201423046A

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）

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

平成26年度　総括･分担研究報告書

研究代表者　落谷　孝広

平成 27（2015）年　4 月

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）

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

平成26年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　落谷　孝広

平成27（2015）年　4月

目　　　　次

Ⅰ．総括研究報告
　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 ---------------- 1
　　落谷　孝広

Ⅱ．分担研究報告
　1. 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 ------------- 7
　　仁科　博史

　2. エクソソーム由来宿主因子の細胞増殖分化能の解明 ------------------------------------ 11
　　宮島　篤

　3. エクソソーム内のHBVマーカーの測定-- 15
　　梅村　武司

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表--- 17

Ⅳ．研究成果の刊行物--- 19

Ⅰ．総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者　落谷　孝広　国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

研究要旨
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。本研究では，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に注目し，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。本研究課題から創出される可能性の有る治療薬は、エクソソーム阻害剤による肝炎の抑制剤、あるいは星細胞の活性化を抑制するマイクロRNA阻害剤などである。初年度、２年度の基礎研究成果からは、B型肝炎感染肝細胞から分泌されるエクソソームに、星細胞の活性化を促し、ひいては肝臓の線維化を誘導する能力が有る事を明らかにした。この事実に基づくと、エクソソームの分泌を阻害しうる薬剤は、B型肝炎治療薬そのものであり、すでに主任研究者らが見いだしているエクソソームの分泌経路を阻害する因子（複数の候補）がその可能性を十分に有している。さらに、エクソソーム中のマイクロRNAの情報を精査する事で、星細胞の活性化を直接制御するメカニズム解明を急いでおり、そのマイクロRNAそのもの、あるいはマイクロRNAによって制御される因子に対する拮抗剤、阻害剤などが、新たな創薬の候補である。

A．研究背景、目的

（背景）

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。しかし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。

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。

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。

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。

B．研究方法

(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。

（倫理面への配慮）

本研究で使用する細胞は，いずれもインフォ

ームドコンセントのもとに倫理審査を得て採取され，市販されているヒト肝細胞や株化された星細胞であるため、倫理的な問題点はない。

C. 研究結果

・研究代表者（落谷 孝広）

(1) HBV-感染肝細胞に由来する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とエクソソーム回収、精製方法の構築を達成した。

(2) HBV 感染および複製に由来するエクソソーム中に存在するマイクロ RNA の網羅的解析を終了した。

(3) HBV 感染後のエクソソーム中には、星細胞を活性化する可能性の有るマイクロ RNA 群が多量に含まれる事が判明した。

(4) 培養したヒト星細胞株にエクソソームを導入した結果、星細胞の活性化指標となる遺伝子群の発現が上昇した事から、感染後の肝細胞からは、星細胞活性化に寄与するエクソソームが分泌される事が明らかとなった。

(5) さらに、同様の感染細胞が分泌するエクソソームは、正常の肝細胞の増殖を促進する効果がある事も明らかとなった。

・研究分担者(仁科 博史)

HBV 感染細胞からのエクソソームの調製は順調に進んだ。一方、エクソソームに HBV 粒子が混入するという問題に直面し、密度勾配遠心法による精製のステップを導入し、この問題を解決した。また、この研究の過程で、肝臓サイズ制御と肝がん発症を誘導する転写共役因子 YAP と関与の可能性が示唆された。

・研究分担者(宮島 篤)

マウスの骨髄から誘導したマクロファージに miR-20a と miR-４５１、そのネガティブコントロールを導入して、TLR の ligand（LPS, poly IC, CpG）で刺激を行い、その上清中に分泌されたサイトカイン、IL-6 と TNFa の定量解析を行った。その結果、IL-6 の産生に関しては一定の傾向は見られなかったが、TNFa の産生に関してはどちらの microRNA を導入しても抑制される傾向が得られた。同様に肝星細胞に microRNA を導入し、線維化関連遺伝子の発現変化を調べた。miR-２９を導入したヒト肝星細胞株ではネガティブコントロールに比して collagen1a1 や Timp 1 が低下する傾向が認められた。また、エクソソームの肝臓における標的となりうる肝臓の自然免疫系細胞、星細胞、類洞内皮細胞、肝炎に付随して増殖する肝前駆細胞の性状解析もあわせて行った。その結果、クッパー細胞と星細胞が相互作用して線維化に関与する可能性が示唆された。また、肝前駆細胞が胆管から発生する可能性も示された。

