

ED, Walchli M, Shibata T, Nishimura S and Miyazawa T. Regional polyesterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry* 36, 9109-9119, 1997.

(総説)

- (1) Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cell in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Lett.* 286, 145-153, 2009.
- (2) 紙谷聡英 「発生過程・成体における多能性幹細胞および肝幹細胞」 *肝胆膵*, **2008**, 57, 347-353.
- (3) Kamiya A, Gonzalez FJ and Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci.* 11, 1302-1310, 2006.
- (4) 紙谷聡英、宮島篤 「初代培養系による肝臓の発生分化」 *外科*, **2001**, 63, 563-570.
- (5) Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukouyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 177-183, 2000.
- (6) 紙谷聡英、宮島篤 「サイトカインによる細胞死の制御機構」 *実験医学*, **1998**, 16, 495-500.
- (7) 紙谷聡英、宮島篤 「GM-CSF」 *Surgery Frontier*, **1996**, 3(Suppl.), 145-150.

平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題 : マイクロ RNA を標的とした新規抗 C 型肝炎ウイルス治療戦略の開発
 課題番号 : H23-肝炎-若手-009
 予定期間 : H23 年度から H25 年度まで
 研究代表者 : 渡士 幸一
 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 7,600,000 円

I. 研究の意義

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は本邦において100から200万人存在すると推定されている。HCV治療としては現在まで主にペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が用いられていたが、その著効率は約50%にとどまることから、新たな抗HCV療法が求められている。特に長期投与に伴う薬剤耐性ウイルス出現を克服するためには、宿主因子を標的とした治療薬開発が重要である。本研究では宿主マイクロRNA(miRNA)を標的とした新規治療法の開発を目指す。miRNAは多様な宿主遺伝子発現を調節する小分子RNAであり、その発現および機能異常はがんや分化異常などさまざまな疾患を引き起こすことが知られる。しかしmiRNA経路を利用した創薬応用は、いまだどの疾患に対してもおこなわれていない。肝臓に高発現するmiR-122はHCVの宿主細胞域を規定する複製補因子として認知されはじめており、細胞においてHCVゲノム複製を強く促進する。これまでに研究代表者はさまざまなmiRNA種の遺伝子サイレンシング経路を低分子化合物により阻害できることを初めて示した。本研究では主にこの化合物をプラットフォームとして、miRNAによるHCV複製機構の解析をおこなうとともに、抗HCV剤開発をおこなう。研究の意義は以下にまとめられる。

1) miRNAによるHCVゲノム複製制御機構が明らかになれば、基礎研究の面でウイルス-宿主相互作用の分子基盤理解が進む、2) 新たなHCV複製阻害剤が同定できれば、HCV感染患者から肝硬変、肝がん発症阻止に有用である、3) 低分子化合物によりmiRNA活性を制御しHCV関連病態を改善することができれば、今後がんや分化異常などさまざまなmiRNA関連疾患への低分子化合物利用の可能性が開ける。

II. 研究の目的、期待される成果

研究の目的：本研究の目的は、miRNAを標的とした新規治療法の開発であり、大きく以下の3点に関して解析をおこなう

- (1) miRNA阻害剤TPFによるHCV複製抑制メカニズムの解析
- (2) さらに抗HCV作用の高い、毒性の少ない化合物の同定
- (3) TPFあるいは2)で得られた抗HCV化合物のin vivoにおける抗HCV効果、毒性の評価

期待される成果：学術的にはmiRNA経路がどのようにHCV複製を制御するか、その分子メカニズ

ムが明らかになると期待される。また本研究により miRNA 経路が抗 HCV 剤の標的となることが明らかになれば、今までにない新しい抗 HCV 剤開発戦略を立てることが可能となる。これはウイルス性因子ではなく宿主細胞性因子を標的とするため薬剤耐性ウイルスの出現が低いと考えられ、薬剤長期投与に伴う薬剤耐性の問題を克服できるものと期待される。また miRNA は HCV 感染以外にもさまざまながんや脂質代謝疾患発症等に関わることから、本研究で低分子化合物を介した miRNA 経路阻害のメカニズムや in vivo での効果が明らかになれば、肝炎以外のがんや代謝疾患への新規治療法開発にも有用な情報を提供できる。

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

(1) TPF による HCV 複製抑制メカニズムの解析

1. miR-122 による HCV 複製亢進機能における argonaute 2 (AGO2) の役割の解析

内在性 miR-122 発現がほとんどない HeLa 細胞では HCV 遺伝子型 1 株の HCV ゲノム複製がほとんど見られないが、これに miR-122 を過剰発現することによりゲノム複製活性が著明に上昇すること、さらにこれに AGO2 に対する siRNA あるいは TPF を持続的に処理することにより上昇した HCV 複製が大きく低下することが認められた。このことより、miR-122 による HCV 複製亢進には AGO2 と miR-122 の会合が重要であることが示唆された。

