

「細胞内適応変異導入による JFH-1 株以外の新規 C 型肝炎ウイルス感染増殖系の樹立」
「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

・
[発表論文]

1. **Poduction of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1.** Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. *J Virol.* 2011 In press.
2. **Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2.** Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul 8;410(3):404-9.
3. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. activation. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. *Hepatology.* 2011 Aug;54(2):425-33.
4. RNA Polymerase Activity and Specific RNA Structure are Required for Efficient HCV Replication in Cultured Cells. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. *PLoS Pathog.* 2010 6(4): e1000885.
5. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. *J Biol Chem.* 2009 Feb 13;284(7):4464-72.
6. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 19;377(3):747-51.
7. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. *J Virol.* 2008 Aug;82(16):7964-76.

8. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. **J Virol**. 2007 Aug;81(15):8030-40.
9. The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. Morikawa K, Zhao Z, Date T, Miyamoto M, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Wakita T. **J Med Virol**. 2007 Jun;79(6):714-23.
10. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, Wakita T. **Hepatol Res**. 2007 Jun;37(6):433-43.
11. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. **Nat Protoc**. 2006;1(5):2334-9.
12. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T. **J Virol**. 2007 May;81(10):5036-45.
13. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. **Mol Cell Biol**. 2001 Sep;21(18):6139-50.
14. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. Isoyama T, Murayama A, Nomoto A, Kuge S. **J Biol Chem**. 2001 Jun 15;276(24):21863-9.

[著書]

1. 脇田隆字、村山麻子
C型肝炎ウイルスの複製機構
Medical Science Digest 2010; 36(8), 912-915,
2. 脇田隆字、森川賢一、村山麻子
HCV 粒子形成システム
肝疾患 Review, 2006 119-123,

[知的財産権の取得及び申請状況]

1. 特許取得

培養細胞で感染性ウイルス粒子産生可能なC型肝炎ウイルス J6CF 株変異体
2011年5月出願済み、出願番号：2011-122795

**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
(H22-肝炎-若手-016)**

研究代表者:
国立感染症研究所 ウイルス第二部 研究員
村山麻子*

(*平成23年9月に政木隆博 主任研究官より引き継ぎ)

本研究の目的

HCV NS5A蛋白質を標的とした新規治療法の開発

1. HCV NS5Aをリン酸化するプロテインキナーゼ(PK)を標的とした抗HCV薬の開発
 - (1) HCVのNS5Aと結合する PKの探索
 - (2) HCVのNS5Aをリン酸化するPKの探索
 - (3) 同定したPKのHCV生活環における機能の解析
2. HCV NS5A結合ペプチドを用いた抗HCV薬の開発
 - (1) HCV NS5Aと結合するペプチドの探索
 - (2) HCVの複製・粒子形成を制御するペプチドの同定

**1. HCV NS5Aをリン酸化するプロテインキナーゼ
(PK)を標的とした抗HCV薬の開発**

HCV NS5Aをリン酸化するPKの同定

HCV NS5Aと結合するPKの同定

-AlphaScreen assay (404 human protein kinase library)
(愛媛大学との共同研究)

79種類のセリン/スレオニンキナーゼを同定した

HCV NS5Aをリン酸化するPKの同定

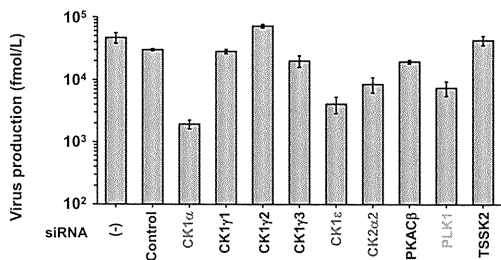
-In vitro phosphorylation assay

9種類のセリン/スレオニンキナーゼを同定した

HCV生活環に与える影響の解析

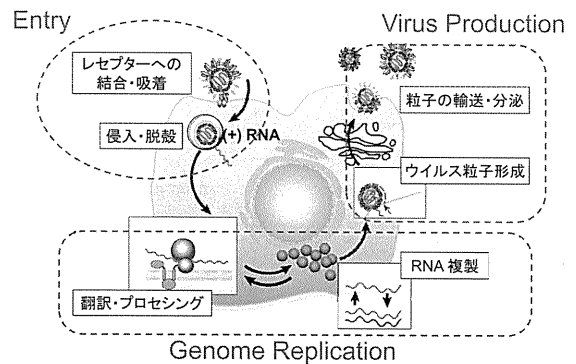
-HCV replicon system (genome replication)
-HCV virus production system (virus assembly)
-HCVpp system (virus entry)

PKのノックダウン: HCV Production

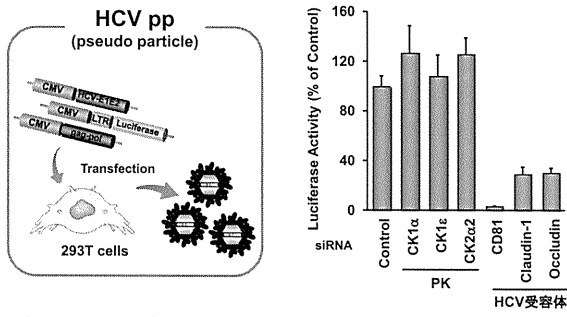


9種類のPKのうち、3種類のPK(CK1 α , CK1 ϵ , CK2 α 2)のノックダウンにより、ウイルス産生が阻害された。
PLK1はノックダウンにより細胞傷害性が観察された。

