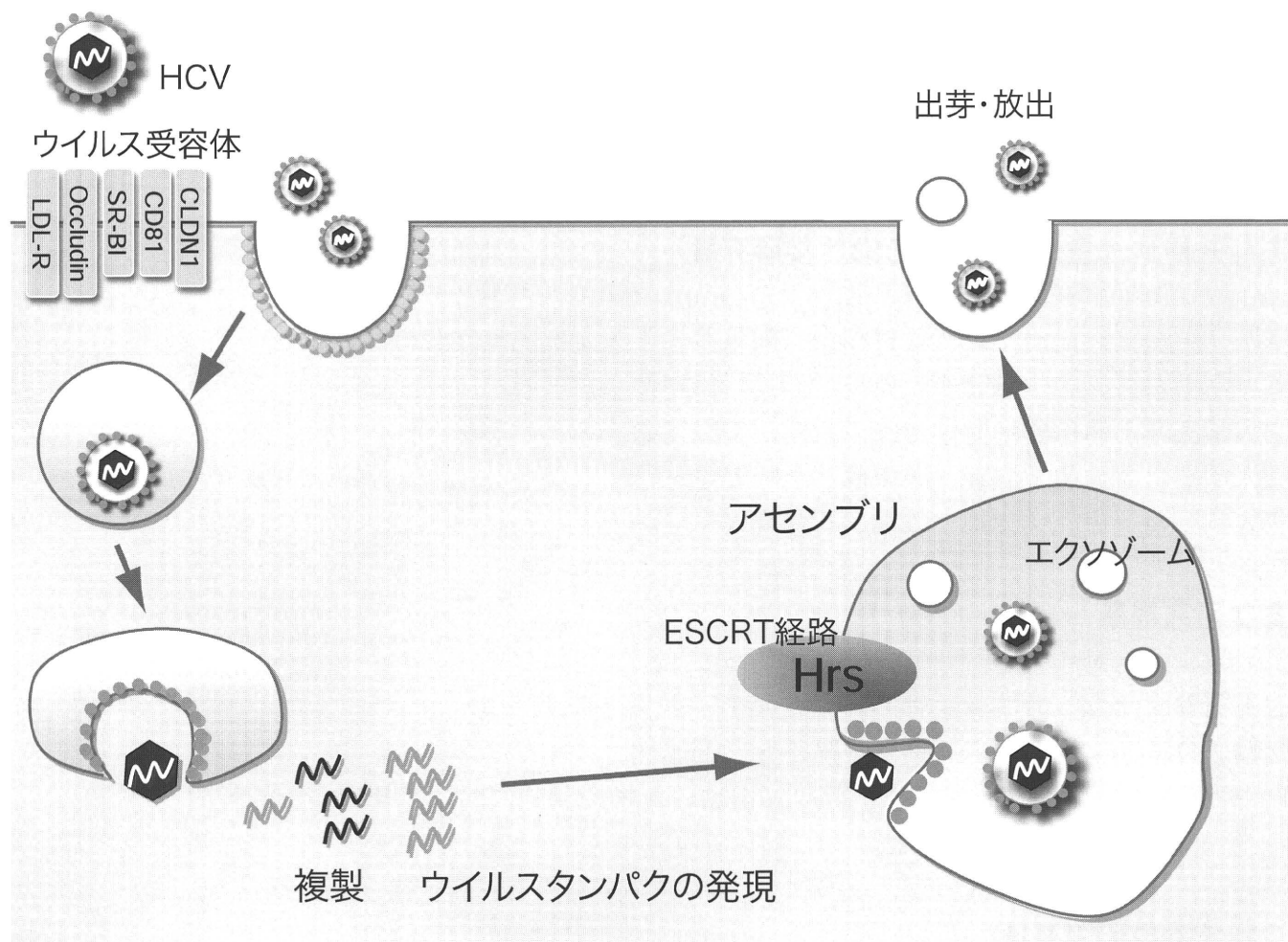


Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



ESCRT分子のHCVにおける役割を検討するために、まず、HCVが含まれるとされるエクソゾームとHrsの関連性を検討した。Hrsノックアウト樹状細胞においては、エクソゾームの放出量が抑制されており、ovalbuminによって刺激を行い、そのエクソゾームを回収したところ、OT-IトランスジェニックマウスのT細胞に対する抗原提示能も減少していた。以上のことからHrsはエクソゾーム放出に必須の分子であり、エクソゾームを介した抗原提示能にも関わっている可能性が示唆された。(BBRC, 2010)

次に、我々はHrsがHCV放出に関係するかどうかを検討した。HrsノックダウンHuh7細胞にHCV株JFH1を感染させると、上清中に放出されるHCV-RNAは有意に減少した。細胞内HCV-RNAやコアタンパク発現量には変化がなかったが、細胞内の感染性HCV粒子はHrsノックダウン細胞において減少していた。以上のことから、HrsはHCVアセンブリに関与している可能性が示唆された。

更に我々は、HCVとエクソゾームの関連性を検討した。HCV感染細胞の上清を精製し、ショ糖密度勾配遠心にて分画すると、HCVコアタンパクとエクソゾームマーカーであるCD63はほぼ同じ分画に存在した。共焦点顕微鏡を用いて観察すると、multivesicular bodyとHCVコアタンパクは部分的に共局在しており、免疫電顕をおこなうと、HCVコアタンパクおよびエンベロープタンパクはmultivesicular body内のintraluminal vesicleにも存在していた。以上のことからHCVはHrs依存性エクソゾーム経路を利用している可能性が示唆された。

●研究代表者の研究歴等

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

・過去に所属した研究機関の履歴

2004-2008年 東北大学医学部免疫学分野

2008-2009年 東北大学医学部消化器病態学分野

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

宮城県立がんセンター総長 菅村和夫 (前東北大学医学部免疫学分野教授)

宮城県立がんセンター研究所 免疫学部長 田中伸幸

東北大学医学部消化器病態学分野 教授 下瀬川徹

東北大学消化器病態学分野 准教授 上野義之

東北大学医学部免疫学分野 教授 石井直人

・主な研究課題

原因不明の胆汁うっ滞性肝疾患におけるアクアポリンの役割

小胞輸送分子 Hrs とオートファジー経路との関連性

Hrs コンディショナルノックアウトマウスを用いた神経細胞における Hrs の機能解明

・これまでの研究実績

※本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

2010年

1. Kondo Y, *Ueno Y, Kakazu E, Kobayashi K, Shiina M, Tamai K, Machida K, Inoue J, Wakui Y, Fukushima K, Obara N, Kimura O, Shimosegawa T. Lymphotropic HCV strain can infect human primary naïve CD4(+) cells and affect their proliferation and IFN-gamma secretion activity. *J Gastroenterol. in press.*
2. Tamai K, *Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano S, Ueno Y, Shimosegawa T, and Sugamura K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun. 27; 399(3): 384-90, 2010.*
3. Kondo Y, *Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, Shimosegawa T. Hepatitis B Virus Replication Could Enhance Regulatory T Cell Activity by Producing Soluble Heat Shock Protein 60 From Hepatocytes. *J Infect Dis. 15; 202(2):*

202-13, 2010.

