出可能であることから、HBV cccDNA を破壊する新薬の効果判定に有用である可能性が示唆された。

E. 結論

新規 HBs 抗原検出法である SHQ 法は、既存の測定系の中で最も高感度であり微量の HBs 抗原検出に優れていた。さらに、HBs 抗体の存在下においても検出可能であることから、HBV cccDNA を破壊する新薬の効果判定に有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

論文発表

1. Matsumoto A, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y, Umemura T, Tanaka E: Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleos(t)ide analogue treatment in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res (in press)
2. Kamijo N, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, Komatsu M, Tanaka E. Mutations of Pre-core and BCP Before and After HBeAg Seroconversion. World J Gastroenterol 2015; 21:541-548

学会発表

なし

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

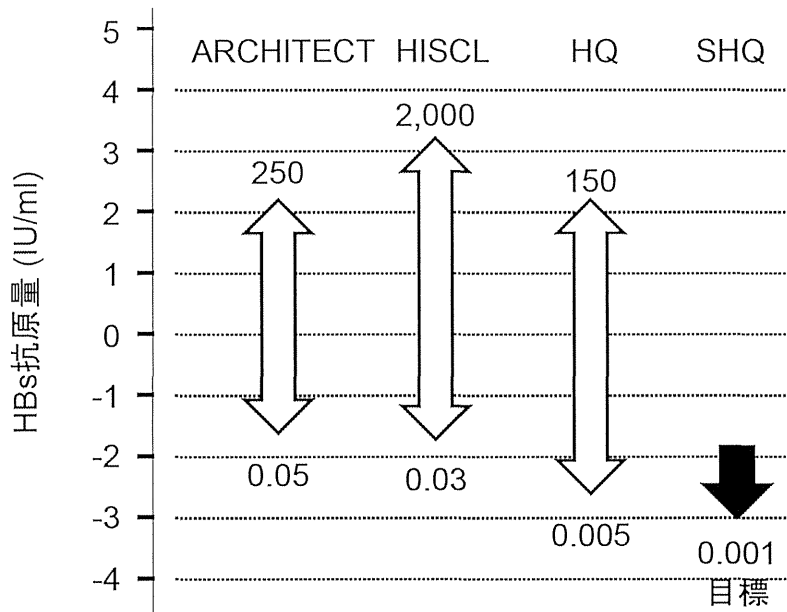


図1 HBs抗原測定法と感度・定量域

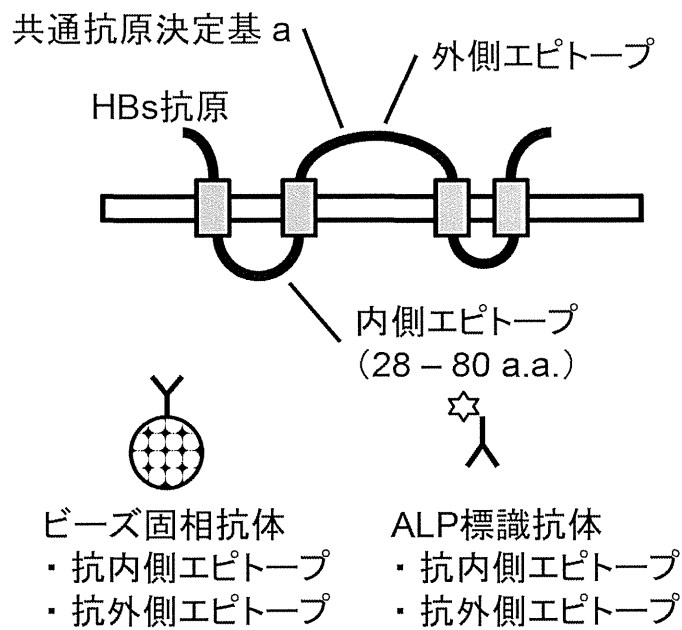


図2 SHQ法によるHBs抗原測定系の原理

表1 対象症例の臨床背景 (n=25)

性別 (男 : 女)	16:9
HBsAg消失時年齢中央値	58歳 (34-77歳)
遺伝子型 B: B+C: C: F: UD	1: 1:21 : 1: 1
LC合併例	16% (4/25)
核酸アナログ使用例	12% (3/25)
HBsAg消失からの観察期間中央値	77ヶ月 (18-148ヶ月)
HBsAg消失後のHCC発症	8% (2/25)

1998～2009年に、従来法にてHBs抗原の消失を確認した25例

表2 HBs抗原消失時期別パターンの頻度と従来法と比較した陰性化の最長時間差

HBs抗原消失時期別パターン	n (%)	通常法 ⇒ HQ法 陰性化の 最長期間差	通常法 ⇒ SHQ法 陰性化の 最長期間差
1 従来法 = HQ法 = SHQ法	2 (8%)	0 年	0 年
2 従来法 < (HQ法 = SHQ法)	7 (28%)	9 年	9 年
3 従来法 < HQ法 < SHQ法	7 (28%)	4 年	11 年
4 (従来法 = HQ法) < SHQ法	9 (36%)	0 年	8 年

		-2	0	1	2	3	4	5	従来法陰性化からの年数				
1	従来法	1120	-	180	-	-	-	-					
	HQ法	2540	-	414	-	-	-	-					
	SHQ法	3021	-	443.2	-	-	-	-					
	HBs抗体 (mIU/ml)	-	-	-	16.2	15.4	-	-					
2	従来法	120	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-
	HQ法	145	145	-	45	247	335	495	444	254	139	126	-
	SHQ法	209	241	-	353	378	451	849	599	389	194	206	-
	HBs抗体 (mIU/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	従来法	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HQ法	39	226	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-
	SHQ法	70	346	-	-	-	45	-	-	-	-	32	-
	HBs抗体 (mIU/ml)	105.1	1.2	28.1	89	72.2	88.8	116.9	97.3	-	166.8	139.6	-
4	従来法	10230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HQ法	24086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SHQ法	29443	-	-	13	-	13	-	12	-	-	-	-
	HBs抗体 (mIU/ml)	-	-	9	-	-	-	-	-	28	83	76	-

図3 HBs抗原測定法別にみた同抗原の消失パターン

表3 HBs抗原消失時期別パターン別にみた背景因子

HBs抗原消失時期別パターン	n	年齢 (歳)	性別 (男:女)	肝硬変合併	HBs抗体陽性	NA治療歴あり
1 従来法 = HQ法 = SHQ法	2	62 (56-68)	0:2	0	2 (100%)	0
2 従来法 < (HQ法=SHQ法)	7	61 (34-67)	6:1	0	6 (86%)	0
3 従来法 < HQ法 < SHQ法	7	61 (44-77)	3:4	4 (57%)	5 (71%)	0
4 (従来法 = HQ法) < SHQ法	9	54 (35-70)	7:2	9 (100%)	9 (100%)	3 (33%)