

VIII. (3年間の研究成果の)概要図等

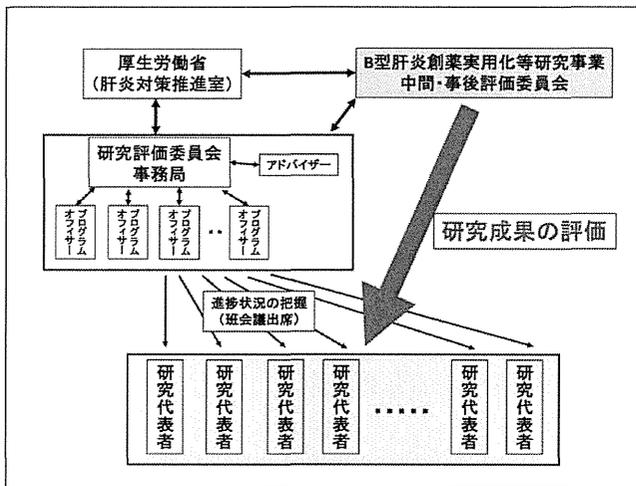


図1 B型肝炎創薬実用化等研究事業の全体構成

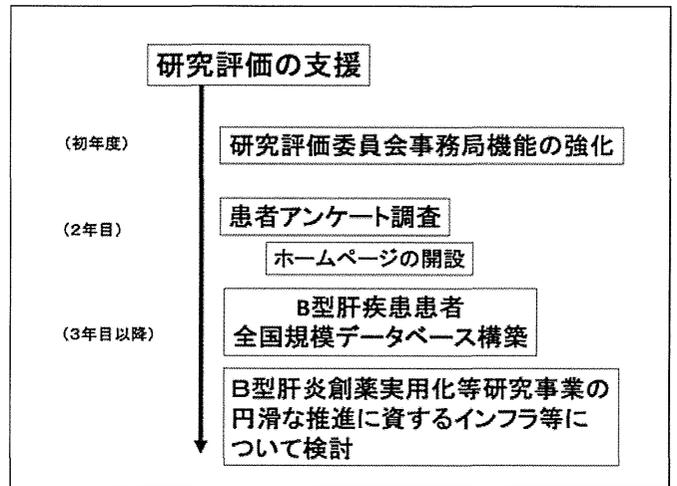


図2 研究評価委員会事務局の遂行する指定研究

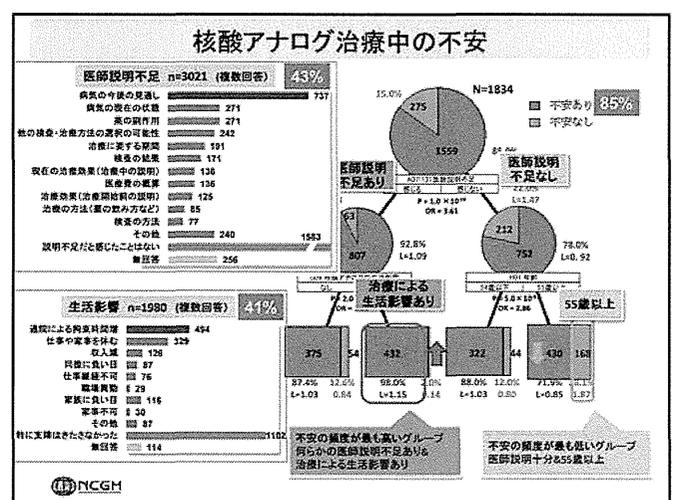
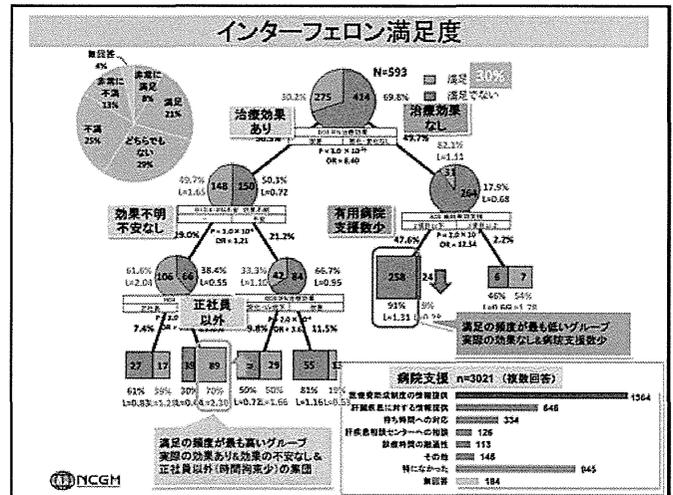
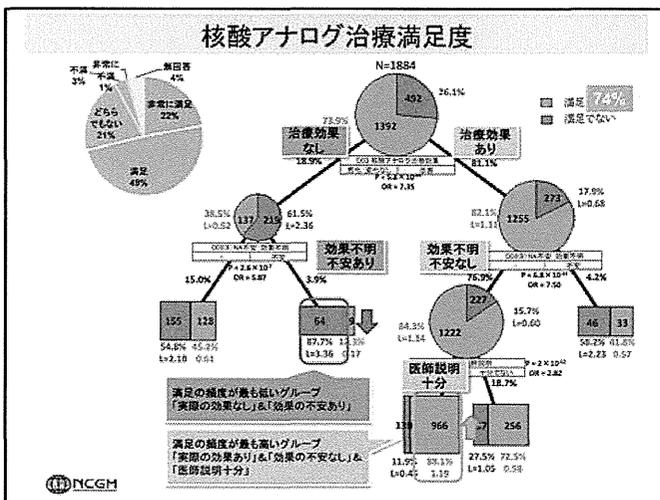
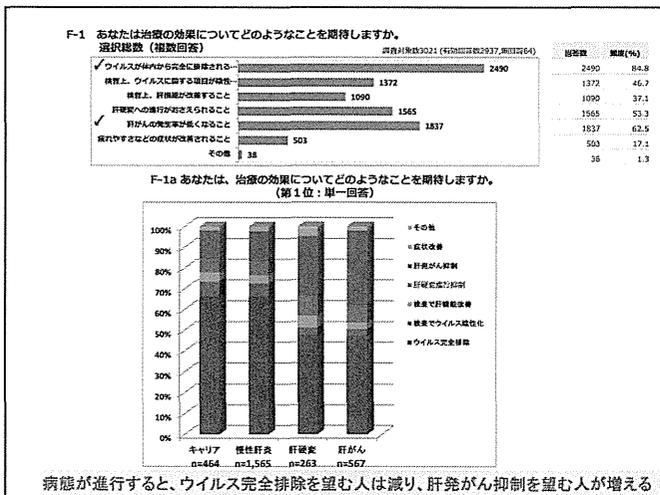


図3 新規創薬に対する患者ニーズを明らかにし、研究事業全体へ反映させる（患者アンケート調査の単純・クロス集計、決定木解析結果）

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- ・昭和 59 年 7 月～昭和 61 年 8 月：東京大学医学部附属病院第一内科（室長：藤原研司）
- ・昭和 61 年 9 月～昭和 63 年 9 月：米国フィラデルフィア市トマス・ジェファーソン大学病理
（John Farber 教授）
- ・昭和 63 年 10 月～平成 4 年 1 月、平成 5 年 10 月～平成 8 年 8 月：東京大学医学部附属病院第一内科
（室長：藤原研司）
- ・平成 8 年 9 月：国立国際医療センター（戸山病院）消化器科
- ・平成 20 年 10 月～：国立国際医療センター（現 独立行政法人国立国際医療研究センター）
肝炎・免疫研究センター（センター長：溝上雅史）

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・藤原研司（前埼玉医科大学第三内科教授、元日本消化器病学会理事長、前横浜労災病院院長）
- ・溝上雅史（独立行政法人国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター長）
- ・八橋 弘（国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター センター長）
- ・泉 並木（武蔵野赤十字病院副院長）
- ・小池和彦（国立大学法人東京大学医学部附属病院消化器内科教授、日本肝臓学会理事長）

・主な研究課題

- ・「脂質過酸化による肝細胞死のメカニズムに関する研究」
- ・「急性肝不全治療における各種プロスタグランジンの有効性とその作用機序に関する研究」
- ・「肝癌増殖活性化のメカニズムに関する研究」
- ・「C 型慢性肝炎に対するインターフェロン療法における治療効果規定因子に関する研究」
- ・「HIV と肝炎ウイルスの重複感染患者の病態に関する研究」
- ・「開発途上国におけるウイルス肝炎キャリアの疫学および治療介入の実態に関する研究」
- ・「肝炎診療全国ネットワーク構築に関する研究」
- ・「肝炎に関する全国規模でデータベース構築に関する研究」

・これまでの研究実績

【政策提言】

- ・平成 24～26 年：厚生労働科学研究「肝炎に関する全国規模のデータベースを用いた肝炎治療の評価及び肝炎医療の向上に資する研究」において、インターフェロン医療費助成を受けた C 型肝炎患者 2 万例以上を解析し、受療状況、治療効果に地域差のあることを見出し、提言した。平成 26 年 5 月には課題を有する一地域を対象とし、厚生労働省主催のブロック会議とは別に、「当該ブロックにおける肝炎診療のあり方について」の意見交換会を実施した。
- ・平成 21 年～23 年：厚生労働科学研究「肝炎に関する全国規模のデータベース構築に関する研究」の一環として遂行した「インターフェロン治療における診療アクセスの改善策に関する前向き・後ろ向き研究（研究代表者）」；ペグインターフェロン治療における外来導入の有用性、安全性を検証し、診療アクセス改善策の一つであることを提言した（原著論文）。
- ・平成 19 年～21 年：国際医療協力研究委託費「開発途上国における血液媒体疾患に対する総合的な対策の

あり方に関する研究(研究代表者)»;アジア、アフリカ 11 カ国におけるウイルス肝炎治療薬導入後の実態、特に、耐性株出現状況を明らかにしウイルス肝炎・HIV対策のあり方について提言した。

・平成 19 年 9 月～平成 20 年 3 月:厚生労働科学研究費特別研究事業「肝炎診療全国ネットワーク構築とその支援のための情報センターのあり方に係る研究(研究代表者)»;肝炎・免疫研究センター 肝炎情報センター 設立に貢献した。

・平成 9 年～平成 14 年:国際医療協力研究委託費「開発途上国におけるウイルス肝炎キャリアの実態及び防御に関する研究(研究分担者)»;ネパール国における肝疾患対策のあり方についてカウンターパートを通してネパール国当局へ提言した。

【業績】(2002 年以降分)

和 文:

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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らない. **成人病と生活習慣病** 43(11): 1287-1304, 2013.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 正木尚彦、西村 崇、忌部 航、山田晃弘、柳瀬幹雄、矢野公士、伊藤清顕、今村雅俊、伊東和樹、宜保行雄、垣内雅彦、川上由育、川上広育、畠山重秋、小松眞史、金 守良、八橋 弘、泉 並木、野村秀幸、西原利治、中尾春壽、米田政志、平松直樹、林 紀夫、溝上雅史. ペグインターフェロン治療における診療アクセスの改善策に関する多施設共同研究～前向き研究と後ろ向き研究からの考察～. **肝臓** 2010;51(7):348-360.
- (9) 白井聖一、酒匂赤人、朝山直樹、尾上淑子、中島 亮、西村 崇、藤谷啓一、矢田智之、山田晃弘、赤澤直樹、櫻井俊之、大嶋隆夫、永田尚義、矢郷祐三、笹島圭太、小早川雅男、秋山純一、柳瀬幹雄、正木尚彦、上村直実. 新しい急性肝炎重症度判定基準の有用性と問題点—単一施設における後ろ向き検討. **日本消化器病学会雑誌** 2010;107(1):48-60.
- (10) 山田晃弘、酒匂赤人、西村 崇、中島 亮、尾上淑子、藤谷啓一、津田尚法、朝山直樹、矢田智之、白井聖一、赤澤直樹、櫻井俊之、矢郷祐三、永田尚義、大嶋隆夫、横井千寿、笹島圭太、小早川雅男、秋山純一、今村雅俊、柳瀬幹雄、上村直実、正木尚彦. HIV 感染者のB型急性肝炎重症化に対するエンテカビル投与により HIV-RNA 量の著明な低下を認めた1例. **日本消化器病学会雑誌** 2009;106(12):1758-1763.
- (11) 阿部敏紀、相川達也、赤羽賢浩、新井雅浩、朝比奈靖浩、……、正木尚彦、……、矢野公士、三代俊治. 本邦におけるE型肝炎ウイルス感染の統計学的・疫学的・ウイルス学的特徴:全国集計 254 例に基づく解析. **肝臓** 2006;47(8):384-391.

(12)橋本直明、平野正憲、滝川 一、佐藤芳之、池田有成、正木尚彦、林 茂樹.C型慢性肝炎におけるcDNA マイクロアレイによる遺伝子発現とインターフェロン治療成績の検討. **肝臓** 2005;46 (10):633-634.

英 文:

- 1) Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, Mizokami M. IL28B polymorphisms and clinical implications for hepatitis C virus infection in Uzbekistan. **PLoS One**. 2014 Mar 24;9(3):e93011. doi: 10.1371/journal.pone.0093011. eCollection 2014.
- 2) 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 Feb 10;9(2):e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449. eCollection 2014.
- 3) Nakamura T, Sata M, Hiroishi K, Masaki N, Moriwaki H, Murawaki Y, Yatsushashi H, Fujiyama S, Imawari M. Contribution of diuretic therapy with human serum albumin to the management of ascites in patients with advanced liver cirrhosis: A prospective cohort study. **Mol Clin Oncol** 2014 May;2(3):349-355.
- 4) Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, Tanaka Y, Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M. Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **J Gastroenterol Hepatol** 29(12): 1996-2005, 2014.
- 5) Ishikane M, Watanabe K, Tsukada K, Nozaki Y, Yanase M, Igari T, Masaki N, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Acute hepatitis C in HIV-1 infected Japanese cohort: single center retrospective cohort study. **PLoS One**. 2014 Jun 19;9(6):e100517. doi: 10.1371/journal.pone.0100517. eCollection 2014.
- 6) Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. **J Virol Methods** 2014 Jul 11. pii: S0166-0934(14)00262-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.07.006.
- 7) Sato I, Shimbo T, Kawasaki Y, Mizokami M, Masaki N. Efficacy and safety of interferon treatment in elderly patients with chronic hepatitis C in Japan: A retrospective study using the Japanese Interferon Database. **Hepatol Res** 2014 Sep 5. doi: 10.1111/hepr.12419. [Epub ahead of print]
- 8) Sato I, Shimbo T, Kawasaki Y, Masaki N. Comparison of Peginterferon alfa-2a and alfa-2b for treatment of patients with chronic hepatitis C: a retrospective study using the Japanese Interferon Database. **Drug Design, Development and Therapy** (in press)
- 9) Kobayashi M, Sako A, Ogami T, Nishimura S, Asayama N, Yada T, Nagata N, Sakurai T, Yokoi C, Kobayakawa M, Yanase M, Masaki N, Takeshita N, Uemura N. Validation of the 3-day rule for stool bacterial tests in Japan. **Intern Med** 2014 Mar; 53: 533-539.

- 10) Murata K, Sugiyama M, Kimuta T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Mizokami M. Ex vivo induction of IFN- λ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. **J Gastroenterol** 2014 Jan;49(1):126-37.
- 11) Abe T, Hashiguchi A, Yamazaki K, Ebinuma H, Saito H, Kumada H, Izumi N, Masaki N, Sakamoto M. Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens. **Pathol Int** 2013 Jun;63(6):305-10. doi: 10.1111/pin.12064.
- 12) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. **Hepatology** 2014 Jan;59(1):89-97.
- 13) Tamada Y, Yatsushashi H, Masaki N, Nakamura M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H, Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H. Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. **Gut** 61(5):765-73, 2012.
- 14) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. **Hepatol Res** 2012 Oct;42(10):958-965.
- 15) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. **Hepatology** 2012 Oct;56(4):1448-56.
- 16) Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Ito K, Masaki N, Mizokami M. Increase in platelet count based on inosine triphosphatase genotype during interferon beta plus ribavirin combination therapy. **J Gastroenterol Hepatol** 2012 Sep;27(9):1461-6.
- 17) Miyagi Y, Nomura H, Yamashita N, Tanimoto H, Ito K, Masaki N, Mizokami M, Shibuya T. Estimation of two real-time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA during PEG-IFN plus ribavirin therapy by HCV genotypes and IL28B genotype. **J Infect Chemother** 2012 Jul 21. [Epub ahead of print]
- 18) Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamura M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, Honda M, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Taniai M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsushashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N,

- Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. **Am J Hum Genet** 2012 Oct 5;91(4):721-728.
- 19) Narahara Y, Kanazawa H, Sakamoto C, Maruyama H, Yokosuka O, Mochida S, Uemura M, Fukui H, Sumino Y, Matsuzaki Y, Masaki N, Kokubu S, Okita K. The efficacy and safety of terlipressin and albumin in patients with type 1 hepatorenal syndrome: a multicenter, open-label, explorative study. **J Gastroenterol** 2012 Mar;47(3):313-20. Epub 2011 Oct 25.
- 20) Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. **Hepatol Res** 2011;41(10):936-945.
- 21) Yoshida H, Shiratori Y, Kudo M, Shiina S, Mizuta T, Kojiro M, Yamamoto K, Koike Y, Saito K, Koyanagi N, Kawabe T, Kawazoe S, Kobashi H, Kasugai H, Osaki Y, Araki Y, Izumi N, Oka H, Tsuji K, Toyota J, Seki T, Osawa T, Masaki N, Ichinose M, Seike M, Ishikawa A, Ueno Y, Tagawa K, Kuromatsu R, Sakisaka S, Ikeda H, Kuroda H, Kokuryu H, Yamashita T, Sakaida I, Katamoto T, Kikuchi K, Nomoto M, Omata M. Effect of vitamin K2 on the recurrence of hepatocellular carcinoma: A randomized, placebo-controlled, double-blind phase II/III study. **Hepatology** 2011;54(2):532-540.
- 22) Aiba Y, Nakamura M, Joshita S, Inamine T, Komori A, Yoshizawa K, Umemura T, Horie H, Migita K, Yatsuhashi H, Nakamuta M, Fukushima N, Saoshiro T, Hayashi S, Kouno H, Ota H, Muro T, Watanabe Y, Nakamura Y, Komeda T, Shimada M, Masaki N, Komatsu T, Yagura M, Sugi K, Koga M, Tsukamoto K, Tanaka E, Ishibashi H; The PBC Study Group in NHOSLJ. Genetic polymorphisms in CTLA4 and SLC4A2 are differentially associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. **J Gastroenterol** 2011;46(10):1203-1212.
- 23) Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsuhashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. The rs8099917 polymorphism, determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy in Japanese patients than other SNPs associated with IL28B. **J Clin Microbiol** 2011;49(5):1853-60.
- 24) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated- interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. **J Hepatol** 2011;54(3):439-448. [Epub 2010 Sep 19]
- 25) Sako A, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Masaki N, Matsuda S. Acute hepatitis B in Japan: The incidence, clinical practices and health policy. **Hepatol Res** 2011;41(1):39-45.
- 26) Yano K, Tamada Y, Yatsuhashi H, Komori A, Aribu S, Ito K, Masaki N, Mizokami M, Ishibashi H, Japan National Hospital Acute Hepatitis Study Group. Dynamic epidemiology of acute viral hepatitis in Japan. **Intervirology** 2010;53(1):70-75.
- 27) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino

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

2年目研究課題

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型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究

課題番号：H25-B創-肝炎-一般-O18

予定期間：H25年度からH27年度まで

研究代表者：村上善基

所属研究機関、部局：大阪市立大学・大学院医学研究科・肝胆膵病態内科学

職名：准教授

委託費(決定額)：1年目 41,600,000円 2年目 47,500,000円 計 89,100,000円

I. 研究の意義

(1)本邦におけるHBV感染患者は全人口の1.5%と推定される。HBVに感染すると高率に慢性化する。治療は核酸アナログ製剤にてウイルスの複製のコントロールは副作用が少なく行われているが、治療期間が長期にわたる。しかし現在の治療ではウイルスを排除することは困難である。その原因として宿主の核内にウイルスの中間複製体があり、その排除が困難であること、HCVと異なり複製経路が複雑であり、十分に生態系が明らかになっていないことが挙げられる。

(2)ウイルスの変異は治療効果と関係するが現時点では変異解析をもとにした治療効果予測方法や、次世代シーケンサーを用いてマイノリティ変異まで含めた耐性ウイルスの研究は存在しない。

(3)ウイルスの複製を複数のポイントで阻害する新規抗ウイルス薬の開発は必要不可欠である。

II. 研究の目的、期待される成果

(1)次世代シーケンサーを使いmajorとminorクローンを治療効果別に同定し、タンパク構造を解析しウイルス耐性メカニズムを明らかにする。また変異パターンより治療薬選択アルゴリズムや、治療経過予測(線維化の進行程度、発癌予測)を行う。

(2)in silico screeningを用いウイルスタンパクを標的とした抗ウイルス活性を持つ低分子化合物を同定し、新規抗ウイルス薬剤開発を行う。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者(村上善基)

PXB細胞を使ったin vitro HBV感染実験系の樹立を行い、ウイルス活性、細胞毒性のモニターを簡便に行うことができた。in silico screeningを用いて得られた抗ウイルス活性持つ核酸アナログ製剤候補2種、core重合阻害薬候補2種を同定した。

・研究分担者(梅山秀明)

in silico screeningによる核酸アナログ剤候補(purine、pyrimidine typeそれぞれ30種)、capsid合成阻害剤候補60種、induced fitタイプの逆転写酵素阻害剤候補60種を選別した。

・研究分担者(岩館満雄)

screening結果を効率よくするためのアルゴリズム改良、低分子化合物選択のためデータベース構築(化合物の中で今まで創薬に使用された履歴と入手手段の確認)を行った。3次元構造解析によるHBVタンパクと低分子化合物のドッキングシミュレーションの実行を行った。

・研究分担者(田口善弘)

疾患の表現系に関与するウイルス遺伝子の変異をmajor、minor cloneごとのカタログ化を行い、臨床検体におけるウイルスの3次元構造解析の情報整備を行った。

・研究分担者(熊田卓)

長期観察した HBV キャリア(1995-2013)391 例の臨床経過解析により、HBV キャリアでは核酸アナログ投与は肝癌死、肝疾患関連死を減少させ、肝線維化が発癌に最も関与している因子であることを示した。

・研究分担者(豊田秀徳)

HBe 抗原陰性患者 732 例に対し長期予後(1991-2011)観察を行った。経過を通して ALT が 30 未満の非活動性キャリアは肝癌、肝疾患関連死は認めなかったが、観察開始時点で非活動性キャリアを明らかにする因子は認めなかった。

・研究分担者(河田則文)

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

・研究分担者(田守昭博)

核酸アナログ製剤治療中の B 型慢性肝疾患例のサンプルデータベースを作成し、HBV 再活性化例における核酸アナログ治療効果と予後について解析した。

・研究分担者(榎本大)

抗 HBV 薬の治療抵抗性因子として治療前に HBVDNA が高値であること、HBsAg の陽性があることを明らかにした。現行の高感度キットでは治療中に耐性ウイルスを検出することは出来ないこと、TDF の効果不良に ETV 耐性変異が影響している可能性を明らかにした。

・研究分担者(本多隆)

肝炎が沈静化した症例の観察開始時に HBV の coreI97L の変異が高率に認められ、解析数を増やしたところこの変異を有する症例は治療の必要性和密接に関係していることを示した。

・研究分担者(棚橋俊仁)

B 型肝炎感染患者 47 検体についてイルミナ社 MiSeq を用いて解析を行った。各検体は 100 万シーケンスリード、1 万デプス以上の解析結果が得られており、ウイルスの変異解析に充分耐え得るデータ取得を可能とした。現在 67 例の解析中である。

・研究分担者(矢野嘉彦)

遺伝子型の異なる B 型肝炎ウイルスにおいて、治療前の核酸アナログ耐性遺伝子を同定し治療前ウイルスの多様性 (Quasispecies) を次世代シーケンサーにより解析した。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1) 新規抗ウイルス活性のある化合物を同定したが、その活性を向上させるため医薬基盤研の創薬ナビに共同研究を申し込んだ。

