

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発
(英語) Development of novel therapeutic methods for complete inactivation of the HBV DNA in the liver by modified genome-editing technology and unique drug-delivery carriers specific to the liver

研究開発担当者 (日本語) 国立国際医療研究センター プロジェクト長 溝上雅史
所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Project Leader, Masashi Mizokami

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) HBV 特異的な人工キメラ遺伝子の開発
開発課題名： (英語) Development of genome-editing gene specific to HBV genome

研究開発分担者 (日本語) 国立国際医療研究センター プロジェクト長 溝上雅史
所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Project Leader, Masashi Mizokami

分担研究 (日本語) 核内 HBV ゲノムとホストゲノム解析
開発課題名： (英語) Analysis of HBV and human genome sequences in cell nucleus

研究開発分担者 (日本語) 国立国際医療研究センター 副プロジェクト長 杉山真也
所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Vice Project Leader, Masaya Sugiyama

分担研究 (日本語) HBV cccDNA を標的にした治療法の開発
開発課題名： (英語) Development of therapeutic strategy targeting HBV cccDNA

研究開発分担者 (日本語) 鹿児島大学、教授、小原恭子

所属 役職 氏名: (英語) Kagoshima University, Professor, Kyoko Kohara

分担研究 (日本語) HBV 感染を標的とした CRISPR/Cas9 系の確立

開発課題名: (英語) Suppression of HBV infection by CRISPR/Cas9 system

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野 助教 福原崇介

所属 役職 氏名: (英語) Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University. Assistant Professor Takasuke Fukuhara

分担研究 (日本語) 新規治療法の効果判定マーカーとその特性

開発課題名: (英語) New viral markers which can estimate effect of new therapies

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人信州大学医学部内科学第二教室 教授 田中榮司

所属 役職 氏名: (英語) Department of Medicine, Shinshu University School of Medicine, Professor
Eiji Tanaka

II. 成果の概要（総括研究報告）

「国立国際医療研究センター 溝上雅史」

ゲノム編集酵素（ZFN、TALEN）について HBV ゲノム特異的な結合能を有する配列の探索とその改良を進め、切断効率の向上を行った。加えて、各分担開発者らが開発した技術を導入したゲノム編集遺伝子と輸送担体を利用することで、その効果の最大化を図った。ゲノム編集遺伝子の評価系として *in vitro*、*in vivo* 実験系を複数開発し、スクリーニングから個別評価系までの一連のシステムを構築した。最終的に、HBV 感染させたヒト肝細胞置換キメラマウスモデルで試験を行い、HBV 特異的な切断効果を確認した。

「川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター 片岡一則」

mRNA 送達は、ゲノム編集酵素を安全に導入するための優れた手段であるが、生体内での mRNA の酵素耐性が低くその *in vivo* 導入は技術的に困難とされていた。これに対して、安定性の高いナノミセル型 mRNA 輸送担体の開発を行い、さらに、mRNA の化学修飾の最適化を行った。この最適化されたシステムを用い、ゲノム編集酵素 mRNA を送達したところ、マウス肝臓において配列特異的な HBV DNA 活性が得られた。

「名古屋市立大学 星野真一」

ゲノム編集遺伝子を肝臓内で効率よく作用させるためには、DNA ではなく RNA 分子として投与することが、効果の最大化と安全性の面から優れていた。そこで、外来性の人工合成 mRNA の分解機構の全容を解明し、その分解に関わる RNA 分解酵素 RNaseL およびオリゴアデニル酸合成酵素 OAS3 を標的としてこれらを阻害することで RNA を安定化、発現効率化する技術を開発した。また、合成 mRNA の 3' UTR に翻訳因子を繫留することで翻訳を効率化する技術の開発にも成功した。

「東京大学 中西真」

正常ヒト培養細胞および、マウス個体、ヒト型肝細胞保持マウスの臓器レベルにおいて、ゲノム編集遺伝子が誘導する、副作用的 DNA 損傷応答活性化を評価する系を開発した。各ゲノム編集遺伝子について評価を行い、高い HBV 切断活性を有しながら、細胞機能を阻害しないゲノム編集遺伝子を複数選定した。

「国立国際医療研究センター 杉山真也」

ゲノム編集遺伝子の HBV 切断とヒトゲノム切断の有無を評価するために、次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の決定と解析をパイプライン化した評価システムを確立した。細胞株、初代培養肝細胞、ヒト肝細胞置換キメラマウスといった各評価過程で HBV とヒトの全ゲノム配列解析を行った。得られた情報は、HBV 特異的ゲノム編集遺伝子の改良に利用し改善を図った。