HCV の生活環

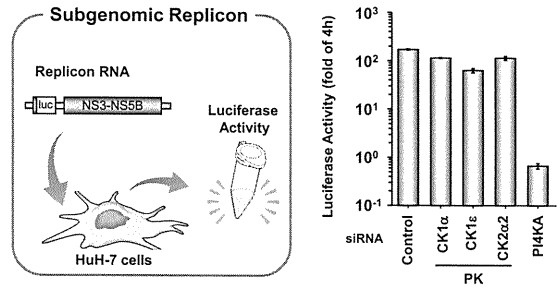


PKのノックダウン: HCV Entry



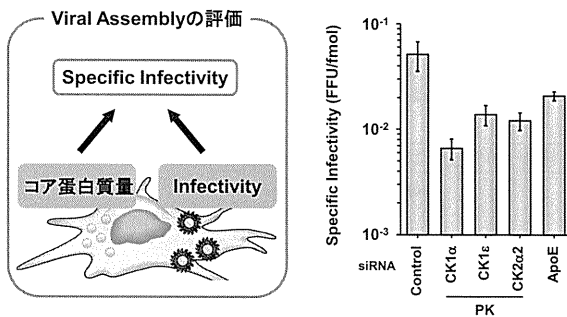
これらのPKのノックダウンはHCVのentryに影響しない。

PKのノックダウン: Genome Replication



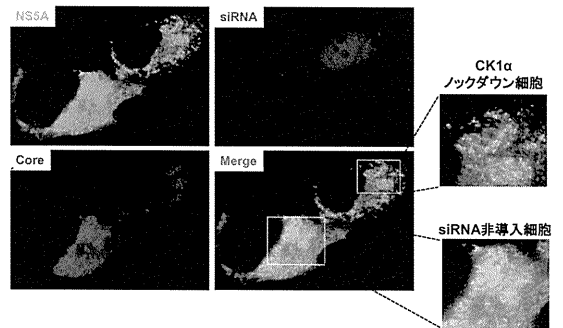
これらのPKのノックダウンはHCVのgenome replicationに影響しない。

PKのノックダウン: Viral Assembly



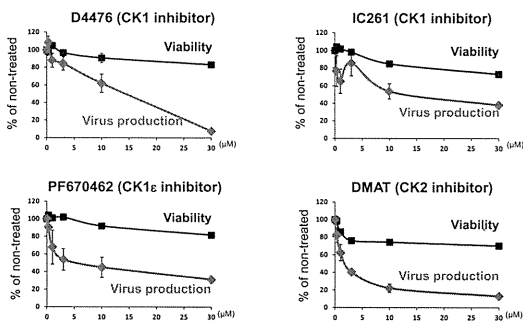
これらのPKのノックダウンはウイルス粒子形成を阻害した。

CK1αノックダウンによるCoreとNS5Aの局在の変化



CK1αのノックダウンにより、CoreとNS5Aの共局在が消失した。

PK阻害剤の抗HCV効果



4種類のCK阻害剤によりウイルス産生量が低下した。

2. HCV NS5A結合ペプチドを用いた抗HCV薬の開発

抗HCV効果をもつ NS5A結合環状ペプチドの探索

NS5A結合ペプチドの同定

- 環状ペプチドライブラリーによるスクリーニング
(東京大学との共同研究)

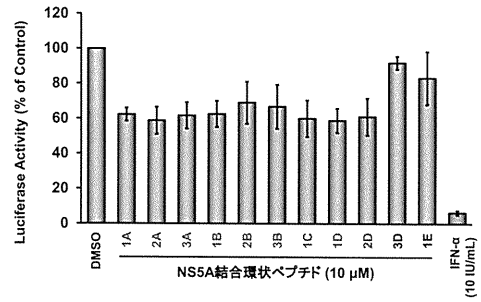


11種類のNS5A結合環状ペプチドを同定した

HCV生活環に与える影響の解析

- HCV replicon system (genome replication)
- HCV virus production system (virus assembly)
- HCVpp system (virus entry)

NS5Aに結合する環状ペプチドが genome replicationに及ぼす影響



NS5A結合環状ペプチド11種類のうち9種類がgenome replicationを阻害した。

2年間の成果のまとめ

HCV NS5A蛋白質を標的とした新規治療法の開発

1. HCV NS5Aをリン酸化するPKを標的とした抗HCV薬の開発
 - (1) HCV生活環に関するPKを3種類同定した。
 - (2) 同定したPKはHCVの粒子形成に関与していた。
 - (3) 抗HCV効果のあるPK阻害剤を4種類同定した。
2. HCV NS5A結合ペプチドを用いた抗HCV薬の開発
 - (1) HCV NS5Aと結合する環状ペプチドを11種類同定した。
 - (2) HCVの複製を阻害する環状ペプチドを9種類同定した。

