

- and Uprichard SL. Identification of the Niemann–Pick C1–like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*. 2012; 18: 281–285.
- (210) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsunami H, Nagaoka S, **Chayama K**, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y and Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*. 2012; 42: 139–149.
- (211) Ochi H, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Uchiyama T, Kamatani N, Nakamura Y and **Chayama K**. Toward the establishment of a prediction system for the personalized treatment of chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 2012; 205: 204–210.
- (212) Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Aoki N, Kanemasa K, Fujita K, **Chayama K**, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Yoshikawa T, Okanoue T and Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver D. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12: 2.
- (213) Takemura Y, Yoshida S, Tanaka S, Kawase R, Onji K, Oka S, Tamaki T, Raytchev B, Kaneda K, Yoshihara M and **Chayama K**. Computer–aided system for predicting the histology of colorectal tumors by using narrow–band imaging magnifying colonoscopy (with video). *Gastrointest Endosc*. 2012; 75: 179–185.
- (214) Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, **Chayama K**, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K and Sekine A. Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women. *J Hum Genet*. 2012; 57: 46–51.
- (215) Fujimura N, Jitsuiki D, Maruhashi T, Mikami S, Iwamoto Y, Kajikawa M, **Chayama K**, Kihara Y, Noma K, Goto C and Higashi Y. Geranylgeranylacetone, heat shock protein 90/AMP–activated protein kinase/endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide pathway, and endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 153–160.
- (216) Kumada H, Toyota J, Okanoue T, **Chayama K**, Tsubouchi H and Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment–naïve patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol*. 2012; 56: 78–84.
- (217) Sanomura Y, Oka S, Tanaka S, Noda I, Higashiyama M, Imagawa H, Shishido T, Yoshida S, Hiyama T, Arihiro K and **Chayama K**. Clinical validity of endoscopic submucosal dissection for submucosal invasive gastric cancer: a single–center study. *Gastric Cancer*. 2012; 15: 97–105.
- (218) Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S and **Chayama K**. Change in malpractice claims in Japanese gastroenterological practice. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107: 143–144.
- (219) Yoshioka K, Ueno Y, Tanaka S, Nagai K, Onitake T, Hanaoka R, Watanabe H and **Chayama K**. Role of natural killer T cells in the mouse colitis–associated colon cancer model. *Scand J Immunol*. 2012; 75: 16–26.
- (220) Matsuo T, Ito M, Tatsugami M, Boda T, Takata S, Tanaka S and **Chayama K**. Gastric cancer development after *Helicobacter pylori* eradication therapy: a new form of gastric neoplasia. *Digestion*. 2012; 85: 61–67.

- (221) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W and Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One*. 2012;7: e47490.
- (222) Yamasaki W, Kakizawa H, Ishikawa M, Date S, Tatsugami F, Terada H, Masaki K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Chayama K and Awai K. Migration to the pulmonary artery of nine metallic coils placed in the internal iliac vein for treatment of giant rectal varices. *Acta Radiol Short Rep*. 2012; 1.
- (223) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y and Kumada H. Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near the IL28B gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment. *Intervirology*. 2012; 55: 417-425.
- (224) Kawaoka T, Aikata H, Murakami E, Nakahara T, Naeshiro N, Tanaka M, Honda Y, Miyaki D, Nagaoki Y, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Takahashi S and Chayama K. Evaluation of the mRECIST and alpha-fetoprotein ratio for stratification of the prognosis of advanced-hepatocellular-carcinoma patients treated with sorafenib. *Oncology*. 2012; 83: 192-200.
- (225) Fujimura N, Noma K, Hata T, Soga J, Hidaka T, Idei N, Fujii Y, Mikami S, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kihara Y, Chayama K, Kato H, Liao JK and Higashi Y. Mineralocorticoid receptor blocker eplerenone improves endothelial function and inhibits Rho-associated kinase activity in patients with hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 2012; 91: 289-297.
- (226) Ohara YK E, Onoyama M, Ohnishi M, Shinagawa K, Oka S, Yoshida S, Tanaka S, Sakamoto S, Yasui W, Shimamoto F, Chayama K. Regression of rectal MALT lymphoma after antibiotic treatment in a patient negative for Helicobacter pylori. *Clinical Journal of Gastroenterology*. 2012; 5: 59-63.
- (227) Shishido T SO, Tanaka S, Aoyama T, Watari I, Imagawa H, Yoshida S, Hiyama T, Chayama K. Removal of a sewing needle penetrating the wall of the third portion of the duodenum by double-balloon endoscopy. *Clinical Journal of Gastroenterology*. 2012; 5: 79-81.

特許

2014(申請中)

- (1) **発明等の名称: 急性重症肝炎モデル非ヒト動物の作製方法、急性重症肝炎モデル非ヒト動物、劇症肝炎治療薬のスクリーニング方法および劇症肝炎治療薬**

出願日: 2014年10月24日

出願番号: 特願 2014-217516

発明者: 茶山 一彰

2013年

- (2) 発明等の名称: HCV の治療剤又は予防剤

出願日: 2013年5月20日

出願番号: 特願 2013-106476 公開番号 2013-163692

発明者: 大段 秀樹, 石山 宏平, 大平 真裕, 浅原 利正, 茶山 一彰, 今村道雄

- (3) 発明等の名称: C型肝炎ウイルスの感染抑制剤

出願日： 2013 年 3 月 19 日

出願番号： 特願 2012-536601 国際公開番号:WO2012/43838

発明者： 土方 誠, 阿部 雄一, 脇田 隆字, 茶山 一彰
2012 年

- (4) 発明等の名称: インターフェロン療法の効果予測用マーカー

出願日： 2012 年 2 月 15 日

出願番号： 特願 2012-031178 公開番号:2013-165681

発明者： 茶山 一彰, 越智 秀典, 中野 力太

- (5) 発明等の名称: 肝細胞癌への進展予測マーカー

出願日： 2012 年 2 月 10 日

出願番号： 特願 2012-027735 公開番号:2012-1794074

発明者 茶山 一彰, 越智 秀典, 三木 大樹

革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究

主任研究者
分担研究者

茶山一彰
志馬寛明
加藤博己
立野知世
山本 卓
田原榮俊
丸澤宏之
Hussein H Aly
坂口剛正
阿部弘美

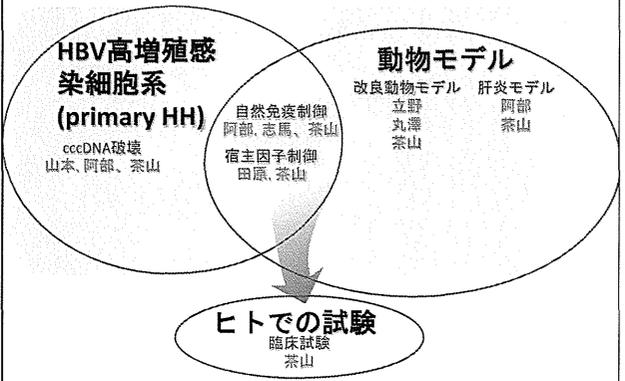
広島大学
北海道大学
京都大学
フェニックス
広島大学
広島大学
京都大学
国立感染症研究所
広島大学
広島大学