「北海道大学 武富紹信」

ゲノム編集遺伝子の効果を評価するために外科切除によって不要となった肝組織等の収集を進めた。肝切除時に癌部、非癌部の初代培養を試み、B 型肝炎感染ヒト肝組織から線維芽細胞、肝細胞の培養に成功した。

「鹿児島大学 小原恭子」

ゲノム編集技術のうち、CRISPR/Cas9 法を HBV cccDNA 分解系として応用した。HBV ゲノム分解の至適条件を持つガイド RNA と Cas9 の酵素型の組み合わせを探索するために Gateway vector system を構築した。Cas9 の酵素型として野生型（二重鎖切断）、Nickase 型（一本鎖切断）及び Defective 型（標的への結合のみ）の三種類を構築し、効果の高い配列を選定した。また、評価系となるツパいの HBV 感染系での自然免疫系の初期反応の解析を行った。

「大阪大学 福原崇介」

本研究班では、HBV ゲノムを標的とする CRISPR/Cas9 システムを確立し、抗 HBV 活性を評価

した。また、HBV ゲノムの中で複数の遺伝子型で保存されている配列を sgRNA に設計した。さらに、Off target な宿主ゲノムへの変異導入を抑制する目的で、Cas9 の nuclease に変異を導入することで、ゲノムに Nick を導入可能であるが切断ができない Nickase を用いたシステムも確立した。HBV を標的とした sgRNA と Cas9 または Nickase を共発現させることで、in vitro および in vivo で HBV ゲノムの切断および HBV の感染性の抑制が可能であることが明らかにした。

「信州大学 田中榮司」

核酸アナログ治療下でも、HBs 抗原量と HBcr 抗原量は肝細胞中 cccDNA 量を評価できる新規マーカーであることを明らかにした。HBs 抗体存在下でも、潜在的に存在する HBV 感染を高感度に検出することが可能な新規測定系を開発した。特殊な HBV の複製状態において血中に出現する HBV RNA 測定を開発し、その意義を検討した。

To eliminate HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) and integrated HBV DNA, we developed genome-editing gene specific to HBV genome, but not human genome. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas9 system were applied to achieve the goal. We have developed several screening and assessment system to select superior genome-editing genes in vitro and in vivo. We characterized the innate immune response to HBV infection in tupaia model. Then, the selected genome-editing genes were moreover improved to show the strict specificity of HBV genome editing. Mizokami, Kohara, and Fukuhara are responsible for the development of the genome-editing genes, such as ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas9 system. We examined the best pair of zinc finger or guide RNA sequence for degradation of HBV genome using Gateway vector system. Especially, we examined the wild type (double strand break), Nickase type (single strand break) and Defective-type Cas9 to reduce the off-target effect.

Messenger (m)RNA delivery is a safe strategy for introducing genome editing nucleases. However, in vivo mRNA delivery is technically challenging due to its low nuclease stability. To solve this problem, we developed a nanomicelle-based carrier with high stability and also optimized the composition of mRNA chemical modification. Using this optimal system for the delivery of genome editing nuclease mRNA, we succeeded in sequence specific cleavage of HBV DNA in mouse liver.

Our data showed that the use of synthetic mRNA, instead of DNA as a vector, has advantage in that there is no risk of developing mutations and integration into genome. However, this strategy requires improvement of the mRNA stability and optimization of the translation efficiency. Here we have unraveled the whole picture of the decay mechanism of exogenous synthetic mRNA and successfully developed a method of improving intracellular stability and translational efficiency of the mRNA. Also, we have developed a new strategy to optimize translational potency by tethering of translation factors to the mRNA 3'UTR.

We confirmed the safety of genome editing strategy for hepatitis B patients using genome-editing gene based artificial cassettes without any remarkable side effects in normal primary human liver cells as well as wild-type and humanized mice harboring human liver cells. In addition, we assessed the sequence both human and HBV genome using next-generation sequencer. The data analysis pipeline we developed in this study enables us to know the genome-editing point in HBV or human genome, semi-automatically. The obtained data were used to improve the genome-editing gene moreover.

A lot of liver organs obtained from liver transplantation were stored to assess the genome-editing gene. A part of the organ obtained from or far from HCC was prepared to culture fibroblast and hepatocytes. These primary cells were provided to the collaborators in this study group.