・研究分担者(梅村武司)

血清中 HBV RNA は検出可能であり、希釈サンプルを用いて検出感度を決定したところ 10^2〜10^9 copies/mL の範囲で測定可能であった。同じ系で測定可能である HBV DNA も同様に 10^2〜10^9 copies/mL であった。

HBV DNA と HBV RNA の混合試験を行うと DNAse 処理後の RT-PCR では HBV RNA のみが測定可能であった。

HBs 抗原の測定については通常法よりも感度が 10 倍改善された。これは HBs 抗体過剰状態であっても測定が可能であること、更に、HBs 抗原変異の影響を受けにくいためであると考えられた。以前の系で HBs 抗原消失症例と考えられていた検体を経時的に測定すると陽性である症例があることが判明した。

D. 考察

１）初年度、２年時の研究結果から、本課題の主眼のひとつである、完全後の肝細胞から放出されるエクソソームが、星細胞の活性化に重要な役割を持つ事を実証で来た成果は大きい。最終的な目的である、創薬に向けて、エクソソーム阻害という明確な標的が明らかとなった。

２）HBV 感染細胞からはエクソソームに加えて、HBV 粒子も放出され、この混入の評価をする必要が生じた。エクソソームに含まれる宿主因子の同定という当初の目的解明に加えて、エクソソームの有効性を評価する

上でも定量的な解析が必要である。

３）エクソソーム内で発現が見られた microRNA を導入すると、マクロファージによる TNFa の産生が抑えられた。肝臓内にはクッパー細胞と呼ばれるマクロファージが豊富に存在し、肝臓内の免疫反応の中枢を担っていると考えられる。また TNFa は肝細胞に対してアポトーシスを誘導することがよく知られている。よって、エクソソームによりクッパー細胞からの TNFa の産生が抑制されて、肝細胞のアポトーシスが抑制されている可能性が考えられる。また今回見られた miR-29 のヒト肝星細胞に対する抗線維化作用は既報と一致する結果であった。さらに、肝線維化におけるクッパー細胞と星細胞の相互作用が重要であるとの結果も得られつつあり、星細胞のみならず各種の肝非実質細胞に対する HBV 感染細胞由来のエクソソームの作用の解析も視野に入れる必要がある。また、HBx が肝前駆細胞に作用する可能性を示唆する報告があり、肝前駆細胞への作用にも興味が持たれる。

４）血清中の HBV RNA と HBV DNA を定量する系を確立した。測定範囲はそれぞれ 10^2～10^9 copies/mL であった。HBs 抗原の測定系も感度、測定範囲とも十分であり、今後エクソソーム内の HBV ウイルスマーカーの測定系として使用可能と考えられる。

E. 結論

１）エクソソーム中のマイクロ RNA の情報を精査する事で、星細胞の活性化を直接制御するメカニズム解明を急いでおり、そのマイクロ RNA そのもの、あるいはマイクロ RNA によって制御される因子に対する拮抗剤、阻害剤などが、新たな創薬の候補である。

２）密度勾配遠心法のステップを精製過程に導入することで、HBV 感染細胞から放出されるエクソソームから HBV 粒子を除くことが可能になった。宿主因子の同定が期待される。

３）セルソーターにより分離した肝臓の構成細胞やヒト細胞株に対して、エクソソーム内因子である microRNA を導入する実験系を確立した。また、導入した細胞の性状解析を行い、免疫反応や免疫細胞に対する感受性、細胞増殖能、線維化などを解析する系が確立された。

４）HBV RNA と HBs 抗原測定系を確立した。来年度以降はエクソソーム内の HBV RNA DNA の測定を行い、病態における意義について検討を行う予定である。