4. Obara N, Fukushima K, *Ueno Y, Wakui Y, Kimura O, Tamai K, Kakazu E, Inoue J, Kondo Y, Ogawa N, Sato K, Tsuduki T, Ishida K, Shimosegawa T. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *J Hepatol.* 53(2): 326-34, 2010.
5. Inoue J, *Ueno Y, Wakui Y, Niitsuma H, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shiina M, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Obara N, Iwasaki T, Shimosegawa T. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern. *J Viral Hepat. in press.*

2009年

6. Kakazu E, *Ueno Y, Kondo Y, Fukushima K, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Ninomiya M, Shimosegawa T. Branched chain amino acids enhance the maturation and function of myeloid dendritic cells ex vivo in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology.* 50(6):1936-45, 2009.
7. Inoue J, *Ueno Y, Nagasaki F, Akahane T, Fukushima K, Kogure T, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Kido O, Nakagome Y, Ninomiya M, Obara N, Wakui Y, Takahashi M, Okamoto H, Shimosegawa T. Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan. *J Gastroenterol.* 44(4): 329-37, 2009.

2008年

8. Tamai K, Toyoshima M, *Tanaka N, Yamamoto N, Owada Y, Kiyonari H, Murata K, Ueno Y, Ono M, Shimosegawa T, Yaegashi N, Watanabe M, and Sugamura K. Loss of Hrs in the Central Nervous System Causes Accumulation of Ubiquitinated Proteins and Neurodegeneration. *Am J Pathol.* 173(6):1806-17, 2008.

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：C型肝炎ウイルスの非構造蛋白 5A を標的とした新規治療法の開発に関する研究

課題番号：H22-肝炎-若手-016

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：政木 隆博

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第二部

職名：主任研究官

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 4,980,000 円

I. 研究の意義

C型肝炎ウイルス(HCV)は公衆衛生上きわめて重要なウイルスである。本邦では約 200 万人の感染者が存在し、持続感染後肝硬変を経て高率に肝細胞癌を引き起こす。主たる治療法であるペグインターフェロンとリバビリンの併用療法もその効果は未だ充分とはいえない。また、HCV は変異しやすいウイルスであり多剤併用療法が望ましい。そのため、従来の抗 HCV 薬とは異なる作用点をもつ治療法の開発は厚生労働行政上急務である。本研究における創薬標的を NS5A 蛋白に設定した理由は、(1) 酵素としての機能が明確な NS3、NS5B 蛋白に比べ、NS5A 蛋白を標的とした阻害薬の開発は遅れていること、(2) NS5A 蛋白は HCV の複製増殖やインターフェロン感受性、病原性発現などに重要な役割を有する多機能蛋白であること、(3) リン酸化蛋白であり、NS5A 蛋白のリン酸化はウイルスゲノム複製、粒子形成過程において重要な役割を担うことから、リン酸化制御という明確な創薬標的の設定が可能であること、の 3 点である。本研究では、NS5A 蛋白を標的とした新規治療法の開発を目標とし、HCV ゲノム複製、粒子形成を制御するプロテインキナーゼ及び NS5A 蛋白結合ペプチドの取得を目指す。

II. 研究の目的、期待される成果

研究の目的：本研究目的は、NS5A 蛋白を標的とした新規治療法の開発であり、具体的には以下の 4 点につき解析を行う。

- (1) NS5A 蛋白と相互作用するプロテインキナーゼの網羅的探索
- (2) NS5A 蛋白をリン酸化するプロテインキナーゼの探索
- (3) 同定されたプロテインキナーゼが HCV 複製、粒子形成に及ぼす影響の解析とその作用機構の解明
- (4) NS5A 蛋白結合ペプチドの探索と HCV ゲノム複製、粒子形成を制御するペプチドの取得

期待される成果：HCV ゲノム複製、粒子形成に関与するプロテインキナーゼが同定されれば、ゲノム複製、粒子形成の両者を標的とした治療法への応用が可能であり、さらに、宿主因子を標的とした治療法であるため、遺伝子型やウイルス変異による薬剤耐性の問題を克服できるものと期待される。一方、HCV ゲノム複製、粒子形成を制御する NS5A 蛋白結合ペプチドの取得は、プロ

テインキナーゼを標的とした治療法とは異なる作用機序を持つ治療薬として期待される。

Ⅲ. 1年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

(1) HCV生活環に関与するプロテインキナーゼの同定

1. NS5A蛋白と強く相互作用するプロテインキナーゼの探索

NS5A蛋白と相互作用するプロテインキナーゼはハイスループットな定量解析が可能であるAlphaScreen法を用いて同定した。404種類のヒトプロテインキナーゼを対象とし、発光シグナル強度1,300以上を強固な蛋白間相互作用と想定したところ、このカットオフ値以上のシグナル強度を示したプロテインキナーゼは89種類であった。このうち79種類がNS5A蛋白のリン酸化に重要とされるセリン/スレオニンプロテインキナーゼであった。

2. NS5A蛋白に対するリン酸化能の評価

AlphaScreen解析でスクリーニングされた79種類のセリン/スレオニンプロテインキナーゼに対して*in vitro*リン酸化アッセイを行ったところ、9種類にNS5A蛋白に対する強いリン酸化活性が認められた。

3. HCVゲノム複製、粒子形成に与える影響の解析

NS5A蛋白をリン酸化する9種類のプロテインキナーゼがHCV生活環に役割を有するか否かを調べるために、各プロテインキナーゼの細胞内発現をノックダウンした状態でHCVを感染させ、感染後のウイルス粒子産生量を解析した。CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2ノックダウン細胞から分泌される感染性ウイルス粒子量(ウイルス感染力価)がmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞の1/5~1/10に抑制された。次に、これら3種類のプロテインキナーゼがHCV生活環の中のどのステップに関わっているのかをより詳細に調べるために、プロテインキナーゼノックダウン細胞におけるRNA複製能をサブゲノミックレプリコンシステムを用いて、また、HCV粒子形成能をウイルス感染が成立しないHuh7-25細胞を用いたHCV産生システムで解析した。HCV RNA複製はレポーターとしてレプリコンに挿入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標にして定量的に評価した。3種類のプロテインキナーゼノックダウン細胞におけるRNA複製能はmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞の複製能と同程度であり、これらのプロテインキナーゼの作用点はゲノム複製のステップではないことが示唆された。HCV粒子形成能の評価は、全長HCV RNAをプロテインキナーゼsiRNAとともにエレクトロポレーション法でHuh7-25細胞に導入し、導入後3日目の上清中コア蛋白量を測定することにより行った。3種類のプロテインキナーゼノックダウン細胞から分泌されるコア蛋白量はmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞における分泌コア蛋白量の1/3~1/2に減少し、ウイルス粒子形成過程がこれらのプロテインキナーゼの作用点である可能性が示唆された。