平成24年度の課題

1. HCV NS5Aをリン酸化するPKを標的とした抗HCV薬の開発
 - (1) PKの作用のウイルス遺伝子型間での相違の検討
 - (2) PK阻害剤による耐性変異の検討
 - (3) マウスモデルによるPK阻害剤の抗HCV効果の検討
2. HCV NS5A結合ペプチドを用いた抗HCV薬の開発
 - (1) HCV感染増殖系における環状ペプチドの効果の検討
 - (2) マウスモデルにおける環状ペプチドの効果の検討

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：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：特任准教授（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

2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) 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。
- (3) 将来的には本研究は、新たな方法論・基盤技術・医療体系を提供することで、国民の健康と福祉に貢献可能と考えられ、特に、IFNとの併用によりC型肝炎の効率的な治療が期待される。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者（吉岡靖雄）

- (1) 体内動態評価；研究代表者はこれまでに、直径70nmの非晶質ナノシリカ（nSP70）が、100nm

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。

- (2) 体内動態評価；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。
- (3) 核酸医薬（siRNA）導入効果；粒子径・表面修飾の異なる非晶質ナノシリカ、及び、上記Qドットを用い、siRNA導入キャリアーとしての有用性をin vitroで評価した。その結果、いずれの非晶質ナノシリカについても、siRNAによる遺伝子発現抑制効果を確認することはできなかった。一方で、表面が細胞内移行ペプチドやアミノ基で修飾されたQドットは、未だ不十分ではあるものの、siRNAによる遺伝子発現抑制効果が認められ、siRNAの細胞内導入キャリアーになり得る可能性が示された。
- (4) 細胞内徐放キャリアーの開発；一方でプレリミナリーなデータではあるものの、非晶質ナノシリカやQドットは、siRNAの細胞内導入キャリアーよりも、siRNAを細胞内で徐放させるキャリアーとしての適用が望ましいことが明らかとなりつつある。本結果は、siRNAの細胞内徐放による治療効果制御という新たな概念を提示する可能性を秘めており、報告書には詳細を記載できると考えている。
- (5) ターゲティング分子の創製；HCV感染肝細胞へ特異的にsiRNAを導入する方法論の欠如がHCVに対する核酸医薬の開発において大きな問題であることから、T細胞受容体を用いた新規ターゲティング分子の構築に向け基礎検討を試みた。その結果、T細胞受容体蛋白質を簡便に創製する方法を確立するとともに、蛋白質特性を評価することで、HCV感染肝細胞を特異的に認識するT細胞受容体の創製に向け有用な情報を得た。

・研究分担者(吉川友章)

- (1) 核酸医薬導入効果；各種非晶質シリカを用いて、核酸医薬送達能をin vitroにおいて比較検討した。まず、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼに対するsiRNAを用いて検討した。粒子径の異なる3種類の非晶質シリカを用い、ルシフェラーゼ発現肝細胞への導入効率を検討したところ、いずれの粒子においてもルシフェラーゼ活性の低下を誘導することはできなかった。次に、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを用いて、肝細胞への遺伝子導入効率を検討した。粒子径・表面修飾の異なる8種類の非晶質シリカを用いて検討したが、いずれの粒子においても、遺伝子発現を確認することができなかった。

・研究分担者(形山和史) (1年目(平成22年度)のみ)

- (1) ナノマテリアルによる核酸医薬送達法のスクリーニング及び最適化を行うために、siRNAの細胞内送達能とその効果発現を簡便に検出可能な評価系を構築した。具体的には、レンチウイルスベクターシステムを用い、遺伝子の量的変化を簡便かつ鋭敏に評価できる *Firefly luciferase* と、遺伝子発現の量的変化を可視化することが可能な緑色蛍光タンパク *Venus* を応用し、siRNA効果判定に適した安定発現細胞株を作製した。

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. 平成24年度の課題

- (1) 定量的な体内動態評価; 現在、Qドットが核酸医薬送達キャリアーとして有望であることから、体内動態評価を進めているが、定性評価にとどまっている。そこで、ICP-MSを用い、静脈内投与後の体内動態、特に、肝臓移行性に関して定量的に解析する。また *in vitro* においても、細胞内移行能を定量的に解析する。
- (2) 細胞内移行能を向上させたナノマテリアルの開発; 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。そこで、様々な細胞に結合し得るRGDペプチドや細胞内移行ペプチドを付与し、ナノマテリアルの細胞内移行能を向上させる。
- (3) ナノマテリアルによる細胞内徐放キャリアーの開発; Qドット・非晶質ナノシリカと、siRNAなどの核酸医薬との複合体作成とその条件の最適化を図る。その後、エレクトロポレーションなどにより、細胞内にナノマテリアル-核酸医薬複合体を導入し、細胞内での遺伝子発現抑制効果を検討する。さらに、上記(2)と融合することで、siRNAの細胞内移行と細胞内徐放を共に可能にするキャリアー開発を試みる。

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)

Narimatsu S, **Yoshioka Y**, Morishige T, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Nishimura MI, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Structure-activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning. **Biochem Biophys Res Commun.** 415: 558-62, 2011.