成果の概要を図に示す

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Naito Y, **Ochiya T**. MicroRNA and Hepatitis B, in Book Title: microRNA: from molecular biology to clinical practice", Springer, in press
2. Katsuda T, Ikeda S, Yoshioka Y, Kosaka N, Kawamata M, **Ochiya T**. Physiological and pathological relevance of secretory microRNAs and a perspective on their clinical application. ***Biol Chem***, 395:365-373, 2014
3. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, **Ochiya T**, Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses. In: Babashah S (ed), MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. Switzerland, Springer, pp 155-182, 2014
4. Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia,

Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. ***Nature*** in press (*Corresponding authors)

5. Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima (2015) Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 457, 493-499.
6. Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2014) The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. ***PLoS ONE*** 9, e97365
7. Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2014) The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 443, 917-923.
8. Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi, Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata (2014) Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. ***Mol. Cell. Biol.*** 34, 1607-1621.
9. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki (2014) Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1- phosphate signaling in zebrafish embryo. ***J. Biochem.*** 155, 235-241.
10. Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto, Yuko Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida (2014) [review] Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells.. ***Tissue Engineering Part B: Reviews*** 20, 1-5.
11. Yagai T, Miyajima A and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *American J. Pathology* 184(8):2250-2259, 2014.
12. Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N and Miyajima A. Mature resting Ly6C^{high} natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur. J. Immunology*.44(9):2638-2647, 2014.
13. Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A and Itoh T. Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology* in press.
14. 1. Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of HBeAg-negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res 2014;44:E45-53.
15. Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E. Serum levels of Interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B. Hepatol Res 2014;44:E172-80.

2. 学会発表

1. 落谷孝広「マイクロ RNA による肝疾患の新しい理解と治療戦略」第 8 回東京肝疾患研究会（PERFECT（2014.6.14　東京）
2. 落谷孝広「小分子化合物による成体肝細胞のリプログラミング第 21 回肝細胞研究会（2004.6.28　東京）
3. 落谷孝広「HBV 感染を制御するマイクロ RNA の解析」HBV キャンプ in Aichi 2014 (2014.8.5　愛知)
4. 落谷孝広「リプログラミングによる肝臓の再生と疾患治療」第 6 回中国肝臓病研究会 (2015.3.7　岡山)
5. 仁科博史；器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[神戸大学医学部セミナー；2014 年 1 月 10 日／神戸]
6. 仁科博史；Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis[熊本大学 HIGO Program；2014 年 2 月 12 日／熊本]
7. 内田好海、仁科博史；マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明［第 20 回日本肝臓医生物学研究会；2014 年 2 月 15 日／東京]
8. 有馬誉恵、仁科博史；マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析［第 134 回日本薬学会；2014 年 3 月 27-30 日／熊本]
9. Ruoxing Yu and Hirohi Nishina；Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs using murine ES cell-derived 3D culture system［第 134 回日本薬学会；2014 年 3 月 27-30 日／熊本]
10. 仁科博史;器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[東京女子医科大学セミナー；2014 年 5 月 29 日／東京]
11. 内田好海、仁科博史；スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明［第 13 回生命科学研究会;2014 年 6 月 20-21 日／札幌]
12. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析［第 13 回生命科学研究会；2014 年 6 月 20-21 日／札幌]
13. 宮村憲央、仁科博史；成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 21 回肝細胞研究会；2014 年 6 月 27-28 日／東京]
14. 内田好海、仁科博史；スタチン催奇性の分子機構の解明[第 21 回肝細胞研究会；2014 年 6 月 27-28 日／東京]
15. 仁科博史；器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割[第 23 回日本 Cell Death 学会；2014 年 7 月 18-19 日／東京]
16. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析［第 23 回日本 Cell Death 学会；2014 年 7 月 18-19 日／東京]
17. 浅岡洋一他；Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会；2014 年 7 月 28 日～8 月 1 日／札幌]
18. 濱部凛他；ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *Per2* と *Cry1a* の解析［第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム;2014 年 9 月 20-21 日／富山]
19. 浅岡洋一、仁科博史；Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会；2014 年 9 月 20-21 日／東京]
20. 平山順他；Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish.［第 20 回小型魚類研究会;2014 年 9 月 20-21 日／東京]
21. 濱部凛他；ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *zPer2* および *zCry1a* の解析［第 3 回修飾シグナル病若手ワークショップ;2014 年 9 月 30-10 月 2 日／湯河原]
22. 宮村憲央、仁科博史；Hippo シグナル系破