2. TPF の抗 HCV 活性における miR-122 と AGO2 の解離

HCV レプリコン細胞に TPF を処理し抗 HCV 効果を発揮している時に、miR-122 と AGO2 の解離がどのように変化しているかを調べた。その結果、TPF 処理により miR-122 と AGO2 の結合が減弱していること、また抗 HCV 効果をもたない TPF 誘導体ではこの解離が見られないことが示された。このように抗 HCV 効果と miR-122-AGO2 結合の解離が相関していた。

以上の結果は、AGO2 を含む RNA-induced silencing complex (RISC) 複合体が、miRNA 本来の遺伝子サイレンシング機能以外にも役割を果たすことを示唆するものである。

(2) TPF 誘導体を用いた、さらに抗 HCV 効果が高い化合物の探索

miRNA サイレンシングおよび HCV ゲノム複製への効果を、8 種類の TPF 誘導体について調べた。これらのうち 1 種類が強い、2 種類が中程度もしくは弱い shRNA 誘導サイレンシング抑制効果を有していた。強いサイレンシング抑制効果を持つ誘導体は、顕著な HCV ゲノム複製抑制を示した。

(3) in vivo における TPF の抗 HCV 効果および毒性の検証

ヒト肝細胞を移植した uPA TG/SCID マウスに HCV を感染させ、その後に acriflavine (ACF: tryptaflavine と proflavine の合剤) を投与することにより、in vivo での ACF の抗 HCV 効果の有無を検証した。ACF 濃度は 0.5 mg/kg から 2 週間ごとに段階的に 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg と増加させていき、10 週間後まで経時的に血中 HCV 量を定量した。しかしながら少なくとも本実験においては血中 HCV 量は大きな変化を認めなかった。抗 HCV 効果が見られなかった理由としては、少なくとも A) ACF が血中で物理的に不安定である、B) ACF がマウス体内では

急速に代謝／排泄される、C) ACFの肝臓移行性が悪いあるいは血中濃度が低い、D) 薬効が低い、等の可能性が考えられる。これまでに ACF をマウス血清を *in vitro* で混和する検証により A) の可能性は低いことがわかった。今後他の可能性に関して検討することにより、次の *in vivo* 実験の計画へ反映させる。

IV. 平成 24～25 年度の課題

(1) 平成 24 年度

1. TPF が抑制する HCV 生活環ステップの同定
2. さらに抗 HCV 効果が高い化合物の探索
3. *in vivo* における TPF あるいは TPF 誘導体の抗 HCV 効果および毒性の検証
4. TPF あるいは TPF 誘導体の抗 HCV 効果プロファイリング

(2) 平成 25 年度

1. TPF あるいは TPF 誘導体のさまざまな HCV 遺伝子型に対する効果の検証
2. TPF あるいは TPF 誘導体が宿主遺伝子発現に与える影響の検証
3. TPF 耐性 HCV レプリコン単離の試み

V. 行政施策への貢献の可能性

本研究により miRNA 経路が抗 HCV 剤の標的となることが明らかになれば、今までにない新しい抗 HCV 剤開発戦略を立てることが可能となる。この抗 HCV 剤の特徴としては、ウイルス性因子ではなく宿主細胞性因子を標的とするため薬剤耐性ウイルスの出現頻度が低いと考えられ、そのため薬剤長期投与に伴う薬剤耐性の問題を克服できるものと期待できる。HCV 感染を排除することができれば、社会的、公衆衛生上の意義のみならず、HCV 感染者からの肝硬変、肝がん発症低下に伴う医療費の削減に貢献できる。

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。

・研究代表者

- 1) Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. Koichi Watashi, Nanako Uchida, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Takaji Wakita. 18th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses. Sep 11, 2011. Seattle, USA.
- 2) Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle. Koichi Watashi, Nanako Uchida, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Takaji Wakita. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep 16, 2011. Sapporo, Japan.

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。

方法

TPFによる抗HCV作用
メカニズムの解析

TPF誘導体の
抗HCV効果解析

ACFのin vivoでの
抗HCV効果、
毒性の検証

TPFおよび誘導体を
用いた抗HCV作用プ
ロファイリング

結果

miR-122とAGO2の
結合解離が抗HCV
作用に重要である
可能性

強い抗HCV効果をも
つ1種類の誘導体

ACFは明らかな抗
HCV作用、毒性なし
(ACFはマウス血中
では比較的安定)

今後の予定

- ・ さらに抗HCV効果が強い化合物
- ・ さらに体内動態が望ましい投与経路
- ・ さらに抗HCV効果が強い投与方法

目標

in vivoで効果のある抗HCV剤の同定

●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15年4月～平成15年10月：

京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究分野 日本学術振興会特別研究員(PD)

