

厚生労働科学研究費補助金  
(肝炎等克服実用化研究事業 (B型肝炎創薬実用化等研究事業))  
総括研究報告書

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

研究代表者 **森屋 恭爾** 東京大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨：**

現行の治療薬とは作用機序の異なる HBV 阻害剤の開発、HBV 感染症に対する根治療法の確立は喫緊の課題である。本年度は以下の成果を得た。1) HBx トランスジェニックマウスへの statin 投与によって、CDK 阻害因子 p21 及びミトファジー阻害因子 DJ-1 の発現亢進を見出した。statin が肝発がん抑制に働く可能性が示された。培養細胞系で、statin が抗炎症因子、抗酸化因子の発現を誘導することを見出した。2) 阻害剤スクリーニングから、HBV 阻害剤候補として、Metachromin A、Berberine、Simvastatin を見出した。3) HBV プレゲノム発現を負に制御する因子 LUC7L3 を同定し HBV 調節機能を解析した。4) プロテオミクス解析より、HBV 増殖を正に制御する LRPPRC と負に制御する SRPK1 を同定した。5) 宿主 microRNA let-7 が HBV preS2 領域の mRNA の配列と高い相同性を持ち、感染細胞では HBV mRNA が let-7 のデコイとして作用する結果、本来の let-7 の機能が損なわれて細胞内環境の恒常性が攪乱され、癌化に寄与する可能性を見出した。6) 同定した長鎖ノンコーディング RNA UHG1 は、HBV 複製に伴い発現上昇を示し、HBV 複製の制御に関与し、肝硬変、肝癌において発現亢進の傾向があることを見出した。7) ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞様細胞に HBV を感染させることに成功した。8) ヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞と内皮細胞の共培養系で in vitro 肝組織モデル (IVL<sup>iPS</sup>) を樹立した。IVL<sup>iPS</sup> では NTCP 発現が亢進しており、HBV 感染感受性が示された。9) 組換えアデノウイルスを利用した高効率 HBV 複製系を作出し、簡便な HBV 定量技術を確立した。HBV ポリメラーゼをトランスに供給できる HBV 複製系を樹立した。10) 肝細胞癌切除後 statin 投与 (高脂血症治療) 群では、術後非投与群に比べ予後良好な傾向であった。

**研究分担者**

齋藤 泉	東京大学医科学研究所	教授
小池和彦	東京大学医学部	教授
國土典宏	東京大学医学部	教授
鈴木哲朗	浜松医科大学医学部	教授
北川雅敏	浜松医科大学医学部	教授
朝比奈靖浩	東京医科歯科大学	教授
森石恆司	山梨大学医学部	教授
田川陽一	東京工業大学	准教授
福原崇介	大阪大学微生物病研究所	助教

**A. 研究目的**

B型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者は全世界で三億人以上とされ、慢性肝炎から肝硬変、肝がんへ到る連鎖に苦しめられている。治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、薬剤の作用機序が限られていること、ウイルス DNA の完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。現行の治療薬とは異なる作用機序を有する

阻害剤、特に感染細胞の核内 HBV DNA を排除できる新規薬剤、HBV 肝発がん抑制剤等が開発されれば、HBV キャリアからの肝不全、肝がんの発生を防ぎ、キャリア状態の解消に繋がる。

本研究では、抗 HBV 薬スクリーニング、マウスモデルでの評価を通じて新規治療薬候補の取得を目指す。また、HBV DNA の複製制御、遺伝子発現調節の分子機構、non-coding RNA による HBV 複製制御、HBV 複製における肝細胞分化レベルの関与等を明らかにし新規創薬標的、戦略を見出す。HBV により発現変動する non-coding RNA の同定と機能解析、HBV タンパク質-宿主因子相互作用解析を行い、病態発現機構解明へ繋げる。さらに、高機能肝組織培養系を駆使し新たな HBV 増殖モデル、HBV プレゲノム高発現系等、薬剤評価に有用な実験系を作出する。また、HBV 関連症例の肝切除等手術後の補助化学療法に資する臨床研究を行う。

## B. 研究方法

### 1. 阻害剤の探索、評価

動物モデルでの評価には、ヒト肝細胞キメラマウス及び HBx 遺伝子発現トランスジェニックマウスを用いた。候補薬剤投与後、マウス血中、肝組織の HBV 発現量また癌関連遺伝子発現、また肝組織中のタンパク質発現の変動を解析した。遺伝子型 C (CAT) の core promoter/enhancer 領域遺伝子を PCR で増幅し pGL2 に組み込み、ルシフェラーゼレポータープラスミドを作製した。このレポータープラスミドを組み込んだ細胞株を樹立し阻害剤スクリーニングに用いた。

### 2. HBV 複製増殖機構の解析

HBV ゲノム DNA から core promoter/enhancer 領域遺伝子 (nt 900-1857) を Firefly luciferase レポーターベクターへサブクローン化し、転写活性測定に用いた。作成したプラスミドを Lipofectamine LTX を利用して HuH-7 細胞に導入した。ウイルス抗原の発現はウエスタンブロットで、転写活性は dual luciferase assay 系で測定した。HBV プレゲノム RNA、また宿主因子 RNA の発現は、リアルタイム RT-PCR によって定量測定した。

HBV 複製、持続感染に関与する宿主因子の

解析として、細胞の核または膜画分を調製した後、SILAC 法によって HBV 感染によって発現変動するタンパク質を網羅的に探索し、遺伝子ノックダウンによる HBV 発現変化を解析した。HBV 感染性の評価は以下のように行った。HBV 感染性粒子はテトラサイクリンを除去した HepAD38 細胞の上清より得て、PEG により濃縮したものを用いた。NTCP 安定発現細胞株 HepG2/NTCP C4 へ感染後、10 日後に HBc の発現を Western Blotting にて、rcDNA 量をリアルタイム PCR 法により評価した。

### 3. HBV 持続感染、病態発現機構の解析

HBV ゲノム複製 Huh-7 細胞を用いて HBV による長鎖ノンコーディング (lnc)RNA の発現変動を定量 RT-PCR 及びマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。lncRNA の機能解析は siRNA を用いたノックダウンし、HBV の複製能に対する影響を RT-PCR、ELISA 解析する事で行った。