綻によって誘導されるマウス肝細胞の動態の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会；2014 年 10 月 4-5 日／静岡]
23. 仁科博史；スタチン催奇性誘導機構の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会；2014 年 10 月 4-5 日／静岡]
24. 仁科博史；成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 87 回日本生化学会大会；2014 年 10 月 15-18 日／京都]
25. 平山順他；ゼブラフィッシュ概日リズムの光同調を担うシグナル経路の解析［第 21 回日本時間生物学会学術大会;2014 年 11 月 8-9 日／福岡］
26. 浅岡洋一、仁科博史；Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構［第 7 回 RRM；2014 年 11 月 22 日／東京]
27. 仁科博史；がん原遺伝子産物 YAP 依存的肝細胞消失を誘導する新規マウスモデルの確立[第 37 回日本分子生物学会；2014 年 11 月 25-27 日／横浜]
28. 浅岡洋一、仁科博史；網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割[第 37 回日本分子生物学会；2014 年 11 月 25-27 日／横浜]
29. 仁科博史；細胞内シグナル伝達系[秋田大学医学部セミナー；2014 年 12 月 12 日／秋田]
30. Matsuda M, Tanaka M, and Miyajima A. Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M. FASEB Summer Research Conferences / Liver Biology: Fundamental Mechanisms and Translational Applications. Keystone Resort (U.S.A.) 2014.7.6-11
31. 松田道隆、田中稔、宮島篤　オンコスタチンMによるマウス肝繊維化促進機構の解析　第 28 回肝類洞壁細胞研究会学術集会　アークホテル岡山（岡山市）：2014.12.13
32. 木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤 Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo 第 43 回日本免疫学会学術集会　国立京都国際会館（京都市）：2014.12.10
33. 神元健児、伊藤暢、宮島篤　単一細胞系譜追跡系による胆管上皮の heterogeneity の解析　第２１回　肝細胞研究会　東京医科歯科大学：　2014.6.28
34. 伊藤暢、金子洸太、神元健児、勝又廉、岡田甫、宮島篤　胆管系の構造と機能の可視化　第２１回　肝細胞研究会　東京医科歯科大学：　2014.6.28
35. Kaneko K, Itoh T, Miyajima A.Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries.FASEB Summer Research Conferences / Liver Biology: Fundamental Mechanisms and Translational Applications　Keystone Resort (U.S.A.)：2014.7.8
36. 松本晶博、梅村武司、田中榮司：「B 型慢性肝炎の核酸アナログ中止における Peg-IFN シークエンシャル投与の安全性と効果」、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月 29 日～30 日

G．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
1.特許取得
特になし。
2.実用新案登録
特になし。
3.その他
特になし。

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

エクソソームを介したHBV感染及び発がんメカニズム解析と治療戦略

研究分担者　仁科 博史　東京医科歯科大学

研究要旨

【目的】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。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対策を考案することを目的とした。

【方法】HBVを発現するヒト培養細胞から放出されるエクソソームを回収し、その後、１次元あるいは２次元電気泳動法によって、HBV非感染細胞由来のエクソソームと比較することで、HBV感染特異的なエクソソームに含まれる宿主タンパク質の同定を行う。

【成績】HBV感染細胞からのエクソソームの調製は順調に進んだ。一方、エクソソームにHBV粒子が混入するという問題に直面し、密度勾配遠心法による精製のステップを導入し、この問題を解決した。

【考案】HBV感染細胞からはエクソソームに加えて、HBV粒子も放出され、この混入の評価をする必要が生じた。エクソソームに含まれる宿主因子の同定という当初の目的解明に加えて、エクソソームの有効性を評価する上でも定量的な解析が必要である。

A.研究目的

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。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対策を考案することを目的とした。

B.研究方法

HBVを発現するヒト培養細胞から放出されるエクソソームを回収し、その後、１次元あるいは２次元電気泳動法によって、HBV非感染細胞由来のエクソソームと比較することで、HBV感染特異的なエクソソームに含まれる宿主タンパク質の同定を行う。

C.研究結果

HBV感染細胞からのエクソソームの調製は順調に進んだ。一方、エクソソームにHBV粒子が混入するという問題に直面し、密度勾配遠心法による精製のステップを導入し、この問題を解決した。また、この研究の過程で、肝臓サイズ制御と肝がん発症を誘導する転写共役因子YAPと関与の可能

性が示唆された。

D.考察

HBV 感染細胞からはエクソソームに加えて、HBV 粒子も放出され、この混入の評価をする必要が生じた。エクソソームに含まれる宿主因子の同定という当初の目的解明に加えて、エクソソームの有効性を評価する上でも定量的な解析が必要である。

E.結論

密度勾配遠心法のステップを精製過程に導入することで、HBV 感染細胞から放出されるエクソソームから HBV 粒子を除くことが可能になった。宿主因子の同定が期待される。

F.研究発表

1.論文発表

1. Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. ***Nature*** in press (*Corresponding authors)

2. Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima (2015) Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 457, 493-499.

3. Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2014) The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. ***PLoS ONE*** 9, e97365

4. Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2014) The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 443, 917-923.

5. Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi, Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata (2014) Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. ***Mol. Cell. Biol.*** 34, 1607-1621.

6. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki (2014) Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme,

enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1- phosphate signaling in zebrafish embryo. ***J. Biochem.*** 155, 235-241.

7. Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto, Yuko Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida (2014) [review] Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells.. ***Tissue Engineering Part B: Reviews*** 20, 1-5.

2.学会発表

1. 仁科博史;器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態 [神戸大学医学部セミナー;2014 年 1 月 10 日/神戸]
2. 仁科博史;Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis[熊本大学 HIGO Program;2014 年 2 月 12 日/熊本]
3. 内田好海、仁科博史;マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明[第 20 回日本肝臓医生物学研究会;2014 年 2 月 15 日/東京]
4. 有馬誉恵、仁科博史;マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析[第 134 回日本薬学会;2014 年 3 月 27-30 日/熊本]
5. Ruoxing Yu and Hirohi Nishina ; Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs using murine ES cell-derived 3D culture system[第 134 回日本薬学会;2014 年 3 月 27-30 日/熊本]
6. 仁科博史;器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態 [東京女子医科大学セミナー;2014 年 5 月 29 日/東京]
7. 内田好海、仁科博史;スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明[第 13 回生命科学研究会;2014 年 6 月 20-21 日/札幌]
8. 浅岡洋一、仁科博史;器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析[第 13 回生命科学研究会;2014 年 6 月 20-21 日/札幌]
9. 宮村憲央、仁科博史;成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 21 回肝細胞研究会;2014 年 6 月 27-28 日/東京]
10. 内田好海、仁科博史;スタチン催奇性の分子機構の解明[第 21 回肝細胞研究会;2014 年 6 月 27-28 日/東京]
11. 仁科博史;器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割[第 23 回日本 Cell Death 学会;2014 年 7 月 18-19 日/東京]
12. 浅岡洋一、仁科博史;器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析[第 23 回日本 Cell Death 学会;2014 年 7 月 18-19 日/東京]
13. 浅岡洋一他;Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell

differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会；2014 年 7 月 28 日～8 月 1 日／札幌]