平成15年11月～平成19年3月：

京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究分野 助手(助教)

平成19年4月～平成21年11月：

米国国立衛生研究所 国立アレルギー感染症研究所 客員研究員

平成21年12月～現在：

国立感染症研究所 ウイルス第二部 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15年4月～平成19年3月：

京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究分野 下遠野邦忠 教授

平成19年4月～平成21年11月：

米国国立衛生研究所 国立アレルギー感染症研究所
Malcolm Martin 研究領域長、Kuan-Teh Jeang 研究部門長

平成21年12月～現在：

国立感染症研究所 ウイルス第二部 脇田隆宇 部長、鈴木哲朗 室長、相崎英樹 室長

・主な研究課題

平成15年4月～平成15年10月：

1) HCV ゲノム複製メカニズムに関する研究

平成15年11月～平成19年3月：

1) 新規抗HCV剤開発に関する研究

2) シクロフィリン阻害剤の抗HCV研究

平成19年4月～平成21年11月：

1) microRNAを阻害する低分子化合物探索及びそのメカニズム解析

2) ヒトレトロウイルス増殖に関与する宿主細胞性因子の解析

平成21年12月～現在：

1) HCV およびB型肝炎ウイルス(HBV)の増殖制御に関する研究

2) 新規抗HCV剤および抗HBV剤開発に関する研究

・これまでの研究実績

※研究代表者の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。

<英論文>

- 1) Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M.: Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. **Biochem Biophys Res Commun** 415: 714-719 (2011)
- 2) Morohashi K*, Sahara H, Watashi K*, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F.: Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. **PLoS One** 6: e18285 (2011) (* equally contributed)
- 3) Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T.: Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. **J Virol** 84: 11761-11770 (2010)
- 4) Watashi K, Yeung ML, Starost MF, Hosmane RS, Jeang KT.: Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. **J Biol Chem** 285: 24707-24716 (2010)
- 5) Watashi K.: Alisporivir, a cyclosporin derivative that selectively inhibits cyclophilin, for the treatment of HCV infection. **Curr Opin Investig Drugs** 11: 213-224 (2010)
- 6) Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MT, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M.: Anti-bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxxygenase inhibitor SC-560. **Antivir Chem Chemother** 20: 47-54 (2009)
- 7) Yeung ML, Bennasser Y, Watashi K, Le SY, Houzet L, Jeang KT.: Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. **Nucleic Acid Res** 37: 6575-6586 (2009).
- 8) Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K.: Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. **Cancer Sci** 100: 1943-1950 (2009).
- 9) Peloponese JM Jr, Yasunaga J, Kinjo T, Watashi K, Jeang KT.: Peptidylproline cis-trans-isomerase Pin1 interacts with human T-cell leukemia virus type 1 tax and modulates its activation of NF-kappaB. **J Virol** 83: 3238-3248 (2009)
- 10) Watashi K, Khan M, Yedavalli VR, Yeung ML, Strebel K, Jeang KT.: Human immunodeficiency virus type 1 replication and regulation of APOBEC3G by peptidyl prolyl isomerase Pin1. **J Virol** 82: 9928-9936 (2008)
- 11) Watashi K, Metselaar HJ, van der Laan LJ.: Interfering with interferon: re-igniting the debate on calcineurin inhibitor choice and antiviral therapy for hepatitis C virus

- recurrence. *Liver Transpl* 14: 265-267 (2008)
- 12) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. : The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9: 1089-1097 (2007)
 - 13) Fukutome A, Watashi K, Kawakami N, Ishikawa H. : Mathematical modeling of severe acute respiratory syndrome nosocomial transmission in Japan: the dynamics of incident cases and prevalent cases. *Microbiol Immunol* 51: 823-832 (2007)
 - 14) Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. : Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem* 282: 32765-32772 (2007)
 - 15) Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T. : Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* 26: 5587-5595 (2007)
 - 16) Watashi K, Shimotohno K. : Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol* 17: 245-252 (2007)
 - 17) El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K. : In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol* 51: 127-133 (2007)
 - 18) Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. : Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol* 46: 26-36 (2007)
 - 19) Watashi K, Shimotohno K. : Cyclophilin and viruses; cyclophilin as a cofactor for viral infection and possible anti-viral target. *Drug Target Insights* 1: 9-18 (2007)
 - 20) Ishii N*, Watashi K*, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K (*: equally contributed). : Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol* 80: 4510-4520 (2006)
 - 21) Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K. : Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 879-884 (2006)
 - 22) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. : Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19: 111-122 (2005)
 - 23) Koyanagi M, Hijikata M, Watashi K, Masui O, Shimotohno K. : Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 280: 12430-12437 (2005)
 - 24) Watashi K, Shimotohno K. : The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: a novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation

- by nuclear hormone receptors. **Cancer Sci** 94: 937-943 (2003)
- 25) Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K.: Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. **Hepatology** 38: 1282-1288 (2003)
- 26) Watashi K, Hijikata M, Tagawa A, Doi T, Marusawa H, Shimotohno K.: Modulation of retinoid signaling by a cytoplasmic viral protein via sequestration of Sp110b, a potent transcriptional corepressor of retinoic acid receptor, from the nucleus. **Mol Cell Biol** 23: 7498-7509 (2003)
- 27) Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M.: Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. **J Gastroenterol** 37 suppl 13: 50-54 (2002)
- 28) Marusawa H, Hijikata M, Watashi K, Chiba T, Shimotohno K.: Regulation of Fas-mediated apoptosis by NF-kappaB activity in human hepatocyte derived cell lines. **Microbiol Immunol** 45: 483-489 (2001)
- 29) Watashi K, Hijikata M, Marusawa H, Doi T, Shimotohno K.: Cytoplasmic localization is important for transcription factor nuclear factor-kappa B activation by hepatitis C virus core protein through its amino terminal region. **Virology** 286: 391-402 (2001)

<特許>

- 1) 「シクロスポリンA結合タンパク質」、発明者：佐原弘益、森陽子、高橋延昭、佐藤昇志、菅原二三男、坂口謙吾、諸橋賢吾、岩端一樹、渡士幸一、下遠野邦忠、菊地浩吉、傳亘、宮下広樹
特許出願人：北海道公立学校法人札幌医科大学、特願2007-217755, PCT2326SI
- 2) 「サイクロフィリンを用いた抗HCV剤のアッセイ法」、発明者：下遠野邦忠、土方 誠、渡士幸一、阿部健司 特許出願人：国立大学法人京都大学、塩野義製薬株式会社、特願 2004-275715
- 3) ” Use of cyclosporins for the treatment of HCV disorders” 発明者：Hijikata M, Shimotohno K, Watashi K 特許出願人：Novartis AG, Application No. W02005/021028, PCT/EP04/009804

平成23年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題： 移植肝へのC型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立

課題番号： H23-肝炎-若手-010

予定期間： H23年度からH25年度まで

研究代表者： 渡利 彰浩

所属研究機関： 大阪大学

所属部局： 大学院薬学研究科

職名： 助教

年次別研究費(交付決定額)：1年目 6,500,000 円

I. 研究の意義

- (1) 肝癌患者の80～90%はC型肝炎ウイルス(HCV)陽性であり、肝移植治療を受けた肝癌患者の99%で移植片に対するHCVの再感染が観察されており、移植片に対するHCV再感染制御法の開発が肝癌治療における最重要課題であるにもかかわらず、感染阻害法の開発は著しく立ち遅れている。
- (2) 最近、Claudin (CL) -1がHCVの感染受容体であること、CL-1を標的としたHCVの感染阻害が報告されたことから、CL-1を標的としたHCV感染阻害戦略が提唱されているものの、HCV感染阻害活性を有するdruggable CL-1 binderは未だに存在しない。
- (3) 既存の治療薬(インターフェロン等)とは異なるC型肝炎治療薬の開発が求められている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 本研究は、独自のclaudin (CL) binder創製技術を有効活用することで、現在唯一HCV感染阻害効果を実証されているCL-1 binderを創製し、移植片に対するHCV感染阻害法の開発を目的とする。
- (2) 移植肝へのHCV再感染を阻害することにより、肝移植患者で見られる肝硬変、肝がんの再発を予防することが期待できる。
- (3) インターフェロン(INF)とは異なる新たな抗HCV薬を開発することにより、INF療法が効かない患者、副作用の発現に伴い治療中断を余儀なくされる患者に対し、新たな治療法を提案することができる。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(渡利 彰浩)

- (1) 出芽バキュロウイルスを用いた膜蛋白質発現系を活用し、scFvライブラリを作製する際に用いる抗原としてCL-2提示バキュロウイルスを作製した。また、CL-1結合性scFv探索系として4種のCL発現細胞を作製した。
- (2) CL-2欠損マウスを利用することにより、抗原性が低いCLに対する抗体産生の誘導に成功した。
- (3) (2)のCL抗体産生マウスの脾臓を回収しscFvライブラリの作製のためのcDNAを作製した。

・研究分担者（角田慎一）

CL-2 KO マウスから作製した cDNA をもとに、ファージディスプレイ scFv ライブラリを構築した。

IV. 平成 24～25 年度の課題

- (1) これまでに作製した scFv ライブラリをもとに、CL-1 binder の取得を試みる。
- (2) 取得した CL-1 binder に関して、CL-1 への親和性および特異性などの結合特性解析を行う。
- (3) *in vitro* HCV 感染モデルを利用した感染阻害効果の検証、ヒト肝臓キメラマウス等を利用した *in vivo* での感染阻害効果を検討することにより、druggable CL-1 binder 候補分子の創製を試みる。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) CL-1 binder を利用した HCV 感染阻害法を確立することにより、肝移植患者における肝硬変・肝がんの再発防止、既存の治療法との併用による相加的・相乗的治療効果、副作用に伴うインターフェロン療法中断患者、高ウイルス量患者に対する治療効果が期待されることから、国民の健康寿命の増進、完治に伴う医療費の削減等において厚生労働行政に多大な貢献が期待される。
- (2) 本邦発の新規抗 HCV 薬を開発することにより、バイオ製薬メーカーの育成、知的財産の確保に貢献できる。