消化器・代謝内科学
免疫学
ウイルス研究所
スライオKK
理学研究科
薬学研究科
消化器内科学
ウイルス学
医療人大学院教育研究センター

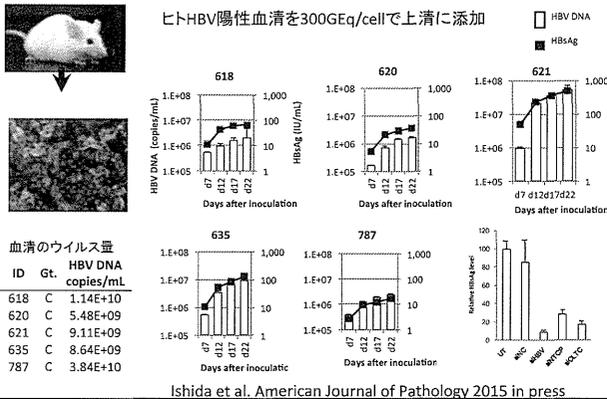
2015年1月27日

広島大学
茶山一彰

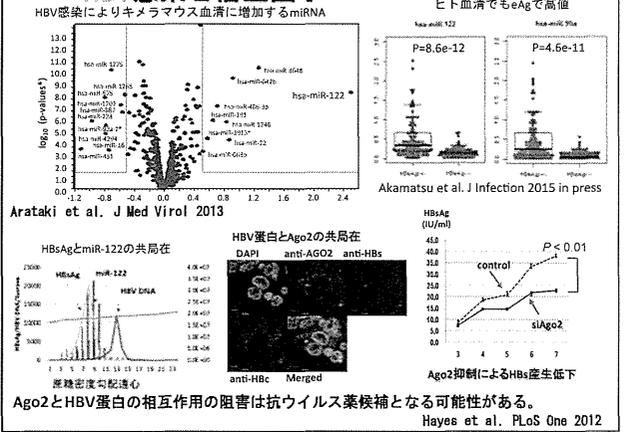
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究



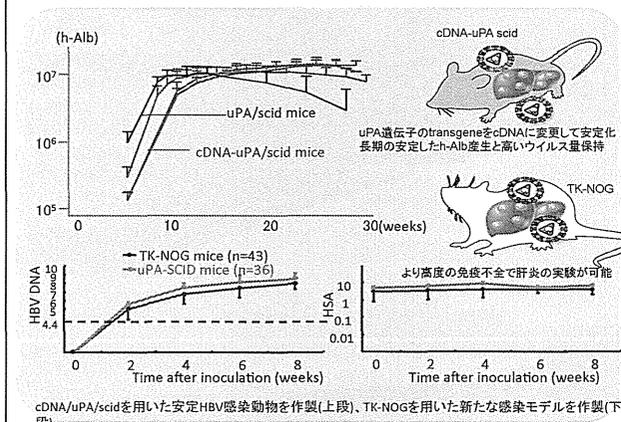
ヒト肝細胞キメラマウスから得られた初代培養肝細胞へのHBV感染系



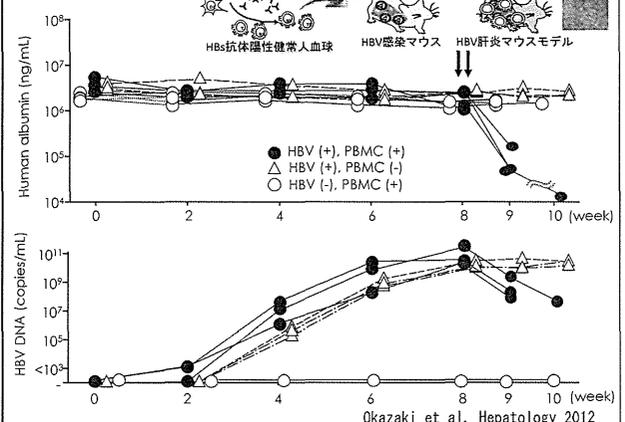
HBV感染と宿主因子



HBV感染動物モデルの改良



肝炎モデル



【別添4】

利益相反について

利益相反の有無等(平成26年度)

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

【別添5】

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服政策研究事業」または「肝炎等克服実用化研究事業」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

- ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
 - イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。
(以下①、②を記載)
 - ①(研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名:〇〇〇〇)
 - ② 今回申請している研究との違い(研究内容に重複がないことを具体的に提示)など、その必要性・合理性の説明
- ① ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の開発に関する研究
(茶山一彰)
 - ② HBVの研究のみを行っている。今回の申請はB型肝炎に限ったものであり、①はC型肝炎に限ったものである。

【別添6】

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成26年度)

- ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
- イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成26年12月5日

- ・ B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究 (藤田尚志)
- ・ 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス技術を利用したB型肝炎感染小動物モデルの開発とその応用 (竹原俊郎)

平成26年12月2日(合同班長会議)

- ・ 免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス技術を利用したB型肝炎感染小動物モデルの開発とその応用 (竹原俊郎)
- ・ ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発 (山村研一)
- ・ ツバメ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究 (小原道法)

平成 26 年度 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『成果概要』

研究課題：ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス
感染モデルマウスの開発

課題番号 : H24-B創-肝炎-一般-017

予定期間 : H24 年度から H28 年度まで

研究代表者 : 山村 研一

所属研究機関、部局: 熊本大学、生命資源研究・支援センター

職名 : シニア教授

委託費(決定額): 1 年目 100,000,000 円 2 年目 100,000,000 円 3 年目 94,000,000 円
計 294,000,000 円

I. 研究の意義

- (1)ヒトにおける B 型肝炎をマウスで再現するには、2つの必須条件がある。第1は、攻撃側の細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、胎児期の胸腺でヒトHLA クラスI 分子によって教育されている必要がある。第2は、CTL の教育に使われたヒトクラス I 分子と、移植したヒト肝細胞が発現するクラス I 分子とが一致している必要がある。これにより、ヒト肝細胞によって提示された HBV 由来の抗原を、CTL が認識して、ヒト B 型肝炎患者と同じ肝炎を誘発できる。すなわち、ヒト肝細胞が生着しているマウスに、免疫応答能を持たせるためにヒトリンパ球を移植しただけでは、移植片対宿主(GVH)反応による肝炎は生じて、HBV に対する免疫応答による肝炎は起こらず、モデルにはならないことを意味している。したがってヒト患者と同じメカニズムで肝炎が発症するモデルを開発することが重要であり、このようなモデルの樹立を目指している。このモデルを用いることにより、初めて慢性化のメカニズムや治療法の検証・開発が解決できる可能性が高く、その意義は極めて大きい。
- (2)慢性 B 型肝炎患者および感染したにもかかわらず治癒した患者由来の iPS を用いて肝細胞を誘導し、ヒト化肝臓マウスを作製できれば、個別化医療につながることを期待され、研究の意義は極めて大きい。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1)ヒトと同じメカニズムで B 型肝炎が発症するマウスモデルの作製のため、ヒトクラス I 分子(HHD と略)を胸腺も含め全身で発現し、かつマウスクラス I は欠損しているマウス(HHB と略)をレシピエントとして樹立する。これを元に 1) HHD を持つチンパンジーiPS(ciPS)と肝臓を欠損させたマウス胚とのキメラ胚作製を通して「チンパンジー肝臓キメラマウス」、2) HHD を持つヒト iPS(hiPS)より分化誘導した肝細胞を移植することによる「ヒト肝臓置換マウス」の開発を行う。
- (2)モデルマウスを用いれば、1)HBV の感染・増殖機構の解明、2)ウイルスの生体内での病原性解析、3)慢性肝炎の発症メカニズムの解析、4)慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進行メカニズムの解析、5)中和抗体や薬剤の有効性の検証が可能となり、その成果が期待される。
- (3)中・長期的には、ヒトあるいはチンパンジー由来の組織・臓器を持つマウス作製が可能で、種々のヒト疾患の病因・病態解析、治療法開発が可能となる。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(山村)