HBV RNA と宿主 microRNA との相同性を in silico 解析し、HBV RNA と相互作用する可能性の高い宿主 microRNA を抽出し、その機能変化を HBV 配列発現下でのレポーターアッセイで、また標的タンパク発現をウエスタンブロット法で解析した。この変化が HBV の塩基配列と宿主の microRNA の相同性に依存していることを確認するために、HBV 配列の当該部位に複数の変異を導入したコンストラクトを作製し、特異性を確認した。標的 microRNA の過剰発現によるレスキュー実験も行った。

### 4. 新規治療技術、実験モデルの開発

ヒト iPS 細胞株に activin A、FGF、BMP4、HGF を段階的に添加することにより肝細胞系譜へと分化誘導した後、これらのうち CD13+CD133+陽性細胞を繰り返し FACS により分離することで iPS 由来肝幹/前駆細胞 (iPS-Hep 細胞) を純化した。本 iPS-Hep 細胞を用いて種々の条件下で HBV 感染実験を行った。

一方、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)ゲル上に形成した血管内皮細胞の管腔ネットワークにヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した肝細胞系譜細胞を播種して肝組織様構造 (IVL<sup>ES/hiPS</sup>) を構築した。その IVL<sup>ES/hiPS</sup> に HBV 感染性粒子を添加し、培養期間中の細胞から

プレゲノム RNA を RT-PCR 法により定量し、培地中からは放出された HBV 粒子を回収しゲノム DNA を定量した。

HBV 複製が確認されていた S 発現欠失 HBV ゲノム (kS) あるいはネガティブコントロールとして HBV のポリメラーゼコード領域を欠失した HBV ゲノム ( Pol) を CMV プロモーターから発現するアデノウイルスベクターを定法通りに作製した。kS ゲノム及び Pol ゲノムは、汎用されている 1.24 倍長と相同配列の領域を最小限に留めるように短絡した 1.03 倍長のもを構築し、ベクター作製に供した。

## 5. 肝細胞癌症例に関する臨床的解析

1997 年から 2011 年に肝切除を行った肝細胞癌患者 1486 例のうち初発で Ablation などの前治療を行っていない 682 例を対象とした。B 型、C 型、非 B 非 C 型肝炎ウイルス別、高脂血症治療薬投与別の無再発生存率や全生存率を検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

動物実験にあたっては、当該研究機関の動物実験規程に従い承認を得た上で実施した。実験動物に苦痛を与えることのないよう配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 阻害剤の探索、評価

HBx トランスジェニックマウスへの statin 投与により複数の肝臓内 autophagy 関連遺伝子および蛋白発現変化を認め、特に autophagy 阻害、発癌関連蛋白 DJ-1 の肝臓における蛋白発現が低下した。また、statin、インターフェロン、抗ウイルス剤併用により安全に HBV 増殖抑制を認めた。cccDNA の著名な減少を認めるものもあったが全体として statin 非投与群と有意な差を認めていない。

8 種類の statin ( Rosuvastatin, Atorvastatin, Compactin, Fluvastatin, Lovastatin, Pitavastatin, Pravastatin, Simvastatin ) による抗酸化、抗炎症因子の発現誘導効果を解析した。Atorvastatin, Fluvastatin, Pitavastatin, Simvastatin をそれぞれ終濃度 3  $\mu$ M で添加した HBV 複製 HuH-7 細胞では、NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 及び Nrf2 の mRNA 発現の有意な上昇が認められた。Atorvastatin, Fluvastatin, Simvastatin を 3  $\mu$ M で添加、3 日間培養したところ 25~35% の HBV プレゲノム RNA 量の低下が認められた。

海洋動物抽出物ライブラリーを用いてコアプロモーター活性抑制を指標に抗 HBV 化合物のスクリーニングを行った。252 画分を探索した結果、ヒットした 4 画分のうち 2 画分の主成分が Polybrominated diphenyl ether ( PBDE ) であった。PBDE およびその誘導体 3 化合物のウイルス粒子産生に対する影響を、HepG2.2.15 細胞を使って解析した。PBDE と一つの誘導体はウイルス産生を抑制したが (  $EC_{50}$  が数  $\mu$ M )、ともに毒性  $CC_{50}$  が 10-20  $\mu$ M を示した。さらに、海洋生物からの精製化合物表品 21 化合物をスクリーニングし、3 化合物がヒットした。低毒性で、抗 HBV 活性が高かったのが、metachromin A であり、HepG2.2.15 細胞のウイルス DNA 放出を指標に抗 HBV 活性を測定したところ、 $EC_{50}$  が 0.8  $\mu$ M で、SI 値が 19.6 であった。また、漢方由来の化合物の Berberine も HepG2.2.15 細胞に対して抗 HBV 活性を示したが、 $EC_{50}$  が 9  $\mu$ M を示した。また、Simvastatin は HBV 初期感染を抑制することが示され、 $EC_{50}$  が 5  $\mu$ M であった。preS1 ペプチドの結合を Simvastatin は阻止できなかったことから、ウイルス接着以降の過程で、Simvastatin は抗 HBV 活性を示すものとして考えられた。

### 2. HBV 複製増殖機構の解析

昨年度、質量分析によって、HBV Enhancer II/Basal core promoter ( Enh II/BCP ) 領域に結合する因子群を同定し、さらに siRNA によるノックダウン解析から、プレゲノムプロモーター活性に関与する宿主因子を選抜した。ノックダウンによって HBV 転写活性が有意に上昇する因子として LUC7-like 3 ( LUC7L3 ) を見出した。LUC7L3 のノックダウンによって HBV