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（渡利 彰浩）

1. Kakamu Y, Matsushita K, Saito Y, Takahashi A, Matsuhisa K, Watari A, Kondoh M and Yagi K. Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. *FASEB J*, 25, 620.11, 2011.
2. Takahashi A, Saito Y, Matsuhisa K, Kakamu Y, Kodaka M, Watari A, Kondoh M and Yagi K. Preparation of a dual claudin binder using a fragment of Clostridium perfringens enterotoxin.. *FASEB J*, 25, 623.3, 2011.
3. Kodaka M, Takahashi A, Yamaura T, Kakamu Y, Matsuhisa K, Matsushita K, Watari A, Kondoh M and Yagi K. Simple screening system for claudin binders using an scFv library derived from claudin-immunized mice. *FASEB J*, 25, 620.12, 2011.
4. Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Watari A, Yagi K. The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Pharmazie*, 65(10), 766-9, 2010.
5. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Suzuki H, Kakamu Y, Watari A, and Yagi K. A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 334(2), 576-82, 2010.
6. Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Watari A and Kiyohito Yagi. A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *FASEB J*, 24, 773.3, 2010.
7. K. Matsuhisa, A. Takahashi, Y. Kakamu, M. Kodaka, Watari A, M. Kondoh, K. Yagi. Development of a novel claudin binder using baculoviral display for its application in mucosal absorption of drugs. 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. Aug. 2011, Maryland, U.S.A.

8. A. Takahashi, Y. Saito, K. Matsuhisa, Y. Kakamu, m. Kodaka, Watari A, M. Kondoh, K. Yagi, Preparation of a dual claudin binder using a fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Experimental Biology, Apr, 2011, Washington, D.C. U.S.A.
9. Y. Kakamu, K. Matsushita, Y. Saito, A. Takahashi, K. Matsuhisa, K. Matsuhisa, Watari A, M. Kondoh, K. Yagi, Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. Experimental Biology, April, 2011, Washington, D.C. U.S.A.

研究分担者 (角田慎一)

- (1) Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Mukai Y., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., Biomaterials., 32(1):162-169, 2011.
- (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., 32(1):3-9, 2011.
- (3) Nomura T., Abe Y., Kamada H., Shibata H., Kayamuro H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Serada S., Naka T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice., J. Control. Release., 149(1):8-14, 2011.
- (4) Yoshida Y., Yamashita T., Nagano K., Imai S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Limited expression of reticulocalbin-1 in lymphatic endothelial cells in lung tumor but not in normal lung., Biochem. Biophys. Res. Commun., 405(4):610-614, 2011.
- (5) Yoshikawa M., Mukai Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S. : Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal antibodies obtained from immune-phage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif., J. Biosci. Bioeng., 111(5):597-599, 2011.
- (6) Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning., Biomaterials., 32(23):5498-504, 2011.
- (7) Kitagaki M., Isoda K., Kamada H., Kobayashi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Niida T., Kujiraoka T., Ishigami N., Ishihara M., Matsubara O., Ohsuzu F., Kikuchi M. : Novel TNF-alpha receptor-1 antagonist treatment attenuates arterial inflammation and intimal hyperplasia in mice., J. Atheroscler. Thromb., in press.
- (8) 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : 抗体プロテオミクス技術, 『臨床プロテオーム ～個別医療を目指す臨床バイオマーカー探索～』, 金原出版株式会社, in press.
- (9) 角田慎一, 堤 康央 : 分子進化技術によるサイトカイン機能改変体の創製と DDS., 日本 DDS 学会季刊誌『プロテインエンジニアリングを利用した次世代バイオ創薬』, 26(6) : 604-610, 2011.
- (10) 角田慎一, 堤 康央 : アジュバントとしてのサイトカインおよびその機能性変異体., 『アジュバント開発研究の新展開』, シーエムシー出版, pp158-163, 2011.

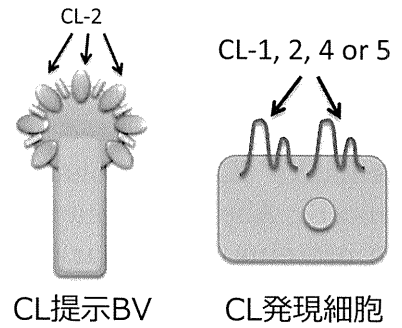
Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

平成23年度研究成果の概要図

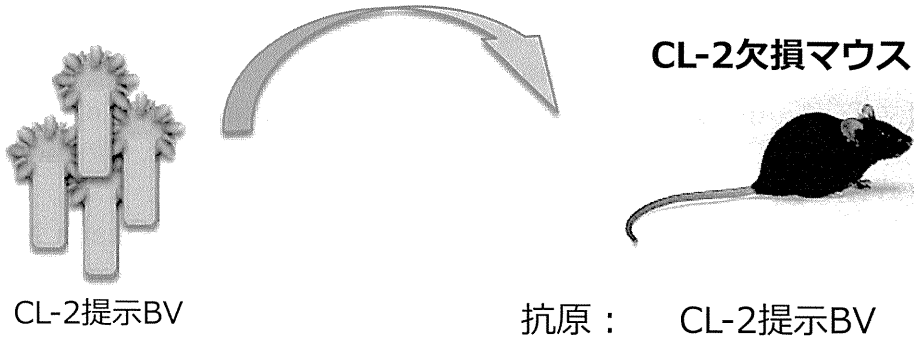
C型肝炎ウイルス感染阻害活性を有するCL-1結合性scFv取得のため、
①Claudin(CL)発現バキュロウイルス・細胞の作製、②CL-2 KOマウスを用いた抗CL抗体の産生、③scFvライブラリの作製を行った。

① CL発現バキュロウイルス・細胞の作製

- (1) CL-2提示バキュロウイルス(BV)を作製した。
- (2) CL-1,2,4,5発現細胞を作製した。

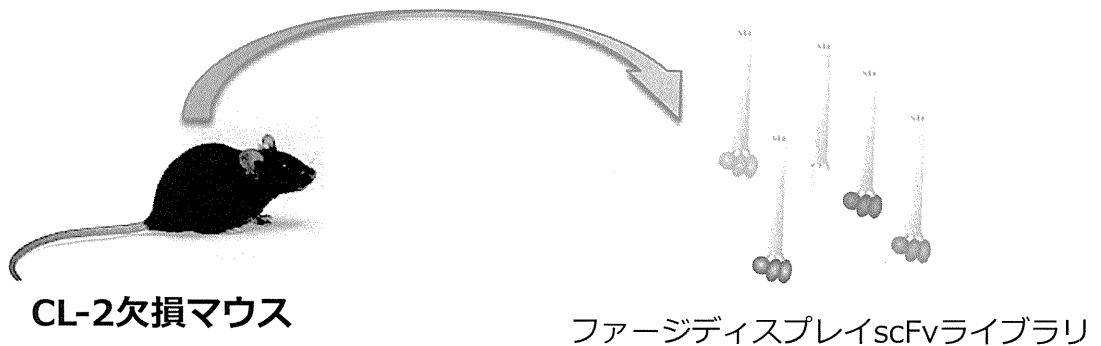


② CL-2 KOマウスを用いた抗CL抗体の産生



抗原性の低いCLに対する抗CL抗体を確認した。

③ scFvライブラリの作製



②で作製した抗CL抗体を産生するマウスの脾臓を用いて、scFvライブラリを構築した。

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

平成19年3月：大阪大学医学系研究科生体制御医学専攻 博士課程修了（医学博士）
 平成19年4月～平成21年8月：大阪大学微生物病研究所発癌制御研究分野 特任研究員
 平成21年9月～現在：大阪大学 大学院薬学研究科 助教
 平成22年12月 日本薬学会近畿支部奨励賞 受賞

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大阪大学微生物病研究所在職中は、岡田雅人教授の下、細胞がん化メカニズムおよびがん遺伝子の進化的な機能変化の解析を行った。大阪大学大学院薬学研究科に異動後、八木清仁教授の下、C型肝炎研究、近藤昌夫准教授および医薬基盤研堤康央プロジェクトリーダー（現阪大院薬教授、医薬基盤研リーダー併任）の下、claudin binder および modulator 研究に着手した。当該申請課題は、上述した先生に加え、阪大微研松浦善治教授、国立感染研脇田隆字部長にご指導を仰ぎつつ、C型肝炎ウイルス感染阻害法の開発を試みるものである。

・主な研究課題

- (1) Claudin-1 を標的としたC型肝炎阻害薬の開発
- (2) Claudin-4 を標的とした粘膜ワクチンの開発
- (3) Claudin-4 を標的とした claudin modulator の開発
- (4) 肝臓に対するナノマテリアルの安全性評価

・これまでの研究実績

- (1) Watari A, Li Y, Higashiyama S and Yutsudo M. A Novel Proapoptotic Gene PANO Encodes a Post-translational Modulator of the Tumor Suppressor p14ARF. *Exp. Cell. Res.*, In Press
- (2) X. Li, M. Kondoh, Watari A, T. Hasezaki, K. Isoda, Y. Tsutsumi and K. Yagi. Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *Die Pharmazie*, 2011, 66(4), 282-6. 2011.
- (3) Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Watari A, Yagi K. The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Pharmazie*, 2010, 65(10), 766-9. 2010.
- (4) Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M and Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, 33(6), 983-7. 2010.
- (5) Watari A, Iwabe N, Masuda H and Okada M. Functional transition of Pak proto-oncogene during early evolution of metazoans. *Oncogene*, 2010, 29(26), 3815-26. 2010.
- (6) Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Suzuki H, Kakamu Y, Watari A, and Yagi K. A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010, 334(2), 576-82. 2010.
- (7) Watari A. CapG. *Encyclopedia of Cancer*, Springer, 2007.

- (8) Ohba Y, Kanao Y, Morita N, Fujii E, Hohrai M, Takatsuji M, Miura D, **Watari A**, Yutsudo M, Zhao H, Yabuta N, Ito A, Kita Y and Nojima H. Oleamide derivatives Suppress the spontaneous metastasis by inhibiting connexin 26. *Int. J. Cancer*, 2007, 121,47-54. 2007.
- (9) **Watari A**, Takaki K, Higashiyama S, Li Y, Satomi Y, Takao T, Tanemura A, Yamaguchi Y, Katayama I, Shimakage M, Miyashiro I, Takami K, Kodama K and Yutsudo M. Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. *Oncogene*, 2006, 25(56), 7373-80. 2006.
- (10) Shimakage M, Inoue N, Ohshima K, Kawahara K, Oka T, Yasui K, Matsumoto K, Inoue H, **Watari A**, Higashiyama S and Yutsudo M. Down-regulation of ASY/Nogo Transcription associated with progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Cancer*, 2006, 119(7),1648-1653. 2006.
- (11) **渡利 彰浩**、湯通堂 満寿男, 不老不死への道 (細胞編) 化学と生物, 2004, 42(5),323-325. 2004.
- (12) Qi B, Qi Y, **Watari A**, Yoshioka N, Inoue H, Minemoto Y, Yamashita K, Sasagawa T and Yutsudo M. Pro-apoptotic ASY/Nogo-B protein associates with ASYIP. *J. Cell. Physiol*, 2003,196(2), 312-318. 2003.
- (13) **Watari A** and Yutsudo M. Multi-functional geneASY/Nogo/RTN-X/RTN4 : apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis*, 2003, 8(1), 5-9. 2003.

平成23年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題 : 肝炎等克服緊急対策研究事業の企画及び評価に関する研究
課題番号 : H23-肝炎-指定-011
予定期間 : H23年度からH25年度まで
研究代表者 : 富澤 一郎
所属研究機関 : 国立感染症研究所
所属部局 : 企画調整主幹
職名 : 企画調整主幹
年次別研究費(交付決定額) : 1年目 5,000,000 円

I. 研究の意義

研究事業の適切かつ円滑な実施に当たって

- (1) 適切な企画と評価
 - (2) 研究の効率的な実施
- が重要である。

加えて

- (3) 研究者への支援
- が望ましい。

本研究では、これらを行い、研究事業の適切かつ円滑な実施を図る。

II. 研究の目的、期待される成果

本研究では、

- (1) 適切な企画・評価と研究事業の効率的な実施のために

- ・新規公募課題応募者に対しヒアリングを開催
- ・研究成果発表会の開催
- ・評価支援システムの開発

- (2) 研究者への支援のため

- ・研究班会議等への参加（情報収集とアドバイス・調整）
- ・研究デザインの整理
- ・情報標準規格についてレビュー

を実施。

これらによって、研究事業の適切かつ円滑な実施が期待される。

また、各研究班会議に出席し、研究の進捗状況の把握、評価委員への情報提供を行うことにより、適切な評価に資することが期待される。

Ⅲ. 1年間の研究成果

- 研究代表者（富澤一郎）

(1) ヒアリング、研究成果発表会の開催

事前評価委員会開催前に、ヒアリングを実施し、事前評価委員が公募課題の内容をより深く理解することを支援した。

同様に、中間・事後評価委員会開催前に、研究成果発表会を開催し、中間・事後評価委員が研究内容をより深く理解することを支援した。

(2) 新規研究課題設定に関する支援

肝炎（特に基礎研究分野）研究の課題設定にあたり、専門家から意見を聴取するとともに、必要な文献調査等を実施した。これにより、研究課題の案を作成し、厚生労働省担当室とも打合せを行い、平成24年度研究課題の設定の支援を行った。

(3) 研究成果概要のとりまとめ

中間・事後評価委員会開催前に、各研究班から研究成果概要を提出していただき、それを中間・事後評価委員へ送付した。これは、中間・事後評価委員が研究内容を事前に理解し、1次評価するのに役立ったと考えられる。また、中間・事後評価委員会終了後、成果概要を1冊にとりまとめ、研究成果報告書の別添として公表することとしている（平成23年度内）。

また、上記と併せ、研究成果アーカイブズを作成し、セキュリティに配慮した上で関係者に研究成果発表会の内容をweb上で閲覧できるようにする予定。

(4) 班会議への専門家の参加（研究班へのアドバイス、評価委員への報告）

専門家(Program Officer)に、オブザーバーとして班会議に参加していただき、研究班へアドバイスしていただくとともに、班会議の内容を評価委員へ報告した。これにより、研究のより良い実施に貢献するとともに、評価委員による評価の一助になったと考えられる。

(5) 研究評価業務支援システムの開発

研究評価業務支援システムを開発した。具体的には、中間・事前評価委員が、Web上で研究計画書、研究成果概要を読み、評価（点数評価、コメント記載）が行え、それをもとに自動集計するシステムを開発・施行し、評価委員会において使用する予定。

(6) 新規研究分野の評価に対する支援

本年度より開始された、「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業」について、関係者からヒアリングを行い、適切な研究が推進されるよう、支援を行った。

(7) 海外の情報収集

HCV国際会議に出席し、HCV研究の世界的動向について調査を実施した。

IV. 平成 24～25 年度の課題

以下の項目が、今後の課題や望ましい項目として挙げられた。

(1) 研究評価業務の改善

より適切な研究企画・評価の実施、研究者、評価委員、研究事業事務局の負担軽減のため研究評価業務の一層の改善が望まれる。

(2) 新規公募課題の取りまとめ

POとの緊密な連携のもとに、平成 25 年度の新規公募課題として取り上げるべき内容を検査することが必要と考えられる。

(3) 一層の研究支援

研究業務の分析を行い、研究業務の支援を行うことが望ましいと考えられた。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 研究事業の企画と評価について円滑な実施への貢献

(2) 研究成果を厚生労働省へ適宜情報提供し、行政施策へ反映

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 研究評価業務支援システム書を作成。

Ⅶ. (1年間の研究成果)の概要図等

課題公募 (MHLW)



ヒアリング (MHLW・本研究班)



事前評価委員会・課題選択 (MHLW)



各研究班 → 研究実施・班会議・報告書



研究成果発表会 (本研究班)



中間・事後評価委員会 (MHLW)



POの班会議参加
感染症情報の収集・交換・提供・調整
(本研究班)

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

平成 16 年 4 月 慶應義塾大学医学部公衆衛生学教室 非常勤助教

平成23年度 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業「肝炎関係研究分野」『成果概要』

研究課題：職域における慢性ウイルス性肝炎患者の実態調査とそれに基づく望ましい配慮の在り方に関する研究

課題番号：H23-実用化-肝炎-一般-001

予定期間：H23年度からH25年度まで

研究代表者：渡辺 哲

所属研究機関：東海大学

所属部局：医学部

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 32,500,000 円

I. 研究の意義

現在、B型、C型肝炎は早期発見することで、病態の改善や治癒が期待できる有効な治療法が存在するため早期発見、早期治療が重要である。しかし、肝炎ウイルス検査の受診率は依然低いため、多くの成人が働いている職域での肝炎検診の意義は非常に大きい。また、肝炎の治療は長期間にわたるため、働きながら治療を受けられるように職域での配慮が必要である。本研究では、会社、産業医、労働者、患者、専門医を対象に大規模調査を行うことで実態を把握し、以下の点で今後の肝炎対策策定に役立てる。

- (1) 職域において肝炎検査の実施状況と、検査受診の際どのような配慮がなされているか等の実態を明らかにすることで、受診勧奨の推進に結びつける。
- (2) 肝炎患者労働者に対する就業上の配慮、プライバシーの保護、会社・産業医・労働者等による望ましい連携のあり方に関する先進的事例を整理しモデルとして提示する。
- (3) 会社、産業医、労働者の三者における肝炎対策の認知度や、肝炎対策を実施する上で三者それぞれが持つ問題点を明確化することで、今後の職域における肝炎対策立案につなげる。

II. 研究の目的、期待される成果

本研究では、会社、産業医、労働者、患者、専門医を対象に大規模な実態調査を行い、以下の点を明らかにし、職域における肝炎患者に対する望ましい配慮の在り方を提言する事を目的とする。

- (1) 労働者のプライバシーに配慮した肝炎ウイルス検査の実施状況
- (2) 働きながら治療を受けられる体制の有無
- (3) 労働者の病状に配慮した適正配置の有無
- (4) 労働者の慢性ウイルス性肝炎に関する認識度
- (5) 専門医、労働者、産業医間の連携

特に本研究では、肝炎対策について、労働者や肝炎患者への倫理的配慮を盛り込んだ望まし