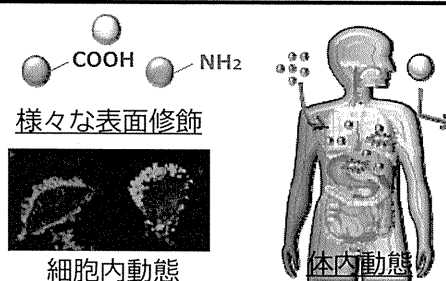
VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

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療法は、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！

2年間の研究成果

- 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粒子径・表面修飾の異なる非晶質ナノシリカ、Qドットを用い、siRNA導入キャリアーとしての有用性をin vitroで評価した結果、表面が細胞内移行ペプチドやアミノ基で修飾されたQドットは、未だ不十分ではあるものの、siRNAの細胞内導入キャリアーになり得る可能性が示された。
- ④プレリミナリーなデータではあるものの、非晶質ナノシリカやQドットは、siRNAの細胞内導入キャリアーよりも、siRNAを細胞内で徐放させるキャリアーとしての適用が望ましいことが明らかとなりつつある。
- ⑤レンチウイルスベクターシステムを用い、遺伝子の量的変化を簡便かつ鋭敏に評価できるFirefly luciferaseと、遺伝子発現の量的変化を可視化することが可能な緑色蛍光タンパクVenusを応用し、siRNA効果判定に適した安定発現細胞株を作製した。
- ⑥T細胞受容体蛋白質を簡便に創製する方法を確立するとともに、蛋白質特性を評価することで、HCV感染肝細胞を特異的に認識するT細胞受容体の創製に向け有用な情報を得た。

以上のように、当初の予定通り研究が進行している。平成24年度には、非晶質ナノシリカやQドットを用い、核酸医薬送達ナノキャリアーとしての適用を、特に、細胞内徐放キャリアーという新たな概念から検討する。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。

●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

薬剤学分野「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)」

H23年4月～；大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任准教授(常勤)

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、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93報(全て査読有り。この内24報がCorresponding author)、総説など31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. Yamashita K, Yoshioka Y*, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nature Nanotechnol. 2011 May;6(5):321-8.

2. Yao X, Yoshioka Y*, Morishige T, Eto Y, Narimatsu S, Kawai Y, Mizuguchi H, Gao JQ, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Tumor vascular targeted delivery of polymer-conjugated adenovirus vector for cancer gene therapy. *Mol Ther.* 2011 Sep;19(9):1619-25.
3. **Narimatsu S, Yoshioka Y*, Morishige T, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Nishimura MI, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Structure–activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Dec 2;415(4):558-62.**
4. **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. *Biomaterilas.* 2011;32(1):3-9.**
5. **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.**
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Shibata H#, Yoshioka Y#, Abe Y, Ohkawa A, Nomura T, Minowa K, Mukai Y, Nakagawa S, Tani 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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, Vandenabeele 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.
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. *Nature 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. *Nature Biotechnol*. 2003;21(4):399-404.

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

(肝炎等克服緊急対策研究事業 若手育成型)

研究代表者: 吉岡靖雄
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

研究分担者: 吉川友章(阪大院薬)

核酸医薬の有効性・問題点

核酸医薬

アンテセンスやsiRNAに代表される核酸医薬(DNAやRNAなどのオリゴ核酸)は、目的遺伝子の発現を特異的かつ顕著に抑制し得ることから、様々な疾病に対する画期的医薬品として期待されている。

HCVに対して、HCVの複製・増殖に必須であるNS3やNS5bに対する核酸医薬や、5'UTRに対する核酸医薬が開発され、その臨床応用が期待されている

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

現状では

ウイルスベクター; 致命的な起炎性など、安全性が懸念
リポソームなど; 肝指向性、遺伝子導入効率が乏しい

核酸医薬を目的の部位(肝臓、細胞質)へ、安全かつ安定に効率的に送達し得る新たな送達技術が開発できれば、核酸医薬を用いたHCV治療戦略に新たな道が開けると期待される

申請者は次世代型素材として期待されているナノマテリアルに着目し、その体内・細胞内動態特性からHCVを標的とした肝臓送達素材として有望であると考えている

ナノマテリアルの核酸送達担体としての利用

ナノマテリアルとは少なくとも1つの次元が100 nm以下の物質であり、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材と比較して、画期的な有用機能を示す。

ナノサイズになることで
比表面積の増大
組織浸透性の向上
反応性の増大

応用

ナノ粒子 移行困難な部位にまで浸透し、薬理作用を示す。
マイクロ粒子 (組織浸透性)

ナノマテリアルの核酸送達担体としての応用に向けて

安定性: RNaseに対する抵抗性を持つ。

標的指向性: 抗体やペプチド等により標的指向性の付与が可能。

細胞内: 徐放化、核酸の徐放化が可能。

課題・問題点
・生体内、細胞内動態の情報が不十分。
・ナノマテリアルの安全性が不明確。
・核酸との結合性の情報が不足。

ナノシリカの体内動態

ナノシリカは、表面電荷など物性の異なるものを容易に合成・入手できる。既に、ナノシリカを遺伝子導入素材として適用した例は存在するが、体内動態を加味しておらず、未だ局所投与・in vitroでの検討がほとんどである。また、安全性に関する知見は皆無である。申請者は、先駆けナノシリカの動態情報を集積し、

nSP70(粒子径70nm)
20 min 6 h

全身 弱

肝臓

収縮蛍光

nSP70(肝臓全体に分布)
クッパー細胞 肝実質細胞

●nSP70においてのみ、肝実質細胞への顕著な分布が認められた。
●さらに、nSP70は細胞質内に効率的に到達していた。

粒子径70nm以下になると肝実質細胞へ移行し、細胞質に到達する

シリカによるsiRNAの細胞導入

mRNA

24時間

ルシフェラーゼ発現ヒト肝癌由来細胞株

siRNA

24時間

ルシフェラーゼに対するsiRNAとナノマテリアルを混合し細胞に添加

ルシフェラーゼアッセイによりsiRNAの導入効率を評価する

ルシフェラーゼ活性抑制効果

シリカ濃度

1 μg/mL 3 μg/mL 30 μg/mL

■ nSP30
■ nSP30-C
■ nSP30-N
■ メソポラスシリカ

量子ドット(QD)

量子ドット

量子ドット(Quantum dot; QD)とはカドミウムとセレンから構成される蛍光粒子。従来の蛍光物質と比べ、蛍光が強く、任意の表面修飾が可能であるため、in vivo imaging素材や薬物送達担体としての利用が期待されている。

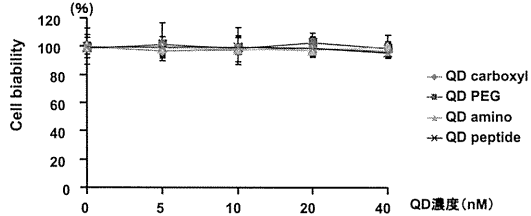
イメージング

しかし、体内動態や核酸との結合性、核酸の導入効率など、核酸送達担体としての有用性に関する情報は不足している。

実験で使用したQDの物性

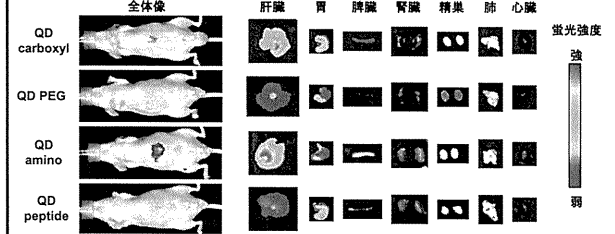
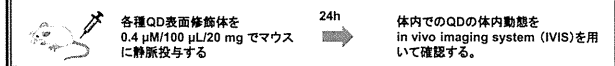
	QD carboxyl	QD PEG	QD amino	QD peptide
粒子径 (nm)	25.8	32.2	20.1	29.4
表面電荷 (mV)	-33.9	-3.7	-2.0	-10.0
表面修飾	カルボキシル基修飾	カルボキシルPEG修飾	PEGを1 st -アミノ基修飾	細胞内移行ペプチド修飾

QDの細胞傷害性



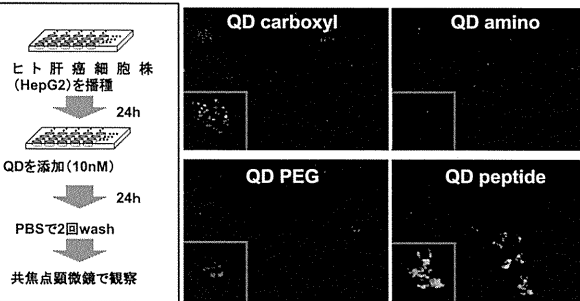
本検討で使用される最高濃度でも細胞傷害性は認められなかった。

QDの体内動態



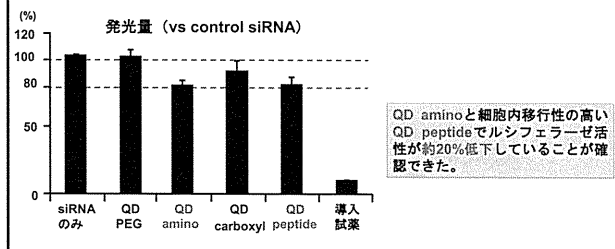
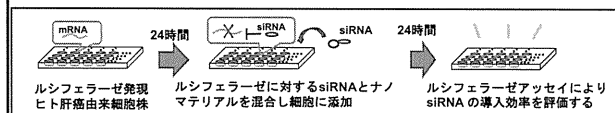
いずれのQD修飾体でも、肝臓、胃に蓄積している。QD PEGはPEG化によって、血中滞留性が向上し、肝臓への移行が減少している。

QDの細胞内動態



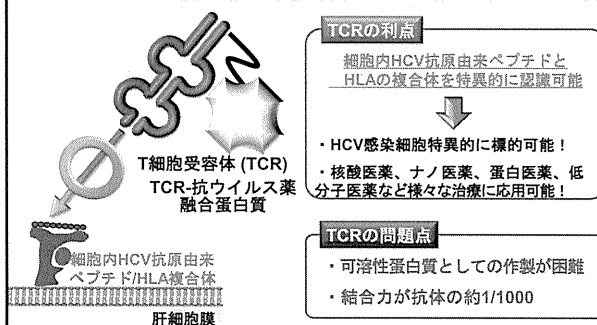
PEG化されているQD PEGとQD aminoは細胞内への移行がほとんど確認できなかった。PEG化されているにもかかわらず、細胞内移行ペプチド修飾されたQD peptideは非常に高い細胞内への移行性を示した。

QDによるsiRNAの細胞導入



QD aminoと細胞内移行性の高いQD peptideでルシフェラーゼ活性が約20%低下していることが確認できた。

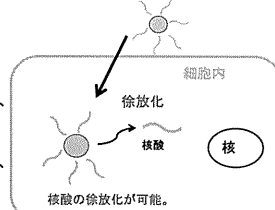
T細胞受容体によるターゲティングとその問題点



TCRのターゲティング分子としての適用を試みている

来年度の展望

- 定量的な体内動態評価: 現在、QDが核酸医薬送達キャリアーとして有望であることから、体内動態評価を進めているが、定性評価にとどまっている。そこで、ICP-MSを用い、静脈内投与後の体内動態、特に、肝臓移行性に関して定量的に解析する。
- 細胞内移行性を向上させたナノマテリアルの開発: PEG修飾QD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。そこで、様々な細胞に結合し得るRGDペプチドや細胞内移行ペプチドを付与し、ナノマテリアルの細胞内移行性を向上させる。
- ナノマテリアルによる細胞内徐放キャリアーの開発: QDと、siRNAなどの核酸医薬との複合体作成とその条件の最適化を図る。その後、電圧ポレーションなどにより、細胞内にナノマテリアル-核酸医薬複合体を導入し、細胞内での遺伝子発現抑制効果を検討する。さらに、上記(2)と融合することで、siRNAの細胞内移行と細胞内徐放を共に可能にするキャリアー開発を試みる。



3 年目研究課題

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：B 型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を
目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究

課題番号：H21-肝炎-一般-001

予定期間：H21 年度から H23 年度まで

研究代表者：田中榮司

所属研究機関：国立大学法人 信州大学

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 42,432,000 円 2 年目 36,400,000 円 3 年目 30,940,000 円 計 109,772,000 円

I. 研究の意義

- (1) B 型肝炎の核酸アナログ薬治療では、治療薬中止後に肝炎の再燃を起こすことが多いが、この再燃を予測する効率的な方法がない。このため、同治療の中止基準がない。
- (2) B 型肝炎の核酸アナログ薬治療には、併用薬などを用いてこれを積極的に中止し、drug free 目指す方法が確立されていない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) B 型肝炎の核酸アナログ薬治療において治療中止が可能な症例を明らかにし、さらに、同治療を中止する場合の危険性を回避するための指針を作成する。
- (2) インターフェロンを併用などにより、核酸アナログ薬を積極的に中止する方法を開発する。
- (3) 上記(1)と(2)により drug free となる症例が増加し、医療経済にも良い効果が得られる。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 核酸アナログ薬中止後の経過観察における、中止継続か再投与かの判断基準を作成した。
- (2) 核酸アナログ薬中止の必要条件 (HBe 抗原陰性、HBV DNA 量 $< 3.0 \log \text{ copy/ml}$ 、投与期間 > 1.6 年) を明らかにした。さらに、必要条件を満たす症例において、中止時の HBs 抗原量と HB コア関連抗原量から中止後の肝炎再燃を予測し、低リスク群、中リスク群、高リスク群の 3 群に分けることが可能であることを明らかにした。
- (3) 上記(1)と(2)の成果に、臨床的に考慮が必要な事項を加え、核酸アナログ薬中止基準を「核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針」としてまとめた。
- (4) 核酸アナログ薬投与継続例を前向きに調査し、どの程度中止可能例が出現するかを検討した。また、核酸アナログ薬中止の前向き検討を進行中である。
- (5) インターフェロン併用による核酸アナログ薬の中止について、有効になるため必要条件 (HBe 抗原陰性、HBV DNA 量陰性、投与期間 > 2.0 年) を明らかにした。
- (6) HBV RNA 高感度定量系を確立した。

・研究分担者(鈴木義之)

- (1) HB コア関連抗原量と肝細胞中 HBV cccDNA 量との相関を明らかにした。
- (2) 核酸アナログ薬を積極的に中止するための sequential 治療を検討し、中止時の HB コア関連抗原量が 4.0 log IU/L 未満の症例では有効率が高いことを明らかにした。

・研究分担者(新海 登)

- (1) 核酸アナログ薬中止基準における HB コア関連抗原量、HBs 抗原量、HBV 遺伝子型、超高感度 HBV DNA 測定法の意義を前向き調査で検討した。
- (2) HBs 抗原量の測定法をキット別に評価し、定量値にキット間での差がないことを明らかにした。

・研究分担者(平松直樹)

- (1) インターフェロン治療効果と各種 HBV マーカの推移との関連を検討し、核酸アナログ薬にインターフェロンを併用する場合の条件検討を行った。

・研究分担者(狩野吉康)

- (1) 核酸アナログ薬投与の多数例を前向きに経過観察し、耐性の出現、HBs 抗原量、HB コア関連抗原量、HBV DNA 量などの推移を調査し、どの程度の割合で中止可能例が出現するかを検討した。

・研究分担者(柘植雅貴)

- (1) 血中 HBV の核酸を DNA に加えて RNA も測定することにより、核酸アナログ薬中止を考える上で有用な基準となることを明らかにした。

・研究分担者(今関文夫)

- (1) HBs 抗原量の自然経過での推移を検討し、中止基準としての意義を明らかにした。

・研究分担者(髭 修平)

- (1) 核酸アナログ薬中止の指標として、HBV pre-core/ core promoter 変異の意義を明らかにした。
- (2) 肝細胞中 HBV cccDNA 量と各種ウイルスマーカーとの関連を検討し。

・研究分担者(八橋 弘)

- (1) 核酸アナログ薬の中止基準として使用可能なウイルスマーカーを明らかにした。
- (2) HBs 抗原量の自然経過での推移を検討し、中止基準としての意義を明らかにした。

・研究分担者(齋藤正紀)

- (1) 核酸アナログ薬中止の指標となる HB コア関連抗原量は核酸アナログ薬投与期間や HBe 抗原陽性と、また、HBs 抗原量は年齢や肝線維化と関連していることを明らかにした。
- (2) 核酸アナログ薬中止の指標として、HBV pre-core/ core promoter 変異の測定が有用であることを明らかにした。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 長期に使用可能なPEG・インターフェロンを併用して核酸アナログ薬を中止するなど、より積極的に中止を推進する方法の検討を行う。
- (2) 核酸アナログ薬中止基準の前向き研究を継続するとともに、新しい指標を導入することにより、より精度の高い中止基準を検討する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 核酸アナログ薬をより積極的に中止する方法を開発する。
- (2) 核酸アナログ薬治療における、同治療薬の継続または中止に関する指針を改良する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

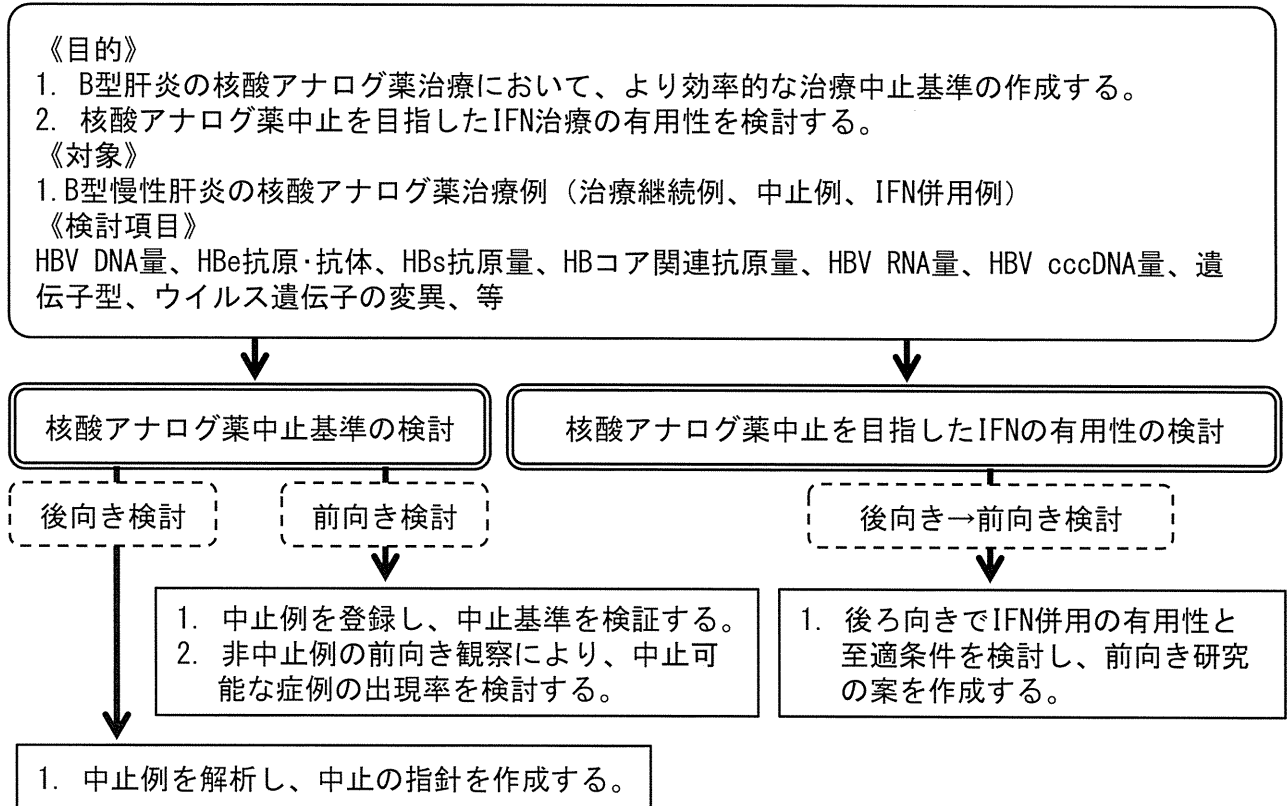
(1) 研究代表者

1. Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogues in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res* (in press).
2. Tanaka E, Urata Y. Risk of hepatitis B reactivation in patients treated with tumor necrosis factor alpha inhibitors. *Hepatol Res* (in press).
3. Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res* 2011;41:1-21.
4. 田中榮司. 透析患者におけるB型肝炎ウイルスマーカー測定の意義. *日本透析医学会雑誌* 2011;26:55-61.
5. Matsumoto A, Maki N, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S, Tanaka E. Comparison of hepatitis B virus DNA, RNA, and core related antigen as predictors of lamivudine resistance in patients with chronic hepatitis B. *Shinshu Medical Journal* 2010;58:153-162.
6. Kumada H, Okanoue T, Onji M, Moriwaki H, Izumi N, Tanaka E, Chayama K, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Suzuki F, Toyota J, Nomura H, Yoshioka K, Seike M, Yotsuyanagi H, Ueno Y. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatol Res* 2010;40:1-7.
7. 田中榮司. B型肝炎再活性化の病態と対策. *日本消化器病学会雑誌* 2010;107:1417-1425.

(2) 研究分担者

1. Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2011;18:e508-515.
2. Huang YW, Chayama K, Tsuge M, Takahashi S, Hatakeyama T, Abe H, Hu JT, Liu CJ, Lai MY, Chen DS, Yang SS, Kao JH. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2010;15:177-184.
3. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. HBcrAg is a predictor of post-treatment recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy. *Liver Int* 2010;30:1461-1470.
4. Hige S, Yamamoto Y, Yoshida S, Kobayashi T, Horimoto H, Yamamoto K, Sho T, Natsuzaka M, Nakanishi M, Chuma M, Asaka M. Sensitive assay for the quantification of hepatitis B virus mutants by a minor groove binder probe and peptide nucleic acids. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4487-4494.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等



《核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012 Digest》

A. 目的

中止を検討する際、中止成功の可能性が高い症例を見いだすことや逆に治療を継続すべき症例を明らかにすること、さらに、中止後の経過観察の指標を設定することにより、核酸アナログ薬中止に伴うリスクを極力回避することを目指した。

最終目標は、ALT< 30 IU/LかつHBV DNA< 4.0 log copy/mlで安定化することとした。

B. 重症化を回避するための条件

1. 重症化の危険性を主治医、患者共に十分理解している。
2. 中止後の経過観察が可能であり、再燃しても適切な対処が可能である。
3. 肝線維化が軽度で肝予備能が良好で、肝炎が再燃した場合でも重症化しにくい症例である。

C. HBV増殖能の評価と再燃のリスクを低下させるための条件

1. 中止の必要条件：中止時のHBV DNAが陰性かつHBe抗原が陰性。
2. 治療期間の条件：核酸アナログ薬投与開始後2年以上経過している。
3. ウイルス抗原量のスコア化による再燃の危険性の評価：中止の必要条件を満たす症例について、中止時のHBs抗原量とHBコア関連抗原量をスコア化し、合計スコアから再燃のリスクを以下の3群に分けて予測することが可能である。

<低リスク群> 中止を考慮しても良い群。ただし、低リスク群でも肝炎再燃症例が存在するため、再燃に対する注意は必須である。(スコア：0、予測成功率：80-90%)

<中リスク群> 状況によって中止を考慮しても良い群。この群では、中止の条件や方法を今後さらに検討する必要がある。(スコア：1-2、予測成功率：約50%)

<高リスク群> 治療の継続が推奨される群。ただし、35歳未満では中止成功例が比較的高く30-40%である。(スコア：3-4、予測成功率：10-20%)

D. 中止後の経過観察方法と再治療開始の条件

1. 定期的にHBV DNAとALTを測定し、HBVの再増殖とこれに伴う肝炎再燃に注意を払う。
2. 肝炎の再燃は中止直後から1年以内が多く、特に中止直後は再燃に対する注意が必要である。
3. 中止後ALT ≥ 80 IU/L またはHBV DNA ≥ 5.8 log copies/mlとなる場合最終的に非活動性キャリア状態に落ち着く可能性は低く、核酸アナログ薬による再治療を考慮する。