(2) NS5A蛋白結合ペプチドの取得

大腸菌発現システムを利用し、NS5A蛋白を発現、精製した。精製NS5A蛋白を用いて東京大学先端科学技術研究センターと共同で11種類のNS5A蛋白結合ペプチドを取得した。

IV. 23～24年度の課題

(1) 平成23年度

1. HCV ゲノム複製、粒子形成に関与する更なるプロテインキナーゼの取得
2. 同定されたプロテインキナーゼによる NS5A 蛋白のリン酸化解析 (*in vivo* での解析)
3. HCV ゲノム複製、粒子形成を制御する NS5A 蛋白結合ペプチドの取得

(2) 平成24年度

1. プロテインキナーゼが関与する HCV ゲノム複製、粒子形成機構の解析
2. NS5A 蛋白結合ペプチドにより制御される HCV ゲノム複製、粒子形成機構の解析

V. 行政施策への貢献の可能性

本研究により HCV ゲノム複製、粒子形成に関与するプロテインキナーゼが同定されれば、ゲノム複製、粒子形成両者の制御を標的とした治療法への応用が可能であり、さらに、宿主因子を標的とした治療法であるため、遺伝子型やウイルス変異による薬剤耐性の問題を克服できるものと期待される。また、HCV ゲノム複製、粒子形成を制御する NS5A 蛋白結合ペプチドが取得されれば、プロテインキナーゼを標的とした治療法とは異なる作用機序を持つ治療薬として期待される。本研究により HCV ゲノム複製や粒子形成過程の制御が可能となれば、学術的な貢献のみならず C 型肝炎の新たな治療法開発への端緒を開くものと期待される。本研究成果を利用した医薬品が開発されれば、医療サービスの向上、国民の健康増進につながるとともに、肝癌発症率の低下にともなう医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、

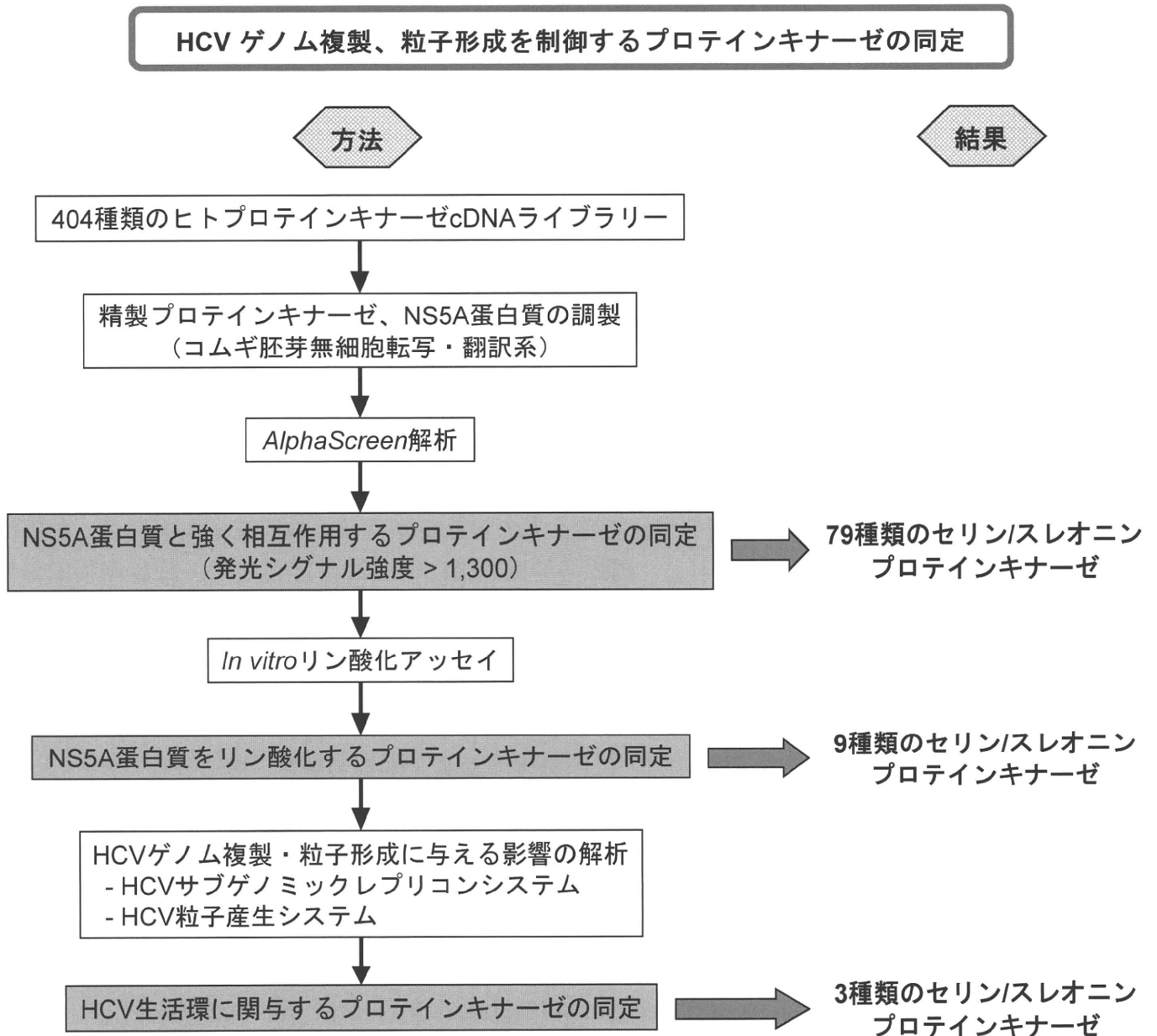
知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

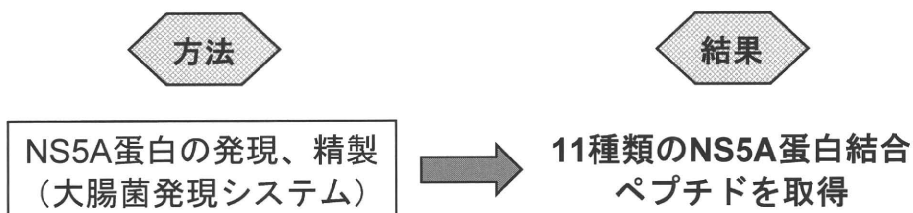
- 1) Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. Yasushi Inoue, Hideki Aizaki, Hiromichi Hara, Mami Matsuda, Tomomi Ando, Tetsu Shimoji, Kyoko Murakami, Takahiro Masaki, Ikuo Shoji, Sakae Homma, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki. **Virology**, in press 2010.
- 2) Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. Takahiro Masaki, Ryosuke Suzuki, Mohsan Saeed, Ken-ichi Mori, Mami Matsuda, Hideki Aizaki, Koji Ishii, Noboru Maki, Tatsuo Miyamura, Yoshiharu Matsuura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki. **Journal of Virology**, 84:5824-5835, 2010.
- 3) HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆字、澤崎達也、鈴木哲朗. **消化器内科**、51 巻、2010、in press.
- 4) C 型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. **ウイルス**、60 巻、PP. 87-92, 2010.

Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



NS5A 蛋白結合ペプチドの取得



●研究代表者の研究歴等

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

・過去に所属した研究機関の履歴

平成12年4月～平成17年3月

東海大学医学部基盤診療学系公衆衛生・社会医学教室 研究員

平成17年4月～平成20年3月

がん研究振興財団 リサーチレジデント、国立感染症研究所ウイルス第二部 流動研究員

平成20年4月～平成20年9月

ウイルス肝炎研究財団 リサーチレジデント、国立感染症研究所ウイルス第二部 流動研究員

平成20年10月～現在

国立感染症研究所ウイルス第二部第三室 主任研究官

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平成12年4月～平成17年3月

東海大学医学部基盤診療学系公衆衛生・社会医学教室 岡崎 勲 教授

平成17年4月～平成20年9月

国立感染症研究所ウイルス第二部 宮村達男 部長、脇田隆字 部長(平成18年4月～)、
鈴木哲朗 第四室室長

平成20年10月～現在

国立感染症研究所ウイルス第二部 脇田隆字 部長、加藤孝宣 第三室室長

・主な研究課題

平成12年4月～平成17年3月

- (1) 株化ヒト肝癌細胞におけるレチノイン酸によるアルブミン発現調節機構の解析
- (2) 膵管上皮不死化細胞株の樹立と膵発癌過程の解析
- (3) 造影超音波検査法を用いた切除不能進行膵癌患者の予後評価システムの確立

平成17年4月～平成20年3月

- (1) All-trans retinoic acid による C/EBP β -LIP を介したヒトアルブミン遺伝子発現調節機構の解析
- (2) RNA polymerase I システムを用いて作製した感染性 HCV 粒子の性状解析

平成20年4月～平成20年9月

- (1) HCV の粒子形成過程に関与する NS5A 蛋白質領域の同定
- (2) RNA polymerase I システムを用いた感染性 HCV 粒子持続産生細胞の樹立と抗ウイルス薬評価系への応用

平成20年10月～現在

- (1) HCV の粒子形成を制御する分子機構の解析
- (2) HCV の粒子形成過程を標的とした新規治療法の萌芽的研究
- (3) HCV の非構造蛋白 5A を標的とした新規治療法の開発に関する研究

・ **これまでの研究実績**

※本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体文字**で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

<欧文論文>

- 1) *Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein.* Yasushi Inoue, Hideki Aizaki, Hiromichi Hara, Mami Matsuda, Tomomi Ando, Tetsu Shimoji, Kyoko Murakami, **Takahiro Masaki**, Ikuro Shoji, Sakae Homma, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, **Takaji Wakita**, Tetsuro Suzuki. *Virology*, in press 2010.
- 2) *Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription.* **Takahiro Masaki**, Ryosuke Suzuki, Mohsan Saeed, Ken-ichi Mori, Mami Matsuda, Hideki Aizaki, Koji Ishii, Noboru Maki, Tatsuo Miyamura, Yoshiharu Matsuura, **Takaji Wakita**, Tetsuro Suzuki. *Journal of Virology*, 84:5824-5835, 2010.
- 3) The usefulness of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in advanced pancreatic cancer. Makoto Ueno, Tetsu Niwa, Shinichi Ohkawa, Ayumi Amano, **Takahiro Masaki**, Kaoru Miyakawa, Tetsuo Yoshida. *Pancreas*, 38:644-648, 2009.
- 4) Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. Keisuke Nagatsuma, Yoshihiro Hayashi, Hiroshi Hano, Hiroshi Sagara, Kazuhiro Murakami, Masaya Saito, **Takahiro Masaki**, Tomoe Lu, Mitsugu Tanaka, Hideaki Enzan, Yoshio Aizawa, Hisao Tajiri, and Tomokazu Matsuura. *Liver International*, 29:47-54, 2009.
- 5) Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. **Takahiro Masaki**, Ryosuke Suzuki, Kyoko Murakami, Hideki Aizaki, Koji Ishii, Asako Murayama, Tomoko Date, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, **Takaji Wakita**, and Tetsuro Suzuki. *Journal of Virology*, 82:7964-7976, 2008.
- 6) Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. Kazuhiko Omata, Ryosuke Suzuki, **Takahiro Masaki**, Tatsuo Miyamura, Tazuko Satoh, and Tetsuro Suzuki. *Apoptosis*, 13:929-937, 2008.
- 7) Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. Hideki Kanai, Hideki Marushima, Naofumi Kimura, Takamasa Iwaki, Masaya Saito, Haruka Maehashi, Keiko Shimizu, Makiko Muto, **Takahiro Masaki**, Kiyoshi Ohkawa, Keitaro Yokoyama, Masaaki Nakayama, Tohru Harada, Hiroshi Hano, Yoshiaki Hataba, **Takahiro Fukuda**, Masahiko Nakamura, Naoto Totsuka, Shutaro Ishikawa, Yasuki Unemura, Yuji Ishii, Katsuhiko Yanaga, and Tomokazu Matsuura. *Artificial Organs*, 31:148-151, 2007.