遺伝子型 A 及び B のプレゲノムプロモーター活性は 2~3 倍まで上昇した。このとき、HBc 抗原の発現が実際に亢進することも遺伝子型 B で確認した。

SILAC 法により核内で発現上昇した因子を 9 種類、減少した因子を 32 種類同定した。また、膜画分でも変動した因子を 40 種類同定した。2 次スクリーニングとして HepG2.2.15、T23 および YE12 細胞を用いて、HBV 感染による遺伝子発現変動を検討し、それぞれの細胞で同じ発現パターンを示す因子として 20 種類の宿主因子を同定した。それらの因子を標的とした shRNA を作製し、ノックダウン HepG2.2.15 細胞を樹立した。20 種類の宿主因子のうち、LRPPRC をノックダウンした細胞では、細胞内および上清中のコア関連 HBV-DNA 量が有意に低下していた。LRPPRC は特定の mRNA に結合し、核から細胞質への輸送に関与することが知られているため、HBV の pregenomic RNA の輸送への関与を検討した。HepG2.2.15 および 1.28 倍長の HBV-DNA を導入した細胞において、LRPPRC の発現抑制によって、核内の pregenomic RNA の量は増加し、細胞質内で減少することが明らかとなった。以上の成績より、LRPPRC は pregenomic RNA の輸送を介し、HBV の感染性を正に制御していることが示唆された。

質量分析により同定されたコア蛋白質と結合する分子のうち、スコアの高い 12 分子に対する shRNA を作製し、ノックダウン HepG2/NTCP 細胞を樹立した。1.28 倍長のプラスミドを導入した系や、HBV の感染の系により、HBV を負に制御する因子として SRPK1 が同定された。SRPK1 のノックアウト HepG2 細胞を樹立したところ、HBV の高い複製効率が確認された。

### 3. HBV 持続感染、病態発現機構の解析

HBV の preS-2 領域の塩基配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 配列と高い相動性を持つことをデータベース検索から見出した。この相動性は本邦に多い HBV の genotype B・C ともに認められた。Let7 の機能を評価するためのレポーターと、genotype C 由来の HBV の preS-2 mRNA を発現するコンストラクト（蛋白は発現しないよう stop コドン挿入したもの）を用い、HBV preS-2 mRNA 存在下では let7 の機能が損な

われることを確認した。さらに、let7 の本来の標的因子である癌遺伝子 LIN28B の蛋白発現量が HBV preS2 mRNA 存在下では増強することを見出した。この効果は HBV preS2 の let7 認識配列に変異を入れると見られないこと、let7 を過剰発現するとレスキューされることから、HBV preS2 mRNA が宿主 miRNA である let7 の機能を抑制するためと考えられた。HBs mRNA を発現するトランスジェニックマウスでは DEN による化学肝発癌の腫瘍形成性が促進した。このことから in vivo においても HBs mRNA による腫瘍形成能の促進効果が示唆された。初代ヒト培養肝細胞に HBV を感染させることによって、let7 標的分子をはじめとする種々の遺伝子発現量の変化がみられたが、そこに HBsAg に包埋した let7 を BNC によって補充することによって、LIN28B をはじめとする HBV 感染による let7 標的分子の発現量変化をキャンセルすることが可能であることが確認できた。

これまでに HBV 複製に伴い著明な発現上昇を示す宿主細胞由来の 6 種の lncRNA (UHG1-6)、発現低下を示す 7 種(DHG1-7)を見出している。本年度は最も期待できる UHG1 を中心に機能解析を行なった。HBV 複製系では対照群(ベクター導入)と比べて 3-4 倍に UHG1 の発現が有意に亢進した。HBV 複製系において UHG1 をノックダウン(KD)すると HBV mRNA 量が抑制された。さらに、産生される HBs、HBe 抗原も UHG1 の KD で低下する傾向を示した。HBV 複製に伴い HIF1 $\alpha$  や MMP14 等の遺伝子発現が上昇するが、UHG1 の KD によりこれらの発現が抑制された。一方で、肝炎、肝硬変、肝癌患者における UHG1 の発現をマイクロアレイで解析したところ、肝硬変、肝癌において発現亢進している傾向がある事が判明した。

### 4. 新規治療技術、実験モデルの開発

肝細胞系譜へと誘導したヒト iPS 由来細胞は、AFP、HNF4a を高度に発現しており、FACS を用いて CD13+CD133+陽性細胞 (iPS-Hep 細胞) を純化することにより、一定期間の継代培養が可能であった。純化した iPS-Hep 細胞において NTCP の mRNA 発現を解析したところ、肝癌細胞株と比較して 100 倍以上の発現量を認めた。また、iPS-Hep 細胞における IFN 添加時の IFN 誘導遺伝子 (ISGs: MxA, PKR,

ISG15)の発現量誘導能はHepG2 - NTCP に比し iPS - Hep 細胞で有意に高かった ( $p < 0.001$ )。次に iPS-Hep 細胞におけるHBVの感染性を検討するために、HepG2.2.15細胞由来HBVを培養上清に添加したところ、細胞内に0.3copies/cellのcccDNAと $2 \times 108$ copies/mlのHBVDNAが上清中に確認され、HBV感染がiPS-Hep細胞において成立することが確認された。

ヒトiPS細胞を用いてアクチビンAを特定濃度で一定期間処理した後、安定的なIVL<sup>iPS</sup>を構築した。IVL<sup>iPS</sup>は2週間以上培養が可能となり、その培養期間中に肝特異的遺伝子発現や尿素合成能などの肝特異的代謝機能が上昇することを確認した。さらに、HBVのレセプターとして唯一知られているNTCPの遺伝子発現が肝癌細胞株ではほとんどなかったが、IVL<sup>hiPS</sup>においては非常に強く2週間程上昇が観られた。IVL<sup>hiPS</sup>にHBVを感染させたところ、細胞内でHBVの増殖およびHBV粒子の細胞外へ放出などHBVが感染可能であることが再確認できたとともに、少なくとも数日間はその現象が効率的に観察され、機能的なモデル構築に成功した。さらに、この*in vitro*感染システムが長期間可能になるように、IVLの構造安定性を試みた。星細胞株TWNT4またはLX2を導入したところ、内皮細胞ネットワークへ向かって遊走が認められ、その後マウス初代培養肝細胞を播種したところ、さらにネットワークへ遊走が観察された。構造的には長期間の安定が確認されたが、用いた星細胞株は増殖性が高く、一面が星細胞でおおわれることになったため、改良が望まれた。また、星細胞を導入したIVLでは、尿素産生の有意な促進は認められなかったが、アセトアミノフェンによる感受性は有意に上昇することが確かめられた。

poly(A)配列を外来のものに置き換える等の改変を加え、相同領域を1.03倍長にまで少なくした新たなHBVゲノムを構築し、AdVの作製を行った。1.24倍長と同様のPCRによる解析を行った結果、ネガティブコントロールのPoIではCCC由来のバンドは全く検出されず、kSでは1.24倍長とほぼ同程度のCCCが検出されたことから、1.03倍長を用いた場合に検出されるCCCは、ほぼ全てがHBVゲノム複製により生成した分子であり、HBVゲノム複製効率の定量には極めて有用性が高い