14. 濱部凛他；ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *Per2* と *Cry1a* の解析 ［第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム;2014 年 9 月 20-21 日／富山］
15. 浅岡洋一、仁科博史；Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会；2014 年 9 月 20-21 日／東京]
16. 平山順他；Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish. ［第 20 回小型魚類研究会;2014 年 9 月 20-21 日／東京］
17. 濱部凛他；ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *zPer2* および *zCry1a* の解析 ［第 3 回修飾シグナル病若手ワークショップ;2014 年 9 月 30-10 月 2 日／湯河原］
18. 宮村憲央、仁科博史；Hippo シグナル系破綻によって誘導されるマウス肝細胞の動態の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会；2014 年 10 月 4-5 日／静岡]
19. 仁科博史；スタチン催奇性誘導機構の解析[第21回日本肝臓医生物学研究会;2014 年 10 月 4-5 日／静岡]
20. 仁科博史；成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 87 回日本生化学会大会；2014 年 10 月 15-18 日／京都]
21. 平山順他；ゼブラフィッシュ概日リズムの光同調を担うシグナル経路の解析 ［第 21 回日本時間生物学会学術大会;2014 年 11 月 8-9 日／福岡］
22. 浅岡洋一、仁科博史；Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構 [第 7 回 RRM;2014 年 11 月 22 日／東京]
23. 仁科博史；がん原遺伝子産物 YAP 依存的肝細胞消失を誘導する新規マウスモデルの確立[第37回日本分子生物学会;2014 年 11 月 25-27 日／横浜]
24. 浅岡洋一、仁科博史；網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割[第 37 回日本分子生物学会；2014 年 11 月 25-27 日／横浜]
25. 仁科博史；細胞内シグナル伝達系[秋田大学医学部セミナー；2014 年 12 月 12 日／秋田]

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

エクソソーム由来宿主因子の細胞増殖分化能の解明

研究分担者　　宮島　篤　　東京大学分子細胞生物学研究所

研究要旨
細胞から分泌される小胞顆粒であるエクソソームが、様々なウイルス種の感染やウイルス依存的疾患発症メカニズムに関与することが報告されている。しかし、HBV 感染時、あるいは HBV 慢性肝炎におけるエクソソームの作用は未解明のままである。HBV 感染時には、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、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可能性が考えられる。従って、HBV 感染細胞から分泌されるエクソソームが、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く、本研究では肝臓における免疫系細胞や肝線維化に関与する細胞種等の性状解析を行うとともに、HBV 感染細胞由来エクソソームの作用を解析する実験系の確立を目指す。

A．研究背景、目的

（背景）

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、新規治療法が望まれている。しかし 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。

最近、細胞から分泌される小胞顆粒であるエクソソームが様々なウイルス種の感染やウイルス依存的疾患発症メカニズムに関与することが報告されている。しかしながら、HBV 感染時、あるいは HBV 慢性肝炎におけるエクソソームの作用は未解明のままである。HBV 感染時には、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、逆に、HBV 慢性肝炎では、免疫系の過剰な活性化が誘導され、肝障害の増悪化や線維化、がん化につながる可能性が考えられる。従って、HBV 感染細胞から分泌されるエクソソームが、免疫系細胞やその他の非実質細胞に作用して感染を制御している可能性が大きい。

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。本研究では、とりわけ肝臓の自然免疫系細胞であるNK細胞やマクロファージ、獲得免疫系細胞の司令塔であるT細胞などに対するHBV感染細胞由来エクソソームの作用を明らかにすることを目的として、それら細胞の性状解析を行う。また、HBV感染細胞由来エクソソームの肝線維化や肝炎に付随して増幅する肝前駆細胞に対する作用を解析するための培養系の樹立を目指す。

B．研究方法

当研究室では種々の肝臓構成細胞に発現する細胞膜タンパク質を多数同定し、モノクローナル抗体とセルソーターによる細胞分離法を確立してきた。そこで本研究では、こうした細胞分離法を用いて、免疫細胞や肝星細胞など肝非実質細胞をセルソーターで分離して培養し、HBV 感染細胞由来のエクソソーム内で発現が見られた microRNA を導入し、各細胞の性状を解析した。また、ヒトの HCC 細胞株およびヒト肝星細胞株にも同様に microRNA を導入して、その性状を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究はマウスから分離した細胞の初代培養系や細胞株による解析であり、生命倫理問題は派生しない。

C．研究結果

マウスの骨髄から誘導したマクロファージに miR-20a と miR-４５１、そのネガティブコントロールを導入して、TLR の ligand（LPS, poly IC, CpG）で刺激を行い、その上清中に分泌されたサイトカイン、IL-6 と TNFa の定量解析を行った。その結果、IL-6 の産生に関しては一定の傾向は見られなかったが、TNFa の産生に関してはどちらの microRNA を導入しても抑制される傾向が得られた。