- 8) Reduction therapy of alanine aminotransferase levels prevent HCC development in patients with HCV-associated cirrhosis. Yasushi Rino, Kazuo Tarao, Souichiro Morinaga, Shinichi Ohkawa, Kaoru Miyakawa, Satoru Hirokawa, Takahiro Masaki, Norio Tarao, Norio Yukawa, Hiroyuki Saeki, Yoshinori Takanashi, and Toshio Imada. **Anticancer Research**, 26:2221-2226, 2006.
- 9) Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. Masaya Saito, Tomokazu Matsuura, Takahiro Masaki, Haruka Maehashi, Keiko Shimizu, Yoshiaki Hataba, Tohru Iwahori, Tetsuro Suzuki, and Filip Braet. **World Journal of Gastroenterology**, 12:1881-1888, 2006.
- 10) All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. Takahiro Masaki, Tomokazu Matsuura, Kiyoshi Ohkawa, Tatsuo Miyamura, Isao Okazaki, Tetsu Watanabe, and Tetsuro Suzuki. **Biochemical Journal**, 397:345-353, 2006.
- 11) Noninvasive assessment of tumor vascularity by contrast-enhanced ultrasonography and the prognosis of patients with nonresectable pancreatic carcinoma. Takahiro Masaki, Shinichi Ohkawa, Ayumi Amano, Makoto Ueno, Kaoru Miyakawa, Kazuo Tarao. **Cancer**, 103:1026-1035, 2005.
- 12) Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. Kazuo Tarao, Shigetoshi Fujiyama, Shinichi Ohkawa, Kaoru Miyakawa, Setsuo Tamai, Satoru Hirokawa, Takahiro Masaki, Katsuaki Tanaka. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 14:164-169, 2005.
- 13) Sustained low alanine aminotransferase levels can predict the survival for 10 years without hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis C virus-associated liver cirrhosis of child stage A. Kazuo Tarao, Yasushi Rino, Shinichi Ohkawa, Osamu Endo, Kaoru Miyakawa, Setsuo Tamai, Satoru Hirokawa, Takahiro Masaki, Tadashi Nagaoka, Naoyuki Okamoto, Katsuaki Tanaka, Norio Tarao. **Intervirology**, 47:65-71, 2004.
- 14) Study of the reappearance of sieve plate-like pores in immortalized sinusoidal endothelial cells - Effect of actin inhibitor in mixed perfusion cultures. Masaya Saito, Tomokazu Matsuura, Takahiro Masaki, Haruka Maehashi, Filip Braet. **Comparative Hepatology**, 3 (Suppl 1):S28, 2004.
- 15) Serum alanine aminotransferase levels and survival after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma and hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. Kazuo Tarao, Yasushi Rino, Shoji Takemiya, Shinichi Ohkawa, Yukio Sugimasa, Kaoru Miyakawa, Setsuo Tamai, Takahiro Masaki, Satoru Hirokawa, Yoichi Kameda, Tadashi Nagaoka, Naoyuki Okamoto, Shigehiro Kokubu, Muneki Yoshida, Akira Kakita. **Cancer Science**, 94:1083-1090, 2003.
- 16) CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. Tohru Iwahori, Tomokazu Matsuura, Haruka Maehashi, Ken Sugo, Masaya Saito, Masakiyo Hosokawa, Kan Chiba, Takahiro Masaki, Hideki Aizaki, Kiyoshi Ohkawa, Tetsuro Suzuki. **Hepatology**, 37:665-673, 2003.

＜邦文論文＞

- 1) **HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索.** 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆宇、澤崎達也、鈴木哲朗. **消化器内科**、51 卷、2010、in press.
- 2) A-P shunt を有し肝細胞癌との鑑別が困難であった限局性結節性過形成の 1 例. 政木隆博、上野 誠、天野 歩、宮川 薫、大川伸一、多羅尾和郎、林 宏行、密田亜希、亀田陽一. **Liver Cancer**, 10:17-25, 2004.
- 3) 膵癌との鑑別に苦慮した急性膵炎後の肉芽性病変の 1 例. 小林規俊、稲森正彦、関原久彦、大川伸一、宮川 薫、玉井拙夫、政木隆博、廣川 智、多羅尾和郎、杉政征夫、武宮省治、林 宏行、亀田陽一. **膵臓**、19:75-81, 2004.
- 4) C 型慢性肝炎に合併した胆管細胞癌の 1 例. 政木隆博、大川伸一、廣川 智、宮川 薫、多羅尾和郎、山田六平、佐伯博行、塩澤 学、赤池 信、杉政征夫、武宮省治、林 宏行、密田亜希、亀田陽一. **Liver Cancer**, 9:116-123, 2003.
- 5) Gemcitabine が奏効した切除不能進行膵癌の 1 例. 政木隆博、大川伸一、廣川 智、宮川 薫、玉井拙夫、多羅尾和郎. **癌と化学療法**、30:1333-1336, 2003.
- 6) 肝および肺に多発結節性病変を呈した epithelioid hemangioendothelioma の 1 例. 政木隆博、大川伸一、廣川 智、宮川 薫、多羅尾和郎、林 宏行、亀田陽一. **Liver Cancer**, 9: 21-28, 2003.
- 7) 膵癌診療における膵液細胞診、K-ras 遺伝子変異および p16 promoter 領域の hypermethylation の意義についての検討. 小林規俊、関原久彦、大川伸一、玉井拙夫、政木隆博、廣川 智、多羅尾和郎. **横浜医学**、54:73-79, 2003.
- 8) C 型慢性肝疾患（慢性肝炎・肝硬変症）難治例に対する十全大補湯の治療経験. 多羅尾和郎、岡本 堯、宮川 薫、遠藤 修、多羅尾範郎、政木隆博. **日本東洋医学雑誌**、54:191-198, 2003.
- 9) 転移性肝癌に対する経皮的穿刺熱凝固療法についての検討. 大川伸一、廣川 智、政木隆博、宮川 薫、多羅尾和郎、赤池 信、杉政征夫、武宮省治、西連寺意勲、本橋久彦. **癌と化学療法**、29:2149-2151, 2002.
- 10) 切除不能 (stage IVb) 膵癌に対する術中照射療法 (IORT). 佐伯博行、杉政征夫、山田六平、赤池 信、武宮省治、政木隆博、宮川 薫、大川伸一. **癌と化学療法**、29:2221-2223, 2002.
- 11) 肝細胞癌の治療効果判定における造影超音波法の有用性～リピオドール CT・ダイナミック CT との比較、追加治療への応用～. 政木隆博、大川伸一、廣川 智、小林規俊、宮川 薫、玉井拙夫、多羅尾和郎. **映像情報 Medical**, 34:95-97, 2002.
- 12) 膣壁腫瘍切除 10 年後に肝転移を来した巨大肝腫瘍の 1 例. 小林規俊、大川伸一、宮川 薫、政木隆博、廣川 智、多羅尾和郎、玉井拙夫、武宮省治、杉政征夫、赤池 信、中山裕樹、加藤久盛、杉浦 賢、亀田陽一、密田亜希、吉田 力. **Liver Cancer**, 8:13-19, 2002.
- 13) 分娩後に発症した methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) による toxic shock syndrome の 1 例. 岡田拓也、塩塚重正、高梨裕子、長尾 充、道躰敏弘、相田貞志、政木隆博、古田 泉、石原扶美武. **厚木病院医誌**、18:78-81, 1998.
- 14) 反復性扁桃炎の治療中に判明した HIV 感染症の 1 症例. 高柳博久、宮崎日出海、石川浩太郎、溝呂木紀仁、大越英毅、岩室紳也、政木隆博、山内眞義. **厚木病院医誌**、18:88-91, 1998.

- 15) 意識障害を呈したケトン性低血糖症の1例. 政木隆博、湯坐有希、長谷川頼康、岡部武史. 厚木病院医誌、17:98-102, 1997.