We clarified that serum levels of HBs and HBcr antigens are useful to estimate intracellular level of HBV cccDNA even under nucleos(t)ide analogues administration. We developed a new assay system which can detect latent HBV infection under existence of HBs antibody with high sensitivity. We also developed an assay system which can measure serum level of HBV RNA, and showed that the level increased under extraordinary circumstances of HBV replication.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 4 件）

1. Murata K, Asano M, Matsumoto A, Sugiyama M, Nishida N, Tanaka E, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N, Shirasaki T, Honda M, Kaneko S, Gatanaga H, Oka S, Kawamura YI, Dohi T, Shuno Y, Yano H, Mizokami M. Induction of IFN- λ 3 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection. *Gut*. 2016 Oct 27.
2. Adachi E, Sugiyama M, Shimizu S, Kodama K, Kikuchi T, Koga M, Mizokami M, Koibuchi T. Human immunodeficiency virus and hepatitis B genotype G/A2 recombinant co-infection: a case study. *Springerplus*. 2016 Sep 7;5(1):1502.
3. Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud Ej, Leong Cr, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. *Front. Immunol*. 2016, 7, 335.
4. Matsumoto A, Imaizumi M, Tanaka Y, Nishiguchi S, Yatsunami H, Ishida T, Moriyama K, Aoyagi K, and Tanaka E. Novel and highly sensitive immunoassay for total hepatitis B surface (HBs) antigen, including that complexed with HBs hepatitis B surface antibody. *Journal of Gastroenterology* 2017, 52 (3), 376-84.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Associations between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection in the Japanese population. Poster, Mizokami M, Nishida N, Tokunaga K. 2016 International HBV Meeting, Seoul, Sep 21-24, 2016. 国際
2. Toll-like receptor 4 pathway mediate liver fibrosis in chimeric mice with human hepatocytes persistently infected with HBV. Oral, Sugiyama M, Kanto T, and Mizokami M. The international Liver Congress 2016 EASL. Barcelona, April 16th, 国際
3. Effects of HLA-DPB1 genotypes on HBV-related diseases in Japanese population. Poster, Nishida N, Ohashi J, Sugiyama M, Tsuchiura T, Ishii M, Tokunaga K, and Mizokami M. 第 13 回国際人類遺伝学会, 京都, 2016.4.3-7. 国際
4. Comprehensive understanding of associations between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection in Japanese individuals. Poster, Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Sawai H, Tokunaga K, Mizokami M. 66th Annual ASHG Meeting, Vancouver, Oct 10-22, 2016 国際
5. Comprehensive understanding of associations between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection in the Japanese population. Poster, Nishida N, Ohashi J, Sugiyama M, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsunami H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang Jong-Hon, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, and Mizokami M. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2016, Boston, Nov 11-15, 2016. 国際
6. B 型肝炎研究の Up-To-Date. 口頭 溝上雅史 特別発言シンポジウム 1, 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 5 月, 2016 国内

7. 現在のHBワクチンは本当にHBV感染を防ぐのか? 口頭 溝上雅史 第1回宮川庚子記念研究財団研修会, 東京, 9月 国内
8. What and How do IFN λ in Hepatitis Virus Infection? ~B型肝炎への応用を含めて~.口頭 溝上雅史 北海道大学, 札幌, 10月, 2016 国内
9. TLR4 経路阻害による B 型肝炎ウイルス感染キメラマウスの肝線維化抑制効果の検討. 口頭 杉山真也、考藤達哉、溝上雅史 ワークショップ WS4-8, 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 5月, 2016 国内
10. TLR4 signaling mediates liver fibrosis in chimeric mice with humanized liver persistently infected with HBV 口頭 Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami. 特別企画 JSH-EASL Joint Meeting, SP1-2, 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 5月, 2016. 国内
11. Variation of PreS-S gene in HBV-associated HCC patients with HLA-DPB1*0201 ポスター P1-092, Masaya Sugiyama, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 10月, 2016. 国内
12. 新規ウイルス感染実験動物 Tupaia belangeri の開発、口頭、小原恭子、真田崇裕、小原道法、第 1 2 回広島肝臓プロジェクトシンポジウム、2016/6/25、国内
13. Innate Antiviral Immune Responses to Hepatitis Viruses in Tupaia belangeri. ポスター、Kayesh, MEH, Ezzikouri, S., Chi, H., Sanada, T., Yamamoto N., Kitab, B., Matuu, A., Hatai, H., Miyoshi, N., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HCV2016, 2016/10/12、国内
14. Innate immune response to Hepatitis C virus or Hepatitis B virus in Tupaia belangeri Liver or PBL. 口頭、Kayesh, MEH, Ezzikouri, S., Chi, H., Miyoshi, N., Sanada, T., Yamamoto, N., Matsuu, A., Horie, M., Kohara, M, Tsukiyama-Kohara, K. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23、国内
15. 新規実験動物モデル「ツパイ」の開発、口演（招待講演） 小原恭子 第 39 回九州実験動物研究総会 2016/10/29、国内
16. 肝炎ウイルスの病原性と病態モデル、口演（招待講演） 小原恭子、第 12 回霊長類医科学フォーラム 2016/11/18、国内
17. B 型肝炎ウイルス感染における自然免疫応答因子の役割についての解析、ポスター、上村健太郎、小野慎子、福原崇介、岡本徹、松浦善治、第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター、2016/10/24、国内
18. Suppression of hepatitis B virus replication by CRISPR/Cas9 system、ポスター、栗原健、福原崇介、小野慎子、森寛行、田村友和、岡本徹、松浦善治、第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター、2016/10/24、国内
19. 核酸アナログ/Peg-IFN 切替療法での HBs 抗原量低下の長期予後、口頭、松本晶博、西口修平、田中榮司、第 52 回日本肝臓学会総会シンポジウム、2016/5/20、国内
20. 核酸アナログ/Peg-IFN シークエンシャル療法における、治療終了 48 週時の著効と関連する因子、口頭、松本晶博、西口修平、田中榮司、第 20 回日本肝臓学会大会ワークショップ、2016/11/4、国内
21. B 肝炎の更なる予後向上を目指して、口頭・シンポジウム、田中榮司、第 51 回日本肝臓学会総会、2015/5/21、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Drug free を目指す B 型肝炎の治療、田中榮司、平成 28 年度 肝炎等克服実用化研究事業 公開

報告会「肝炎研究 今、未来」、2016/3/11、国内

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

(英語) Development of novel therapeutic methods for complete inactivation of the HBV DNA in the liver by modified genome-editing technology and unique drug-delivery carriers specific to the liver

研究開発担当者 (日本語) 川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター センター長 片岡 一則

所属 役職 氏名： (英語) Innovation Center of NanoMedicine (iCONM), Kawasaki Institute of Industrial Promotion, Director General, Kazunori Kataoka

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 肝臓特異的なドラッグデリバリーシステムの開発

開発課題名： (英語) Development of drug delivery system targeting the liver

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：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、溝上雅史
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）
 1. 宮田完二郎、長田健介、片岡一則 PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体の自己組織化体：高分子ミセル型 DDS Drug Delivery System 2016, **31**, 283-292
 2. 宮田完二郎、内田智士、内藤瑞、片岡一則 高分子ナノテクノロジーが切り拓く核酸医薬デリバリー Drug Delivery System 2016, **31**, 44-53

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
 1. Overcoming hurdles to clinical translation of RNA therapeutics, 口頭(招待講演), K. Kataoka, Gordon Research Conference on RNA Nanotechnology, 2017/1/24, 国外
 2. Smart targeted therapy by self-assembled supramolecular nanosystems, 口頭(基調講演), K. Kataoka, 10th World Biomaterials Congress, 2016/5/19, 国外

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

- (4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New
Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名： (日本語) 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内
HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発
(英語) Development of novel therapeutic methods for complete inactivation
of the HBV DNA in the liver by modified genome-editing technology and unique drug-delivery carriers
specific to the liver

研究開発担当者 (日本語) 大学院薬学研究科 教授 星野 真一
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Prof. Shin-ichi Hoshino

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) RNA の品質管理と安定化
開発課題名： (英語) Quality control and stabilization of RNA

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、ZFN/TALEN/Crispr-Cas9 システムを用いて肝臓内 HBV ゲノムを切断することを目的としている。その過程で、ZFN/TALEN/Crispr-Cas9 の人工キメラ遺伝子を発現させるために、DNA ベクターを用いず、ゲノムへのインテグレートによる発癌等のリスクのない人工合成 mRNA を使用する点に大きな特徴を有する。したがって、RNA の持つ不安定性と翻訳効率を改善することが本研究の成功の鍵を握る。我々は、外来性の人工合成 mRNA の分解機構の全容を解明し、その分解に関わる RNA 分解酵素 RNaseL およびオリゴアデニル酸合成酵素 OAS3 を標的としてこれらを阻害することで RNA を安定化、発現効率化する技術を開発することに成功した (特願 2014-263857 ; 特願 2016-219227)。また、合成 mRNA の 3'UTR に翻訳因子を繫留することで翻訳を効率化する技術の開発にも成功した (特願 2014-107562)。

In this study, we aimed to eliminate HBV from liver genome by using a novel approach for genome editing with ZFN/TALEN/Crispr-Cas9 systems. For this purpose, the use of synthetic

mRNA, instead of DNA as a vector, has advantage in that there is no risk of developing mutations and integration into genome. However, this strategy requires improvement of the mRNA stability and optimization of the translation efficiency. Here we have unraveled the whole picture of the decay mechanism of exogenous synthetic mRNA and successfully developed a method of improving intracellular stability and translational efficiency of the mRNA. Also, we have developed a new strategy to optimize translational potency by tethering of translation factors to the mRNA 3'UTR.

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 溝上雅史 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Ryota Yamagishi, Takeshi Tsusaka, Hiroko Mitsunaga, Takaharu Maehata, and Shin-ichi Hoshino : The STAR protein QKI-7 recruits PAPD4 to regulate post-transcriptional polyadenylation of target mRNAs. **Nucl Acids Res** 2016, 44, 2475-2490.
2. Hussein H. Aly, Junya Suzuki, Koichi Watashi, Kazuaki Chayama, Shin-ichi Hoshino, Makoto Hijikata, Takanobu Kato, and Takaji Wakita : RNA exosome complex regulates stability of Hepatitis B Virus's X-mRNA transcript in a Non-Stop mediated (NSD) RNA quality control mechanism. **J Biol Chem** 2016, 291, 15958-15974.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 星野真一 : mRNA 分解による抗ウイルス防御、第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム『転写後制御を通じた病原体-宿主の攻防戦略』、2016 年 11 月 30 日（横浜）
2. 野木森拓人、永井貴広、細田直、星野真一 : 細胞内における人工合成 mRNA の安定化および発現効率化、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日（横浜）
3. Yamagishi, R., Sekido, Y., Hoshino, S.: The Star protein QKI-7 recruits PAPD4 to regulate polyadenylation of its target mRNA, The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2016 年 10 月 6 日-8 日（横浜）
4. Iwaoka, R., Aoki, K., Hosoda, N., Hoshino, S., Wakiyama, M.: MicroRNA-Ago-TNRC6 complex-mediated translational activation, EMBO/EMBL symposium 'The complex life of mRNA', 2016 年 10 月 5 日-8 日（ドイツ、ハイデルベルク）
5. 星野真一 : mRNA ポリ A 鎖調節とストレス顆粒形成、第 1 回 RNA 顆粒/RNA タンパク質

複合体研究会、2016年7月16-17日（岡崎市）招待講演

6. 稲垣佑都、細田直、星野真一：脊髄小脳変性症の原因因子 Ataxin-2 は標的 mRNA のポリ A 鎖を安定化する、第1回 RNA 顆粒/RNA タンパク質複合体研究会、2016年7月16-17日（岡崎市）
7. 堀田昂志、山岸良多、細田直、星野真一：脊髄小脳変性症の原因因子 Ataxin-2 によるストレス顆粒形成のメカニズム、第62回日本薬学会東海支部大会、2016年7月9日（名古屋）
8. 古舘和也、山岸良多、星野真一：統合失調症関連因子 QKI-7 は p27kip1 mRNA のポリ A 鎖伸長を制御する、第62回日本薬学会東海支部大会、2016年7月9日（名古屋）
9. 永井貴広、野木森拓人、細田直、星野真一：自然免疫制御システム OAS-RNaseL による外来性 RNA 分解制御、第62回日本薬学会東海支部大会、2016年7月9日（名古屋）
10. 稲垣佑都、細田直、星野真一：脊髄小脳変性症の原因因子 Ataxin-2 は標的 mRNA のポリ A 鎖を安定化する、第62回日本薬学会東海支部大会、2016年7月9日（名古屋）
- 11.
12. 星野真一：「mRNA 分解の分子機構（mRNA 分解研究の新展開）」愛知県がんセンター特別招聘セミナー、2016年5月17日（名古屋）招待講演
13. Ryoichi Sawazaki*¹, Shunsuke Imai*², Mariko Yokogawa¹, Yoko Usui¹, Takeru Sagae¹, Shin-ichi Hoshino³, Ichio Shimada², Masanori Osawa¹: Structural Characterization of PABP Multimerization on Poly(A) Tail, The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016年8月21-26日（京都）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

(1) 特願 2016-219227

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業
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
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New
Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内 HBV DNA
不活化を目指した新規治療法の開発
(英語) Development of novel therapeutic methods for complete inactivation
of the HBV DNA in the liver by modified genome-editing technology
and unique drug-delivery carriers specific to the liver

研究開発担当者 (日本語) 医科学研究所 教授 中西 真
所属 役職 氏名：(英語) The Institute of Medical Science Professor Makoto Nakanishi

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名：(英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立国際医療センター・研究所・プロジェクト長・溝上 雅史 括研究報告を
参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 9 件)

1. Kono K, Al-Zain A, Schroeder L, Nakanishi M, Ikui AE.
Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in
Saccharomyces cerevisiae.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jun 21;113(25):6910-5.
2. Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M, Katsuyama K, Goyal P,
Brind'Amour J, Sun MA, Sun Z, Ishikura T, Mizutani-Koseki Y, Ohara O, Shinkai Y,
Nakanishi M, Xie H, Lorincz MC, Koseki H.

Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1(-/-) ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95 Binding to Hemimethylated DNA.
Cell Stem Cell. 2016 Jul 7;19(1):81-94.

3. Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, Nakanishi M.
Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis
Nat Commun. 2016 Jul 8;7:12059.
4. Johmura Y, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi K, Nakanishi M.
Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation.
Sci Rep. 2016 Aug 10;6:31194.
5. Wu W, Togashi Y, Johmura Y, Miyoshi Y, Nobuoka S, Nakanishi M, Ohta T.
HP1 regulates the localization of FANCD1 at sites of DNA double-strand breaks.
Cancer Sci. 2016 Oct;107(10):1406-1415.
6. Johmura Y, Nakanishi M.
Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance.
Cancer Sci. 2016 Nov;107(11):1550-1555.
7. Shimada M, Nakanishi M.
Aurora B twists on histones for activation.
Cell Cycle. 2016 Dec 16;15(24):3321-3322.
8. Negishi Y, Miya F, Hattori A, Johmura Y, Nakagawa M, Ando N, Hori I, Togawa T, Aoyama K, Ohashi K, Fukumura S, Mizuno S, Umemura A, Kishimoto Y, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Nakanishi M, Saitoh S.
A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly.
BMC Med Genet. 2017 Jan 13;18(1):4.
9. Yamaguchi L, Nishiyama A, Misaki T, Johmura Y, Ueda J, Arita K, Nagao K, Obuse C, Nakanishi M.
Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation.
Sci Rep. 2017 Dec;7(1):55.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. DNA damage response and repair in cancer.
Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis.
口頭, 中西 真, 第75回 日本癌学会学術総会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜・
2016/10/6-2016/10/8, 国内.

2. Cell Cycle Control in Disease
口頭, 中西 真, The Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB)
COEX ソウル市 韓国, 2016/10/13, 国外
3. ヒストンユビキチン化・脱ユビキチン化による DNA 維持メチル化制御
口頭, 中西 真, 第 39 回 日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市パシフィコ横浜,
2016/12/1, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. なし

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) B型肝炎創薬実用化等研究事業
(英語) Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B

研究開発課題名：(日本語) 人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内 HBVDNA 不活化を目指した新規治療法の開発

(英語) Development of novel therapeutic methods for complete inactivation of the HBV DNA in the liver by modified genome-editing technology and unique drug-delivery carriers specific to the liver

研究開発担当者 (日本語) 北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室 I 教授 武富紹信

所属 役職 氏名：(英語) Department of Gastroenterological Surgery I, Graduate School of Medicine, Hokkaido University. Professor, Akinobu Taketomi, MD, PhD.

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 患者検体の収集と実用化に向けた臨床試験の準備

開発課題名：(英語) Large scale collection of biological specimens from HCC patients and preparation for the clinical trial

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

(1) 肝細胞癌初回切除症例の切除肝組織、血液の集積

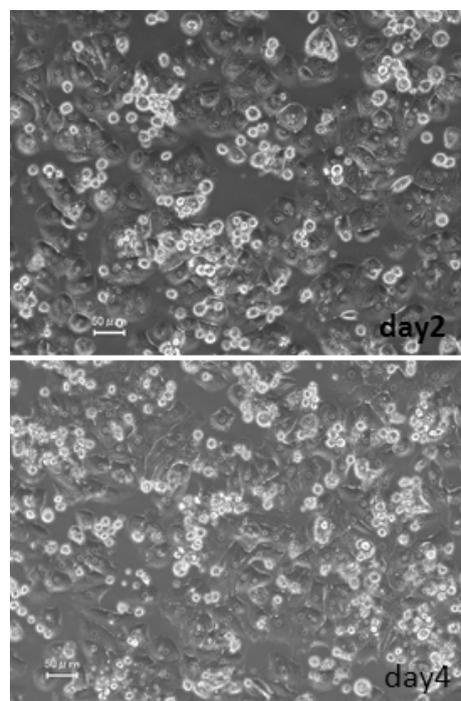
われわれは（北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I 武富紹信ら）消化器癌の手術患者の同意を得て、切除組織の余剰部位、血液、臨床情報を集積する Tissue Bank を稼働しており、Tissue Bank に集積した試料を本課題の共同研究施設に供与することが大きな役割である。2012 年 4 月 1 日から 2016 年 3 月 31 日に、施行した肝切除症例のうち試料を採取し得る大きさ、形状の 456 例を新たに Tissue Bank に登録し、切除組織（癌部、非癌部）、血液、臨床情報を集積した。うち、HCC は 258 例、B 型-HCC は 97 例、対照となる大腸癌肝転移は 102 例でとなった。2000 年以降の肝切除症例は 1512 例、HCC は 987 例、B 型-HCC は 416 例となった。