- (1) ヒト iPS 細胞(hiPS)からの肝細胞の分化誘導

Hannan らの方法 (Hannan et al. *Nature Protocols* 8: 430–437, 2013) に改良を加え、分化効率がよくしかも通常 4 週間を要するところ 14–16 日間程度で肝細胞を誘導する方法を確立した。下記に述べる卵黄嚢移植では、肝細胞が 10^5 個あれば十分であるが、この方法により十分な肝細胞を得ることができることが分かった。

(2) 卵黄嚢静脈よりの肝細胞移植法の確立

ヒト肝細胞の拒絶を避けるため、胎生期 16.5 日目に胎児の卵黄嚢血管内に、ヒト肝細胞を移植する方法を確立した。一腹で 4–5 の胎児へ移植する技術を確立し、十分な数のキメラマウスを作製できることを確認した。

(3) タモキシフェン投与方法

通常、タモキシフェンは腹腔内へインジェクションするが、流産や死亡を惹起する可能性がある。そこで、タモキシフェンを 1mg/g food の割合で混ぜ、それを特殊な粉末給餌器に入れて与えることで、腹腔内投与と同じ効率で、Cre が各内へ移行し、loxP 間の組換えを起こせることが分かった。

・研究分担者(江良)

(1) チンパンジー iPS (ciPS) 細胞の樹立と解析

チンパンジーの末梢血液由来の単核球に、初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つ非組込型センドアイウイルスベクター (SeV) を感染させ、4 株の ciPS 細胞の樹立に成功した。これらの ciPS は、核型は正常であること、幹細胞マーカーを発現していること、外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化能があることを確認した。

(2) ciPS 細胞へのヒトクラス I (HHD) 遺伝子導入

電気穿孔法にて HHD を効率よく導入し、発現していることを確認した。

(3) チンパンジー iPS 細胞のナイーブ化

hiPS や ciPS は、分化が進んだ epiblast と同じ分化状態にあり (primed state)、キメラ作製効率が非常に悪いことが知られている。したがって、ciPS をより未分化な naïve state に転換する必要がある。最近、ケンブリッジ大の高島らにより、Nanog と Klf4 を用いる再現性もある優れた方法が報告された。この方法により ciPS を naïve 化し、キメラマウスを作製しているところである。

・研究分担者(荒木)

(1) HHD 遺伝子、HHB マウスからの ES 細胞 (ES:HHB) とマウス系統の樹立

フランスの Lemonnire 博士より、HHD 遺伝子、HHB マウスを入手した。HHB マウスより得た胚盤胞を用いて、ES 細胞 (ES:HHB) の樹立に成功した。非常に高い効率で、生殖系列に伝達されることを確認している。

(2) ES:HHB;SCCD およびそのマウス系統の樹立

SAP-CreER^{T2}(SC) と CAG-loxP-EGFP-loxP-DT-A(CD) の 2 つのコンストラクトを ES:HHB に導入し、HHB:SCCD マウスの樹立に成功した。タモキシフェンを投与することにより、Cre ER^{T2} が細胞質から核内に移行し、ジフテリア毒素である DT-A が CAG プロモーター下で発現し、肝細胞は死滅することを確認した。

(3) Hhex 遺伝子欠損マウス系統の樹立

ES:HHB および CRISPR/Cas9 法を用いて、Hhex 遺伝子を破壊し、マウスの肝臓は欠損させたマウス系統 (HHB:Hhex^{-/-}) の樹立に成功した。

(4) Fah 遺伝子欠損マウス系統の樹立

Fah (fumarylacetoacetate hydrolase) 欠損マウスでは、すぐ上流の有毒な基質である fumarylacetoacetate (Faa) が蓄積し、肝臓細胞が死滅する。しかし、NTBC 薬剤を与えると、有毒な Faa 等が産生されなくなり、正常に飼育可能である。NTBC を除去すれば肝細胞死を誘導できるので、ヒト肝細胞の移植用としては有用である。そこで、ES:HHB と CRISPR/Cas9 法を用いて、Fah を破壊し、HHB:Fah^{-/-} マウス系統を樹立することに成功した。

・研究分担者(佐々木)

(1)HBV 感染の確認法、慢性肝炎等各肝炎モデルの診断

肝炎の各病態の判断は血清学的検査に基づき、実臨床で実際に行っている。マウス血液を用いて、ELISA 法による HBs の定量、qPCR 法による HBV-DNA の定量方を確立した。

(2)組換え体 HBV ウイルスの入手と感染実験

国際医療センターの下遠野邦忠先生、溝上雅史先生から HBV ゲノムにルシフェラーゼ遺伝子を組込んだ組換え体ウイルスを入手した。iPS 細胞から分化させた肝細胞では、HBV の感染に必要な taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が発現することを確認し、現在、HBV 感染実験を行っている。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) Hhex 遺伝子欠損胚とナイーブ化したチンパンジーiPS でキメラを作製することになるが、世界中でまだこのような試みはなされていないチャレンジングな実験である。それゆえ、可能となった時のインパクトは非常に大きいし、種々の臓器・組織を置換できる可能性もあり、その後大きな展開を期待できる。ただ、達成のためには、細かい実験条件を多々詰めなければならず、このための研究費と時間が必要である。
- (2) *de novo* 肝炎は、B 型急性肝炎治療後に肝細胞内に存在する HBV-covalently closed circular DNA(cccDNA) からの転写が、免疫抑制状態で再活性化することにより肝炎が再燃すると考えられている。HBV-cccDNA の再活性化、*de novo* 肝炎発症をも再現するマウスモデルとなるかが今後の課題である。
- (3) 上記マウスの開発に成功すれば、薬効評価等に用いることができる。そうなれば、多数のモデルマウスが必要となる。このためには、安定供給体制の構築が課題となる。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

- (1) ヒト患者と同じメカニズムで肝炎を起こすマウスができれば、治療法・治療薬の検証・開発につながる。

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新たなモデルの樹立は、B 型肝炎の治療開発を促進し、肝炎対策行政へ貢献できる。

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者(山村)

- (1) Maehara, N., Arai, S., Mori, M., Iwamura, Y., Kurokawa, J., Kai, T., Kusunoki, S., Taniguchi, K., Ikeda, K., Ohara, O., Yamamura, K. and Miyazaki, T. Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Report*. 9:1-14, 2014

・研究分担者(江良)

- (1) Fujie, Y., Fusaki, N., Katayama, T., Hamasaki, M., Soejima, Y., Soga, M., Ban, H., Hasegawa, M., Yamashita, S., Kimura, S., Suzuki, S., Matsuzawa, T., Akari, H. and Era, T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS One*.in press.

・研究分担者(荒木)

- (1) 特許米国出願『マウス系統を樹立する方法』、出願番号／出願日：13/818,906／08/30/2011、公開番号／公開日 US-2013-0211187-A1／08/15/2013、発明者：荒木正健、荒木喜美、出願人：熊本大学。

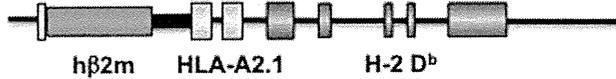
・研究分担者(佐々木)

- (1) Watanabe, T., Ishihara, K., Hirose, A., Watanabe, S., Hino, S., Ojima, H., Kanai, Y., Sasaki, Y. and Nakao, M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human tumor necrosis factor /lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 32: 1529-1541, 2012.

VIII. (3年間の研究成果の)概要図等

基本となるヒトHLA class I 遺伝子およびマウスHHD

1. HLA-A2.1($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$)- $\beta 2m$ (HHD)の入手と配列確認

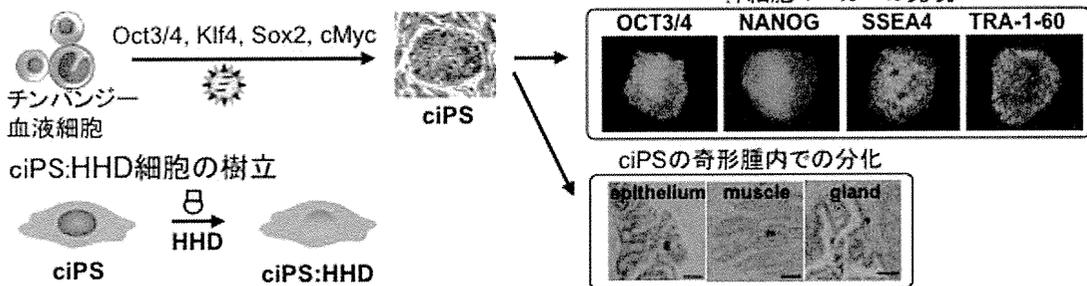


2. Tg(HLA-A2.1($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$)- $\beta 2m$);H2-D^{B*/b};B2m⁺(HHB)の入手とES細胞の樹立

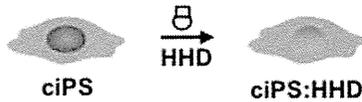


A. チンパンジー肝臓キメラマウスの作製

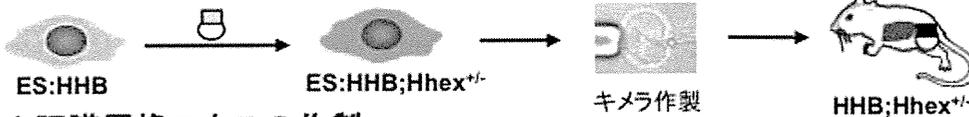
1. チンパンジーiPS (ciPS) 細胞の樹立と分化能の確認



2. ciPS:HHD細胞の樹立

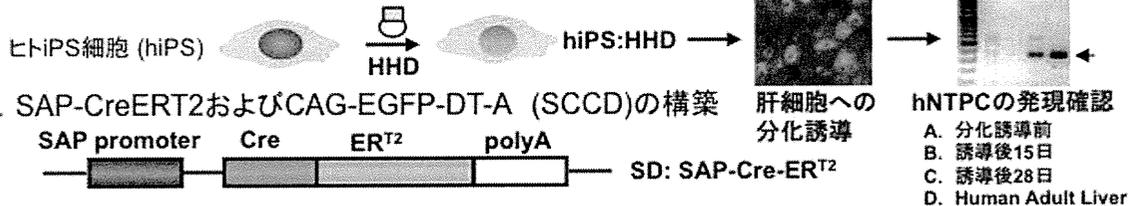


3. 肝臓欠損マウスの作製

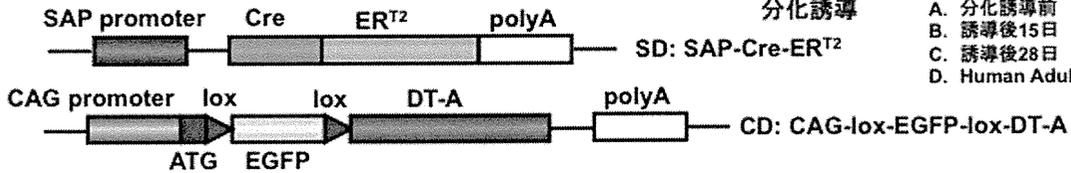


B. ヒト肝臓置換マウスの作製

1. ヒトiPS:HHD細胞の肝細胞への分化誘導とhNTPCの発現



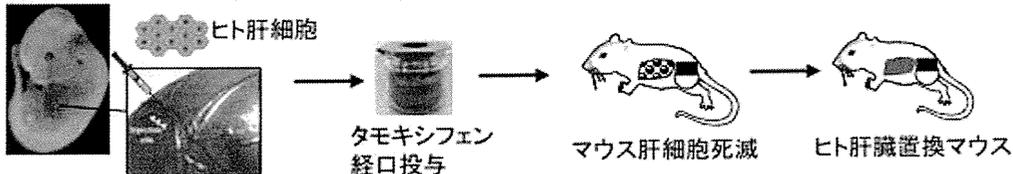
2. SAP-CreERT2およびCAG-EGFP-DT-A (SCCD)の構築



3. HHB;SCCDマウスの樹立



4. E16.5胎児の卵黄囊静脈への肝細胞移植



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

富山医科薬科大学和漢薬研究所

大阪大学医学部

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

荻田善一(当時、大阪大学、富山医科薬科大学)

熊原雄一(当時、大阪大学)

岸本忠三(当時、大阪大学)

本庶佑(当時、大阪大学)

松原謙一(当時、大阪大学)

・主な研究課題

免疫応答の遺伝学

HBV のモデルマウス作製

優性遺伝病の発生機構

マウス個体の胚・遺伝子操作

ほ乳類発生の分子機構

・これまでの研究実績

発表論文

1. Hoshii, T., Kasada, A., Hatakeyama, N., Ohtani, M., Tadokoro, Y., Naka, K., Ikenoue, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Araki, K., Yamamura, K., Matsuda, S. and Hirao, A. mTORC1 controls the cell cycle of the earliest T-lineage-committed cells and its inactivation eradicates acute lymphoblastic T-cell leukemia in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. in press.
2. **Maehara, N., Arai, S., Mori, M., Iwamura, Y., Kurokawa, J., Kai, T., Kusunoki, S., Taniguchi, K., Ikeda, K., Ohara, O., Yamamura, K. and Miyazaki, T. Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Report*. 9:1-14, 2014**
3. Yamazaki, T., Mori, M., Arai, S., Tateishi, R., Abe, M., Ban, M., Nishijima, A., Maeda, M., Asano, T., Kai, T., Izumino, K., Takahashi, J., Aoyama, K., Harada, S., Takebayashi, T., Gunji, T., Ohnishi, S., Seto, S., Yoshida, Y., Hiasa, Y., Koike, K., Yamamura, K., Inoue, K. & Miyazaki, T. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. Plos One 9: e109123, 2014.
4. Ozaki, N., Fukuchi, Y., Tomiyoshi, S., Uehara¹, H., Ida, S., Wang, J., Kimi Araki, K., Sibilila, M., Baba, H., and Yamamura, K., and Ohmuraya, M. Autophagy regulation in the pancreatic acinar cells is independent of epidermal growth factor receptor signaling. Biochem. Biophysic. Res. Comm.446: 224-230, 2014.
5. Arai, A., Morita, K., Maehara, K., Iwamura, Y., Honda, S., Nakashima, K., Kurokawa, J., Mori, M., Motoi, Y., Miyake, K., Yamamura, K., Ohara, O., Shibuya, A., Wakeland, E. K., Li, Q.-Z. and Miyazaki, T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain IgM immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Report* 3:1187-1198, 2013.

6. Nakahara, M., Tateyama, H., Araki, M., Nakagata, N., Yamamura, K. and Araki, K. Gene-trap mutagenesis using Mol/MSM-1 embryonic stem cells from MSM/Ms mice. *Mammal Genome* 24:228-239, 2013.
7. Semba, K., Kimi Araki, K., Matsumoto, K., Suda, H., Ando, T., Sei, A., Mizuta, H., Takagi, K., Mai Nakahara, M., Muta, M., Yamada, G., Nakagata, N., Iida, A., Ikegawa, S., Nakamura, Y., Araki, M., Abe, K. and Yamamura, K. Ectopic expression of *Ptf1a* induces spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations in *Danforth's short tail* mice. *Plos Genet.* e1003204, 2013.
8. Sakai, D., Nakamura, Y., Nakai, T., Mishina, T., Kato, S., Grad, S., Alini, M., Risbud, A.V., Chan, D., Cheath, K.S.E., Yamamura, K., Masuda, K., Okano, H., Anod, K. and Mochida, J. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nature Comm.*3:1264. DOI: 10.1038/ncomms2226.
9. Hoshii, T., Tadokoro, Y., Naka, K., Ooshio, T., Muraguchi, T., Sugiyama, N., Soga, T., Araki, K., Yamamura, K. and Hirao, A. Acute myeloid leukemia stem cells lacking mTORC1 self-renew but have defective leukemia-initiating capacity in mice. *J. Clin. Invest.* 122:21124-2129, 2012.
10. Asada, N., Takase, M., Nakamura, J., Oguchi, A., Asada, M., Suzuki, N., Yamamura, K., Nagoshi, N., Shibata, S., Rao, T. N., Fehling, H. J., Fukatsu, A., Minegishi, N., Kita, T., Kimura, T., Okano, H., Yamamoto, M. and Yanagita, M. Dysfunction of fibroblasts of extra-renal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J. Clin. Invest.* 121:3981-3990, 2011.
11. Li, Z., Zhao, G., Shen, J., Araki, K., Haruna, K., Inoue, S., Wang, J. and Yamamura, K. Enhanced expression of human cDNA by phosphoglycerate kinase promoter-puromycin cassette in the mouse transthyretin locus. *Transgenic Res.* 20:191-200, 2011.
12. Ando, T., Semba, K., Suda, H., Sei, A., Mizuta, H., Araki, M., Abe, K., Imai, K., Nakagata, N., Araki, K. and Yamamura, K. The floor plate is sufficient for development of the sclerotome and spine without the notochord. *Mechanism Dev.* 128: 129-140, 2011.
13. Araki, K., Okada, Y., Araki, M. and Yamamura, K. Comparative analysis of right-element mutant *lox* sites on recombination efficiency in ES cells. *BMC Biotech.* 10: 29, 2010.
14. Wang, J., Ohmuraya, M., Suyama, K., Hirota, M., Ozaki, N., Baba, H., Nakagata, N., Araki, K. and Yamamura, K. Relationship of strain dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of *Prss1* and *Spink3* expression. *Lab. Invest.* 90: 654-664, 2010.
15. Miike, K., Aoki, M., Yamashita, R., Takegawa, Y., Saya, H., Miike, T. and Yamamura, K. Proteome profiling reveals gender differences in the comparison of human serum. *Proteomics* 10:2678-2691, 2010.
16. Araki, K., Takeda, T., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura, K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mammal. Genome* 20: 14-20, 2009.
17. Yamashita, R., Takegawa, Y., Sakumoto, M., Nakahara, M., Kawazu, H., Hoshii, T., Araki, K., Yokouchi, Y. and Yamamura, K. Defective development of the gall bladder and cystic duct in *Lgr4*-hypomorphic mice. *Mechanism Dev.* 238:993-1000, 2009.

18. Ozaki, N., Ohmuraya, M., Hirota, M., Ida, S., Wang, J., Takamori, H., Higashiyama, S., Baba, H. and Yamamura, K. Serine protease inhibitor, Kazal type 1, promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cancer Res.* 7:1572-1581, 2009
19. Yamamura, K. and Araki, K. Gene trap mutagenesis in mice; New perspectives and tools in cancer research. *Cancer Science* 99: 1-6, 2008.
20. Hashimoto, D., Ohmuraya, M., Hirota, M., Yamamoto, A., Suyama, K., Baba, H., Araki, K., Mizushima, N. and Yamamura, K. Involvement of autophagy in trypsinogen activation. *J. Cell Biol.* 181: 1065-1072, 2008.
21. Zhao, G., Li, Z., Araki, K., Haruna, K., Yamaguchi, K., Araki, M., Takeya, M., Ando, Y. and Yamamura, K. Inconsistency between hepatic expression and serum concentration of transthyretin in mice humanized at the transthyretin locus. *Genes Cells* 13: 1257-1268, 2008.
22. Yamazaki, H., Tsuneto, M., Yoshino, M., Yamamura, K. and Hayashi, S.. Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells* 25, 78-87, 2007.
23. Komatsu, K., Wakatsuki, S., Yamada, S., Yamamura, K., Miyazaki, J., Koni, P. A. and Sehara-Fujiwara, A. Meltrin β expression in cardiac neural crest cells is required for ventricular septum formation of the heart. *Dev. Biol.* 303:82-92, 2007.
24. Reifenberg, K., Lehr, H-A., Torzewski, M., Steige, G., Wiese, E., Küpper, I., Becker, C., Ott, S., Nusser, P., Yamamura, K., Rechtsteiner, G., Warger, T., Graf, N., Kleinert, K., Schmidt, A., Pieske, B., Wenzel, P., Münzel, T. and Löhler, J. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Amer. J. Pathol.* 171:463-472, 2007.