<著書>

- 1) C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. ウイルス、60巻、PP. 87-92, 2010.
- 2) HCVの分子生物学. 肝癌-基礎・臨床研究のアップデート. 政木隆博、鈴木哲朗. 日本臨床、67巻増刊号3、PP. 134-137, 2009.
- 3) C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構. 鈴木哲朗、政木隆博、相崎英樹. ウイルス、58巻2号、PP. 199-206, 2008.
- 4) 膵癌の予後判定における造影超音波検査の有用性. 膵癌・胆道癌の診断と治療：最新の研究動向. 天野歩、政木隆博. 日本臨床、64巻増刊号1、PP. 301-305, 2006.
- 5) C型慢性肝炎：インターフェロン無効例に対する発癌予防策. 多羅尾和郎、大川伸一、宮川 薫、政木隆博、上野 誠、廣川 智. 内科、93巻、PP. 507-510, 2004.
- 6) UDCAはC型肝炎硬変症からの肝発癌抑制に貢献しうるか. 多羅尾和郎、大川伸一、宮川 薫、政木隆博、廣川 智、藤山重俊. Bio Clinica、18巻、PP. 931-932, 2003.
- 7) C型肝炎に対する肝庇護療法. 多羅尾和郎、大川伸一、宮川 薫、政木隆博、廣川 智、上野 誠. 臨床消化器内科、18巻、PP. 1651-1657, 2003.
- 8) 肝臓用薬の使い方. 肝疾患診療のチェックポイント2002. 多羅尾和郎、大川伸一、宮川 薫、小林規俊、政木隆博、玉井拙夫. 臨床消化器内科、17巻、PP. 1013-1020, 2002.
- 9) ヒト不死化肝細胞株の樹立. 肝癌細胞由来ヒト高機能肝細胞株の樹立. 松浦知和、斉藤勝也、筋野 甫、蓮村 哲、政木隆博、永森静志. 外科、63巻、PP. 539-543, 2001.
- 10) 伊東細胞. 不死化伊東細胞の三次元培養とレチノイド代謝. 松浦知和、川田雅昭、政木隆博、蓮村 哲、筋野 甫、永森静志. 肝類洞壁細胞研究の進歩、11巻、PP. 64-66, 1999.

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した核酸医薬送達ナノシステムの開発

課題番号：H22-肝炎-若手-017

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：吉岡靖雄

所属研究機関：大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

所属部局：薬学研究科

職名：特任講師（常勤）

年次別研究費(交付決定額)：1年目 6,500,000（うち間接経費1,500,000）円

I. 研究の意義

- (1) インターフェロン（IFN）療法の確立は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、C型肝炎は“致命的な病”から“制御可能な慢性感染症”へと変化した。
- (2) 一方で、重篤な副作用による IFN 療法の中断、薬剤耐性ウイルスの頻発、高額費用などの解決すべき問題が多数残されており、新たな観点からの治療薬開発が世界的に望まれている。
- (3) 本観点から、HCV ゲノム複製に関わる転写・翻訳を、siRNA やアンチセンス等を用いて核酸レベルで抑制する核酸医薬が、上記問題点を克服し得る可能性を秘めていることから、次世代型画期的医薬品として注目されている。
- (4) しかし核酸医薬は一般に、①血中で速やかに分解される（血中半減期は数十秒）、②肝指向性に極めて乏しい、③細胞外から作用発揮の場である細胞内への移行性が全くない、などの致命的欠点から十分な治療効果を発揮できず、これらを克服し得る薬物送達戦略の開発が待望されている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 当該研究では、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する次世代治療戦略を提示するものである。
- (2) 更に核酸医薬の標的として、HCV 複製を阻害するものだけでなく、SR-BI・LDL-R・claudin・CD81 等の HCV 感染受容体をも選択することで、HCV 感染阻害・複製阻害の両者を達成し得る画期的核酸医薬を創製しようとするものであり、斬新性・独創性・緊急性の高い不可欠な取組みと言える。
- (3) 本研究成果は、HCV に対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV 治療に多大に貢献し得ると期待される。

III. 1年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

- ・研究代表者（吉岡靖雄）

(1) 研究代表者はこれまでに、直径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) が、100 nm 以上の素材とは異なる体内動態を有し、静脈内投与後 80-90%が肝実質細胞などの肝臓組織に移行することを明らかとしている。さらに、nSP70 は強い急性毒性を示すものの、表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾した nSP70-C や nSP70-N は全く急性毒性を示さないことを明らかとしている。そこで、nSP70-C や nSP70-N の体内動態をマウスを用いて検討した。その結果、nSP70-C や nSP70-N も、nSP70 と同様に、静脈内投与後、肝臓に集積することが明らかとなった。現在、透過型電子顕微鏡を用いて、肝臓内での詳細な分布を検討中であるが、nSP70-C や nSP70-N が安全性に優れた肝臓デリバリーキャリアーになり得ることが明らかとなった。

(2) Q ドットは、体内画像診断用試薬としてマウスレベルで汎用されるナノマテリアルである。そこで、4 種類の Q ドット (①表面がカルボキシル基で修飾されたもの、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの、③表面がポリエチレングリコール (PEG) で修飾されたもの、④表面が PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの) を用い、in vitro での細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。その結果、in vitro では、上記②が最も細胞内移行に優れ、他の 3 種類の Q ドットは全く細胞内に移行しなかった。一方で、マウスに静脈内投与後の体内動態を検討した結果、上記④の PEG 修飾 Q ドットが肝臓に選択的に移行することが明らかとなった。現在、移行率を定量するとともに、透過型電子顕微鏡により詳細な組織分布を精査中であるが、PEG 修飾 Q ドットが優れた肝臓デリバリーキャリアーになり得る可能性が示された。

・研究分担者(吉川友章)

(1) nSP70-C や nSP70-N の核酸医薬送達キャリアーとしての有効性を、in vitro で検討中である。具体的には、研究分担者である形山が検討している siRNA 配列と nSP70-C や nSP70-N の複合体を作製した後、HCV レプリコンを導入した細胞 (ルシフェラーゼ発現により HCV 複製を評価可能) に導入することで、核酸医薬の細胞内送達能及び遺伝子発現抑制能を評価中である。現在は、プレリミナリーな結果しか得られていないが、平成 22 年度中には明確な結果を示し、報告書に記載できると考えている。

(2) また、上記 Q ドットをマウスに投与後の生化学的検査・血球検査などの一般毒性を評価中であり、平成 22 年度内に評価を終える予定である。

・研究分担者(形山和史)

(1) HCV レプリコンを導入した細胞を用い、HCV の複製・増殖を抑制し得る最適な siRNA 配列の確定を図っている。具体的には、HCV の配列を標的とした siRNA、宿主細胞の HCV 複製・増殖に関与する蛋白質 (HSP など) を標的とした siRNA を作製し、最も優れた HCV 複製・増殖抑制能を有する siRNA 配列の確定を図っており、平成 22 年度内に評価を終える予定である。