システムであることを明らかにした。また、肝臓由来の細胞に極めて高効率に遺伝子導入が可能でAdVとCMVプロモーターを併用した結果、定量PCRではHBVゲノム複製がベクター導入後僅か4日から確認されたことから、ハイスループット系による抗HBV薬スクリーニングシステムの開発を行い、抗HBV薬であるLamivudineやEntecavirの抗ウイルス効果を定量的かつ簡便に解析することが可能であることを示した。また、PoIゲノム発現AdVとPoI遺伝子を単独で発現するAdVを共感染した結果、kSよりは少ないもののHBVゲノム複製を確認した。

## 5. 肝細胞癌症例に関する臨床的解析

肝細胞癌に対する肝切除の成績をもとに、肝炎ウイルスの抗原・抗体別の予後を解析した。B型、C型、非B非C型肝炎ウイルス別の生存期間や無再発生存期間には差を認めなかった。非B非C型かつHBc抗体陽性41例の無再発生存率は陰性例101例に比較して有意に良好であった。しかし、これを非B非Cかつアルコール多飲歴のない90例について限定して解析したところ、HBc抗体の有無による予後の差は認められなかった。また、スタチン投与群は非投与群に比較して予後良好な傾向がみられたが検討症例数をさらに増やす必要がある。

## D. 考察

### 1. 阻害剤の探索、評価

本研究では、新規創薬標的となるHBV複製、病態機構の研究と薬剤候補物質獲得を目指す。今回HBxトランスジェニックマウスへのstatin投与によって、CDK阻害因子p21発現亢進及びマイトファジー阻害因子DJ-1の発現低下を見出した。statinが肝発がん抑制に働く可能性が示された。

statinは既に広く使用され肝炎患者においても安全性が確立されている。臨床データにおいてstatinによるHBV肝発癌抑制を示唆する報告がなされたが後ろ向き解析であり、またその機序についての基礎的考察も不十分である。本研究班で初めてstatinが肝臓抗炎症作用を発現(鈴木)、増殖抑制(森石)がデータとして得られるとともに今回発癌抑制の機序を説明しうる蛋白変化をマウスモデルで確認した。ヒトを対象とした研究

に進めるうえで statin の有用性を示唆し、かつ過去の貴重な手術検体で薬剤標的となりうるか具体的に検討できる遺伝子を見出した。

抗 HBV コアプロモーター活性やウイルス産生に対して阻害活性を示す化合物を同定した。今後 metachromin A などの誘導体や類縁化合物に対して抗 HBV 活性を検討する。また、海洋生物抽出物以外の天然物に対しても抗 HBV 活性の有無を検討する計画である。また、コアプロモーターアッセイ系を B 型肝炎創薬実用化等研究事業の他班に提供し、その細胞系による低化合物ライブラリーを用いた抗 HBV 剤探索にも協力しており、本研究から波及した成果も今後期待できる。

## 2. HBV 複製増殖機構の解析

転写調節領域に結合し、転写制御に働く宿主因子を明らかにすることは、エピジェネティックな分子機構を解明する上で非常に重要である。また、HBV Enh II/BCP 領域は、プレゲノム RNA、HBc 抗原の発現に必須であるだけでなく、HBV 関連肝発がん例でこの領域の変異が蓄積することから癌化にも関与すると考えられている。本年度、Enh II/BCP 結合し HBV 転写活性を負に制御する因子として LUC7L3 を同定した。LUC7L3 は、酵母 Luc7p のホモログであり、Luc7p は U1 snRNP splicing complex を形成するサブユニットであることが知られている。しかしながら、転写調節における機能については全くと言ってよいほど明らかにされていない。今後、HBV 転写制御における LUC7L3 の役割、分子機構を明らかにする予定である。

本研究により HBV の感染性に関与する宿主因子が同定された。LRPPRC は HBV の Pregenomic RNA が核外に輸送されるのに重要な因子であることがこれまでの結果から示唆される。今後は、ノックアウト細胞による解析に加え、LRPPRC の発現に影響する薬剤や分子を同定する。また、HBV 感染における SRPK1 の役割もさらに明らかにし、LRPPRC と同様に、発現や活性に影響する分子を同定する。

## 3. HBV 持続感染、病態発現機構の解析

細胞内の microRNA は遺伝子発現を精密に制御しており、その発現の攪乱はウイルス複

製能変化や細胞癌化といった病態に深く関わることが想定されている。これらのステップにおける肝細胞内 microRNA の役割を解析し、その発現量を調節することによって、劇的な HBV 増殖抑制、排除、病態改善が可能となりうる。今回、我々は、HBV の preS-2 領域の mRNA 塩基配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 を吸着し、その機能を攪乱する結果、肝癌でもその重要性が報告されている癌遺伝子 LIN28B の発現を増強することを確認した。これは、HBV の cccDNA から転写される preS2 mRNA 領域の存在が細胞癌化に関与していること、「HBs 抗原量が癌化と相関する」と報告されているが、実は抗原蛋白量ではなく HBV mRNA 量はその病態の本体である可能性を示唆するものである。HBV mRNA の病態形成、とくに肝発癌に関わる可能性は、今年度の in vivo モデルによる検討でも確認した。さらに、HBsAg を用いた microRNA の感染肝細胞への効率的なデリバリーは、HBV による肝発癌を抑制する可能性がある。今回用いた BNC による microRNA の肝細胞への送達は臨床応用可能な新規核酸療法として期待できるものである。いっぽう、吸着される microRNA が宿主細胞に与える影響だけでなく、ウイルス側の複製・増殖への影響を検討することで、ウイルス増殖の制御や完全排除にも応用できるかもしれない。今後さらに検討を加えていきたい。

同定された機能未知の lncRNA UHG1 は HBV の複製制御に関与している可能性が高いと考えられる。UHG1 は肝硬変、肝癌において発現亢進している傾向がある事からも分子標的としての妥当性が示唆される。今後は、UHG1 の HBV 複製への機能や UHG1 標的遺伝子、UHG1 誘導機構について解析する。この研究成果を基盤として UHG1 の発現あるいは機能を阻害する分子のスクリーニング系を構築し、化合物スクリーニングを実行することにより、治療薬候補の発見が期待できる。

## 4. 新規治療技術、実験モデルの開発

分化レベルを制御・純化することで、ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆様細胞において HBV 感染を成立させることに成功した。本 iPS-Hep 細胞は、肝癌細胞株とは異なり、IFN 添加時の ISGs 誘導能が保たれていることから、宿主自然免疫を中心としたウイルス・宿主間相

相互作用の解析が可能性であると考えられる。iPS-Hep 細胞における HBV 感染系を用いることでより生体に近い HBV 全ライフサイクルの解析と新たな創薬展開が期待できる。

IVL<sup>ES/iPS</sup>では、実際の肝臓の組織と類似した肝細胞特異的な極性シグナルを構築することができたため、類洞側の肝細胞表面に局在している NTCP の発現が誘導でき、特に 2 週間以上の発現が維持されていることから、HBV の感染・増殖が可能となったと考えられる。また、HBV 感染後に NTCP の発現が低下していく現象は大変に興味深い。用いた星細胞株は、増殖性が高く、遺伝子発現解析により、活性化されていることが確認できた。つまり、個体における肝の線維化状態に近いと思われ、肝細胞の極性は乱れていることが考えられ、NTCP の発現などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。従って、星細胞株の活性化を抑制した IVL 構築を検討する必要がある。

本研究で確立した HBV プレゲノム高度発現 AdV システムは、複製した HBV ゲノムから生成する CCC のみを特異的かつ高効率に定量可能な方法であり、HBV ゲノム複製機構の解析だけでなく、抗 HBV 薬スクリーニング法の開発にも有用性が高いことが明らかになった。しかも本法で用いている HBV ゲノムは S タンパク質の ATG を置換しているため S 非発現 HBV ゲノムとなっており、安全性も極めて高い。現在は既存薬での最終的な確認を行っているが、今後は様々なライブラリーを用いて抗 HBV 薬のスクリーニングを開始する予定である。また、HBV の Pol 欠失プレゲノム発現 AdV と Pol 発現 AdV の共感染で HBV ゲノムの複製を高効率でトランスに補完するシステムの開発に成功したため、現在コアのトランスのシステムについても検討を行っており、AdV を用いた新規遺伝子治療用ベクターについても開発を進めている。

#### 5. 肝細胞癌症例に関する臨床的解析

近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)や非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の増加に伴い、非 B 非 C 肝に発生する肝細胞癌は増加傾向にあると報告されている。しかし、非 B 非 C 肝の一部には B 型肝炎への既感染症例が含まれており、HBcAb 陽性例の予後については不明な点が多い。肝細胞癌に対する肝切

除の成績をもとに、肝炎ウイルスの抗原・抗体別の予後を解析した。

非 B 非 C 症例の 3 分の 1 にはアルコール多飲歴を認め、NASH や NAFLD など HBV, HCV 肝炎症例とは異なった背景が存在すると考えられる。HBcAb の意義については非ウイルス性肝障害の因子を除いて考慮すると予後への影響は限定されたものだった。スタチンによる発癌抑制効果が再発抑制にどの程度寄与するかは今後の検討課題である。

#### E. 結論

マウスモデル実験系で statin による HBV 発現の抑制作用、増殖阻害的な宿主因子発現変化が示された。HBV 複製細胞系、レポーターアッセイで阻害剤の探索を行い候補化合物として、Metachromin A、Berberine、Simvastatin を見出した。HBV 複製機構、HBV タンパク質発現によって変動する宿主因子を数種類同定し機能解析を行った。in vitro 肝組織モデルなど、新規技術、実験モデルの開発に新たな知見を得た。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein *Toxicol Appl Pharmacol* 237-243 2014
2. Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. *World J Gastroenterol*. 3044-9. 2014
3. Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M. Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int Immunol*. 397-406 2014
4. Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. Effect of the

- infectious dose and the presence of hepatitis C virus core gene on mouse intrahepatic CD8 T cells. *Hepatol Res* E240-E2522014
5. Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer* 2189-982014
  6. Lystad A H, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, and Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 2014;15:557-565.
  7. Kondo S, Yoshida K, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *PLoS One* 2014 9:e108627.
  8. Suzuki M, Kondo S, Pei Z, Maekawa A, Saito I, and Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene* 2015:1-9.
  9. Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. *Genome Res* 2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25653310.
  10. Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(1):1-6.
  11. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol.* 2014;49(2):173-84.
  12. Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014;5(14):5581-90.
  13. Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462-463:42-8.
  14. Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of PNPLA3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res.* 2014;44(10):E137-44.
  15. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- in Infectious Virus Production. *J Virol.* 88: 7541-7555, 2014.
  16. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. *J Virol.* 89: 2220-2232, 2015,
  17. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 95: 2658-2667, 2014.
  18. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant



- baculoviruses. **J Virol Methods** 207: 38-44, 2014.
19. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. **Biosens Bioelectron.** 58:33-39, 2014.
  20. Kotake, Y., Naemura, M., Kitagawa, K., Niida, H., Tsunoda, T., Shirasawa, S. and Kitagawa, M.: Oncogenic Ras regulates the expression of multiple lncRNAs. **Cytotechnology** in press. PMID25501747
  21. Kitagawa, K., Shibata, K., Matsumoto, A., Matsumoto, M., Ohhata, T., Nakayama, K., Niida, H. and Kitagawa, M.: Fbw7 targets GATA3 through CDK2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development. **Mol. Cell. Biol.** 34:2732-2744, 2014. PMID:24820417
  22. Fukasawa, H., Furuya, R., Yasuda, H., Fujigaki Y., Yamamoto, T., Hishida, A. and Kitagawa, M.: Anti-cancer agent-induced nephrotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** 14, 921-927, 2014. PMID:24476314
  23. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T. and Kitagawa, M. : YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. **Genes Cells** 19: 504-516, 2014. PMID: 24774443
  24. Murakawa M\*, Asahina Y\*, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kitazume-Kusano A, Watanabe T, Kawai-Kitabatake F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai N, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. \*MM and YA contributed equally to this work. Impaired induction of IL28B and expression of IFN 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. **J Gastroenterol Hepatol** 2015 doi: 10.1111/jgh.12902.
  25. Tsuchiya K\*, Asahina Y\*, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. \* These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. **Cancer** 2014; 120: 229- 273.
  26. Tsuchiya K, Asahina Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. **Liver Transpl** 2014; 20: 291- 297.
  27. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, Asahina Y, Enomoto N, Arii S, Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. **Oncology** 2014; 86: 53- 62.
  28. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. **Hepatol Res** 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421.
  29. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J,

- Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; 9: e86449.
30. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: evaluation by near infrared spectroscopy. *Hepatol Res* 2014; 44: 319- 326.
  31. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res* 2014; 44:1339-1346. doi: 10.1111/hepr.12309.
  32. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2014; 44: 720- 727.
  33. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K: Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014
  34. Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Molecules*, 19: 4006-4020, 2014
  35. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFDa, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 134: 1158-1161, 2014
  36. Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs*, 12: 462-476, 2014
  37. Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. *PLoS one*, 9: e85360, 2014
  38. Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci Bioeng.* (2014) 118:107-111, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.
  39. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存・輸送・解凍、最新動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、(株)技術情報協会、P504 ~ 508、2014 年
  40. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534

## 2. 学会発表

1. Integrated hepatitis B virus DNA is epigenomically affected by the methylation status of the human genome Hiroshi Yotsuyanagi, Yoshiyuki Watanabe, Hiroyuki Yamamoto, Ritsuko Oikawa, Shinji Tanaka, Masakazu Yamamoto, Norihiro Kokudo, Kyoji Moriya, Shigeki Arii, Fumio Itoh and Kazuhiko Koike. **2014 Single Topic conference. 2014.11**
2. Expression of Bnip3, a mitochondrial autophagy (mitophagy)-related gene, is decreased in cells expressing the core protein of hepatitis C virus. Takeya Tsutsumi, Kazuya Okushin, Kenichiro Enoku, Hidetaka Fujinaga, Hiroshi Yotsuyanagi, Kyoji Moriya, Kazuhiko Koike. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses
3. Next-generation sequencing revealed the prevalence of multi-geo/subtypic multiple infection of hepatitis C virus in hemophiliac patients in Japan. Masato Ogishi, Hiroshi Yotsuyanagi, Takeya Tsutsumi, Hiroyuki Gatanaga, Kyoji Moriya & Kazuhiko Koike. **2014 AASLD**
4. Yoshioka T, Maekawa A, Suzuki M, Kondo S, Kanegae Y, and Saito I. Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV). The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
5. Maekawa A, Pei Z, Kondo S, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
6. Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Dually safer adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes with significantly low immune responses. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
7. Suzuki M, Kondo S, Saito I, and Kanegae Y. Best insertion sites and orientation for the single and double expression unit in the adenovirus vector genome. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
8. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Kanegae Y, Nomoto A, and Saito I. Development of new methods to detect the replication HBV genome in the cells infected with adenovirus vector expressing pregenome RNA. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Virus, UCLA, Los Angeles, September 3-6
9. 近藤小貴、鈴木まりこ、前川文、斎藤泉、鐘ヶ江裕美、近藤小貴、アデノウイルス感染初期における virus-associated RNA の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
10. 鈴木まりこ、近藤小貴、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、斎藤泉、アデノウイルスベクターを用いた効率的な HBV ゲノム複製解析システムの開発：circularly closed circular DNA (CCC) の検出、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、11 月 10-12 日、2014
11. 近藤小貴、鈴木まりこ、山崎学、鐘ヶ江裕美、野本明男、斎藤泉、アデノウイルスベクターを用いた定量的 HBV 複製 ccc 及び rc ゲノム検出法の開発、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11 月 25-27 日、2014
12. 高田朱弥、大塚基之、小池和彦 HBs 抗原に依存した肝発癌機序の解明と発癌予防法の開発. JDDW 神戸 2014.
13. Kitagawa, M., Kitagawa, K. : GATA3 is a novel target for an E3 ligase SCF-Fbw7 in T-cell development. The FEBS EMBO 2014 Conference, Aug 30-Sep. 4. 2014, Paris.
14. Kitagawa, K., Kitagawa, M.: Fbw7 targets GATA3 and contributes to regulation of T-cell development. FASEB Science Research Conferences, Ubiquitin and Cellular Regulation. Jun 15-20, Saxtons River.
15. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T., Kitagawa, M. : YB-1 Promotes Transcription Of Cyclin D1 In Human Non-Small-Cell Lung. The Annual Meeting Of American Thoracic Society

- International Conference. May16-21. 2014, San Diego.
16. Uchida, C., Kitagawa, M.: Possible contribution of pRB- NuMA interaction in mitotic progression. Gordon Research Conference "Genomic Instability", Jul 6-11. 2014, Hong Kong.
  17. 原田雅教、神武洋二郎、大畑樹也、北川恭子、丹伊田浩之、松浦駿、船井和仁、梶村春彦、須田隆文、北川雅敏:非小細胞肺癌において YB-1 は cyclinD1 の転写を亢進させる 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014 年 4 月 25-27 大阪
  18. 酒井聡、井上靖道、中西真、林秀敏、北川雅敏: p53 依存的な TRB1 のタンパク質発現制御機構の解析平成 26 年度 がん若手研究者ワークショップ、2014 年 9 月 4 日、蓼科
  19. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb、柴田進和、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz: マウス ES 細胞における Xist の発現抑制機構 日本遺伝学会第 86 回大会 2014 年 9 月 17 日、長浜、滋賀県.
  20. 北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏: Fbw7 の T 細胞分化の制御における新規基質 GATA3 の分解の寄与 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 26 日 横浜
  21. 丹伊田浩行、松沼亮一、北川雅敏: DDB2 依存的 HB01 リクルートは UV により生じるシクロブタン型ピリミジンダイマーの効果的な修復に必要である 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜
  22. 内田千晴、服部隆行、山本直樹、北川雅敏、田矢洋一: RB タンパク質は紡錘体微小管の正しい配置に関わる 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜.
  23. 原田雅教、神武洋二郎、北川恭子、丹伊田浩行、梶村春彦、北川雅敏: 非小細胞肺癌において Y-box binding protein 1 (YB-1) はサイクリン D1 に直接結合し転写活性を亢進させる。第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25-27 横浜
  24. 丹伊田浩行、松沼亮一、北川雅敏: DDB2-dependent HB01 recruitment is required for efficient repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer 日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 2 日、鹿児島
  25. 北川雅敏、北川恭子: T 細胞分化過程における GATA3 の Fbw7 依存的分解の分子機構 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、京都.
  26. Chiharu Uchida, Masatoshi Kitagawa, Yoichi Taya: Possible contribution of pRB - NuMA interaction in mitotic progression. 第 19 回静岡健康・長寿学術フォーラム、2014 年 11 月 7 日、沼津.
  27. 丹伊田浩行、松沼亮一、荻朋男、森脇真一、北川 雅敏: DDB2-dependent HB01 recruitment is essential for repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、横浜
  28. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb、柴田進和、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz: 未分化 ES 細胞の Xist 発現抑制機構 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、横浜
  29. 北川恭子、柴田清、大畑樹也、丹伊田浩行、北川雅敏: T 細胞分化過程における GATA3 分解機構 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日 横浜
  30. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Gene alterations in  $\beta$ -catenin and p53/ cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
  31. Nakagawa M, Asahina Y, Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based- direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
  32. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y,

- Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN/4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
33. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Yltsui Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
  34. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Azuma S, Asahina Y, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase-14 regulates the maturation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
  35. Tsuchiya K, Yasui Y, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Clinical outcomes in patients who develop hepatocellular carcinoma after hepatitis C viral eradication by antiviral therapy. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
  36. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Yamamoto K, Sasazuki T, Sugiyama M, Seto W, Yuen M, Poovorawan Y, Ahn SH, Han K, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang J, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.
  37. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN 4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.
  38. Tsuchiya K, Yasui Y, Takada N, Nakakuki S, Matsuda S, Kaneko S, Muraoka M, Yamashita N, Hattori N, Tamaki N, Osaki S, Suzuki T, Hosokawa K, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriaminepentacetic acid magnetic resonance imaging and contrast enhanced ultrasonography with sonazoid as part of therapeutic strategies for small nonhypervascular hepatic nodular lesions. The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.
  39. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守 シンポジウム 難治性C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討第40回日本肝臓会東部会東京, 2014年11月
  40. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺 守 シンポジウム NS3およびNS5A阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル3剤併用療法の治療効果第50回日本肝臓会総会東京, 2014年5月
  41. 朝比奈靖浩 公聴会 NS3およびNS5A阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレ

- ビル 3 剤併用療法の治療効果第 50 回日本肝臓会総会東京, 2014 年 5 月
42. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守パネルディスカッション C 型慢性肝炎に対するインターフェロンをベースとしたプロテアーゼ 3 剤併用療法の治療効果と DAA 耐性変異の検討第 19 回日本肝臓会大会神戸, 2014 年 10 月
  43. 櫻井幸, 朝比奈靖浩, 渡辺 守パネルディスカッション B 型慢性肝疾患における核酸アナログ治療中の肝発癌危険因子の検討第 40 回日本肝臓会東部会東京, 2014 年 11 月
  44. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守ワークショップ 高齢者 C 型慢性肝炎への IFN 治療後発癌と発癌に関与する因子の解析第 19 回日本肝臓会大会神戸, 2014 年 10 月
  45. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守ワークショップ ウイルス性急性肝炎および de novo B 型肝炎の動向第 40 回日本肝臓会東部会東京, 2014 年 11 月
  46. 東正新, 朝比奈靖浩, 渡辺 守ワークショップ 肝細胞癌スクリーニング時における拡散強調画像陽性所見の重要性第 40 回日本肝臓会東部会東京, 2014 年 11 月
  47. 村川美也子, 朝比奈靖浩, 中川美奈, 後藤文男, 大谷賢志, 河合富貴子, 谷口未樹, 新田沙由梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 井津井康浩, 東正新, 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺 守ワークショップ C 型慢性肝炎治療における IFN 不応性に関わる IL28B 近傍遺伝子多型(SNP)と血球内 IFN 産生能の関連第 50 回日本肝臓会総会東京, 2014 年 5 月
  48. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守ワークショップ インターフェロン治療後の線維化マーカーの推移と発癌リスクの検討第 50 回日本肝臓会総会東京, 2014 年 5 月
  49. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守ワークショップ 次世代プロテアーゼ阻害剤併用 3 剤治療の適応症例の検討第 100 回日本消化器病学会総会東京, 2014 年 4 月
  50. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepacivirus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11, Banff, Canada.
  51. Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. Los Angeles, USA.
  52. 山下篤哉, 藤本雄介, 田中智久, 葛西宏威, 児玉栄一, 渡士幸一, 脇田隆字, 前川伸哉, 榎本信幸, 田中 淳一, 森石恆司, 海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日~12 日, 横浜
  53. 安本順, 葛西宏威, 土橋香織, 渡士幸一, 脇田隆字, 田中智久, 山下篤哉, 森石恆司, HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日~12 日, 横浜
  54. 田中智久, 陳文家, 乙黒光姫, 葛西宏威, 山下篤哉, 森石恆司, 日本在来馬におけるウマヘパシウイルス感染第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日~12 日, 横浜
  55. 土橋香織, 葛西宏威, 田中智久, 陳文家, 渡士幸一, 脇田隆字, 山下篤哉, 梁明秀, 岡本徹, 松浦善治, 森石恆司, トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日~12 日, 横浜
  56. 天野稜大, 山下篤哉, 葛西宏威, 田中智久, 坂本直哉, 前川伸哉, 榎本信幸, 津吹政可, 森石恆司 Tyrphostin 類縁化合物の C 型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日~12 日, 横浜
  57. Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19.Hiroshima
  58. 田川陽一: ES 細胞から *in vitro* 器官形成モデル、そして、最小ほ乳類 *in vitro* 生命システム、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)2014 年(シンポジウム)
  59. 玉井美保, 藤山陽一, 田川陽一: *In vitro* liver model derived from murine ES/iPS cells for animal use alternative: 動物実験代替を目指した *in vitro* 肝組織モデル、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)、2014 年(口頭&ポスター)

60. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏 悟 , **田川 陽一** : A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells 霊長類 ES/iPS 細胞用緩慢法凍結保存液の開発、日本組織培養学会第 87 回大会、東京(星陵会館)、2014 年(ポスター)
61. 玉井美保、酒井宏司、宮川眞一、**田川陽一** : マウス門脈結紮による肝再生モデルにおける IL-6 依存性、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)
62. 守矢 恒司、玉井美保、豊田 優、**田川 陽一** : アセトアミノフェン誘導肝障害の *in vivo* および *in vitro* モデルによる解析、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)
63. 苅谷智行、玉井美保、相川博明、**田川陽一** : ES 細胞および TS 細胞を用いたマウス胚盤胞 *in vitro* モデルにおける TLR 応答、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北海道(北海道大学)2014 年(ポスター)
64. 玉井美保、**田川陽一** : マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルにおける肝代謝能、第 21 回肝細胞研究会、東京(東京医科歯科大学)、2014 年(ポスター)
65. 守矢 恒司、玉井美保、豊田 優、**田川 陽一** : 概日リズムを考慮したアセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける急性期タンパク質による保護作用、第 21 回肝細胞研究会、東京(東京医科歯科大)、2014 年(ポスター)
66. **田川陽一**、玉井美保、藤山陽一 : 最小哺乳類 *in vitro* システムの戦略と応用、第 66 回日本生物工学会大会 シンポジウム(試験管から個体までの人工生命体研究の現状と将来)、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014 年(シンポジウム)
67. 玉井美保、藤山陽一、**田川陽一** : 流体デバイスを用いたマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデル、第 66 回日本生物工学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター)、2014 年(ポスター)
68. 竹下裕治、張本乾一、玉井美保、南隆之、荻博次、長岡紀幸、松川昭博、吉田靖弘、**田川 陽一** : QCM-D による様々な細胞種の接着と伸展の観察、第 66 回日本生物工学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター)2014 年(ポスター)
69. **Yoh-ichi TAGAWA**, Miho Tamai, Sungho Ahn, Kenji Nakashima, Masahiko Ito, and Tetsuro Suzuki : Human iPS cell-derived *in vitro* model for Hepatitis B virus infection and proliferation、2014 World Stem Cell Summit、San Antonio (Marriott Rivercenter) 2014 年 (poster)
70. Miho TAMAI, Yoichi Fujiyama, **Yoh-ichi TAGAWA** : High- and multi-functional *in vitro* liver model derived from mouse ES/iPS cells on micro-fluidic device、2014 World Stem Cell Summit、San Antonio (Marriott Rivercenter)2014 年 (poster)
71. 玉井美保、藤山陽一、**田川陽一** : マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルの肝細胞極性、第 9 回「長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方)2015 年(口頭)
72. **田川陽一**、玉井美保、守矢恒司、藤山陽一 : 人工哺乳類システム、第 9 回「長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方)2015 年(口頭)
73. 守矢恒司、玉井美保、豊田優、小松銀河、**田川陽一** : アセトアミノフェン誘導肝障害 *in vivo* モデルにおける概日リズムの影響、第 9 回「長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して」、長野(ラフォーレ倶楽部白馬八方)2015 年(口頭)
74. **田川陽一**、玉井美保、藤山陽一 : 最小哺乳類 *in vitro* モデルの構築と応用-ES/iPS 細胞を用いた試み-、第 14 回分子予防環境医学研究会、大阪(大阪市立大学)2015 年(特別講演)
75. **田川陽一**、玉井美保、藤山陽一 : 再生医学研究オーバービュー - ES 細胞から分化細胞、組織、そして、生命システム シンポジウム「細胞を創る」研究会 7.0、東京、2014 年(シンポジウム)
76. **田川陽一** : B 型肝炎感染・増殖 *in vitro* システム、イノベーションジャパン 2014、東京(ビックサイト)、2014 年(ポスター)
77. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
78. Chikako Ono, **Takasuke Fukuhara**, Mai

Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014

79. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
80. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

## H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
1. 複数のユニットが多重に連結した DNA カセットおよび該カセットをを含むベクターの製造方法 特願 2014-242914
  2. 名称：細胞培養デバイス、細胞培養システム、及び細胞培養方法、 発明者：藤山陽一、田川陽一、権利者：株式会社島津製作所、東京工業大学、種類：特許、特許第 5686310
  3. 名称：肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワnkチンの製造方法、スクリーニング方法、およびキット発明者：田川 陽一、玉井 美保、アン ソンホ、鈴木 哲朗、伊藤 昌彦、中島 謙治 権利者：東工大、浜松医科大 種類：特許 番号：特願2014-52754 出願年月日：2014年03月14日 国内外の別：国内

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし