

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) B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究  
(英語) Comprehensive Studies to Eradicate HBV Infection and to Eliminate cccDNA

研究開発担当者 (日本語) 東京大学 大学院医学系研究科 病因病理学専攻 教授 森屋 恭爾  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Infection Control and Prevention, Graduate school of Medicine, The university of Tokyo. Professor Moriya Kyoji

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) 核酸導入による HBV 複製の制御  
開発課題名：(英語) Regulation of HBV replication by synthetic nucleotides

研究開発分担者 (日本語) 東京大学 大学院医学系研究科 内科学専攻 教授 小池 和彦  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Professor & Chairman Kazuhiko Koike

分担研究 (日本語) 肝細胞癌術後患者における高脂血症治療薬の影響について  
開発課題名：(英語) Statin use is associated with a reduced risk of hepatocellular carcinoma recurrence after initial liver resection

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部 肝胆膵外科、人工臓器・移植外科 教授 國土 典宏  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Division, Artificial Organ and Transplantation

分担研究 (日本語) iPS細胞を用いたHBV感染・培養系の確立と新規抗ウイルス薬の探索  
開発課題名: (英語) Development of a new model for host interaction with HBV using human  
iPS cell-derived hepatic cell line

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 肝臓病態制御学講座  
寄附講座教授 朝比奈靖浩

所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Medical and Dental University, Professor, Yasuhiro Asahina

分担研究 (日本語) HBVプロモーターおよびウイルス産生を標的にした化合物探索  
開発課題名: (英語) Identification of anti-HBV compounds targeting HBV core-promoter and  
the viral production.

研究開発分担者 (日本語) 山梨大学大学院総合研究部 教授 森石 恆司

所属 役職 氏名: (英語) Graduate Faculty of Interdisciplinary Research, University of Yamanashi,  
Professor, Kohji Moriishi,

分担研究 (日本語) HBVの*in vitro*感染・増殖系の確立と抗ウイルス薬スクリーニング系への  
応用

開発課題名: (英語) Establishment of a culture model of HBV infection and proliferation for  
screening of the anti-viral drugs

研究開発分担者 (日本語) 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 准教授 田川 陽一

所属 役職 氏名: (英語) Tokyo institute of technology Associate professor Yoh-ichi TAGAWA

分担研究 (日本語) B型肝炎ウイルスの持続感染に関与する宿主因子の同定

開発課題名: (英語) Identification of host factors involved in HBV infection

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) B型肝炎ウイルス転写複製機構の解析による治療法の開発

開発課題名: (英語) Development of the antiviral therapeutic method based on the analysis of  
HBV transcription and replication

研究開発分担者 (日本語) 学校法人 慈恵大学 准教授 鐘ヶ江 裕美

所属 役職 氏名: (英語) Jikei University School of Medicine Associate Professor Yumi Kanegae

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文:

## 化合物の探索

HBV コアプロモーター細胞アッセイ系を確立し天然物ライブラリーから抗 HBV 活性を示す化合物を同定することを旨とした。また、HBV 感染細胞の超微形態観察から抗 HBV 戦略の基盤研究確立を旨とした。HBV コアプロモーター細胞アッセイ系を用いて、海洋生物抽出物から metachromin A や漢方成分 B を同定した。これら化合物の抗 HBV 活性を解析するとともに、その誘導体や類縁化合物の抗 HBV 活性を解析し、より高い抗 HBV 化合物同定を旨とした。Metachromin A とテルペン類の抗 HBV 化合物を解析したが、metachromin A のウイルスプロモーターを標的にした抗 HBV 活性より効果が期待できる化合物として、類縁体一つが低毒性の抗 HBV 剤リードとして期待できた。さらに、脂肪滴と HBV 感染との関連性を解析し、脂肪滴の大きさと HBV 感染は、負の相関をしめしていた。脂肪滴サイズの拡大によって HBV 感染が亢進したことから、脂肪滴のサイズあるいは関連制御因子を介して HBV がウイルス量を制限し、持続感染を成立しやすくさせていることが示唆された。そのことから、脂肪代謝を標的にしたスタチン類の抗 HBV 活性を培養細胞系で解析し、simvastatin を抗 HBV 化合物候補として同定した。さらに、simvastatin 以外のスタチンとして新規スタチン化合物三つの抗 HBV 活性を検討した。そのうち 2 化合物の IC<sub>50</sub> が 1.8 から 3.8 μM であり、simvastatin より高い抗 HBV 活性を示した。さらに漢方成分の解析も行い、抗 HBV 活性を検討している。以上、本研究において天然物から抗 HBV 活性をも化合物を同定するとともに、脂肪蓄積と HBV 感染の関連を明らかにし、それを標的にしたスタチン類の抗 HBV 作用を明らかにした。本研究成果は抗 HBV 剤開発および HBV 診断治療戦略開発に貢献すると思われる。

HBV 複製機構を詳細に研究し、その成果に立脚した抗 HBV 薬のスクリーニングシステムの構築及び抗 HBV 薬の開発を行うことを目的とした。HBV ゲノム複製効率率は低いため、本研究の目的を達成するために、高効率 HBV ゲノム複製システムである HBV103-AdV システムを開発した。HBV103-AdV システムを用いて、約 90% の cccDNA を破壊する CRISPR/Cas9 システムの開発に成功した。また、本法により既に 30,000 以上の化合物のスクリーニングが終了しており、4 つの候補薬を得た。このうちの 1 つは、既存薬の耐性ウイルスにも効果を示しており、有用性が期待される。

既存薬であり肝臓保護作用などが知られている statin の B 方肝炎療法への有用性を評価することを目的とした。HBV 感染ヒト肝臓キメラマウスへの statin 投与によりウイルス mRNA 量を有意に減少させ肝臓 HBe、HBc 蛋白量を減少させることを見出した。Statin と抗ウイルス剤ラミブジン、エンテカビル、また PEG-インターフェロンとの併用により抗 HBV 作用の相乗作用・HBV DNA 低下効果一をキメラマウスで確認した。HBx トランスジェニックマウスにおいて CDK 阻害因子 p21 発現低下および statin 投与による増加を確認した。さらに肝発癌増殖に重要な役割をはたす DJ-1 が statin により発現低下することを見出した。

## 宿主因子解析と新規スクリーニング系構築

HBV の遺伝子発現機構、特にプレゲノム発現に重要なエンハンサーII/コアプロモーター (ENHII/BCP) の制御に働く宿主因子を同定し、ENHII/BCP の調節機構を明らかにすること、これによって新たな創薬標的を見出すことを目的とした。

ENHII/BCP 領域に結合する宿主因子をプロテオーム解析により探索しノックダウン圧政から HBV 複製への関与を評価した。ENHII/BCP 結合因子として同定した LUC7L3 は HBV ENHII/BCP 活性を抑制し、プレゲノム RNA 及び HBc 抗原の産生、ウイルス粒子の産生を負に制御することを明らかにした。これらの HBV 遺伝子発現制御に重要な LUC7L3 内領域を同定した。これに加え、LUC7L3 の発現によ

ってプレゲノム RNA のスプライシングが促進されることを見出した。以上の結果の論文発表を行った。

肝癌における microRNA 機能に関わる分子の発現状況を網羅的に検索し、DDX20 とよばれる microRNA 機能に重要な因子の発現が低下していることを明らかにした。DDX20 の発現低下は特に microRNA140 の機能低下に関与することが示され、実際 microRNA140 のノックアウトマウスでは肝癌の易発癌性を呈することを確認した。これにより、microRNA140 および DDX20 蛋白が、肝癌において癌抑制的に働いていることが示された。また、HBV の preS-2 領域の塩基配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 を吸着し、その機能を攪乱する可能性があることをみいだした。HBV large S mRNA が発現するトランスジェニックマウスを作製し、DEN を用いた化学物質による肝発癌系で観察すると、large S mRNA の let-7 吸着作用が肝発癌促進的に働くことを *in vivo* で確認した。さらに、B 型肝炎ウイルスの envelop を用いた bio-nanoparticle に核酸を封入することによって、肝細胞特異的に let-7 を含めた小分子核酸をデリバリーをすることを可能とした。この方法は B 型肝炎ウイルスの構成因子を用いているため、B 型肝炎感染細胞を標的とするには理論的にも効率がよいと予想された。

HBV 複製に伴い著明に発現亢進し、肝硬変、肝がんで高発現する新規長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA) *UHG1* を見いだした。*UHG1* は HBV mRNA の合成に関与し、Smad 経路を促進することで線維化関連遺伝子を誘導することが判明した。*UHG1* の発現制御機構を解析し、発現阻害を評価するスクリーニング系を確立して、statin および SIS3 が *UHG1* の発現阻害効果を示すことを見いだした。

SILAC 法や Hbc 蛋白質との結合因子の探索を通じて、LRPPRC や SRPK1 といった宿主因子を同定した。これらの因子のノックダウンおよびノックアウト Huh7 や HepG2 細胞を樹立し、それらの意義を検討したところ、LRPPRC は HBV の pgRNA の核外輸送を正に制御することが明らかになった。また、SRPK1 は pgRNA のコア粒子への取り込みを負に制御することが明らかになった。また、これらの因子の発現を変動させるコンパウンドをレポーターシステムにより探索し、同定した。しかし、このコンパウンドに強い HBV 抑制効果は認められなかった。

#### 実験手段の開発

これまで、ヒト肝臓に生理的に近い状態で供給容易な HBV 感染・増殖系はなかった。また、定常状態の肝細胞が一定の速度で *turn over* しているにも関わらず、cccDNA が核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、ヒト iPS 細胞から肝幹前駆細胞および成熟肝細胞様細胞への分化誘導・純化法を確立し、HBV および蛍光遺伝子組み換え体 HBV を感染させることに成功し、cccDNA の形成と感染粒子の産生を確認した。ヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜における HBV 感染・培養系を開発したことにより、より生理的な HBV 感染・増殖系の供給が容易となり、新規抗 HBV 薬の探索・薬効評価が可能となる。

ヒト iPS 細胞由来の肝細胞系譜細胞を用いて管腔構造を形成させたヒト内皮細胞との共培養により、生体の肝組織に近い肝細胞極性を有する *in vitro* 肝組織を構築し、HBV の感染と増殖を *in vitro* で再現するモデル構築を目指し研究をおこなった。血管内皮細胞を EHS ゲル状に播種し培養することで、管腔を有するネットワーク構造を形成させ、ヒト肝細胞を播種すると、肝細胞は内皮細胞ネットワークへ向かって遊走し、肝類洞様構造 (IVL) を構築することができた。HBV 遺伝子を導入した持続発現細胞株 (Hep G2.2.15, HuH-HB-Ae) を用いた IVL<sup>Hep G2.2.15/HuH-HB-Ae</sup> では、平面上の共培養に比較し HBV 遺伝子の発現、ウイルス粒子や抗原タンパク質の培地中への放出レベルが上昇していた (Ahn, S., et al, *J. Biosci. Bioeng.* 2014)。次に、ヒト ES/iPS 細胞を用いて同様に、IVL<sup>ES/iPS</sup> を構築するための条件を検討し、肝

細胞への誘導過程における最適な構築ポイントを見出した。ヒト iPS 細胞の肝臓系譜細胞由来 IVL<sup>iPS</sup> を構築し、2 週間以上培養が可能であることを確認した。さらに、HBV レセプターである NTCP の発現が非常に高く維持が可能であった。HBV の感染実験により、細胞内で HBV の増殖および HBV 粒子の細胞外放出などが観察され、HBV の感染が可能であった。また、エンテカビルの投与により、阻害がみられることが確認され、今後、当該研究班内で発見・開発された抗 HBV 候補物質について解析を進めていくためのモデルを確立した(特開 2015-173635)。

#### 術後補助療法等に関する臨床的解析

肝細胞癌は肝切除後 3 年以内に 50-60%は再発することが知られている。しかし、有効な肝細胞癌の補助療法は確立されていない。肝細胞癌に対して肝切除を施行した患者に対する術後の statin の投与の影響を調べるのが本研究の目的である。

2003 年から 2013 年に東京大学医学部肝胆膵外科で肝切除を行った 734 例を対象とした。statin (pravastatin, simvastatin, fluvastatine, pitavastatin, atorvastatin, and rosuvastatin)を 6 ヶ月以上周術期に使用した症例は statin 使用者と定義した。statin 使用の有無による予後を検討した。statin は 31 例 (4.2%)において使用されていた。2 群の患者背景は B 型肝炎の有無 (使用 vs 非使用 6.5% vs 22.8%,  $p=0.03$ )、C 型肝炎の有無 (19.4% vs 45.0%,  $p=0.005$ )、輸血の有無(16.4% vs 3.1%,  $p=0.004$ )、繊維化の有無(16.1% vs 39.8%,  $p=0.008$ )によって違いが認められた。無再発生存率は statin 使用群で良好だった ( $p<0.001$ )。多変量解析を施行すると、statin の使用は肝細胞癌の無再発生存率を低下させる有意な独立因子だった。全生存期間には差を認めなかった。

statin の投与は肝細胞癌切除後の再発の危険率を低下させること、statin は肝細胞癌切除後の補助療法薬としての可能性があることを示す知見を得た。

英文：

#### Search for anti-HBV agents

Moriishi group established cell-based assay system targeting HBV core-promoter activity and analyzed intracellular structures in HBV-infected cells by an electron microscopy. Eventually they identified polybrominated dephenyl ether, metachromin A, a Chinese herb compound and so on as anti-HBV compounds from natural products. The antiviral mechanisms of those compounds and analogues were analyzed. Metachromin A and related analogues were examined for identification of novel antivirals targeting HBV promoter. Other analogues may be expected to be lead compounds due to low cytotoxicity and will be employed for future study. Furthermore, statins were analyzed regarding antiviral activity due to negative co-relationship between LD size and HBV infection. Thus, statins were screened for identification of novel anti-HBV compounds. Simvastatin exhibited anti-HBV activity on the cell culture system. Furthermore, two statin analogues exhibited anti-HBV activity like simvastatin with an EC<sub>50</sub> value of 1.8  $\mu$ M to 3.8  $\mu$ M. Other compounds were identified from Chinese herb extracts and examined them for antiviral assay. These findings suggest that statin analogues and several compounds derived from natural products could suppress HBV replication and propagation. The further study will contribute to development of novel anti-HBV compounds and of novel systems for diagnosis and treatment of hepatitis B on the basis of those findings.

The purpose of this research is to study HBV replication mechanism in detail, based on the results, to develop anti-HBV drugs. The problem to achieve this purpose was the efficiency of HBV genome replication is low in culture cells. Kanegae and Saito group developed the HBV103-AdV system, which showed the highly efficient HBV genome replication not only in HepG2, but also in the primary hepatocyte. Using HBV103-AdV system, we successfully constructed a CRISPR/Cas9 system that specifically and efficiently destroyed about 90% of cccDNA. And also we searched more than 30,000 compounds using this system and we identified 4 candidate drugs. One of them was effective for resistant HBV of existing drugs.

Moriya group found that, in HBV infected chimera mice model, statin administration resulted in decreased levels of HBeAg and HBcAg in hepatocyte through decreasing expression of HBV mRNA. A combination treatment of statin with each of the individual nucleotide analogues lamivudine, entecavir and PEG-IFN led to synergistic antiviral activity in the same mouse model.

In HBx gene transgenic mice, expression level of the cell cycle kinase inhibitor p21 was found to be lower in the liver compared to control mice, which may be involved in the viral pathogenesis. Statin administration to the HBx gene transgenic mice contributed to recovery of p21 level. In addition, statin treatment with the transgenic mice resulted in suppression of DJ-1 expression that possibly plays a role in growth and tumor generation of hepatocellular carcinoma.

#### Investigation of host factors involved in HBV lifecycle or the viral pathogenesis and development of new drug screening

Suzuki group identified LUC7 like 3 pre-mRNA splicing factor (LUC7L3, also known as hLuc7A or CROP) as a novel interacting partner of HBV enhancer II and basal core promoter (ENII/BCP), key elements within the core promoter, through the proteomic screening and found that LUC7L3 functions as a negative regulator of ENII/BCP. Gene silencing of LUC7L3 significantly increased expression of the viral genes and antigens as well as the activities of ENII/BCP and core promoter. In contrast, overexpression of LUC7L3 inhibited their activities and HBV replication. In addition, LUC7L3 possibly contributes to promotion of the splicing of 3.5 kb RNA, which may also be involved in negative regulation of the pregenome RNA level. This is the first to demonstrate the involvement of LUC7L3 in regulation of gene transcription and in viral replication.

From the comprehensive screen of microRNA-related molecules, Koike group found that DDX20, an important component regarding microRNA function, was frequently downregulated in HCCs. Downregulation of DDX20 expression is specifically related with the decreased function of miR140. Mir140 knockout mice were more susceptible to hepatocarcinogenesis. These observations suggested that miR140 and DDX20 are novel liver tumor suppressors. In addition, preS2 regions in HBV absorb let-7, a microRNA which is a liver tumor suppressor, and deregulate let-7 function. HBV large S mRNA expressing transgenic mice were more prone to liver carcinogenesis induced by DEN through decoy function of large S mRNA against let-7. Further, HBV envelop was used as a carrier or bionanoparticle of let-7, which was specifically delivered to hepatocytes in vitro. This method may efficiently target HBV-infected hepatocytes because it uses components of HBV, which may

theoretically distribute to the cells infected with HBV.

Kitagawa group found a novel lncRNA *UHGI* which is induced accompanied by HBV replication. *UHGI* is overexpressed in livers bearing cirrhosis or hepatomas, and involved in mRNA transcription of HBV. It promotes transcription of fibrosis related genes via Smad pathway. The molecular mechanisms of *UHGI* induction were further investigated. In addition, the group successfully established a screening system for inhibitors which suppress *UHGI* induction and found that statins and SIS3 inhibited *UHGI* induction.

Fukuhara group identified 2 host factors, LRPPRC and SRPK1 by SILAC system and mass spectrometry. First, these factors deficient Huh7 or HepG2 cells were established by shRNA-mediated knockdown or CRISPR/Cas9-mediated knockout system. The group clarified that LRPPRC was involved in the transport of HBV pgRNA and SRPK1 negatively regulated the uptake of viral genome into capsid. So far, we screened for compound involved in the expression levels of LRPPRC and SRPK1. Unfortunately, the treatment with these compound had no strong inhibitory effect on the infection of HBV.

#### Development of research tools useful for studies toward discovery of anti-HBV drugs

HBV research is hampered by a lack of appropriate in vitro infectious models. To meet this need, Asahina group developed culture models of HBV infection using human iPS cell-derived hepatocyte lineages. These cells were susceptible to HBV infection, produced HBV particles, and maintained innate immune responses. This study provides evidence that iPS-derived hepatic cell lines can be utilized for novel HBV culture models to investigate the interactions between HBV and host cells and the development of anti-HBV strategies.

Tagawa group developed culture models of HBV infection using human induced pluripotent stem cell-derived *in vitro* liver tissue (IVL), including immature proliferating hepatic-like cell and endothelial cells. This model was susceptible to HBV infection, produced HBV particles. The infection efficiency of HBV in IVL predominantly depended on the expression levels of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). IVL expressed NTCP for HBV persistence.

This study concluded that iPS-derived liver tissue can be utilized for novel HBV culture models between HBV and host cells and the development of anti-HBV strategies.

#### Clinical study on postoperative statin treatment

The cumulative recurrence rate of hepatocellular carcinoma (HCC) remains high, approximately 50-60% at 3 years after liver resection. However, effective adjuvant therapies after HCC resection have yet to be established. Kokudo group aimed to investigate prognostic influence of statin use against HCC recurrence in patients who underwent initial HCC resection.

Between 2003 and 2013, 734 patients that underwent initial liver resection for HCC were included in the study. Exposure to statin (pravastatin, simvastatin, fluvastatine, pitavastatin, atorvastatin,

and rosuvastatin) was defined as the use of recommended daily dose for more than 6 months before and after surgery. Short- and long-term outcomes were compared between patients who received statin and who did not.

Of the 734 patients, 31 (4.2%) patients received statins for the treatment of dyslipidemia (the statin group), and 703 (95.8%) patients did not (the non-statin group). The patient's background and short-term outcomes were different in part between the statin group and the non-statin group in part, including the proportions of hepatitis B (6.5% vs. 22.8%,  $P=0.032$ ) and C (19.4% vs. 45.0%,  $P=0.005$ ), red blood transfusion rate (16.1% vs. 3.1%,  $P=0.004$ ), and the proportion of fibrosis score, F3-4 (16.1% vs. 39.8%,  $P=0.008$ ). The recurrence-free survival (RFS) rate was significantly higher in the statin group than in the non-statin group ( $P < 0.001$ ). The 1-, 3-, and 5-year RFS rates were 87.1%, 76.7%, and 76.7%, respectively, in the statin group, and 65.3%, 40.6%, and 32.9%, respectively, in the non-statin group. A multivariable Cox proportional hazards model revealed that use of statin (HR: 0.34, 95%CI: 0.12-0.75,  $P=0.005$ ) was associated with a significantly lower risk of HCC recurrence. The overall survival rate was similar between the groups ( $P=0.142$ ).

The use of statin reduced a risk of HCC recurrence after initial liver resection. Statin has a potential as an adjuvant therapy for HCC resection.

### 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 (国際誌 44 件)

1. Aizawa S, Okamoto T, Sugiyama Y, Kouwaki T, Ito A, Suzuki T, Ono C, Fukuhara T, Yamamoto M, Okochi M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Suzuki R, Shoji I, Moriishi K, Moriya K, Koike K, Matsuura Y. TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis. *Nat Commun.* 2016 May 4;7:11379.
2. Tian Y, Yang Y, Zhang X, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kamijo Y, Lu Y, Moriya K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Age-dependent PPAR $\alpha$  activation induces hepatic sulfatide accumulation in transgenic mice carrying the hepatitis C virus core gene. *Glycoconj J.* 2016 Jun 18;33 (6), 927-936.
3. Nishikawa H, Shiraki M, Hiramatsu A, Moriya K, Hino K, Nishiguchi S. JSH guidelines for sarcopenia in liver disease (first edition): Recommendation from the working group for creation of sarcopenia assessment criteria in the JSH. *Hepatol Res.* 2016 Sep;46(10):951-63
4. Ogishi M, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Delineation of autoantibody repertoire through differential proteogenomics in hepatitis C virus-induced cryoglobulinemia. *Sci Rep.* 2016 Jul 12;6:29532
5. Tsutsumi T, Okushin K, Enooku K, Fujinaga H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Aizaki H, Suzuki T, Matsuura Y, Koike K. Nonstructural 5A Protein of Hepatitis C Virus Interferes with Toll-Like Receptor Signaling and Suppresses the Interferon Response in Mouse Liver. *PLoS One.* 2017 Jan 20;12(1): e0170461
6. Yamada N, Sugiyama R, Nitta S, Murayama A, Kobayashi M, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Resistance mutations of Hepatitis B virus in entecavir – Refractory patients. *Hepatology Communications.* 2017 April 110-121
7. Sekiba K, Yamagami M, Otsuka M, Suzuki T, Kishikawa T, Ishibashi R, Ohno M, Sato M,



- Koike K. Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Apr 29;486(2):521-525.
8. Takata A, Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Koike K. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let-7. *Sci Rep*. 2016;6:23237.
  9. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Yamagami M, Ohno M, Takata A, Shibata C, Ishibashi R, Koike K. MicroRNAs and liver disease *J Hum Genet*. 2017; 62(1):75-870.
  10. Mise Y, Hasegawa K, Satou S, Shindoh J, Miki K, Akamatsu N, Arita J, Kaneko J, Sakamoto Y, Kokudo N. How has virtual hepatectomy changed the practice of liver surgery? Experience of 1194 virtual hepatectomy before liver resection and living donor liver transplantation. *Ann Surg* 2017 (in press).
  11. Yamashita S, Sakamoto Y, Yamamoto S, Takemura N, Omichi K, Shinkawa H, Mori K, Kaneko J, Akamatsu N, Arita J, Hasegawa K, Kokudo N. Efficacy of Preoperative Portal Vein Embolization Among Patients with Hepatocellular Carcinoma, Biliary Tract Cancer, and Colorectal Liver Metastases: A Comparative Study Based on Single-Center Experience of 319 Cases. *Ann Surg Oncol* 2017 (in press)
  12. Ho MC, Hasegawa K, Chen XP, Nagano H, Lee YJ, Chau GY, Zhou J, Wang CC, Choi YR, Poon RT, Kokudo N. Surgery for Intermediate and Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Consensus Report from the 5th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting (APPLE 2014). *Liver Cancer* 2016; 5:245-6.
  13. Kokudo T, Hasegawa K, Matsuyama Y, Takayama T, Izumi N, Kadoya M, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Kaneko S, Kokudo N; Liver Cancer Study Group of Japan. Survival benefit of liver resection for hepatocellular carcinoma associated with portal vein invasion. *J Hepatol* 2016; 65:938-43.
  14. Kokudo T, Hasegawa K, Kokudo N, Kokudo T, Uldry E, Demartines N, Halkic N. Hepatocellular Carcinoma: The Gap Between Eastern and Western Clinical Practice. *Ann Surg* 2016 (in press)
  15. Kokudo T, Hasegawa K, Amikura K, Uldry E, Shirata C, Yamaguchi T, Arita J, Kaneko J, Akamatsu N, Sakamoto Y, Takahashi A, Sakamoto H, Makuuchi M, Matsuyama Y, Demartines N, Malagó M, Kokudo N, Halkic N. Assessment of Preoperative Liver Function in Patients with Hepatocellular Carcinoma - The Albumin-Indocyanine Green Evaluation (ALICE) Grade. *PLoS One* 2016; 11:e0159530
  16. Hayashi A, Shibahara J, Misumi K, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M. Histologic Assessment of Intratumoral Lymphoplasmacytic Infiltration Is Useful in Predicting Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2016; 11:e0155744.
  17. Shibahara J, Hayashi A, Misumi K, Sakamoto Y, Arita J, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M. Clinicopathologic Characteristics of Hepatocellular Carcinoma With Reactive Ductule-like Components, a Subset of Liver Cancer Currently Classified as Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma With Stem-Cell Features, Typical Subtype. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:608-16.
  18. Shindoh J, Makuuchi M, Matsuyama Y, Mise Y, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Complete removal of the tumor-bearing portal territory decreases local tumor recurrence and

- improves disease-specific survival of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016; 64:594-600.
19. Tamaki N, Kurosaki M, Kusakabe A, Orito E, Joko K, Kojima Y, Kimura H, Uchida Y, Hasebe C, Asahina Y, Izumi N. Hepatitis B Surface Antigen Reduction by Switching from Long-term Nucleoside/nucleotide Analog Administration to Pegylated Interferon. *J Viral Hepat* 2017 Feb 15.
  20. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Komori A, Toyoda H, Kumada T, Namisaki T, Yoshiji H, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwara E, Itoh Y, Ide T, Tamori A, Matsubara M, Kawada N, Shirabe K, Tomita E, Honda M, Kaneko S, Nishina S, Suetsugu A, Hiasa Y, Watanabe W, Genda T, Sakaida I, Nishiguchi S, Takaguchi K, Tanaka E, Sugihara J, Shimada M, Kondo Y, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Tanaka Y, on behalf of the Japanese Genome-Wide Association Study Group for Viral Hepatitis. Genome-wide association study identifies 1 a TLL1 variant associated with development of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2017 Feb 2.
  21. Murakawa M, Asahina Y, Nagata H, Nakagawa M, Kakinuma S, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Otani S, Kaneko S, Miyoshi M, Tsunoda T, Asano Y, Sato A, Itsui Y, Azuma S, Nouchi T, Furumoto Y, Asano T, Chuganji Y, Tohda S, Watanabe M. ITPA gene variation and ribavirin-induced anemia in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated with sofosbuvir plus ribavirin. *Hepatol Res* 2017 Jan 27.
  22. Murakawa M, Asahina Y, Kawai-Kitahata F, Nakagawa M, Nitta S, Otani S, Nagata H, Kaneko S, Asano A, Tsunoda T, Miyoshi M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Iijima S, Tsuchiya K, Izumi N, Tohda T, and Watanabe M. Hepatic IFNL4 expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 2017 early view on Feb 27.
  23. Itakura J, Kurosaki M, Hasebe C, Osaki Y, Joko K, Yagisawa H, Sakita S, Okushin H, Satou T, Hisai H, Abe T, Tsuji K, Tamada T, Kobashi H, Mitsuda A, Ide Y, Ogawa C, Tsuruta S, Takaguchi K, Murakawa M, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N. Complex pattern of resistance-associated substitutions of hepatitis C virus after daclatasvir/asunaprevir treatment failure. *PLoS One* 2016; 11: e0165339.
  24. Nitta S, Asahina Y, Matsuda M, Yamada N, Sugiyama R, Masaki T, Suzuki R, Kato N, Watanabe M, Wakita T, Kato T. Effects of Resistance-Associated NS5A Mutations in Hepatitis C Virus on Viral Production and Susceptibility to Antiviral Reagents. *Sci Rep* 2016; 6: 34652.
  25. Goto F, Kakinuma S, Miyoshi M, Tsunoda T, Kaneko S, Sato A, Asano Y, Otani S, Azuma S, Nagata H, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Asahina Y, Watanabe M. Bone Morphogenetic Protein-4 Modulates Proliferation and Terminal Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Hepatol Res* 2016 Sep 27.
  26. Takada H, Tsuchiya K, Yasui Y, Nakakuki N, Tamaki N, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N. Irregular vascular pattern by contrast-enhanced ultrasonography and high serum Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein level predict poor outcome after successful radiofrequency

- ablation in patients with early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* 2016; 5: 3111-3120.
27. Nagata H, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Kaneko S, Goto F, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Seishin Azuma S, Kakinuma S, Tojo N, Tohda T, [Asahina Y](#), Watanabe M, the Ochanomizu Liver Conference Study Group. Serial measurement of Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein is useful for predicting liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with IFN-based and IFN-free therapy. *Hepatol Int* 2016;10: 956-964.
  28. Kaneko S, Kakinuma S, [Asahina Y](#), Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Asano Y, Nagata H, Otani S, Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Iwamoto M, Watashi K, Wakita T, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Watanabe M. Human induced pluripotent stem cell-derived hepatic cell line as a new model for host interaction with hepatitis B virus. *Sci Rep* 2016; 6:29358.
  29. Taniguchi M, Tasaka-Fujita M, Nakagawa M, Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Goto F, Nagata H, Kaneko S, Nitta S, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Itsui Y, Mori K, Yagi S, Kakinuma S, [Asahina Y](#), Watanabe M. Evaluation of Interferon Resistance in Newly Established Genotype 1b Hepatitis C Virus Cell Culture System. *J Clin Transl Hepatol* 2016; 4: 5-11.
  30. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Miyoshi M, Tsunoda T, Asano Y, Kawai-Kitahata F, Nitta S, Nakata T, Okamoto O, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, [Asahina Y](#), Yamaguchi T, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase-14 Mediates Formation of Bile Ducts and Hepatic Maturation of Fetal Hepatic Progenitor Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 469: 1062-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.105.
  31. Kawai-Kitahata F\*, [Asahina Y](#)\*, Tanaka S, Kakinuma S, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nagata H, Kaneko S, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Itsui Y, Nakagawa M, Tanabe M, Takano S, Fukasawa M, Sakamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. \*These authors contributed equally to this study. Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features. *J Gastroenterol* 2016; 51: 473-86. doi: 10.1007/s00535-015-1126-4.
  32. Azuma S, [Asahina Y](#), Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Ootani S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Murakawa M, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Watanabe M. Efficacy of additional radiofrequency ablation after transcatheter arterial chemoembolization for intermediate hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2016; 46: 312-9. doi: 10.1111/hepr.12566.
  33. [Asahina Y](#), Izumi N, Hiromitsu K, Kurosaki M, Koike K, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tanaka E, Tanaka Y, Tsubouchi H, Hayashi N, Hiramatsu N, Yotsuyanagi H. JSH Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection: A 2016 update for genotype 1 and 2. *Hepatol Res* 2016; 46: 129-165.
  34. [Asahina Y](#) and Watanabe M. Need for appropriate programs for prevention of hepatitis B infection: lessons from the latest nationwide survey in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;

31: 12-13.

35. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Murakami S, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosoya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M, Moriishi K: Inhibitory effect of CDK9 inhibitor FIT-039 on hepatitis B virus propagation. *Antiviral Res*, 133: 156-164, 2016
36. Kouwaki T, Okamoto T, Ito A, Sugiyama Y, Yamashita K, Suzuki T, Kusakabe S, Hirano J, Fukuhara T, Yamashita A, Saito K, Okuzaki D, Watashi K, Sugiyama M, Yoshio S, Standley DM, Kanto T, Mizokami M, Moriishi K, Matsuura Y: Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx. *Journal of Virology*, 90: 3530-3542, 2016
37. Adachi A, Tamai M, Tagawa Y. Collagen: The Oldest Scaffold for Tissue Regeneration Current Tissue Engineering, 2016, 5(2): 85-102.
38. Furuzono S, Meguro M, Miyauchi S, Inoue S, Homma T, Yamada K, Tagawa Y, Nara F, Nagayama T. A novel aldosterone synthase inhibitor ameliorates mortality in pressure-overload mice with heart failure. *European Journal of Pharmacology*, 795:58-65, 2016. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.049
39. Nakajima K, So M, Takahashi K, Tagawa Y, Hirao M, Goto Y, Ogi H. Optimized Ultrasonic Irradiation Finds Out Ultra-stable Aβ1-40 Oligomer, *J. Phys. Chem. B* in press, 2017
40. Yue Y, Tamai M, Tagawa Y. Nitric Oxide is Critical for Avoiding Hepatic Lipid Overloading via IL-6 Induction during Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice Experimental Animals in press.
41. Toyoda Y, Kashikura K, Soga T, Tagawa Y. Metabolomics of an in vitro liver model containing primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network: comparative study on the metabolic stability and the effect of acetaminophen treatment *Journal of Toxicological Sciences* in press
42. Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Shi G, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single-domain intrabodies against hepatitis C virus core inhibit viral propagation and core-induced NFκB activation. *J Gen Virol*. 2016 ;97(4): 887-92.
43. Ichise H, Hori A, Shiozawa S, Kondo S, Kanegae Y, Saito I, Ichise T, Yoshida N. Establishment of a tamoxifen-inducible Cre-driver mouse strain for widespread and temporal genetic modification in adult mice. *Exp Anim*. 2016; 65(3): 231-44.
44. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Matsuda N, Nomoto A, Suzuki T, Saito I, Kanegae Y. Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. *Sci Rep*. 2017; 7: 41851.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hepatitis C virus core protein interacts with Bnip3 and suppresses its dimerization and binding with LC3,ポスター, Tsutsumi T, Kado A, Okushin K, Enooku K, Fujinaga H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Kanegae Y, Saito I, Matsuura Y, Koike K, 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV 2016), Kyoto, Japan, Oct 13, 2016, 国内
2. レジパスビル/ソホスブビル 2 剤併用療法の治療効果と安全性の検討,ポスター, 西島 瑞希, 南達也, 建石 良介, 藤原 直人, 中塚 拓馬, 佐藤 雅哉, 榎奥 健一郎, 工藤 洋太郎, 中川 勇人, 浅岡 良成, 泉谷 昌志, 近藤 祐嗣, 藤永 秀剛, 田中 康雄, 大塚 基之, 加藤 直也, 四柳 宏, 池

- 田 均, 森屋 恭爾, 小池 和彦, 第 24 回日本消化器関連学会週間(JDDW) (第 20 回日本肝臓学会大会) , 神戸, 2016/11/3,国内
3. Delineation of autoantibody repertoire through differential proteogenomics in HCV-induced cryoglobulinemia, ポスター, Yotsuyanagi H, Ogishi M, Moriya K, Koike K, Asian Pacific Digestive Week (APDW) 2016, Kobe, Japan, Nov 5, 2016,国内
  4. In vivo knock-down of bile salt export pump exacerbates the homeostasis of the cholesterol and bile acid metabolism in mouse NAFLD model,ポスター, Okushin K, Tsutsumi T, Enooku K, Fujinaga H, Kado A, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, MA, USA, NOV 13, 2016,国外
  5. アルブミン、ICG15 分値を用いた新しい肝機能評価分類(ALICE score)の肝細胞癌術後短期成績における有用性の検討、口頭、國土貴嗣、長谷川潔、網倉克己、高橋遍、金子順一、赤松延久、有田淳一、阪本良弘、坂本裕彦、國土典宏、第 78 回日本臨床外科学会、高輪プリンスホテル、2016/11/26、国内。
  6. 尾状葉下大静脈部の肝がんに対する central hepatectomy、口頭、阪本良弘、新川寛二、吉岡龍二、有田淳一、赤松延久、金子順一、長谷川潔、國土典宏、第 78 回日本臨床外科学会、高輪プリンスホテル、2016/11/26、国内。
  7. ALPTIPS(Associating Liver Partial partition and Trans-Ileocecal Portal vein embolization for Staged hepatectomy)、口頭、Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N、第 71 回日本消化器外科学会、徳島、2016/7/16、国内
  8. 肝内胆管癌の治療方針 拡大手術 vs 縮小手術 縮小手術の立場から、口頭、長谷川潔、阪本良弘、宮田明典、河口義邦、大道清彦、新川寛二、赤松延久、金子順一、有田淳一、國土典宏、第 71 回日本消化器外科学会、徳島、2016/7/16、国内
  9. ALPPS 手術の原理を応用した安全で効果的な二期的肝切除 ALPTIPS の開発、口頭、稲垣冬樹、阪本良弘、宮田明典、新川寛二、赤松延久、有田淳一、金子順一、長谷川潔、大倉直樹、國土典宏、第 116 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2016/4/16、国内
  10. 肉眼的門脈腫瘍栓を伴う肝細胞癌に対する切除を中心とした治療戦略、口頭、新川寛二、長谷川潔、宮田明典、三原裕一郎、谷圭吾、大道清彦、河口義邦、稲垣冬樹、赤松延久、有田淳一、金子順一、阪本良弘、國土典宏、第 116 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2016/4/16、国内
  11. 肝内胆管癌の発生部位と組織学的特徴や予後との関係、口頭、阪本良弘、市田晃彦、有田淳一、赤松延久、金子順一、長谷川潔、國土典宏、口演、第 52 回日本肝癌研究会、虎ノ門、2016/7/1、国内
  12. The validity of the Makuuchi's criteria revisited: retrospective analysis of 1385 consecutive cases of hepatocellular carcinoma,口演、Inagaki F, Hasegawa K, Shinkawa H , Arita J, Kaneko J, Akamatsu N, Sakamoto Y, Kokudo N.第 28 回日本肝胆膵外科学会、大阪、2016/6/3、国内
  13. Recent progress in anti-HCV therapy and challenges toward HCC eradication. 口頭、Asahina Y. Academic Forum of Liver Disease in Northeast China and the Annual Convention for the Study of Liver Diseases in Jilin Province in 2016. Oct 29 2016, Changchun, China. 国外。
  14. Hepatocarcinogenesis after hepatitis C viral eradication. 口頭、Asahina Y. The 10th APASL Single Topic Conference. June-8, 2016, Kaoshiung, Taiwan. 国外。

15. Reduced changes in bone mineral density in CHB patients receiving tenofovir alafenamide (TAF) compared with tenofovir disoproxil fumarate. 口頭. Seto WK, Asahina Y, Peng, Stanciu CYC, Abdurakhmanov D, Flaherty JF, Kim K, Gaggar A, Subramanian M, Tabak F, Tuan T, Nguyen TT, Chan HLT. The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2016). November 11-15, 2016, Boston, USA. 国外.
16. Genetically modified human induced pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor-like cell lines as a model for interaction between hepatitis B virus and host cells. ポスター. Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Miyoshi M, Tsunoda T, Nitta S, Sato A, Asano Y, Nagata H, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nakagawa M, Azuma S, Watanabe M. The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2016). November 11-15, 2016, Boston, USA. 国外.
17. A model for interaction between HBV and host cells derived from human induced pluripotent stem cells. ポスター. Kaneko S, Kakinuma S, Asahina Y, Kamiya A, Nitta S, Tsunoda T, Miyoshi M, Asano Y, Nagata H, Goto F, Otani S, Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma AS, Watanabe M. The 51th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2016). April 2016, Barcelona, Spain. 国外.
18. C型慢性肝疾患における抗ウイルス療法と発癌抑止効果：ポスト C型肝炎ウイルス時代における今後の課題. 口頭、朝比奈靖造. 第52回日本肝癌研究会，東京，2016/7. 国内.
19. 未来を担うエキスパートに学ぶ C型慢性肝炎治療における薬剤耐性変異ウイルスに関する課題と対策. 口頭. 新田 沙由梨, 加藤 孝宣, 朝比奈 靖造. 第41回日本肝臓学会東部会，東京，2016/12. 国内.
20. 非ウイルス性肝癌の現況と治療戦略 非B非C型肝細胞癌の臨床背景. 口頭. 東 正新, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第41回日本肝臓学会東部会，東京，2016/12. 国内
21. B型肝炎 根治を目指して HBV 関連肝疾患における核酸アナログ治療効果と肝発癌の関連. 口頭. 村川 美也子, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第41回日本肝臓学会東部会，東京，2016/12. 国内.
22. C型肝炎の残された問題点 C型慢性肝疾患に対するインターフェロンフリー治療の効果と安全性の検討. 口頭. 中川 美奈, 村川 美也子, 朝比奈 靖造. 第41回日本肝臓学会東部会，東京，2016/12. 国内.
23. B型肝炎治療のアップデート HBV 排除にむけたヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞を用いた培養系の開発. 口頭. 金子 俊, 柿沼 晴, 朝比奈 靖造. 第20回日本肝臓学会大会，神戸，2016/11. 国内.
24. 肝疾患バイオマーカーの新知見 C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療後の発癌予測因子の検討. 口頭. 永田 紘子, 中川 美奈, 朝比奈 靖造. 第20回日本肝臓学会大会，神戸，2016/11. 国内.
25. 肝炎ウイルス制御下時代の肝癌診療 宿主ゲノム変異の網羅的解析からみたウイルス制御下における発癌の検討. 口頭. 北畑 富貴子, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第20回日本肝臓学会大会，神戸，2016/11. 国内.
26. C型慢性肝疾患に対する抗ウイルス治療の意義の検討. 口頭. 中川 美奈, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第20回日本肝臓学会大会，神戸，2016/11. 国内.
27. 新規技術を用いた肝疾患診療の未来 診断から治療へ C型慢性肝炎に対する IFN-based/free 治療の比較と Mac2 Binding Protein(M2BP)Gi の有用性の検討. 口頭. 中川 美奈, 朝比奈 靖

- 造, 渡辺 守. 第 102 回日本消化器病学会総会, 東京, 2016/4.国内.
28. B型肝炎ウイルス排除にむけて 創薬への新知見 ヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞を用いた創薬を目指した HBV 感染培養研究. 口頭.金子 俊, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第 102 回日本消化器病学会総会, 東京, 2016/4. 国内.
  29. ウイルス性肝炎研究の新戦略 HCV NS5A 阻害剤耐性変異株の特徴と薬剤感受性に関する検討. 口頭.新田 沙由梨, 朝比奈 靖造, 加藤 孝宣. 第 102 回日本消化器病学会総会, 東京, 2016/4. 国内.
  30. 肝癌の病態解明を見据えた新戦略 肝細胞癌の病態に関連する宿主ゲノム変異と B 型肝炎ウイルス X 蛋白の機能解析. 口頭.北畑 富貴子, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第 102 回日本消化器病学会総会, 東京, 2016/4. 国内.
  31. C 型肝炎治療の新時代と将来への展望 C 型慢性肝炎治療後の発癌リスクを考慮した治療戦略. 口頭.村川 美也子, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第 102 回日本消化器病学会総会, 東京, 2016/4 国内.
  32. 明日から役立つ肝臓病理 Viral Hepatitis ウイルス性肝炎の線維化診断における M2BPGi の意義とその機序における病理学的考察. 口頭.永田 紘子, 中川 美奈, 朝比奈 靖造. 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 2016/5. 国内.
  33. C 型肝炎治療の問題点 NS5A 阻害剤耐性変異の HCV ライフサイクルへの影響と薬剤感受性の解析. 口頭.新田 沙由梨, 朝比奈 靖造, 加藤 孝宣. 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 2016/5. 国内.
  34. C 型肝炎治療の新時代に向けて C 型慢性肝疾患に対するインターフェロンフリー治療の効果と安全性の検討. 口頭.中川 美奈, 朝比奈 靖造, 渡辺 守. 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 2016/5. 国内.
  35. B 型肝炎研究の Up-To-Date ヒト iPS 細胞由来肝細胞系譜細胞を用いた新たな HBV 感染培養系モデル. 口頭.金子 俊, 柿沼 晴, 朝比奈 靖造. 第 52 回日本肝臓学会総会千葉, 2016/5 国内.
  36. 抗ウイルス療法による発癌抑制効果. 口頭.朝比奈 靖造.特別企画 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉, 2016/5. 国内.
  37. CDK9 inhibitor FIT-039 suppresses HBV propagation. 口頭、Moriishi K, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M.第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
  38. Anti-HBV activity of Coptidis rhizome alkaloids via targeting the viral core promoter. 口頭、Yamashita A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Moriishi K,第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
  39. Establishment of highly HBV-permissible HepG2 cell line to facilitate screening of antiviral compounds. ポスター Otoguro T, Tanaka T, Chen W, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Moriishi K第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内
  40. Inhibition of HBV propagation by treatment with CDK9 inhibitor FIT-039、ポスター、Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M and Kohji Moriishi、2016 International HBV meeting, 2016/9/21-24, Yonsei, 国外
  41. 流体デバイスを用いた組織チップの開発、口頭、玉井 美保、藤山 陽一、田川 陽一 デザイン生命工学研究会 第 2 回大会、神戸、2017/3/21、国内
  42. 改変 SDIA 法による神経組織分化誘導と毒性試験への応用、ポスター、真保恵美子、高橋和雅、玉井美保、田川陽一 デザイン生命工学研究会 第 2 回大会、神戸、2017/3/21、国内

43. 細胞培養系を用いた発生プロセスにおける自然免疫システム確立の解明、ポスター、大田拓穂、玉井美保、田川陽一 デザイン生命工学研究会 第2回大会、神戸、2017/3/21、国内
44. 培養腸管上皮組織の構築と腸内環境様刺激への応答進藤寛将、ポスター、玉井美保、田川陽一、デザイン生命工学研究会 第2回大会、神戸、2017/3/21、国内
45. 腸内細菌と宿主腸管組織のコミュニケーション、口頭、田川陽一、進藤寛将、玉井美保、長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して、長野、2017/1/24、国内
46. 化学処理フィーダーを用いた神経分化誘導と神経毒性試験、ポスター、高橋 和雅、中島 吉太郎、玉井 美保、荻 博次、田川 陽一、第39回 日本分子生物学会年会、横浜、2016/12/1、国内
47. 肝細胞、内皮細胞および肝星細胞を用いた *in vitro* 肝組織モデル、ポスター、阿部 一成、玉井 美保、村上 努夢、田川 陽一、第39回 日本分子生物学会年会、横浜、2016/12/2、国内
48. 概日リズムを導入した *in vitro* 肝毒性試験モデルの構築、ポスター、守矢 恒司、玉井 美保、小松 銀河、上平 正道、田川 陽一、第39回 日本分子生物学会年会、横浜、2016/11/30、国内
49. 胚性幹細胞由来心筋組織への概日リズム導入、ポスター、鴨志田 美里、玉井 美保、弘瀬 雅教、田川 陽一、第39回 日本分子生物学会年会、横浜、2016/11/30、国内
50. 合成生物学研究のための哺乳類の *in vitro* 生命システム、口頭、田川陽一、日本生物物理学会、つくば、2016/11/27、国内
51. 動物実験代替法を目指した哺乳類 *in vitro* システム、口頭、田川 陽一、玉井 美保、藤山 陽一、日本薬物動態学会 第31回年会、松本、2016/10/14、国内
52. 流体デバイスを用いた ES/iPS 細胞由来肝臓モデル、口演、田川 陽一、バイオジャパン 2016、東京、2016/10/12、国内
53. Neural differentiation derived from mouse ES cells on chemical treated feeder、ポスター、高橋 和雅、玉井 美保、田川 陽一、日本組織培養学会 第89回大会、大阪、2016/5/25、国内
54. 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
55. 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
56. The application of genome editing for gene therapy, Technical Seminar, Oral, Kanegae Y, Maekawa A, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/06/29, Japan
57. Improvement of the efficiency in CRISPER/Cas9 system against Hepatitis B virus using adenovirus vector, Poster, Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Kanegae Y, The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/06/29, Japan
58. hnRNP A1 and A2 are potential targeted proteins for regulatory increasing of SMN synthesis in Spinal Muscular Atrophy, Poster, Kashima A, Agawa-Ohta M, Kanegae Y, Yamada H. The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy, 2016/06/29, Japan
59. shRNAs を複数同時発現する単一型アデノウイルスベクターの HBV 複製阻止への応用、ポスター発表、鈴木まりこ、前川文、鐘ヶ江裕美、斎藤泉、第64回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、国内。



60. Cas9と多重guide RNA搭載アデノウイルスベクターを用いた高効率HBV DNA除去システム、口頭発表、前川文、鈴木まりこ、斎藤泉、鐘ヶ江裕美、第64回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/24、国内。
61. Cas9及び多重guide RNA発現アデノウイルスベクターを用いた高効率HBV DNA除去システム、ポスター発表、前川文、斎藤泉、鐘ヶ江裕美、第39回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内。
62. ゲノム編集による遺伝子治療の最前線、口頭発表、鐘ヶ江裕美、前川文、鈴木まりこ、斎藤泉、近藤小貴、第39回日本分子生物学会年会、2016/12/2、国内。
63. ゲノム編集による遺伝子治療の最前線、ポスター発表、鐘ヶ江裕美、前川文、鈴木まりこ、斎藤泉、近藤小貴、第39回日本分子生物学会年会、2016/12/2、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 一般社団法人日本肝臓学会 サルコペニア判定基準（第1版）  
【一般社団法人日本肝臓学会 サルコペニア判定基準作成ワーキンググループ】

委員長	西口 修平	兵庫医科大学内科学・肝胆膵科
委員	日野 啓輔	川崎医科大学肝胆膵内科学
同	<u>森屋 恭爾</u>	東京大学医学部附属病院感染制御部
同	白木 亮	岐阜大学医学部附属病院第一内科
同	平松 憲	広島大学病院消化器・代謝内科
同	西川 浩樹	兵庫医科大学内科学・肝胆膵科
顧問	<u>小池 和彦</u>	東京大学医学系研究科消化器内科学
2. 哺乳類の合成生物学、田川陽一、高校生と学部学生を対象とした合成生物学セミナー～合成生物学で考える生命科学の未来～、2016/9/25、東京、国内
3. 最小 *in vitro* 哺乳類人工生命システム 構築の試み、田川陽一、動物実験に関する教育講演会、第一三共株式会社、2016/9/21、東京、国内
4. 『生命とはなにか？人工生命からさぐる生命と非生命の境』、田川陽一、BS フジ「ガリレオ X」、2016/10/9、国内

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 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) B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に  
関する包括的研究  
(英語) Comprehensive Studies to Eradicate HBV Infection and to Eliminate  
cccDNA

研究開発担当者 (日本語) 浜松医科大学 医学部 ウイルス・寄生虫学講座 教授 鈴木哲朗  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Virology and Parasitology, Hamamatsu University School  
of Medicine, Tetsuro Suzuki.

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 の遺伝子発現制御機構解析と阻害剤の探索  
開発課題名：(英語) Research on regulatory mechanism of HBV gene expression and basis for  
antiviral drug development

研究開発分担者 (日本語) 浜松医科大学 医学部 ウイルス・寄生虫学講座 教授 鈴木哲朗  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Virology and Parasitology, Hamamatsu University School  
of Medicine, Tetsuro Suzuki

分担研究 (日本語) HBV 複製に関与する長鎖ノンコーディング RNA の同定と治療への応用  
開発課題名：(英語) Identification and application of long non-coding RNA regulating HBV  
replication

研究開発分担者 (日本語) 浜松医科大学 医学部 分子生物学講座 教授 北川雅敏  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Molecular Biology, Hamamatsu University School of  
Medicine, Masatoshi Kitagawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：東京大学 大学院医学系研究科 森屋 恭爾 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 0件、国際誌 4件）

1. Li Y, Ito M, Sun S, Chida T, Nakashima K, Suzuki T. LUC7L3/CROP inhibits replication of hepatitis B virus via suppressing enhancer II/basal core promoter activity. *Sci Rep* 6: 36741, doi: 10.1038/srep36741. (2016).
2. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Matsuda N, Nomoto A, Suzuki T, Saito I, Kanegae Y. Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. *Sci Rep*. 7:41851. doi: 10.1038/srep41851 (2017).
3. KOTAKE Y, KITAGAWA K, OHHATA T, SAKAI S, UCHIDA C, NIIDA H, NAEMURA M, KITAGAWA M. Long Non-coding RNA, PANDA, Contributes to the Stabilization of p53 Tumor Suppressor Protein. *Anticancer Res*. 36(4): 1605-11 (2016).
4. KOTAKE Y, NAEMURA M, KITAGAWA K, NIIDA H, TSUNODA T, SHIRASAWA S, KITAGAWA M. Oncogenic Ras regulates the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology* 2016, 68: 1591-1596 (2016).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. PUF60 は複数の機構で HBV 複製を制御する, 口頭, 孫鎖鋒, 中島謙治, 伊藤昌彦, 鈴木哲朗, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
2. B 型肝炎ウイルス spliced RNA 由来 C 末端システイン欠損コアタンパク質のカプシド形成における役割, 口頭, 中島謙治, 伊藤昌彦, 鈴木哲朗, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
3. Replication of hepatitis B virus was inhibited by LUC7L3/Luc7A/CROP via suppressing enhancer II/basal core promoter activity, ポスター, Ito M, Li Y, Sun S, Chida T, Nakashima K, Suzuki T, 2016 International HBV Meeting, 2016/9/22, 国外.
4. Involvement of the spliced RNA-enhanced HBc lacking its C-terminal cysteine in the viral capsid assembly, ポスター, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, 2016 International HBV Meeting, 2016/9/23, 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