以上のように、研究代表者・分担者ともに、当初の予定通り研究は進行しており、HCV を標的とした核酸医薬送達ナノシステムの開発に向けて着実な成果を得ていると確信している。

IV. 23~24 年度の課題

(1)平成 22 年度に、PEG 修飾 Q ドット・nSP70-C・nSP70-N が優れた肝臓移行性を有することを明らかとしたことから、平成 23 年度には PEG 修飾 Q ドットの有効性・安全性評価を中心に検討する(下記 2-4)。

(2)PEG 修飾 Q ドットの安全性に関して、in vitro における細胞傷害試験や、マウスに投与後の生化学的検査・血球検査などの一般毒性は平成 22 年度に実施中であるが、免疫毒性評価(マウスに投与後の血中炎症性サイトカイン量などを測定)や生殖発生毒性評価(妊娠マウスに投与後の流産率などを測定)など特殊毒性を評価することで、安全性を精査する。

(3)PEG 修飾 Q ドット・nSP70-C・nSP70-N と、siRNA・アンチセンスなどの核酸医薬との複合体作成とその条件設定を進める。PEG 修飾 Q ドットの PEG 先端には、核酸やペプチドを修飾可能な官能基が付与されていることから、円滑に実施可能と考えられる。

(4)3 で作製した PEG 修飾 Q ドット・nSP70-C・nSP70-N と核酸医薬の複合体を用い、HCV レプリコンを導入した細胞を用いたルシフェーラゼアッセイにより HCV の複製阻害能を検討する。また、肝実質細胞の細胞株・プライマリー細胞を用いて、PEG 修飾 Q ドット・核酸医薬複合体による SR-BI・LDL-R・claudin・CD81 の発現抑制効果を FACS・RT-PCR により評価するとともに、HCV 感染阻害効果を検討する

(5)PEG 修飾 Q ドット・nSP70-C・nSP70-N 以外にも、肝実質細胞に特異的に移行するナノマテリアルを随時探索する予定である(平成 23 年度)。

(6)平成 24 年度には、平成 23 年度に引き続き、ナノマテリアルと核酸医薬の複合体である核酸医薬送達ナノシステムの安全性・有効性をマウスレベルで検証する。さらに、平成 22・23 年度の成果をうけ、ナノマテリアルの安全性を霊長類を用いて実施する。本検討では、霊長類を用いた新規治療技術等の有効性・安全性評価に関して優れた実績を有する医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターと連携する。霊長類にナノキャリアーを静脈内投与後、経日的に、体重・体温・心拍数・呼気二酸化炭素分圧・血圧・呼吸数・血液中ホルモン・サイトカイン量・一般生化学的検査・血球数、を測定することで安全性を評価する。

V. 行政施策への貢献の可能性

特に該当無し

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者(吉岡靖雄)及び研究分担者(吉川友章)

(1)Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1b production, ROS production and endosomal rupture. **Biomaterials**. 2010;31(26):6833-6842.

(2)Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. **Biomaterials**. 2011;32(1):3-9.

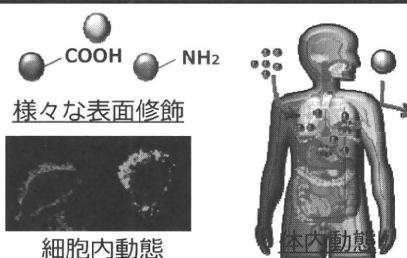
Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

全体構想

画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した核酸医薬送達ナノシステムの開発

これまでに我々は、ナノマテリアルが他の物質とは異なる特異的な動態を持つことを明らかとしてきた。

特異的な動態を生かして、ナノ医薬キャリアとして利用できないか？



C型肝炎治療であるIFN療方は、多くの問題点を残している。そこで近年、siRNAやアンチセンス等による核酸医薬が、現状のHCV治療の問題点を克服し得る新たな次世代型画期的治療戦略として期待されている。しかし核酸医薬にも克服すべき点が多く、致命的問題点を解決可能な薬物送達システムの開発が待望されている。

IFN療法の問題点

- ①無効、再燃例が約50%
- ②多くの副作用(間質性肺炎 etc...)
- ③薬剤耐性ウイルスの頻発

現行治療法



核酸医薬の問題点

- ①血中で速やかに分解される
- ②肝指向性に極めて乏しい
- ③細胞外から細胞内への移行性がない

新規治療法



安全かつ有効な核酸医薬送達システムの開発を目指し、ナノマテリアルによる「siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発」を図る!

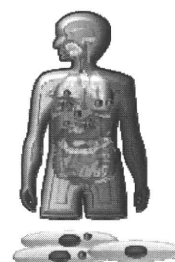
1年目の研究成果

研究代表者はこれまでに、直径70 nmの非晶質ナノシリカ (nSP70) が、100 nm以上の素材とは異なる体内動態を有し、静脈内投与後80-90%が肝実質細胞などの肝臓組織に移行することを明らかとしている。さらに、nSP70は強い急性毒性を示すものの、表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾したnSP70-CやnSP70-Nは全く急性毒性を示さないことを明らかとしている。そこで平成22年度には、当初の予定通り研究を実施し、下記の結果を得た。

- ①nSP70-CやnSP70-Nも、nSP70と同様に、静脈内投与後、肝臓に集積することが明らかとなった。
- ②表面修飾などが異なる4種類のQドットを用い、マウスでの体内動態を評価した結果、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾されたQドットが、静脈内投与後に肝臓へ選択的に移行することが明らかとなった。
- ③ siRNAと、nSP70-CやnSP70-Nとの複合体を作製した後、HCVレプリコン細胞を用いることで、核酸医薬の細胞内送達能及び遺伝子発現抑制能を評価中である。
- ④HCVレプリコン細胞を用い、HCVの複製・増殖を抑制し得る最適なsiRNA配列の確定を図っている。

以上のように、今年度は当初の予定通り研究が進行しており、nSP70-C、nSP70-NやPEG修飾Qドットが優れた肝臓デリバリーキャリアーになり得ることを明らかとしている。平成23年度も、これら基盤情報を発展させ、より加速して当該研究を推進する予定である。