特許取得：

1. 「新規発現ベクター (CAG promoter)」、国内特許 登録番号 2824434、発明者：宮崎純一、山村研一、荒木正健他、1998年9月11日
2. 「トラップベクターおよびこれを用いた遺伝子トラップ法」、オーストラリア「AU778719」(2005.4)、米国「US7,312,075」(2007.12)、欧州「EP1201759」(2010.3)、中国「ZL00812904.5」(2010.6)、香港「HK1048830B」(2010.12)、日本「JP4664554」(2011.2)、発明者：山村研一、荒木喜美。

平成24(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)
 ① B型肝炎ウイルスが感染可能な小動物モデルの開発に関する研究
 課題番号:H24-B創-肝炎-一般-017

ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術 を利用したB型肝炎ウイルス感染 モデルマウスの開発

平成27(2015)年1月27日(火)
 独立行政法人国立国際医療研究センター・国府台病院肝炎・免疫
 研究センター1 階研修室

研究代表者 山村 研一 熊本大学生命資源研究・支援センター
 研究分担者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所
 佐々木 裕 熊本大学生命科学研究部
 荒木 喜美 熊本大学生命資源研究・支援センター
 協力者 明里宏文、李正花、白木伸明、渡邊文久、直江秀昭、
 松本健、仁木大輔、アーマッド・マザヘリー



目的

B型肝炎創薬実用化等研究事業

① B型肝炎ウイルスが感染可能な小動物モデルの開発に関する研究
 (24261101)

ウイルスの生体内での病原性、感染中和機構、増殖機構の解析や非臨床試験等に利用することが可能な小動物モデルの開発を目指す研究を採択する。具体的には、B型肝炎ウイルスを感染させた後に、生体内でウイルスを複製増殖させることが可能であり、かつ免疫反応が正常な小動物モデルの開発を目指した研究を推進する。

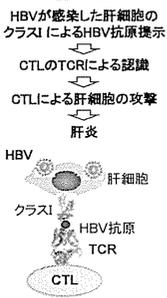


免疫反応が正常なだけでなく、
 ヒト同様の免疫応答によるB型肝炎の発症

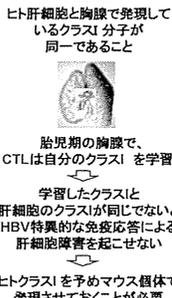
モデルマウスにおいてB型肝炎を起こすために

細胞障害性T細胞(CTL)が、HBVに感染した肝細胞を攻撃する必要がある

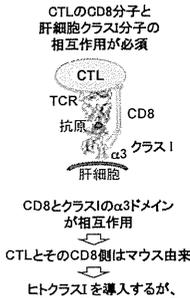
条件1



条件2



条件3

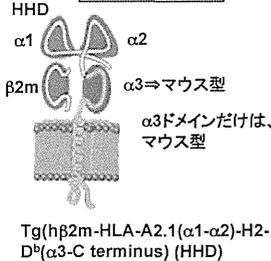


基本となるレシピエントマウス

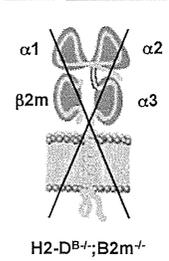
◎α3ドメインはマウス化したヒトクラスI(HHD)を発現
 ◎マウスクラスIは破壊

細胞性免疫系のヒト化マウス(HHB)

ヒトクラスIの発現

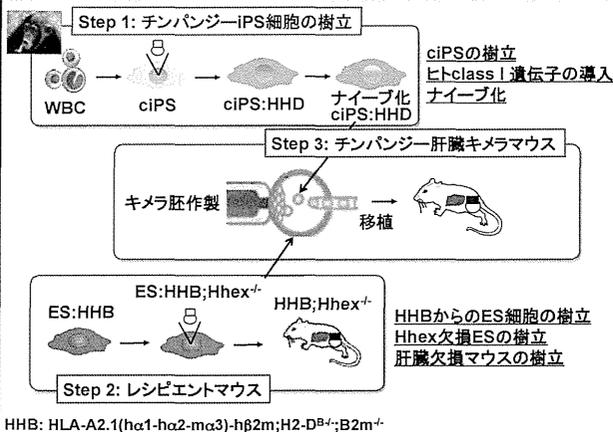


マウスクラスIの破壊

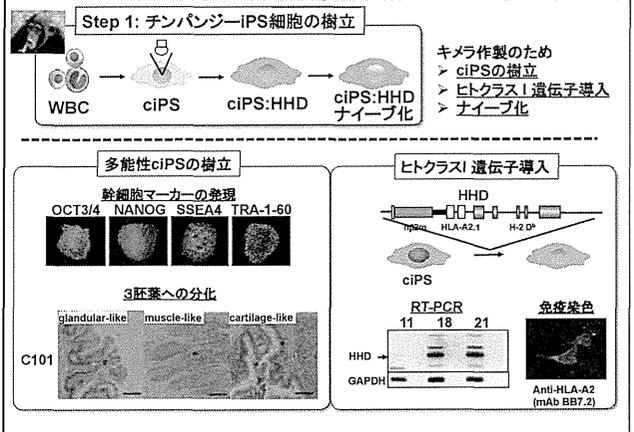


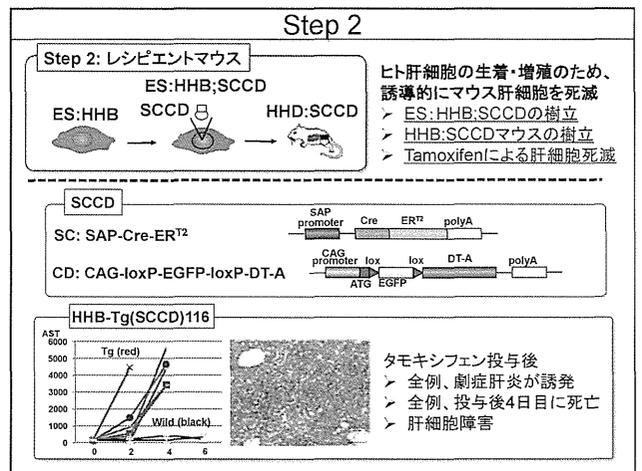
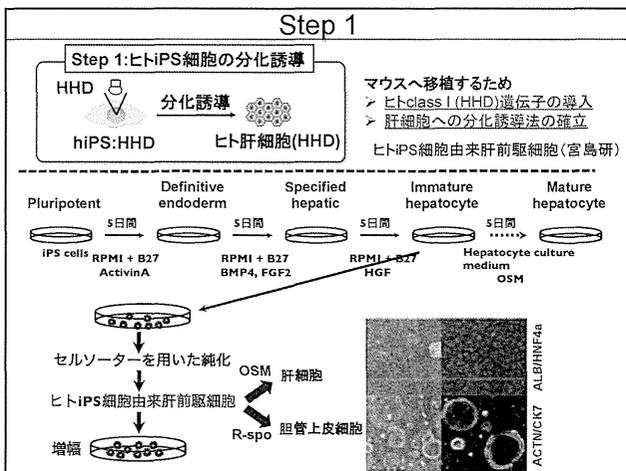
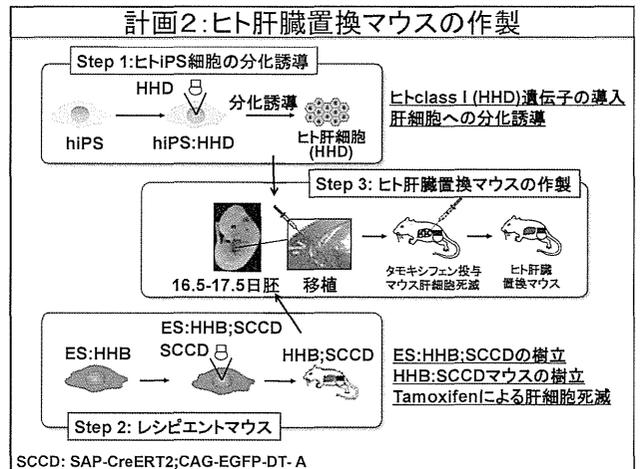
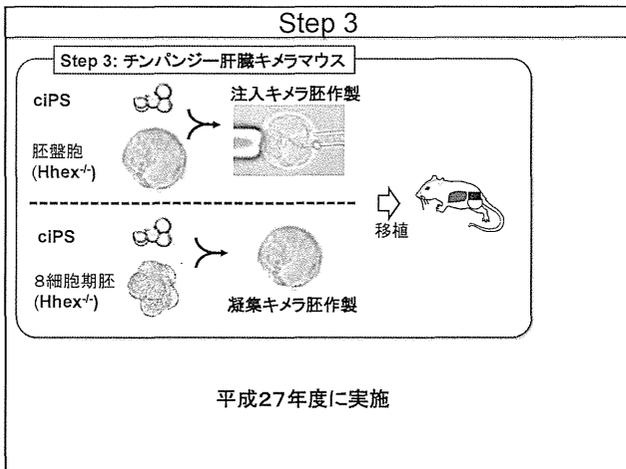
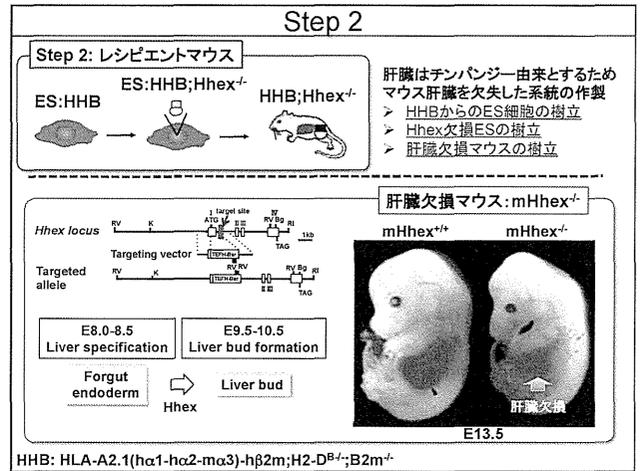
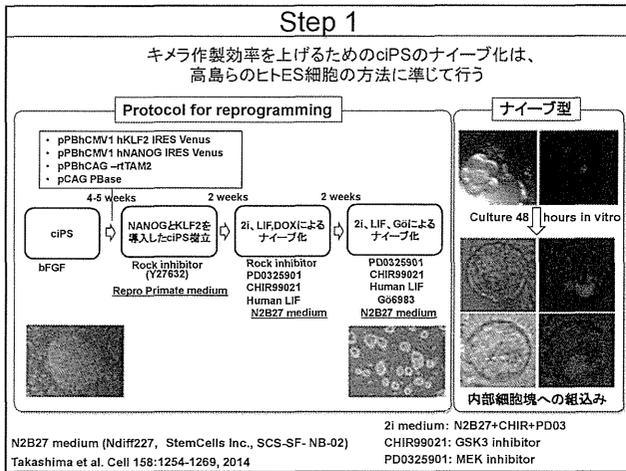
Pascolo et al. JEM 185:2043-2051, 1997; Firat, H. et al. Eur. J. Immunol. 29:3112, 1999

計画1: チンパンジー肝臓キメラマウス



Step 1





平成 26 年度 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『成果概要』

研究課題：B型肝炎創薬実用化等研究事業の評価等に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-指定-001

予定期間：H24年度からH26年度まで

研究代表者：正木尚彦

所属研究機関、部局：国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

職名：肝炎情報センター長

委託費(決定額)：1年目 25,000,000 円 2年目 50,000,000 円 3年目 38,000,000 円
計 113,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎創薬実用化等研究事業全体が円滑に進捗するように、評価委員会事務局として各種機能を遂行する必要がある。
- (2) B型肝炎の抗ウイルス療法に焦点を絞った患者実態調査がこれまで成されていない。
- (3) B型肝炎創薬に対する患者の期待を明らかにする。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 本研究事業全体の進捗を視野に入れつつ評価委員会事務局機能を担当することで、限られた期間内での新規薬剤の開発に貢献しうる。
- (2) B型肝炎疾患患者の求めるニーズを正確に把握し、その情報を各研究代表者へ提供することで、創薬事業のあり得べき方向性を示すことが出来る。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者(正木尚彦)

- (1) 評価委員会事務局としての活動：研究協力者として、7名のプログラム・オフィサー(PO；内科系4名、薬学系2名、基礎系1名)を委嘱し、さらに、理化学研究所創薬部門のプログラム・ダイレクターに評価委員会事務局アドバイザーを委嘱し、事務局機能の充実を図っている。また、平成27年4月には日本医療研究開発機構が正式設立されることから、平成26年10月に本研究事業のプログラム・ダイレクターを決定、委嘱した。本研究事業は平成24年度(初年度)は16班で開始され、その後、平成25年度(2年目)二次公募で1班、平成25年度(2年目)三次公募で1班が追加され、現在計18班で進められている。研究者間で開催される班会議は平成24年度は計20回(単独15回、合同5回)開催され、POの出席延べ人数は20名(うち9回の班会議に研究代表者が出席)であった。平成25年度は班会議が計22回(単独16回、合同6回)開催され、POの出席延べ人数は18名(うち6回の班会議に研究代表者が出席)であった。平成26年度(4月～12月10日まで)もすでに16回(単独8回、合同8回)の班会議が開催されており、平成26年度残期間でも6回の班会議(単独4回、合同2回)が予定されていることから、情報共有を目的とした合同班会議へのシフトが加速されていることが分かる。最終的に平成26年度は計22回の班会議が開催され、POの出席延べ人数は34名(うち9回の班会議に研究代表者が出席)となる予定である。

(2)他の厚生労働科学研究事業では、初年度の研究発表会を開催せずに書類審査のみで2年目への継続の可否を決定されているが、本研究事業は国民の期待がきわめて高い研究事業であること、1研究課題あたりの交付金額が高額であることなどを踏まえ、平成25年1月31日に研究発表会、中間評価委員会を実施した。中間評価委員による厳正な審査が行われ、研究継続の可否ならびに交付研究費の妥当性について議論された。尚、平成25年度は現行の18研究班を対象とし、平成26年1月30日に研究発表会、中間評価委員会を開催した。平成26年度は平成27年1月27日を予定している。

(3)本研究事業の研究者間で共有するホームページの作成・運用:本研究事業の効率的な遂行のためには、複数の研究班間での情報共有、共同研究の推進がきわめて重要であると考え、研究者間のみで閲覧可能なホームページを平成25年10月23日に開設した。特に、研究者間での意見交換の場(「掲示板」として、「アナウンス・ディスカッションボード」)を設けている。知的財産権に係る内容も含まれ得ることから、閲覧資格に制限を設ける、アクセスのためのパスワードを定期的に変更するなど、セキュリティーの担保には十分留意している。

(4)研究協力者として、肝炎情報センターに任期付き常勤研究員(医師職)を雇用し、「B型肝炎に対する新しい治療法開発のためのアンケート調査」を実施した。調査対象は全国の肝疾患診療連携拠点病院に通院するB型肝炎患者である。平成24年12月13日に研究代表者の所属する国立国際医療研究センター倫理委員会での承認を取得し、厚生労働省肝炎対策推進室との調整を経て、平成25年8月~26年1月の半年間で全国63施設(61拠点病院+国立国際医療研究センター病院・国府台病院)に5784部配布し、3021部を回収した(回収率52.2%)。単純・クロス集計、データマイニング(決定木)解析、テキストマイニング解析を実施しており、その結果の一部を記載する。

①インターフェロン治療満足度、その規定因子について:有効回答数584例では、「非常に満足している」、「満足している」が各々8.6%、22.3%で計30.9%であった。一方、「満足していない」、「非常に不満である」が各々25.5%、13.2%で計38.7%となり、これを上回っていた。計298変数を用いた決定木解析では、インターフェロン満足度が最も高いグループは「実際の効果が得られた」&「インターフェロンの効果に不安を持っていない」&「職業が正社員でない(=時間的拘束が少ない)」集団であった。最も満足度が低いグループは「実際の効果が得られなかった」&「病院から有効な支援をあまり受けていない」集団であった。役に立った病院の支援として挙げられたのは、「医療費助成制度に関する情報提供(48.1%)」、「肝臓疾患に関する情報提供(22.8%)」、「待ち時間への対応(11.8%)」、「肝疾患相談センターへの相談(4.4%)」、「夜間や週末の診療など、診療時間の融通性(4.0%)」などで、「特になかった」とする回答も33.3%存在した。

②核酸アナログ製剤満足度、不安、その規定因子について:核酸アナログ製剤治療効果に関して(有効回答数1924例の単一回答)、「ウイルス量が測定できない程低下した(30.3%)」、「肝機能が改善した(22.6%)」、「肝機能が正常化した(19.9%)」の計72.8%が効果ありと回答し、満足度に関しては(有効回答数1895例、単一回答)、「非常に満足している」、「満足している」が各々23.1%、51.2%で計74.3%であった。これに、「満足でも不満でもない(21.8%)」、「満足していない(3.4%)」、「非常に不満である(0.5%)」が続いた。決定木解析では、最も満足度が高いグループは「実際の効果が得られた」&「核酸アナログの効果に不安を持っていない」&「医師説明が十分だと感じている」集団であった。最も満足度が低いグループは「実際の効果が得られなかった」ために「核酸アナログの効果に不安を持っている」集団であった。不安の構造をみると、最も不

不安が多いグループは「医師の説明が不足と感じている」と「核酸アナログによる日常生活への影響を感じている」集団で、最も不安が少ないグループは「医師による説明を十分と感じている」と「年齢が 55 歳以上」の集団であった。核酸アナログ製剤による日常生活への影響として、「通院による拘束時間が増えた(26.5%)」、「仕事や家事を休まなければならない日が増えた(17.8%)」、「収入が減った(6.7%)」、「家族に負い目を感じ精神的なストレスとなった(6.2%)」などが挙げられた。

- ③新規創薬への期待について:有効回答数 2937 例(複数回答)では、「ウイルスが体内から完全に排除されること(84.8%)」、「肝がんの発生率が低くなること(62.5%)」、「肝硬変への移行が抑えられること(53.3%)」、「検査上、ウイルスに関する項目が陰性(46.7%)」、「検査上、肝機能が改善すること(37.1%)」の順であった。第1位の期待(単一回答)と病態との間には強い相関があり、キャリア、慢性肝炎、肝硬変、肝がんと病態が進行するにつれて、ウイルス完全排除を望む人は減少し、肝発がん抑制を望む人が増加した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) アンケート調査票の自由記載に関するテキストマイニング解析を今年度内に終了する予定で、データマイニング解析結果と合わせて、B 型肝炎患者が望む創薬ニーズに関する知見を本研究事業の研究代表者 18 名へフィードバックする。
- (2) 本研究事業事務局機能は日本医療研究開発機構へ移管される方針であるが、今後考えられる課題として、将来実用化されることになる新規薬剤のマーケット規模予測や、その中～長期的効果を推定するための有用なツールとなりうるであろう「B 型肝炎患者に関する全国規模のデータベース構築」が考えられる。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

- (1) 本研究事業全体の進捗を視野に入れつつ評価委員会事務局機能を担当することで、限られた期間内での新規薬剤の開発に貢献しうる。
- (2) B型肝炎患者の求めるニーズを正確に把握し、その情報を各研究代表者へ提供することで、創薬事業のあり得べき方向性を示すことが出来る。

VI. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 指定研究として評価委員会事務局機能を遂行することで、本研究事業の円滑な推進が可能となる。
- (2) アンケート調査の解析結果は国主導で開始された本研究事業の進むべき道標となることが期待される。
- (3) 本研究事業の研究者間で共有するホームページを作成し運用しているところであるが、研究代表者の承諾が得られれば一般医療者、一般住民向けに公開することも可能である。これにより、B型肝炎に対する関心が高まり、その結果適切な治療を受ける患者数が増加すれば、肝硬変・肝臓癌へのさらなる進展が抑制され、ウイルス肝炎罹患者の予後改善に繋がる。最終的には国民総医療費の節減効果も期待しうる。

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) 正木尚彦. 肝炎をめぐる医療政策. **医学のあゆみ** 240(12):997-999, 2012.
- (2) 正木尚彦. 急性肝炎サーベイランスの現状. **わが国における急性肝炎の現状 全国調査 2008-2011**(山本和秀監修、考田雅彦・能祖一裕編集)、中外医学社、東京、pp20-25、2012.
- (3) 正木尚彦. ウイルス肝炎に関する国の対策事業、公費助成や受診勧奨など. 特集 **ウイルス肝炎の新展**

- 開. **診断と治療** 101(9):1375-1380, 2013.
- (4) 正木尚彦、斎藤英胤、朝比奈靖浩. 鼎談:ウイルス性肝炎はまだなくなるらない. **成人病と生活習慣病** 43(11): 1287-1304, 2013.
- (5) 正木尚彦、坂口孝作、海嶋照美、荒尾元博、須田烈史、島上哲朗. 座談会:肝炎ウイルス陽性患者に対する診療体制をどうするか. **日本内科学会雑誌** 103(1): 123-140, 2014.
- (6) 正木尚彦. [特集]ウイルス肝炎診療の最前線と今後の展開. ウイルス肝炎に対するワクチン予防～ユニバーサルワクチネーションの動向も含めて. **内科** 113(4): 703-708, 2014.
- (7) 正木尚彦. 肝炎ウイルス検診. **成人病と生活習慣病** 44(6): 657-661, 2014.