同様に肝星細胞に microRNA を導入し、線維化関連遺伝子の発現変化を調べた。miR-２９を導入したヒト肝星細胞株ではネガティブコントロールに比して collagen1a1 や Timp 1 が低下する傾向が認められた。

また、エクソソームの肝臓における標的となりうる肝臓の自然免疫系細胞、星細胞、類洞内皮細胞、肝炎に付随して増殖する肝前駆細胞の性状解析もあわせて行った。その結果、クッパー細胞と星細胞が相互作用して線維化に関与する可能性が示唆された。また、肝前駆細胞が胆管から発生する可能性も示された。

D．考察

エクソソーム内で発現が見られた microRNA を導入すると、マクロファージによる TNFa の産生が抑えられた。肝臓内にはクッパー細胞と呼ばれるマクロファージが豊富に存在し、肝臓内の免疫反応の中枢を担っていると考えられる。また TNFa は肝細胞に対してアポトーシスを誘導することがよく知られている。よって、エクソソームによりクッパー細胞からの TNFa の産生が抑制されて、肝細胞のアポトーシスが抑制されている可能性が考えられる。また今回見られた miR-29 のヒト肝星細胞に対する抗線維化作用は既報と一致する結果であった。さらに、肝線維化におけるクッパー細胞と星細胞の相互作用が重要であるとの結果も得られつつあり、星細胞のみならず各種の肝非実質細胞に対する HBV 感染細胞由来のエクソソームの作用の解析も視野に入れる必要がある。また、HBx が肝前駆細胞に作用する可能性を示唆する報告があり、肝前駆細胞への作用にも興味が持たれる。

E．結論

セルソーターにより分離した肝臓の構成細胞やヒト細胞株に対して、エクソソーム内因子である microRNA を導入する実験系を確立した。また、導入した細胞の性状解析を行い、免疫反応や免疫細胞に対する感受性、細胞増殖能、線維化などを解析する系が確立された。

F．研究発表

1．論文発表

Yagai T, Miyajima A and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *American J. Pathology* 184(8):2250-2259, 2014.Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N and Miyajima A. Mature resting Ly6C^{high} natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur. J. Immunology*.44(9):2638-2647, 2014. Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A and Itoh T. Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology* in press.

2．学会発表

Matsuda M, Tanaka M, and Miyajima A.
Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M.
FASEB Summer Research Conferences / Liver Biology: Fundamental Mechanisms and Translational Applications. Keystone Resort (U.S.A.) 2014.7.6-11

松田道隆、田中稔、宮島篤
オンコスタチンMによるマウス肝繊維化

促進機構の解析
第28回肝類洞壁細胞研究会学術集会
アークホテル岡山（岡山市）： 2014.12.13

木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤
Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo
第43回日本免疫学会学術集会
国立京都国際会館（京都市）： 2014.12.10

神元健児、伊藤暢、宮島篤
単一細胞系譜追跡系による胆管上皮の heterogeneityの解析
第２１回　肝細胞研究会
東京医科歯科大学： 2014.6.28

伊藤暢、金子洸太、神元健児、勝又康、岡田甫、宮島篤
胆管系の構造と機能の可視化
第２１回　肝細胞研究会
東京医科歯科大学： 2014.6.28
Kaneko K, Itoh T, Miyajima A.
Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries.
FASEB Summer Research Conferences / Liver Biology: Fundamental Mechanisms and Translational Applications
Keystone Resort (U.S.A.)： 2014.7.8

G．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
１.特許取得
　特になし。
2.実用新案登録
　特になし。
3.その他
　特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