(2) 次世代シーケンサーによるウイルス変異解析は膨大な情報が得られるが、その中で表現系と関連する変異を推定するためにマイケル・グロミハ IIT マドラス生物工学科と共同研究を行い、異なる遺伝子型における核酸アナログ製剤使用時のウイルス遺伝子の推移、変異と耐性菌の関連解析を行い、どの変異が耐性菌の機能と関係しているかを予測する。

(3) B 型肝炎ウイルスの薬剤応答に関与する稀な変異を同定し得るシーケンスデータ取得システムを構築し、ウイルスゲノム基盤データを作成する。

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) ウイルス変異解析より治療効果予測アルゴリズムを作成する。特に豊田の見いだした疾患進展しな

いHBV キャリアの同定、本多の見いだした I97L 変異の測定を簡便に測定しうる方法を開発。

(2) 核酸アナログ製剤だけではなく、surface の重合阻害による再感染防止薬、induced fit による逆転写酵素阻害剤、capsid 合成阻害による RNA 合成阻害薬を創製できるポテンシャルを我々の班は有しているために、これらの薬剤を組み合わせることによって、より短時間で慢性 B 型肝炎を制御する方法を提供することができる。

VI. 行政施策への貢献の可能性

(1) 治療前のウイルス変異アトラスを作成し各種治療薬別の治療効果シミュレーションを行い、治療の標準化を行う。

(2) 核酸アナログ製剤以外の作用ポイントを持った薬剤を提供し HBV に対するカクテル療法を開発し肝炎対策基本法に従った施策に貢献する。

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 論文報告

1. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (in press)
2. Widasari DI, Yano Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusida MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, Tanahashi T, Azuma T, Hayashi Y. A Deep-Sequencing Method Detects Drug-Resistant Mutations in the Hepatitis B Virus in Indonesians. *Intervirology*. 2014 Oct 31;57(6):384-392.
3. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi Y-h, and Azuma T. High-throughput Analysis of miRNA Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma using Next Generation Sequencing. *PLoS One*. 2014 Sep 12;9(9):e106314. doi: 10.1371/journal.pone.0106314.
4. Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida Y and Azuma T. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathogens* 2014 Jun 26;6:27.
5. Tamori A, Hino M, Hagihara A, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2014 Sep;29(9):1715-21.

(2) 学会・研究会発表

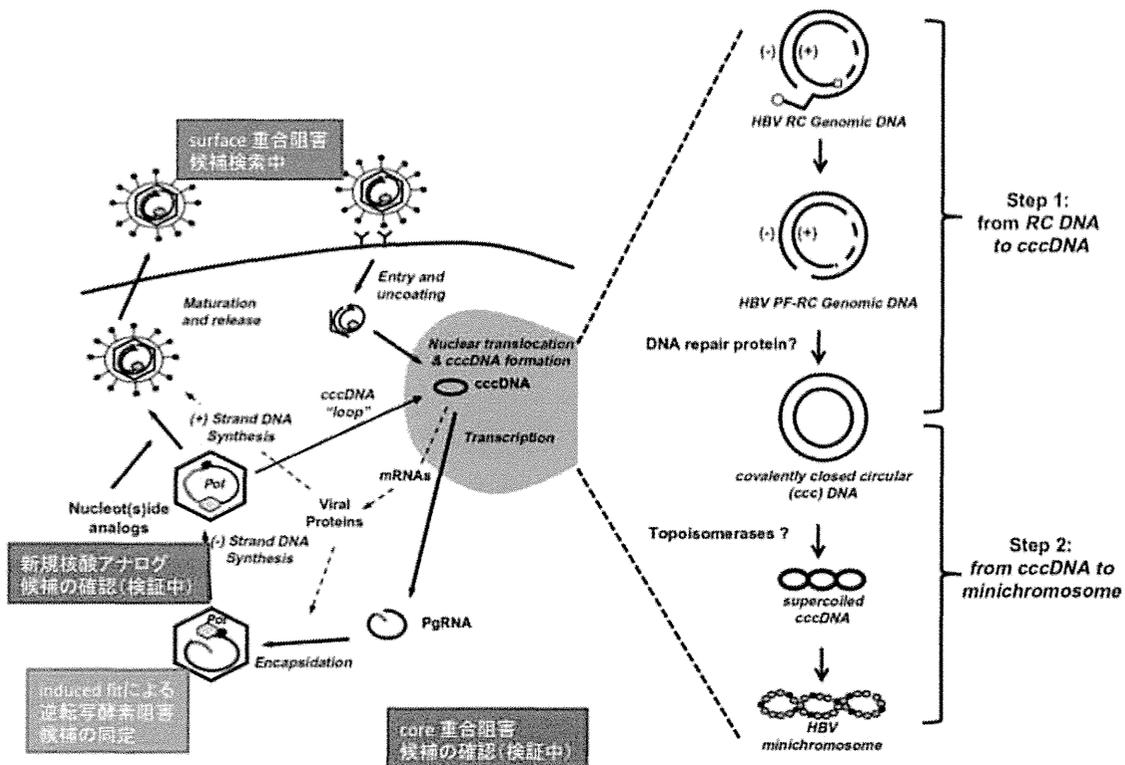
1. 田守昭博、川村悦史、萩原淳司、藤井英樹、打田佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、村上善基、河田則文 HBV再活性化における宿主因子とウイルス因子に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月29日 東京都
2. 村上善基、田守昭博、河田則文 HBVを標的としたdirect antiviral agent (DAA)開発方法の試み 第50回日本肝臓学会総会 平成26年5月29日 東京都
3. 村上善基、棚橋俊仁、田口善弘、豊田秀徳、熊田卓、榎本大、田守昭博、河田則文 次世代シーケンサーによる肝発癌に関与するmiRNAの網羅的解析 第100回日本消化器病学会総会 平成26年4月24日 東京都
4. Tamori A, Goto H, Tada M, Inui K, Kawamura E, Hagihara A, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Prospective study of hepatitis B reactivation in rheumatoid arthritis patients on immunosuppressive study: Evaluation of both HBsAg-positive and negative patients. AASLD 65th meeting 2014 Nov 11 Boston MA
5. Murakami Y, Iwadate M, Hayakawa M, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Y-h Taguchi, Umeyama H Attempt to development for direct acting antiviral agent for HBV 2014 HBV International Meeting 2014 Sep 4, Los Angels

Ⅷ. (2年間の研究成果の)概要図等

今年度の計画と計画達成度



新規抗ウイルス薬の標的部位。赤は in vitro 実験で薬効を確認、オレンジは in silico screening にて候補を同定、青は現在 in silico screening にて同定中(Levrero M et al. J Hepatol 2009 より改変)



VIII. (2年間の研究成果の)

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

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

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

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

・主な研究課題

- ・肝疾患進展におけるmiRNAの役割解析についての研究
- ・肝細胞癌、肝硬変における核酸創薬線維化過程における星細胞の関与の研究
- ・慢性ウイルス性肝炎、肝線維化に対するmiRNAを用いた治療法の開発
- ・肝疾患における非侵襲的新規バイオマーカーの開発
- ・慢性肝疾患におけるエクソソームによる細胞間情報伝達をもとにした肝疾患進展メカニズム解析
- ・タンパクの三次元構造解析を利用した低分子化合物による機能阻害剤のスクリーニング

・これまでの研究実績

学術論文

1. Itami S, Eguchi Y, Mizutani T, Aoki E, Ohgi T, Kuroda M, Ochiya T, Kato N, Suzuki H, Kawada N, Murakami Y. Control of HCV replication with iMIRs, a novel anti-RNAi agent. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* in press
2. Murakami Y, Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (in press)
3. Widasari DI, Yano Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusida MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, Tanahashi T, Azuma T, Hayashi Y. A Deep-Sequencing Method

- Detects Drug-Resistant Mutations in the Hepatitis B Virus in Indonesians. Intervirology. 2014 Oct 31;57(6):384-392.*
4. Arimoto K, Hishiki T, Kiyonari H, Abe T, Cheng C, Yan M, Fan J, Futakuchi M, Tsuda H, Murakami Y, Suzuki H, Zhang D, Shimotohno K. Murine Herc6 plays a critical role in protein ISGylation in vivo and has an ISGylation independent function in seminal vesicles. J Interferon Cytokine Res. 2014 Nov 19. [Epub ahead of print]
 5. Taguchi Y-h and Murakami Y. Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases? BMC Res Notes. 2014 Aug 30;7:581. doi: 10.1186/1756-0500-7-581.
 6. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi Y-h, and Azuma T. High-throughput Analysis of miRNA Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma using Next Generation Sequencing. PLoS One. 2014 Sep 12;9(9):e106314. doi: 10.1371/journal.pone.0106314. eCollection 2014.
 7. Tamori A, Kioka K, Sakaguchi H, Enomoto M, Hoang H, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Kawasaki Y, Tsuruta D, Kawada N. Effects on anemia of drug adjustment in patients with chronic hepatitis C during telaprevir-combined therapy. Annals of Hepatology in press
 8. Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida Y and Azuma T. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant Helicobacter pylori characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. Gut Pathogens 2014 Jun 26;6:27.
 9. Kawamura E, Shiomi S, Kotani K, Kawabe J, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Tamori A, Kawada N. Positioning of 18F-FDG PET imaging in the management algorithm of hepatocellular carcinoma Journal of Gastroenterology and Hepatology 2014 Sep;29(9):1722-7.
 10. Tamori A, Hino M, Hagihara A, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2014 Sep;29(9):1715-21.
 11. Enomoto M, Tamori A, Murakami Y, Kawada N. Interferon- α/β for treatment of chronic hepatitis C infection in the era of direct-acting antiviral agents. Hepatol Res. 2013 Dec 11. doi: 10.1111/hepr.12289.
 12. Motoyama H, Kawada N, Komiya T, Le Thuy, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, and Yoshizato K. Cytoglobin, the newest globin in mammals, is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Lab Invest. 2013 Dec 2. doi: 10.1038/labinvest.2013.135.
 13. Enomoto M, Morikawa H, Murakami Y, Tamori A and Kawada N. Adjuvant epoetin- β with peginterferon- α and ribavirin in Japanese ribavirin-intolerant relapsed patients with chronic hepatitis C genotype 2. Hepatol Res. 2013 Oct 11. doi: 10.1111/hepr.12257

14. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Yamamoto K, Murakami Y. Impact of HBV Integration into Liver Tissue on the Efficacy of Peginterferon and Ribavirin Therapy in HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients J Clin Gastroenterol. 2013 Jul 8. PMID: 23842217
15. Y-h Taguchi, Murakami Y. Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers. PLoS ONE 2013; 8: e66714
16. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y. Association between Hepatic Steatosis and Hepatic Expression of Genes Involved in Innate Immunity in Patients with Chronic Hepatitis C. Cytokine 2013 Aug;63(2):145-50.
17. Kanai M, Otsuka Y, Otsuka K, Sato M, Nishimura T, Mori Y, Kawaguchi M, Hatano E, Kodama Y, Matsumoto S, Murakami Y, Imaizumi A, Chiba T, Nishihira J, Shibata H. A Phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin in cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Jun;71(6):1521-30.
18. Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis BMC Cancer. 2013;13:99
19. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y. Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. Biomarkers. 2013;18:82-7.
20. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, and Y-h Taguchi. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. PLoS ONE. 2012; 7: e48366
21. Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. J Gastroenterol. 2012; 47: 883-895
22. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. J Med Virol. 2012 ; 84: 61-70.
23. Toyoda H, Kumada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically-resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the IL28B gene. J Med Virol. 2011; 83: 1559-1564
24. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. PLoS One. 2011; 6: e19799
25. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Impact of genetic polymorphisms

- near the IL28B gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2011; 83: 1203-1211
26. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. *PLoS One.* 2011; 6: e16081.
 27. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Medical Genomics.* 2010; 3: 48
 28. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. *PNAS* 2010; 107: 15856-61
 29. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int.* 2010; 60: 351-357
 30. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers.* 2009; 14: 529-38.
 31. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Regulation of the Hepatitis C Virus genome replication by miR-199a*. *Journal of Hepatology.* 2009; 50: 453-460
 32. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I. Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (MLL4) Gene and Rearrangements of MLL4 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Human mutation.* 2008; 29:703-708
 33. Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y. Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients. *Journal of Hepatology.* 2008; 48: 43-50
 34. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, and Shimotohno K Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene.* 2006; 25: 2537-2545
 35. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot, C, and Paterlini-Brechot P. Large scaled analysis of Hepatitis B Virus (HBV) DNA integration in HBV-related hepatocellular carcinomas (HCC). *Gut.* 2005; 54: 1162-1168
 36. Toyoda H, Hayashi K, Murakami Y, Honda T, Katano Y, Nakano I, Goto H, Kumada T, Takamatsu J. Prevalence and clinical implications of occult hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan. *J Med Virol.* 2004; 73: 195-199
 37. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, and Okanoue T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and

- peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol.* 2004; 72: 203-214
38. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene.* 2003; 22: 3911-6.
 39. Daimon Y, Yamanishi K, Murakami Y, Kirishima T, Ito Y, Minami M, Okanoue T. Novel single nucleotide polymorphisms of the cytokeratin 19 pseudogene are associated with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2003; 25: 281-286.
 40. Gozuacik D, Chami M, Lagorce D, Faivre J, Murakami Y, Poch O, Biermann E, Knippers R, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 570-579.
 41. Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, Okanoue T, Urashima T, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene.* 2001; 20: 6233-6240.
 42. Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol.* 2000; 10: 211-231.
 43. Murakami Y. Nucleotide sequence analysis of the entire HBV genome in patients with chronic hepatitis B treated with interferon and lamivudine. *J Kyoto Pref. Univ. Med.* 1999; 108: 215-222
 44. Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N, Sakamoto M, Nishioji K, Nakagawa Y, Minami M, Murakami Y, Kashima K. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol.* 1999 ; 94: 1332-1340.
 45. Okanoue T, Itoh Y, Minami M, Sakamoto S, Yasui K, Sakamoto M, Nishioji K, Murakami Y, Kashima K. Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1148 patients. *Viral Hepatitis Therapy Study Group. J Hepatol.* 1999 ; 30: 653-659.
 46. Yasui K, Okanoue T, Murakami Y, Itoh Y, Minami M, Sakamoto S, Sakamoto M, Nishioji K. Dynamics of hepatitis C viremia following interferon-alpha administration. *J Infect Dis.* 1998; 177: 1475-1479

総説 英文

1. Taguchi Y-h, Murakami Y, Iwadata M, Umeyama H, Okamoto A. Heuristic principal component analysis based unsupervised feature extraction and its application to bioinformatics. *Big Data Analytics in Bioinformatics and Healthcare.* IGI Global in press
2. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T and Iizasa H. Chapter 7 MicroRNAs and Oncogenic Human Viruses. *MicroRNAs: Key Regulator of Oncogenesis.* Springer 2014
3. Murakami Y, and Tanahashi T. Analysis of circulating microRNA by microarray in liver disease. *Methods Mol Biol.* 2013;1024:173-82. Humana Press 2013

発明特許

1. テスト体液サンプルの分類方法 村上善基 PCT/JP2013/054571 (出願日 2013-2-23)
2. テスト体液サンプルの分離方法 村上善基 特願2012-37586 (H24-2-23)
3. 慢性C型肝炎の治療効果予測方法. 村上善基. PCT/JP2010/065306 (出願日 2010-9-7)
4. 遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法. 村上善基. 特願 2010-86966 (H22-4-5)
5. 慢性C型肝炎の治療効果予測方法. 村上善基. 特願 2009-229977 (H21-9-7)
6. C型肝炎ウイルスの複製を制御するマイクロ RNA. 下遠野邦忠、村上善基. 特願 2007-91723 (H19-3-30)

平成26年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤 応答性と新規治療薬開発に関する研究

H25-B創-肝炎-一般-018

大阪市立大学大学院医学研究科
肝胆臓病態内科学 村上善基

平成27年1月27日
於 国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター

解析の背景

- 慢性B型肝炎治療上の問題点
- インターフェロン治療に対する反応が良くない。
- ヌクレオチドアナログは副作用が少なく、耐性株の出現頻度は低くなったが、薬剤の性質上長期投与の必要性がある。
- 慢性C型肝炎治療との治療効果の差が見られる。

解析の目標

- 耐性株の出現予防に治療前に塩基配列とウイルスの立体構造解析より耐性株の出現の予想をする。
- 安全で耐性株の出現が低く、長期投与しなくても良い薬剤の開発
- 既存のデータベースを利用した創薬

ウイルス遺伝子解析

- 抗ウイルス剤の反応別にHBVの変異部位を逆転写領域とそれ以外の領域別々にカタログ化する。

(熊田、河田、田守、豊田、櫻本、本多)

- B型肝炎の治療における、B型肝炎ウイルスの変異を解析する
- 治療抵抗性株の出現のタイミングを探る
 - 治療前は、治療抵抗性株は存在しないか？
 - 治療前から治療抵抗性株が存在したのか？
- 使用薬剤や治療法とのウイルス変異の関係

棚橋、矢野、岡田、伊藤：ウイルス遺伝子解析
梅山、岩館、田口：ウイルス遺伝子構造解析

材料と方法（1）

- B型肝炎ウイルスの臨床サンプル67検体
 - PCRにより、B型肝炎ウイルス遺伝子を増幅
 - Illumina社Miseqにより、Deep Sequencing
- 各検体のNGSデータについて、
 - 配列断片を参照配列にマッピング
 - RT領域のMajorityの塩基配列を決定
 - RT領域のMinor Variants を決定 (CLC Genomics Workbench 7.5.1を使用)

材料と方法（2）

- RT領域のMajorityの塩基配列をアミノ酸配列に翻訳、既知の治療抵抗性変異と比較
- RT領域のMinor Variantsを解析し、既知の治療抵抗性変異と比較

Table 2
Amino acid substitutions in the reverse transcriptase domain of HBV polymerase involved in resistance to nucleos(tide) inhibitors, found in treated patients

Drug	Major mutations	Accessory mutations
Lamivudine	rS129V [2], rS173L [2-3], rM130M [2-3], rA181S [2], rA181T [2-3], rI194L [2], rM200V [2-3], rM204V [2], and rP107S [2-3]	rS107Y [2], rM100C [2], rA181V [2], rI194L [2], rM200V [2-3], rM204V [2], rM278L [2], rM279I [2], rM279V [2], rM279F [2], rM279G [2], rM279H [2], rM279K [2], rM279L [2], rM279M [2], rM279N [2], rM279P [2], rM279Q [2], rM279R [2], rM279S [2], rM279T [2], rM279V [2], rM279W [2], rM279X [2], rM279Y [2], rM279Z [2], rM279A [2], rM279B [2], rM279C [2], rM279D [2], rM279E [2], rM279F [2], rM279G [2], rM279H [2], rM279I [2], rM279J [2], rM279K [2], rM279L [2], rM279M [2], rM279N [2], rM279O [2], rM279P [2], rM279Q [2], rM279R [2], rM279S [2], rM279T [2], rM279V [2], rM279W [2], rM279X [2], and rM279Y [2]
Adefovir	rL281V [2], rA181S [2-3], rA181T [2-3], rM152V [2-3], rM152I [2-3], rM152L [2-3], rM152M [2-3], rM152N [2-3], rM152O [2-3], rM152P [2-3], rM152Q [2-3], rM152R [2-3], rM152S [2-3], rM152T [2-3], rM152V [2-3], rM152W [2-3], rM152X [2-3], rM152Y [2-3], rM152Z [2-3], rM152A [2-3], rM152B [2-3], rM152C [2-3], rM152D [2-3], rM152E [2-3], rM152F [2-3], rM152G [2-3], rM152H [2-3], rM152I [2-3], rM152J [2-3], rM152K [2-3], rM152L [2-3], rM152M [2-3], rM152N [2-3], rM152O [2-3], rM152P [2-3], rM152Q [2-3], rM152R [2-3], rM152S [2-3], rM152T [2-3], rM152V [2-3], rM152W [2-3], rM152X [2-3], and rM152Y [2-3]	rM152V [2], rM152I [2], rM152L [2], rM152M [2], rM152N [2], rM152O [2], rM152P [2], rM152Q [2], rM152R [2], rM152S [2], rM152T [2], rM152V [2], rM152W [2], rM152X [2], and rM152Y [2]
Tenofovir	rI177V [2], rA181S [2], rA181T [2], rA181V [2], rI194L [2], and rP107S [2]	rM200V [2] and rM204V [2]
Emtricitabine	rA181S [2] and rM200V [2-3]	rM204V [2]
Disinfectant	rA181S [2] and rM200V [2-3]	rM204V [2]

Underlined bold letters and letters in bold italics indicate major mutations and by themselves confer high-level resistance to the drug. Important resistance mutations are indicated in bold, and other mutations associated with resistance to the corresponding inhibitor are shown in italic font. Accessory mutations shown in the right column are those that appeared sporadically, have limited effect on resistance, or may contribute to increase wild forms of resistant mutants.

Menéndez-Arias, L., Alvarez, M., & Pacheco, B. (2014)

結果：Majorityな治療抵抗性変異

Lamivudine

解析終了した47検体

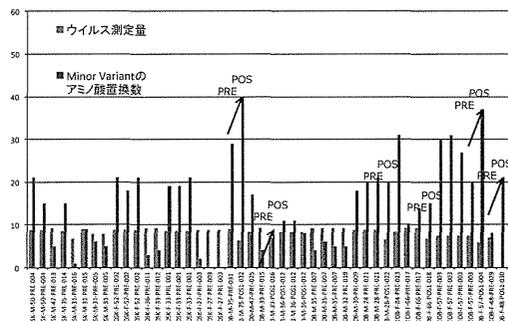
- RT領域のLamivudine治療抵抗性変異V207I
 - 45検体がV (野生型)
 - 1検体がL
 - 1検体がM (治療前後での変異は見当たらない)
- RT領域のLamivudine治療抵抗性変異Q267H
 - 12検体がQ (野生型)
 - 3検体がH (抵抗性変異) ← 同一患者の検体
 - 41検体がL (治療前後での変異は見当たらない)

Entecavir

- RT領域のEntecavir治療抵抗性変異S219A
 - 42検体がS (野生型)
 - 5検体がA (抵抗性変異) ← 同一患者の検体 (治療前後での変異は見当たらない)

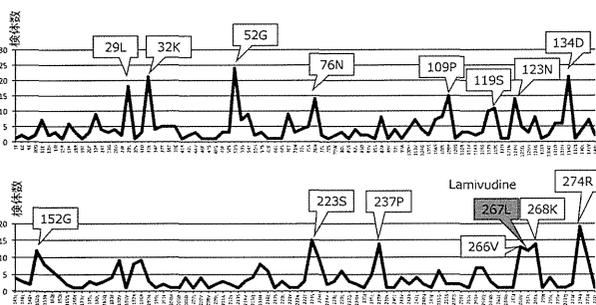
結果:RT領域のアミノ酸の多様性

各個体別のminority変異の数



検体に含まれるウイルス集団内で、RT領域にアミノ酸の多様性が見られた位置

minority変異が10検体以上で見られた部位



小括 (1)

- Majorityの変異を見る限り、治療開始後にウイルスが治療抵抗性変異を獲得したケースは見られなかった。
- 治療開始後に、RT領域に変異をもつ、Minorな株が増えたケースが見られた。

新規HBV薬創薬

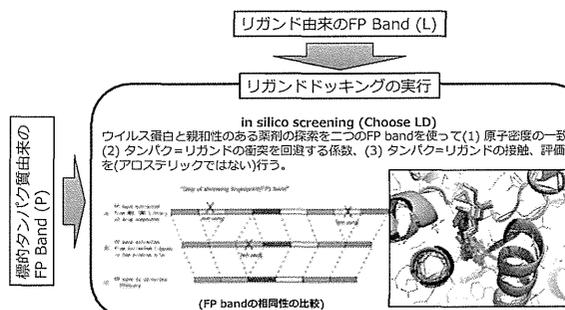
- 核酸アナログ、逆転写酵素阻害剤、core重合阻害、surfaceタンパク重合阻害候補化合物の検索。

梅山、岩籠、田口：in silico screening

- in vitro感染系 (PXB細胞、Hep38.7-Tet、Hep2.2.15.7)を使った薬剤スクリーニングと安全性試験。

早川、村上：in vitro screening

ウイルスタンパクと薬剤の構造解析



ドッキングソフトウェアリソグ、ドッキングリボシミュレーションは以前から使われている方法である。特に薬剤データベースの選択の方法は我々独自のものが得意になっている。

(JP特許4314128号 H21-5-22)(JP特許4314206号 H21-5-22)
(PCT/JP07/073005 H19-11-21)(PCT/JP08/070973 H20-11-30)