ナノシリカ Qドット など



体内動態
肝臓集積性
安全性
治療効果

●研究代表者の研究歴等

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

・過去に所属した研究機関の履歴・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)・主な研究課題

H16年3月；大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了

薬学分野「眞弓忠範教授」：薬学博士

サイトカインや抗体、抗原分子を初めとする蛋白質による薬物治療（サイトカイン療法・抗体療法・がんワクチン療法など）の最適化を目指した薬物送達システムを構築した。

H16年4月；国立医薬品食品衛生研究所・食品部 研究員（厚生労働技官）（米谷民雄部長）

粘膜免疫の観点から食物アレルギーの発症メカニズムの解明及び予防戦略の開発を図った。

H18年4月～；大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師（常勤）

（澤 芳樹センター長）

「兼任；大阪大学大学院薬学研究科・講師（堤 康央教授・中川晋作教授）」

「(独) 医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト・客員研究員（堤 康央プロジェクト長）」

ナノテクノロジーや蛋白質工学・遺伝子工学などを駆使し、遺伝子、蛋白質（サイトカイン、ワクチン）やナノマテリアルを、有効かつ安全なバイオ医薬品として開発していくための創薬基盤技術の開発と、レギュラトリーサイエンス（安全性評価、品質保障）の推進を図っている。現在は、富山大学医学部産婦人科 教授 齋藤滋先生、大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長 柳原格先生、藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授 宮川剛先生、(財)食品薬品安全性センター 室長 桑形麻樹子先生、(独) 医薬基盤研究所 リーダー 角田慎一先生、大阪大学大学院薬学研究科 准教授 近藤昌夫先生、大阪大学大学院薬学研究科 教授 小比賀聡先生、国立感染症研究所 室長 横田恭子先生、三菱商事株式会社、ビタミンC60バイオリサーチ株式会社、などとの共同研究を推進している。

・これまでの研究実績

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

吉岡靖雄（申請者）はこれまでに、原著論文 77 報（全て査読有り。この内 18 報が Corresponding author）、総説など 21 報を公表済みであるが、代表論文 20 件を下記に記す。なお、下記論文は全て査読有りである。また、申請者が Corresponding author の場合、右に*を付した。さらに、Each author contributed equally の場合、右に#を付した。

1. Higashisaka K, ***Yoshioka Y****, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y. ***Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. Biomaterials. 2011;32(1):3-9.***

2. **Morishige T, Yoshioka Y*, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials*. 2010;31(26):6833-6842.**
3. Yoshioka Y*, Watanabe H, Morishige T, Yao X, Ikemizu S, Nagao C, Ahmad S, Mizuguchi K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin- α with receptor selectivity by using a phage display system. *Biomaterials*. 2010;31(7):1935-43.
4. Morishige T, Yoshioka Y*, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Creation of a LIGHT mutant with the capacity to evade the decoy receptor for cancer therapy. *Biomaterials*. 2010;31(12):3357-63.
5. Kayamuro H#, Yoshioka Y#, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, Yoshikawa T, Kubota-Koketsu R, Ikuta K, Okamoto S, Mori Y, Kunisawa J, Kiyono H, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol*. 2010;84(24):12703-12.
6. Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, Yoshioka Y, Tsunoda S, Nakagawa S, Yamagata Y, Tsutsumi Y. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. *Sci Signal*. 2010;3(148):ra83.
7. Yao X, Yoshioka Y*, Morishige T, Eto Y, Watanabe H, Okada Y, Mizuguchi H, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Systemic administration of a PEGylated adenovirus vector with a cancer-specific promoter is effective in a mouse model of metastasis. *Gene Ther*. 2009;16(12):1395-404.
8. Shibata H#, Yoshioka Y#, Abe Y, Ohkawa A, Nomura T, Minowa K, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Tsunoda S, Kamada H, Tsutsumi Y. The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF. *Biomaterials*, 2009;30(34):6638-47.
9. Kayamuro H#, Abe Y#, Yoshioka Y#, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF- α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*. 2009;30(29):5869-76.
10. Ohgiya Y, Arakawa F, Akiyama H, Yoshioka Y, Hayashi H, Sakai S, Ito S, Yamakawa Y, Ohgiya S, Ikezawa Z, Teshima R. Molecular cloning, expression and characterization of a major 38 kDa cochineal allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):1157-62.
11. Mukai Y, Shibata H, Nakamura T, Yoshioka Y, Abe Y, Nomura T, Taniai M, Ohta T, Ikemizu S, Nakagawa S, Tsunoda S, Kamada H, Yamagata Y, Tsutsumi Y. Structure-function relationship

- of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J Mol Biol.* 2009;385(4):1221-9.
12. Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, Minowa K, Mukai Y, Abe Y, Taniai M, Nomura T, Kayamuro H, Nabeshi H, Sugita T, Imai S, Nagano K, Yoshikawa T, Fujita T, Nakagawa S, Yamamoto A, Ohta T, Hayakawa T, Mayumi T, Vandenberg P, Aggarwal BB, Nakamura T, Yamagata Y, Tsunoda SI, Kamada H, Tsutsumi Y. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1 selective mutant of a TNF alpha antagonist. *J Biol Chem.* 2008;283(2):998-1007.
13. Gao JQ, Eto Y, Yoshioka Y, Sekiguchi F, Kurachi S, Morishige T, Yao X, Watanabe H, Asavatanabodee R, Sakurai F, Mizuguchi H, Okada Y, Mukai Y, Tsutsumi Y, Mayumi T, Okada N, Nakagawa S. Effective tumor targeted gene transfer using PEGylated adenovirus vector via systemic administration *J Control Release.* 2007;122(1):102-10.
14. Hayashi A, Wakita H, Yoshikawa T, Nakanishi T, Tsutsumi Y, Mayumi T, Mukai Y, Yoshioka Y, Okada N, Nakagawa S. A strategy for efficient cross-presentation of CTL-epitope peptides leading to enhanced induction of in vivo tumor immunity. *J Control Release.* 2007;117(1):11-9
15. Sakai S, Akiyama H, Sato Y, Yoshioka Y, Linhardt RJ, Goda Y, Maitani T, Toida T. Chondroitin sulfate intake inhibits the IgE-mediated allergic response by down-regulating Th2 responses in mice. *J Biol Chem.* 2006;281(29):19872-80.
16. Shibata H#, Yoshioka Y#, Ikemizu S, Kobayashi K, Yamamoto Y, Mukai Y, Okamoto T, Taniai M, Kawamura M, Abe Y, Nakagawa S, Hayakawa T, Nagata S, Yamagata Y, Mayumi T, Kamada H, Tsutsumi Y. Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8293-300.
17. Kamada H#, Tsutsumi Y#, Yoshioka Y#, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10(7):2545-50.
18. Kaneda Y#, Tsutsumi Y#, Yoshioka Y#, Kamada H, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials.* 2004;25(16):3259-66.
19. Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Kobayashi K, Okamoto T, Mukai Y, Shimizu T, Nakagawa S, Nagata S, Mayumi T. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol.* 2003;21(5):546-52.
20. Kamada H, Tsutsumi Y, Sato-Kamada K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Okamoto T, Nakagawa S, Nagata S, Mayumi T. Synthesis of a poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride) co-polymer and its application for renal drug targeting. *Nat Biotechnol.* 2003;21(4):399-404.

2 年目研究課題