(2) ヒト切除肝組織からの肝由来細胞の初代培養条件、限界条件の検討

当初 7 例の初代培養で、温阻血された肝炎組織からの初代培養の成功率が極めて低かった。可及的にロスタイムを短縮すべく、手術班と培養班のワークフローを整えた。さらに、ラット細切肝組織を用いて、灌流、消化、分散、培養の至適条件を粗く検討し、肝細胞の生着率が高い方法を見出し、暫定的な至適条件とした。13 例の初代培養で新たな方法による初代培養を実施し、B 型肝炎感染ヒト肝組織からの初代培養とともに、線維芽細胞、癌細胞の培養に成功した。13 例中 4 例で肝細胞が生着したが、継続的な細胞供給にはさらに成功率を向上させる必要がある。

術式は培養の成否に深くかわる。採取可能な組織量の観点から、初代培養に適した術式は区域切除以上である。温阻血時間の観点からは、阻血時間が最も短い外側区切除が最適だが、症例数は少ない。一方、葉切除は多量の組織採取が見込まれるものの、阻血時間が長いので生着率は低い。過去 3 年（2013-2015 年度）の肝切除症例のうち、区域切除以上の切除術式が約 6 割であった。また、非 B 非 C-HCC のうち約 4 割は HBV 既感染であった。下表の如く、種々の意味合いを持つ肝組織とその初代培養細胞が得られるので、種々のニーズに応え得るリソースとなることに意義がある。

分類	HBV integration	ccc DNA	肝発癌要因	担癌
HBV 感染	+	+	+	+
既感染	?	?	+	+
非感染	-	-	+	+
胆道癌	-	-	+	+
大腸癌肝転移	-	-	-	+
良性疾患	-	-	-	-



Brief summary of the experimental results

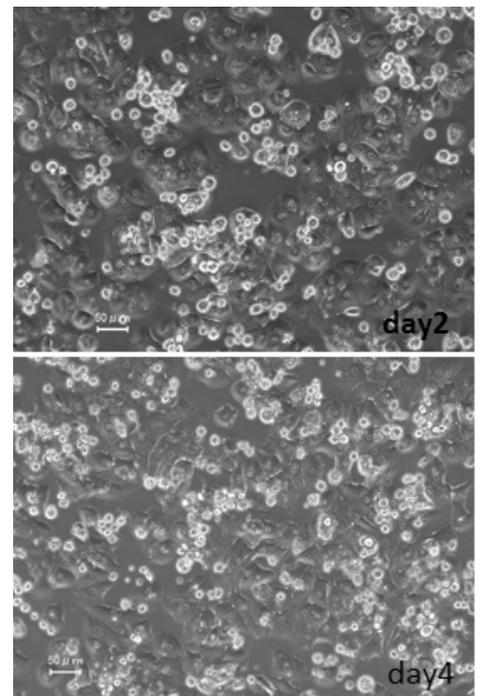
(1) Collection of human liver tissues and blood samples from the patients with HCC underwent hepatectomy.

In this project, we have main roles of collection of human liver tissue and blood samples from the patients with hepatitis B related HCC underwent hepatectomy to provide them to co-investigators. Samples from patients suffering from not only hepatitis B virus but also hepatitis C or non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) were collected. HCV and NAFLD samples will be also used as control in this study. To collect the tissue/blood samples and the patients' clinical information, Tissue Bank in Department of Surgery, Hokkaido University, which was approved by the Institutional Review Board of the Hokkaido University, were conducted. Informed consent was obtained from each patient in accordance with the Ethics Committees Guidelines for our institute. Human liver tissues were obtained from 456 patients who underwent surgical resection of primary HCC between 2012 and 2016. Among them, 97 cases were HBV related HCC.

(2) Evaluation of the condition of primary culture of hepatocyte from human resected liver tissues.

The successful rate of primary hepatocyte culture is very low in early period, because of a prolonged warm ischemic time of the liver during surgery. As investigators cannot control the warm ischemic time during surgery, we constructed the sophisticated work-flow from bedside to bench to minimize the damage of liver tissues. The patients who underwent hepatectomy with a short ischemic time, such as a left lateral segmentectomy or a partial resection of the liver, were selected for the primary culture. Furthermore, the experimental conditions of tissue digestion or tissue culture has been re-evaluated using rat liver tissues to determine the optimal condition to yield higher successful rate of primary hepatocyte culture. During study periods, primary hepatocyte culture has been established from 13 hepatectomized patients including 4 cases of HBV infection.

To improve the rate of establishment of primary hepatocyte culture from human liver tissues, immortalization of primary hepatocyte by transduction with hTERT, SV40 LT or HPV E6E7 gene are planned.