エクソソーム内のHBVマーカーの測定

研究分担者　　梅村武司　信州大学医学部消化器内科

研究要旨
【目的】エクソソーム内のHBVの動態を明らかにするためにHBV RNAとHBs抗原測定系の確立を行った。
【方法】HBV感染患者血清から核酸を抽出し、DNAse処理後にRTを行いreal-time PCR法でHBV RNAを、同時にDNAse処理せずそのままreal-time PCR法でHBV DNAの測定を行った。新規開発されたHBs抗原測定系を用いてHBs抗原の定量を行った。
【成績】血清中のHBV RNAは10^2～10^9 copies/mLの範囲で測定可能であった。同様に、HBV DNAの検出範囲も10^2～10^9 copies/mLであった。HBs抗原の測定感度は従来法の10倍となり、HBs抗体過剰状態、HBS抗原の変異検体が含まれていても測定は可能であった。
【考案】高感度HBV RNAとHBs抗原測定系を確立した。今後、エクソソーム内のHBVウイルスマーカーの測定系として使用可能でありその意義を検討していく予定である。

A．研究背景、目的

（背景）

B型肝炎ウイルス（HBV）感染による慢性肝炎症例では核酸アナログ製剤の内服によりウイルス量の減少が認められ肝硬変、肝がんへの進展を抑制する事が可能となっている。しかし、現時点では肝内のcccDNAを排除することは困難であるためウイルスを完全に排除する新規治療法の開発が待たれている。

本研究班では細胞外分泌顆粒であるエクソソームがHBVの感染、薬剤耐性、発がんメカニズムにどのように関係しているかを解明し、肝炎・肝がんの創薬開発を行うことを目的としている。これまでに感染細胞のエクソソーム内HBVに関するウイルスマーカーの動態は明らかとされていない。本年度は高感度HBV RNA測定系とHBs抗原測定系の確立を行った。

B．研究方法

当院にてB型慢性肝炎と診断された患者血清 200μl から核酸の抽出を行った。DNAseで処理を行い、RTでは5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'を用いてcDNAを作成した後、forward primer 5'-ACAACAT CAGGATTCCTAGGAC-3'、 reverse primer 5'-GGTTGG TGAGTGATTGGAGGTT-3'、TaqMan probe 5'-CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC-3'を用いてreal-time PCR を行い、HBV RNA量を定量した。同じ系でDNAseとRTの過程を除いてHBV DNA量を同じ検体で測定した。

HBs抗原の測定は界面活性剤を含む前処理にて、内側の抗原決定基を露出させ、内側と外側に対する複数の固相抗体を用いてHBs抗原を捕らえ、複数の標識抗体により HBs抗原を検出する方法を用いている。

（倫理面への配慮）

本研究は信州大学医学部臨床倫理委員会で承認され、患者から同意を得て血清保存を行い、測定した。

C．研究結果

血清中HBV RNAは検出可能であり、希釈サンプルを用いて検出感度を決定したところ10^2～10^9 copies/mL の範囲で測定可能であった。同じ系で測定可能であるHBV DNAも同様に10^2～10^9 copies/mLであった。

HBV DNAとHBV RNAの混合試験を行うとDNAse処理後のRT-PCRではHBV RNAのみが測定可能であった。

HBs抗原の測定については通常法よりも感度が10倍改善された。これはHBs抗体

過剰状態であっても測定が可能であること、更に、HBs抗原変異の影響を受けにくいためであると考えられた。以前の系でHBs抗原消失症例と考えられていた検体を経時的に測定すると陽性である症例があることが判明した。

D. 考察

血清中のHBV RNAとHBV DNAを定量する系を確立した。測定範囲はそれぞれ10^2～10^9 copies/mLであった。HBs抗原の測定系も感度、測定範囲とも十分であり、今後エクソソーム内のHBV ウイルスマーカーの測定系として使用可能と考えられる。

E. 結論

HBV RNAとHBs抗原測定系を確立した。来年度以降はエクソソーム内のHBV RNA DNA の測定を行い、病態における意義について検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of HBeAg-negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res 2014;44:E45-53.

2. Okuhara S, Umemura T, Joshita S, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E. Serum levels of Interleukin-22 and hepatitis B core-related antigen are associated with treatment response to entecavir therapy in chronic hepatitis B. Hepatol Res 2014;44:E172-80.

2. 学会発表

1. 松本晶博、梅村武司、田中榮司：「B型慢性肝炎の核酸アナログ中止におけるPeg-IFN シークエンシャル投与の安全性と効果」、第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月29日～30日

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1.特許取得
特になし。

2.実用新案登録
特になし。

3.その他
特になし。