III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 8 件）

1. Orimo T, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Shimada S, Tsuruga Y, Kamachi H, **Taketomi A**. Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma with Bile Duct Tumor Thrombus, Including Cases with Obstructive Jaundice. *Ann Surg Oncol*. 2016 Aug;23(8):2627-34.
2. **Taketomi A**. Clinical trials of antiangiogenic therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2016 Apr;21(2):213-8.
3. Yokoo H, Kamiyama T, Kakisaka T, Orimo T, Wakayama K, Shimada S, Tsuruga Y, Kamachi H, **Taketomi A**. Efficacy of Sorafenib for Extrahepatic Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Liver Resection *Gan To Kagaku Ryoho*. 2015 Nov;42(12):1497-9.
4. Takahara T, Wakabayashi G, Beppu T, Aihara A, Hasegawa K, Gotohda N, Hatano E, Tanahashi Y, Mizuguchi T, Kamiyama T, Ikeda T, Tanaka S, Taniai N, Baba H, Tanabe M, Kokudo N, Konishi M, Uemoto S, Sugioka A, Hirata K, **Taketomi A**, Maehara Y, Kubo S, Uchida E, Miyata H, Nakamura M, Kaneko H, Yamaue H, Miyazaki M, Takada T. Long-term and perioperative outcomes of laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma with propensity score matching: a multi-institutional Japanese study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2015 Oct;22(10):721-7.
5. Fujiyoshi M, Kuno A, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H, **Taketomi A**; Hepatitis Glyco-biomarker Study Group.. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2015 Nov;50(11):1134-44.
6. Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Orimo T, Wakayama K, Kamachi H, Tsuruga Y, Yamashita K, Shimamura T, Todo S, **Taketomi A**. Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatol Res*. 2014 Nov 10.
7. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Kakisaka T, Tsuruga Y, Todo S, **Taketomi A**. Analysis of the risk factors for early death due to disease recurrence or progression within 1 year after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*. 10:107 (2012)
8. Takeishi K, **Taketomi A**, Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F, Maehara Y. Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatology*. 2012 Jul;57(1):77-83.
Taketomi A, Takeishi K, Mano Y, Toshima T, Matomura T, Aishima S, Uchiyama H, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Total hepatic resection of the right hepatic vein drainage area simulated by the three dimensional computed tomography. *Surgery Today*. 2012 Jan;42(1):46-51.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

【講演・発表】

1. **武富紹信**：「肝臓外科領域の最近の進歩と今後の展望」、第 50 回新さっぽろ消化器懇話会、2016 年 1 月 27 日、国内。
2. **武富紹信**：「消化器癌における腫瘍血管内皮細胞の機能解析」、第 8 回消化器疾患プロジェクト会議、

2016年1月27日、国内.

3. **武富紹信**：「肝臓外科領域における C 型肝炎治療」、第 25 回 KULDUS 講演会、2016 年 5 月 11 日、国内.
4. **Akinobu Taketomi**, Yousuke Tsuruga, Shingo Shimada, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Hideki Yokoo, Hirofumi Kamachi, Toshiya Kamiyama. “Operative planning for major hepatectomy to prevent liver failure.” The 28th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery July 2nd, 2016. 、国内.
5. **武富紹信**：プロテイン S 研究会シンポジウム「消化器外科領域における VTE の臨床的重要性」第 38 回日本血栓止血学会学術集会、2016 年 6 月 17 日、国内.
6. **武富紹信**：「肝細胞癌に対する分子標的治療～外科医はどう使いこなすか～」第 16 回岐阜肝臓外科研究会、2016 年 6 月 23 日、国内.
7. **武富紹信**：「肝臓外科領域における C 型肝炎治療」伊万里有田地区医師会学術講演会、2016 年 7 月 22 日、国内.
8. **Akinobu Taketomi**. “Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in Japan.” 7th Japanese-Mongolian International Joint Symposium on Surgical Treatment of Digestive Tract Cancers. August 27th, 2016. Ulaanbaatar, Mongolia. 、国外.
9. **Akinobu Taketomi**. “Current surgical treatment for hepatocellular carcinoma in Japan.” 4th International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology (FACO). September 22th, 2016. 、国外.
10. **武富紹信**：「肝臓外科領域における VTE」第 10 回 Acte Care and Emergency Surgery (ACES) 研究会、2016 年 10 月 7 日、国内.
11. **武富紹信**：「知っていますか？メタボで肝臓が悪くなる」標茶町講演会、2016 年 10 月 12 日、国内.
12. **武富紹信**：「進行肝臓癌に対する治療戦略」函館市外科会学術講演会、2016 年 11 月 1 日、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし