

201228002A

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業

次世代生命基盤技術を用いた
B型肝炎制圧のための創薬研究
(H24-B創-肝炎-一般-003)

平成24年度総括・分担研究報告書

研究代表者 小嶋 聡一

平成25(2013)年3月

序文

C型肝炎は、プロテアーゼ阻害剤登場で制圧に向けて見通しができてきたのに対して、B型肝炎ウイルス(HBV)は、我が国ではほぼ同数の患者がいるにもかかわらず、持続感染成立や劇症化の分子機構がわかっておらず、基礎研究・創薬研究は大きく立ち遅れています。また、現在のHBV治療の中心は核酸アナログ製剤ですが、HBVの完全排除は望めず、投与中止に伴う再増殖や長期投与に伴う耐性ウイルスの問題を抱えつつ薬を一生服用し続ける必要があります。この状況から脱却し9年以内に有望な薬剤候補を世に送り出すために、本研究班では、B型肝炎の創薬実用化を目指し、理化学研究所の小嶋、東京慈恵会医科大学の松浦、国立感染症研究所の相崎を中心として、最終的に次世代HBV薬候補3つ以上を製薬会社に提供することを目指して、臨床に即したウイルス研究に基づく大規模スクリーニング研究を行います。最先端の生命基盤技術を用いた独自の解析方法を駆使して1) 劇症肝炎、若年発癌などの特徴ある臨床病態を示したHBV感染症例からオミックス解析を駆使して新規標的候補を同定し(松浦グループ:松浦、名越、鈴木(治)、金井、堂前)、2) ハイスループット(HTP)ケミカル&In Silicoスクリーニングを行い(小嶋グループ:小嶋、小川、平野、鈴木(正)、吾郷)、3) 構造活性相関研究を経て得たリード・ヒット化合物の有用性・毒性を評価して(相崎グループ:相崎、土屋、種村、渡辺)、5年後に製薬企業とタイアップして臨床試験を実施することを目指します。理研が有する“京”コンピュータやSPRING-8(放射光)、SACLA(X線自由電子レーザー:XFEL)、次世代シークエンサー、HTPスクリーニングシステム、分子イメージング等を駆使し、これにかかる解析を期間、量ともに1/3に短縮した創薬研究を実施します。

初年度は、研究体制を確立し、確実な見通しを作ることを目標として、昨年7月より研究活動を続けて参りました。目標達成のために、臨床に即した新規スクリーニング系作りの基礎を固め、既存スクリーニング系をHTP化するとともに、スクリーニング研究体制を固め、スクリーニングをスタートすること、培養細胞系やヒト肝移植キメラマウスモデル、赤毛サル等大動物、新規毒性アレイ評価系、メタボローム評価系も使い、抗ウイルス効果の評価・安全性及び薬物動態について厳しい評価を行う体制作りに取り組み、成果を上げることができました。

このように研究班1年目の課題を順調に遂行でき、当初設定した目標をほぼ達成できたのは、研究分担者、研究協力者をはじめとした諸先生方の絶大なご支援の賜物と深く感謝申し上げます。また、本研究班の活動に始終ご助言とご理解を頂きました本事業評価委員会の先生方、並びに厚生労働省健康局疾病対策課肝炎対策推進室の技官、事務官の方々に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究班の事務局として、本事業の遂行に献身的に努力していただきました田島貴美枝、高山康代の両氏に心から感謝いたします。

平成 25 年 3 月 28 日

研究代表者 小嶋 聡一

目 次

I 研究班 班員名簿	1
II 総括研究報告	3
研究代表者 小嶋聡一(理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム)	
III 分担研究報告	
1. スクリーニングに関する研究	18
小嶋聡一(理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム)	
小川健司(理化学研究所 分子リガンド探索研究チーム)	
平野秀典(理化学研究所 計算分子設計研究グループ)	
鈴木正昭(理化学研究所 分子イメージング科学研究センター)	
吾郷日出男(理化学研究所 宮野構造生物物理研究室)	
2. 臨床標的に関する研究	42
松浦知和(東京慈恵会医科大学 臨床検査医学)	
協力研究者:鈴木哲朗(浜松医科大学医学部医学科)	
名越澄子(埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科)	
鈴木治和(理化学研究所 LSA要素技術開発グループ)	
金井好克(大阪大学大学院 医学系研究科生体システム薬理学)	
堂前 直(理化学研究所 バイオ解析チーム)	
3. 有効・安全性評価に関する研究	64
相崎英樹(国立感染症研究所 ウイルス第2部 第4室)	
土屋好司(東京理科大学 理学部第一部応用化学科)	
種村健太郎(東北大学大学院農学研究科・動物職制化分野)	
渡辺恭良(理化学研究所 分子イメージング科学研究センター)	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	83
V 研究成果の刊行物・別刷	86
VI 参考資料	281
確認書等、班会議資料、合同勉強会資料	

研究班 班員名簿

次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究

区分	氏名	所属機関	職名	
研究代表者	小嶋 聡一	理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム	チームリーダー	
研究分担者	小川 健司	理化学研究所 分子リガンド探索研究チーム	専任研究員	
	平野 秀典	理化学研究所 計算分子設計研究グループ	研究員	
	鈴木 正昭	理化学研究所 分子イメージング科学研究センター	副センター長	
	吾郷 日出夫	理化学研究所 宮野構造生物物理研究室	専任研究員	
	松浦 知和	東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座中央検査部消化器肝臓内科	准教授	
	名越 澄子	埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科	教授	
	鈴木 治和	理化学研究所 オミックス基盤研究領域 LSA要素技術開発グループ	プロジェクトディレクター	
	金井 好克	大阪大学大学院 医学系研究科生体システム薬理学	教授	
	堂前 直	理化学研究所 バイオ解析チーム	チームヘッド	
	相崎 英樹	国立感染症研究所 ウイルス第2部 第4室	室長	
	土屋 好司	東京理科大学 理学部第一部応用化学科	助教	
	種村 健太郎	東北大学大学院農学研究科・動物生殖科学分野	准教授	
	渡辺 恭良	理化学研究所 分子イメージング科学研究センター	センター長	
	研究協力者	秦 咸陽	理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム	ジュニアリサーチアソシエート
中村 亜希子		理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム	テクニカルスタッフ I	
坂田 幸大郎		湧永製薬株式会社(分子リガンド生物研究チーム)	連携促進研究員	
後藤 俊男		理化学研究所 創薬・医療技術基盤プログラム	プログラムディレクター	
斎藤 臣雄		理化学研究所 支援促進チーム	チームヘッド	
横山 茂之		理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域	領域長	
須藤 正幸		中外製薬(株) 富士御殿場研究所 創薬企画推進部	課長	
鈴木 哲朗		浜松医科大学医学部医学科 感染症学講座ウイルス学・寄生虫学分野	教授	
坪田 昭人		東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 臨床医学研究所	教授	
池田 均		東大病院検査部 消化器内科	准教授	
滝川 康裕		岩手医科大学 消化器・肝臓内科	教授	
清水 雅仁		岐阜大学大学院医学系研究科腫瘍制御学講座 消化器病態学分野	助教	
寺井 崇二		山口大学大学院 医学系研究科 消化器病態内科学	准教授	
石井 孝司		国立感染症研究所 ウイルス第2部 第5室	室長	
水上 拓郎		国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第4室	室長	
明里 宏文		京都大学霊長類研究所・人類進化モデル研究センター 比較免疫微生物領域	教授	
浮田陽子		理化学研究所 宮野構造生物物理研究室	リサーチアシスタント	
堀哲哉		理化学研究所 宮野構造生物物理研究室	専任研究員	
事務局		田島貴美枝	〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1研究本館	アシスタント
		高山康代	独立行政法人理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム TEL 048-467-7938(直) FAX 048-462-4675	

総括研究報告

次世代生命基盤技術を用いた B型肝炎制圧のための創薬研究班
平成 24 年度総括研究報告書

研究報告者 小嶋 聡一 独立行政法人理化学研究所 チームリーダー

【研究要旨】

I. スクリーニンググループ（小嶋グループ）

- ① スクリーニング用ライブラリーに、天然化合物とその誘導体、糸状菌培養エキス計 2,000 種、カビ培養液抽出濃縮物 800 種を新たに購入、追加した。
- ② 相崎班で確立した HepaRG/Hep2. 2. 15 を用いる cell-based screening 系を導入し、蛍光核酸プローブを利用した抗ウイルス活性のハイスループット(HTP)スクリーニング系を確立した。
- ③ 分泌型の Gaussia ルシフェラーゼを用いたカプシド形成阻害化合物 HTP スクリーニング系を構築した。
- ④ パイロット実験として HBV に伴う肝線維化を動物実験で抑える TGF- β 活性化阻害薬リード化合物を取得した。同化合物の標的である潜在型 TGF- β Latency-associated protein(LAP)への結合モデリング予測に基づくインシリコスクリーニングを実施した。
- ⑤ Imidazonaphthyridine (INd)というインターフェロン様作用を示す経口 IFN α 2 型受容体アゴニストについて、類縁体合成、構造活性相関研究を開始した。IFN α 2 型受容体細胞外ドメイン (IFNAR2-EC) と IFN α の発現コンストラクトを構築し、結晶化に成功した。

II. 臨床標的グループ（松浦グループ）

- ① HBV 創薬へ向けてのオミックス解析による病態解明と標的同定のための 6 大学(7 施設)での臨床検体収集体制を構築し、2013 年 1 月よりサンプル（血液、肝臓等）の収集を開始した。
- ② HBV 遺伝子型 Ae の HBV 持続複製細胞株を樹立した。
- ③ Genotype Ae, C, Bj で特徴ある臨床病型症例での HBs 抗原、または HBV 発現系作製のためのプレ実験を開始した。
- ④ HBV 産生株細胞 Hep2. 2. 15 その親株の HepG2 細胞を、3 種の核酸アナログ体（ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル）を添加した培養液で培養し、HBV 感染・及びその薬剤治療における宿主側の関与因子について比較オミックス（トランスクリプトーム解析、モディフィコーム解析）を行った。核酸アナログ体処理により劇的な発現変動を示す遺伝子プローブは検出されなかった。一方、アセチル化ペプチド 1,200 種程度が N 末端のアセチル化ペプチドでリジン残基のアセチル化は 300 個程度であることを見出した。
- ⑤ 宿主の“肝線維化活性化因子”としての TGF- β の LAP 断片が、B型肝炎患者における病態解析のバイオマーカーとなり得るか検討を続行した。
- ⑥ 特徴ある B 型慢性肝疾患症例の血液および肝組織の収集のため、埼玉医科大学、慈恵会医科大学、山口大学、岩手医科大学、岐阜大学、および東京大学の 6 大学 7 施設の IRB へ申請し、承認を得た。
- ⑦ 小分子 RNA を含むトータル RNA を高純度に精製し、大規模トランスクリプトーム

解析に必要なRNA量を確保し、deepCAGE および小分子RNA解析を開始した。

- ⑧ FLC-4 ヒト肝細胞がん細胞株、HeLa ヒト子宮頸がん細胞株ならびにマウス肝から調製した細胞膜・細胞内膜画分を用いた膜タンパク質網羅的定量解析を可能とする比較定量プロテオミクス技術を確立した。
- ⑨ FLC-4 細胞単層培養時と三次元培養時における膜タンパク質の発現変動を網羅的に解析した。三次元培養することにより462タンパク質が増加することを見出した。
- ⑩ 質量分析装置を導入し、ヒト単球性白血球細胞株(THP-1)を用いて網羅的翻訳後修飾解析（モディファイコム解析）のためのショットガンプロテオミクス分析法を確立し、翻訳後修飾を網羅的に検出し、モディファイコム解析の可能性を示した。約20,000種のペプチドより約2,000種のタンパク質が同定でき、現在各種修飾の解析を行っている。

III. 有効・安全性評価グループ（相崎グループ）

- ① スクリーニンググループへの細胞および技術供与を行うと伴に、候補薬物の有効性・安全性の評価体制を構築した。
- ② HBV 候補薬の有効性・毒性を評価するための感染に伴う細胞のメタボロミクス解析を目指し、HepaRG、Hep2.2.15、TetOFF HBV 培養細胞系等を評価比較。キメラマウスから調製した新鮮肝細胞を各種感染実験に用いることに決定した。
- ③ HBV 薬およびリガンド分子標識のモデル物質として、葉酸標識したマイクロバブル調製に成功した。
- ④ 小動物の一般毒性検査のために薬剤投与後一般状態を24時間モニターする設備を整えた。
- ⑤ 薬物動態に関する薬物トランスポーターの追跡プローブを開発。薬効評価のための核酸・抗体分子プローブの標識法と病態モデル動物のPET撮像用のシステムを整備した。

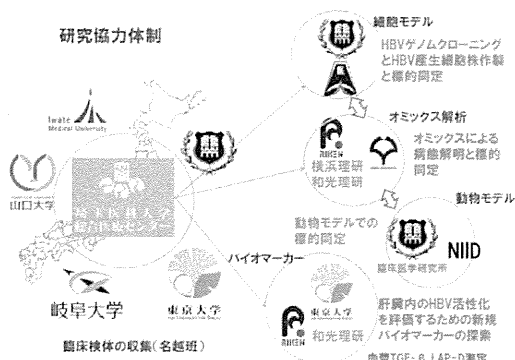
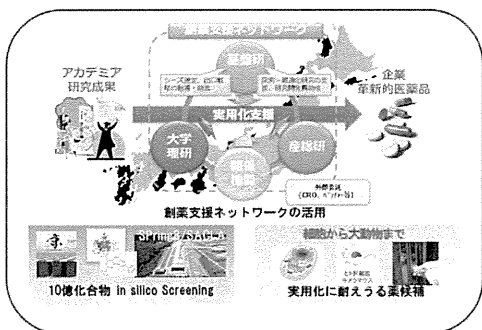
本研究班の目標

B型肝炎の創薬・実用化を目標とし、理化学研究所の小嶋、東京慈恵会医科大学の松浦、国立感染症研究所の相崎を中心として、理化学研究所が有する「京」コンピュータを用いた10億化合物in silicoスクリーニング、SPring-8(放射光施設)、SACLA(X線自由電子レーザー施設)を用いた構造解析、次世代シーケンサー、HTPスクリーニング、PETイメージング等の次世代生命基盤技術を駆使して、次世代HBV薬候補化合物を3つ以上同定し、創薬支援ネットワークを活用しながら、臨床試験・実用化を目指すことを最終目標とする。



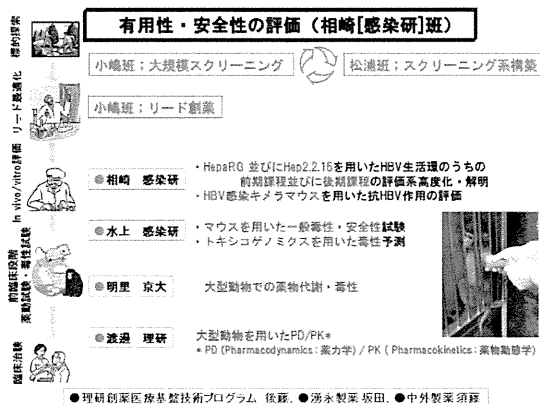
松浦グループでは、最先端の生命基盤技術を用いた独自の解析方法を駆使して1) 劇症肝炎、若年発癌などの特徴ある臨床病態を示したHBV感染症例からオミックス解析を駆使して新規標的候補を同定し、我が国固有の遺伝子型HBVを持続産生する細胞株を樹立して小嶋グループに渡す。

次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究
 (独)理化学研究所分子リガンド生物研究チーム 小嶋聡一



A. 研究目的

小嶋グループでは、相崎グループから導入するHepaRG/Hep2.2.15細胞を用いるcell-based screening系をHTP化し、これを用いて、理研天然物化合物バンク(NPDepo)、市販並びに東大ライブラリー計18万化合物をスクリーニングするとともに、松浦グループで確立する我が国に多い遺伝子型発現株でも順次スクリーニングを行い、ヒット化合物、標的分子の情報を基に京コンピュータでインシリコスクリーニングを行い、誘導体を精密有機合成し、立体構造解析して、リード化合物を得ることを目標としている。



5年間の研究の流れは以下の図に示すとおりである。

次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究

申請代表者： 理化学研究所 小嶋 聡一

理研が有する次世代生命基盤技術を駆使して、genotype Dの既存Hep2.2.15細胞株を用いるcell-basedスクリーニング(CBS)と、新たに同定するgenotype Bj, Ce, Aeに対する新規6-12治療標的に対するハイスループットスクリーニング(HTS)を行い、ヒット/リード化合物の有効性・毒性を調べ、次世代HBV薬候補を3種以上提示。

松浦 G (専任医大)
 独創的新規標的の同定

小嶋 G (理研)
 大規模スクリーニング

相崎 G (感染研)
 有効性・安全性評価



理研創薬医療技術基盤プロジェクト後藤 初年度は、研究体制を確立し、最終目標到達
 ディレクターと企業研究者(湧永製薬、中外 までの確実な見通しを作ることを目標とし
 製薬)2名の研究協力者のアドバイスの下、 た。
 実用化に耐えうる薬剤開発を目指す。

B. 研究方法

理化学研究所では、他に類をみない天然化合物バンク NPDepo を整備、NPDepo 3 万化合物やファルマイト社 5 万化合物を用いた創薬医療技術基盤プロジェクトを展開中。

小嶋グループでは、ハイファジェネシス社 19,000 株微生物ライブラリーも加え、ライブラリーのさらなる充実をはかるとともに東大ライブラリー 14 万化合物を活用する。感染研究所より抗ウイルス活性 cell-based screening 系を導入し、理研の技術をもって HTP 化する。既にみついているリード・ヒット化合物を展開すると共に“京”コンピュータを用いた *in silico* スクリーニング、SPring-8 (放射光; AIP Conf Proceed 2010)/SACLA (X 線自由電子レーザー: XFEL <http://xfel.riken.jp/pdf/XFEL_BL-TDRver1.05.pdf>), 次世代シーケンサー、HTP スクリーニングシステム、分子イメージングを駆使し、スクリーニング研究にかかる期間、量を 1/3 に短縮した創薬研究を実施する。

平成 24 年度は、各種倫理審査の承認を得た後に、HepaRG/Hep2.2.15 細胞を用いる cell-based screening 系を相崎グループから導入し、技術員を派遣し技術導入した。

元理研 (現東大先端科学技術研究センター) の岡本教授が開発した生細胞で使用可能な蛍光核酸プローブ (ECHO プローブ) を導入し、HBV RNA スクリーニング系構築を試みた。

理研横浜研究所の臼井ユニットリーダーが開発した短時間で溶液中の DNA を検出可能な蛍光核酸プローブ Omega Amp の導入に着手した。

B 型肝炎に伴う肝線維化の原因となる TGF- β 活性化反応を抑制する薬剤候補のインシリコスクリーニング、類縁体合成、構造活性相関研究を開始し、HBV キメラマウスを用いた薬効薬理試験において抗線維化活性を確認した。TGF- β 活性化反応を抑制する薬剤候補のインシリコスクリーニングは分担研究者の平野に依頼して実施した。

誘導体は、芳香族カルボン酸とアルコール (水酸化クマリン) との脱水縮合により合成し、TGF- β 活性化反応をミミックする TGF- β LAP 切断産物の生成阻害でその生物活性を評価した。本も有望な化合物について、培養ラット星細胞系における抗線維化活性と B 型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた抗ウイルス活性、ならびに抗線維化抑制活性を評価した。

分子ドッキングを行う際には、ターゲットタンパク質の立体構造と化合物の構造式 (化合物ライブラリー) が必要である。TGF- β 1 タンパク質の立体構造は X 線結晶解析から得られた構造 (PDB entry: 3RJR) を用いた。また、理化学研究所でデータベース化を行っている天然物ライブラリーである NPDepo を用いた。分子ドッキングには遺伝的アルゴリズムに基づいた、低分子がタンパク質の結合部位にどのようにドッキングするかを計算するプログラム GOLD を用いた。

Core タンパク質は大腸菌で強制発現させた組換えタンパク質であっても、*in vitro* でカプシド様の構造を形成する特徴を利用し、Bimolecular luminescence complementation の技術を応用して、Core タンパク質の二量体形成を *in vitro* で可視化する HTP スクリーニング系の構築を試みた。

INd と IFNAR2-ECD の複合体結晶構造解析等の物理化学的手法を使い化合物による IFNAR2-ECD の活性化機構の解明を目指した。この目標を達成する為に (1) IFN α と IFNAR2-ECD の大量発現精製系の構築、(2) 溶液中での IFNAR2-ECD と INd 複合体の安定性の確認、(3) 結晶化と構造解析を行う。今年度は IFN α と IFNAR2-ECD の大量発現精製系の構築を行った。

INd は、1,5-ジアミノピリジンと 1,3-ジケトン(1,1,1,5,5,5-ヘキサフルオロペンタン-2,4-ジオン)をリン酸存在下で反応させ、得られた 2-アミノ-5,7-ジフルオロメチル-1,8-ナフチリジンをアセトニトリル中、ブロモピルビン酸エチルと反応させイミダゾナフチリジンエステルへ変換し、エステル部分を水酸化ナトリウムで加水分解し、カルボン酸体へと変換後、カルボキシル基を(イソシアノイミノ)トリフェニルホスホランを用いて 1,3,4-オキサジアゾール環へと変換することで合成した。

松浦グループでは、HBV 創薬へ向けてオミックス解析による病態解明と標的同定のための 6 大学(7 施設)での臨床検体収集体制構築、2013 年 1 月よりサンプル(血液、肝臓等)収集開始と測定系を立ち上げ、遺伝子型 Ae, C, Bj で特徴ある臨床病型症例での HBs 抗原、または HBV 発現系の作製のためのプレ実験を開始し、HBV 遺伝子型 Ae の HBV 持続複製細胞株を樹立した。HBV 産生株細胞 Hep2.2.15 その親株の HepG2 細胞を、3 種の核酸アナログ体(ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル)を添加した培養

液で培養し、HBV 感染・及びその薬剤治療における宿主側の関与因子について比較オミックス(トランスクリプトーム解析、モディフィコーム解析)を行った。具体的には、ヒト肝癌細胞である HepG2 細胞、その HBV 産生株である Hep2.2.15 細胞(各 2 x 10⁷ 細胞からスタート)を、5%FBS 添加 ASF10 培地を用いて培養し、無処置サンプルおよび核酸アナログ体であるラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置してウイルスの産生を抑えたサンプルを独立に各 3 サンプル調製した。処置後、細胞は培地を除き、PBS で十分に洗った後に、Qiazol 溶液を加えて均一に溶解して回収した。次に、小分子 RNA も含めて全 RNA が抽出可能な miRNAeasy キットを用いてトータル RNA を高純度に精製し、ナノドロップおよびバイオアナライザーで収量と RNA の品質をチェックした。RNA は、我々が持つ独創的な解析技術である deepCAGE 法を用いて行った。deepCAGE 法は、キャップがついている mRNA を次世代シーケンサーにより、プロモーターレベルで大規模解析する技術である。また、miRNA 等の小分子 RNA を解析するために、小分子 RNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーでの解析に供した。さらに、Illumina beads array (マイクロアレイ)を用いた遺伝子レベルでの発現解析も並行して行なった。モディフィコームは、SDS-PAGE 後インゲル消化し、ショットガン分析した。

宿主の“線維化活性化因子”としての TGF- β LAP 断片が B 型肝炎患者における病態解析のバイオマーカーとなり得るかの検討を続行した。

相崎グループでは、HBV 候補薬の有効性・毒性を評価するための感染に伴う細胞のメタボロミクス解析を目指し、HepaRG、Hep2.2.15、TetOFF HBV 培養細胞系等を評価、比較検討した。HBV 薬およびリガンド分子標識のモデル物質として、葉酸標識したマイクロバブルは、葉酸標識 PEG 化リン脂質をリン酸緩衝溶液(PBS)中で混合後、内包ガス(六フッ化硫黄, SF6)を送りながら超音波照射 (1 分間) することにより調製した。小動物の一般毒性検査のために薬剤投与後一般状態を 24 時間モニターするケージ内行動測定装置を整え、エンテカビル単回投与マウスの行動を観察した。薬効評価のための核酸・抗体分子プローブの標識法と病態モデル動物の PET 撮像用のシステムを整備するためにアイソレーションボックスを作成した。

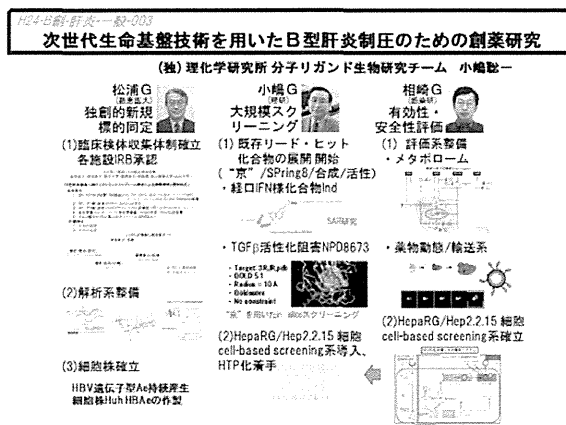
(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験、動物実験、ヒト材料実験は、すでにほぼすべての施設で IRB の許可を得ており、担当する各研究機関、研究施設のそれぞれの委員会に申請し、承認を得たのち、規定に従い、適切に実験を実施した。

臨床サンプル (血液検体および肝臓) の採取にあたっては、各研究施設の倫理委員会の承認を得たうえで、録患者に対して不利益、危険性およびその対処について十分に説明し、インフォームドコンセントを書面で得て行った。

C. 研究結果

初年度は、研究体制を確立し、各グループの準備を進め、図に示す成果を得て、最終目標到達までの確実な見通しを作った。



小嶋グループでは、

ライブラリーの充実: 市販の化合物ライブラリーの中から、理研に既存の化合物ライブラリーにはない構造の化合物を 2,000 種選択して購入した。また、糸状菌のプロスライブラリーを 800 種購入した。これらを溶液化し、スクリーニング用プレートとして調製した。

ウイルススクリーニング系の導入と HTP 化: 相崎グループから Hepa RG/Hep2.2.15 細胞を用いる cell-based screening 系を導入し、理研の技術 (ECHO プローブ/Omega Amp) を駆使して HTP 化して、大規模スクリーニングを開始した。さらに、Bimolecular luminescence complementation の技術を応用し、分泌 Gaussia ルシフェラーゼを用いた HTP カプシド形成阻害化合物スクリーニング系 (Core タンパク質の二量体形成を in vitro で可視化する HTP スクリーニング系) を構築した。

TGF-β 活性化反応抑制剤の展開と評価: 4-または 6-,7-ヒドロキシクマリンと、安息香酸やピコリン酸、フラン酸カルボン酸等の誘導体を原

料として 40 種の TGF- β 活性化反応抑制薬
剤候補のエステル化合物を合成し、TGF- β
LAP 切断生成反応の阻害活性の評価を行
い、最も有望な化合物は、大量(500mg 規模)
合成し、動物実験に供した。NMR を用いた
検討からエステル化合物が加水分解を受け
て分解している結果が得られた。

NPDepo を用いた分子ドッキングを行い、
候補化合物の選定を行った。分子ドッキング
の結果から候補化合物を選定する際には、ス
コア上位の化合物、候補化合物および類縁化
合物と似た結合様式をもつ化合物を優先し
た。それらの化合物に対して生化学実験を行
ったが、候補化合物よりも強い結合親和性を
持つものを見付けることはできなかった。

培養ラット肝星細胞の活性化を抑えた有
望化合物は、B型肝炎ウイルス感染ヒト肝
細胞移植キメラマウスにおいて、抗ウイル
ス活性は示さなかったものの、抗線維化抑
制活性を示すことを確認した。

Ind 誘導体の合成と立体構造解析：1,5-ジ
アミノピリジンと 1,3-ジケトン(1,1,1,5,5,5-
ヘキサフルオロペンタン-2,4-ジオン)をリン
酸存在下で反応させ、得られた 2-アミノ-5,7-
ジフルオロメチル-1,8-ナフチリジンをア
セトニトリル中、ブロモピルビン酸エチルと
反応させイミダゾナフチリジンエステルへ
変換し、エステル部分を水酸化ナトリウムで
加水分解し、カルボン酸体へと変換後、カル
ボキシル基を(イソシアノイミノ)トリフェニ
ルホスホランを用いて 1,3,4-オキサジアゾ
ール環へと変換する事で Ind を得る事に成功
し、1,5-ジアミノピリジンに対して反応させ
る 1,3-ジケトンの置換基(R1 および R2)を変

換する事で様々な誘導体の構築が可能とな
った。IFN α 2 型受容体細胞外ドメイン
(IFNAR2-EC) と IFN α の発現コンストラク
トを構築し、結晶化に成功した。

松浦グループでは、

HBs 蛋白・HBV 産生細胞株の樹立：高機
能肝癌細胞 FLCs は、FLC-4,5,7 で遺伝子発
現は異なり、さらに 3 次元培養では膜トラン
スポーターが蛋白レベルで発現が増加した。
HBV 発現細胞作製の前段階として、FLC に
genotype Ae と C の HBs 遺伝子または
HBV genome をトランスフェクションし、3
つの S 蛋白の発現を検討した。(詳細は鈴木
哲朗研究協力者報告参照)。

HBV 産生細胞を用いた新規ターゲットの
検索：HBV 産生株細胞 Hep2. 2. 15 その親株
の HepG2 細胞を、3 種の核酸アナログ体 (ラ
ミブジン、アデフォビル、テノフォビル) を
添加した培養液で培養し、HBV 感染・及びそ
の薬剤治療における宿主側の関与因子につ
いて比較オミックス (トランスクリプトーム
解析、モディフィコーム解析) を行った。核
酸アナログ体処理により劇的な発現変動を
示す遺伝子プローブは検出されなかった。一
方、アセチル化ペプチド 1,200 種程度が N
末端のアセチル化ペプチドでリジン残基の
アセチル化は 300 個程度であることを見出
した。

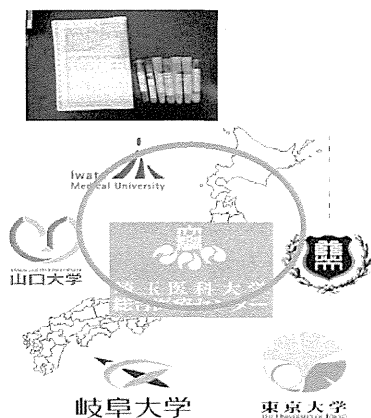
FLC-4 ヒト肝細胞がん細胞株、HeLa ヒト子
宮頸がん細胞株ならびにマウス肝から調製
した細胞膜・細胞内膜画分を用いた膜タンパ
ク質網羅的定量解析を可能とする比較定量
プロテオミクス技術を確立した。FLC-4 細胞

単層培養時と三次元培養時における膜タンパク質の発現変動を網羅的に解析した。三次元培養することにより 462 タンパク質が増加することを見出した。

質量分析装置を導入し、ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1) を用いて網羅的翻訳後修飾解析 (モディフィコーム解析) のためのショットガンプロテオミクス分析法を確立し、翻訳後修飾を網羅的に検出し、モディフィコーム解析の可能性を示した。約 20,000 種のペプチドより約 2,000 種のタンパク質が同定でき、現在各種修飾の解析を行っている。

抗 HBV 薬の治療効果判定のための新規バイオマーカーの探索: 先行研究の肝障害患者の肝臓線維化活性を反映する血漿 TGF- β LAP 断片濃度測定データから、B 型肝炎症例を抽出し、核酸アナログ製剤加療例での経過を検討した結果、エンテカビル投与症例で、血中 HBV-DNA が低値・ALT 低値を推移しているにもかかわらず、LAP-D が増加し、肝臓線維化活性の持続高値を示す症例を認めた。

血液検体または肝臓の採取: 症例の選択基準を検討した。6 大学 7 施設で採取した血液検体の処理・輸送体制を各施設の状況に応じて検討した。埼玉医科大学総合医療センターにおける血液検体または肝臓の保存、およびデータ管理体制を個人情報情報の保護に配慮し検討した。今後、選択基準に従い患者を登録し、血液検体の採取を開始する。



参加施設は、埼玉医科大学総合医療センター (名越)、東京慈恵会医科大学 (本院: 松浦、柏病院: 坪田)、岩手医科大学 (滝川)、山口大学 (寺井)、岐阜大学 (清水)、東京大学 (池田) の 6 大学 7 施設。

相崎グループでは、

スクリーニンググループへの細胞および技術供与: HBV 初期感染過程のスクリーニング用に用いる HepaRG の技術指導を行った。

後期感染過程にスクリーニングに用いる Hep2. 2. 15 細胞由来の HepAD38 細胞を提供すると共に、スクリーニンググループのスクリーニング担当者 1 名が感染研を訪れ、技術指導を行った。さらに、もう 1 名 1 年半の予定で技術指導中である。HBV 生活環の各ポイントでの解析技術を確立中であり、スクリーニングについては、HBV 初期感染過程の解析は HBs ELISA、HBV 後期感染過程の解析は taqman PCR 法での解析をベースに大規模アッセイ系に載せるための改良を行っている。

HBV 感染に伴う宿主の代謝変化の解析: HepAD38 細胞株からテトラサイクリンを除くことで HBV pgRNA を産生させ、培養上清中の HBV DNA 量を realtime PCR 法で測定した。テトラサイクリン除去後、HBV は急速に増加し、約 20 日で 10^8 copies/ml に達した。一方、テトラサイクリン添加培地で培養した細胞からも 10^6 copies/ml の HBV が検出されたことから、TetON/OFF 細胞系で HBV の産生を完全に制御することは難しく、比較メタボローム解析には適切でないことが判明した。

小動物におけるトキシコゲノミクスを用いた毒性評価系の確立

マウスを用いた一般毒性試験を実施している段階である。肝臓等の病理所見を確認した後、DNA マイクロアレイ解析を行い、基盤研で公開されている TG-GATE と比較し、毒性予測を試みる。

実験用霊長類を用いた安全性評価系の確立：実験用霊長類への HBV 感染実験を行うべく、実施機関への動物実験、バイオハザード申請や実施担当者へのワクチン接種等の準備を進めている。実験実施に供するサル個体入手に向け、現在馴化と獣医学的な事前健康確認を実施中である。

異なる遺伝子型 HBV 産生株の樹立：HuH-7 細胞による HBV 遺伝子型 A, B, C, D の一過性ゲノム複製系で HBs 抗原 (LS, MS, SS) の発現を培養上清の ELISA、ウェスタンブロットで解析した。HBs 抗原レベルは遺伝子型 A が最も高かった。また、LS/MS/SS 比が HBV クローン間で異なることが示された。例えば、遺伝子型 A 株は遺伝子型 C 株に比べ MS 及 SS の発現は高いものの、LS の発現は遺伝子型 C 株より低レベルであった。FLC-7 細胞においても HuH-7 細胞と同等の発現レベルが得られ、遺伝子型間の特徴も同様であった。ORL8c、FLC-4、FLC-5 はこれらの 2 種類に比べ低発現であった。

LS/MS/SS 比を、PreS1/PreS2/S 遺伝子のみ の発現系で比較したところ、ゲノム複製系と同様の傾向が認められた。

HBV 遺伝子型 A ゲノムを HuH-7 細胞へ導入し、薬剤選択と HBs 抗原発現スクリーニングによって HBV 持続複製細胞株を樹立した。樹立株中の HBs 抗原レベルは ~ 30 ng/mL であった。

葉酸標識ナノバブルの調製：葉酸標識 PEG 化リン脂質(DSPE-PEG (5000)-FA)を合成した。まず、無水 DMF/無水 DMSO(3:1) 中で葉酸(FA)を 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC) と反応させることにより FA-EDC を得た。この FA-EDC とアミン末端 PEG 化リン脂質 (DSPE-PEG(5000)-NH₂)を水中で 2 日間、

窒素還流下でアミドカップリングさせることにより、目的の DSPE-PEG(5000)-FA を得た。

新規界面活性剤であるシクロアミロース修飾界面活性剤(CA-LA)、アニオン性リン脂質(DPPS)および本研究で合成した DSPE-PEG(5000)-FA をリン酸緩衝溶液(PBS)中で混合後、内包ガス(六フッ化硫黄, SF₆)を送りながら超音波照射 (1 分間) することにより葉酸標識微小気泡の調製を行った。

マウスを用いた毒性評価系の構築：一般毒性試験実施にむけた環境整備として、現行の第一選択薬のひとつとされるエンテカビルを用いて、単回強制投与による影響評価を行った。実験動物として雄 C57BL/6 マウスに対して、ゾンデを用いて、エンテカビル、100mg/kg (溶媒は 0.5%メチルセルロース溶液)を単回胃内強制投与し、投与後の一般状態を監察した後、本来のマウスの活動時間である夜間の一般行動への影響について検討する為、7 昼夜の間、飼育ケージ内マウス活動量測定装置を用いて測定した。一般行動解析後のマウスの脳、肝、腎、肺、脾、胃、精巣について、肉眼所見を得た後、10%中性ホルマリンにて固定後、常法に従いパラフィン切片を作成し、解析に供した。尚、脳、肝、腎については、網羅的遺伝子発現解析を検討する目的で、適切に保存した。尚、投与対照群には溶媒である 0.5%メチルセルロース溶液を投与した。小動物の一般毒性検査のために薬剤投与後一般状態を 24 時間モニターする設備を整えた。

薬物動態に関する薬物トランスポーターの追跡プローブを開発：今回アイソレーションボックスを作成するに当たり、理化学研究所分子イメージング科学研究センターの所有する動物用 PET 装置（microPET focus 220、SIEMENS 社製）のガントリサイズ、撮像用ベッドに適合したサイズ・形状でかつ、内部からウィルスを漏出させずに撮像を可能にする様留意し、透明なアクリル製のケースと ULPA (Ultra Low Penetration Air) フィルタを採用した。ULPA フィルタは直径 0.15 μ m の粒子を 99.9995%以上の捕集効率で除去する性能を有し、粒子サイズがこれ以上でも以下でも捕集効率は向上することから、ウィルス粒子またはウィルス含有飛沫等の漏出防止に十分な性能を有すると判断した。さらに、モデルマウスを飼育室にてボックス内に保定し、隔離後に撮像室へ運搬、PET 撮像を行う一連の間にマウスの体温と麻酔状態を維持するため麻酔ガスラインと体温調節用ホットパッド、検温プローブの接続を可能にする機構を考案した。

D. 考察

小嶋グループの検討から、抗 HBV 化合物スクリーニングの HTP 化に成功し、18 万化合物を 4 か月でスクリーニングできる目途が立った。平成 25 年度中に少なくとも小嶋、小川で 6 クールのスクリーニングを実施できることがわかった。一方、パイロットスタディとして B 型肝炎に伴う TGF- β 活性化反応を抑制するヒット化合物のインシリコスクリーニング、類縁体合成、構造活性相関研究、培養細胞実験、HBV キメラマウス実験を実施し、有望な化合物が HBV に伴う線

維化抑制活性を有していることを動物実験で確認するとともに、京コンピュータを用いたインシリコスクリーニング開始から動物実験までは最短 6 化月で実行可能なことがわかった。HBV に付随する肝線維化抑制候補薬については、今後残された溶解性と安定性の問題解決に取り組む。すでに、エステル結合をアミド、エーテル、ケトンに置き換えた化合物の合成に着手しており、エステル化合物および改変化合物について、DMSO および水溶液中での構造安定性を NMR 解析により検討する。

松浦グループの検討では、抗 HBV 薬を開発するための新規化合物スクリーニング系の開発をめざし、特徴ある臨床例からの HBV DNA の精製→ゲノム解析→宿主細胞（FLC 細胞）への導入・発現の検討→新規 HBs 蛋白質・HBV 発現細胞の樹立、という系を構築した。また、新規標的の同定をめざし、新規化合物が抽出される前に、従来の核酸アナログ体を用いて、宿主細胞への影響をトランスクリプトーム解析、モディフィコーム解析、膜プロテオーム解析で網羅的に解析する系を、オミックス研究グループと立ち上げた。また、新規治療薬候補化合物の *in vivo*, *in vitro* での効果、特に肝障害や肝線維化を評価するバイオマーカーとして、TGF- β LAP 断片が有用か検討を継続する。

相崎グループの検討では、スクリーニンググループへの細胞および技術供与を行った。HBV 生活環の各ポイントでの解析技術は確立中であるが、HBV 初期感染過程および後期感染過程の解析には HBs ELISA および taqman PCR 法での解析が有用であることが示され、細胞および情報をスクリーニンググループと共有し、研究の進展を図ることが可能になった。

比較メタボローム解析には、当初 TetON/OFF 細胞系を用いるつもりであったが、HBV 産生を完全に制御できないという問題点が判明した。来年度は、比較メタボローム解析にはキメラマウス由来ヒト肝細胞用いることができないか解析予定である。

今年度確立したマウスを用いた毒性評価系を用いて、来年度は小嶋グループから供与される薬剤候補の毒性を評価する。また、核酸アナログを PET 標識化し、微量残存 HBV の検出技術を構築し、小嶋グループから供与される薬剤候補についても PET を用いた体内動態を調べる予定である。

E. 結論

小嶋グループの調査・検討から、蛍光核酸プローブを利用した抗ウイルス活性の HTP スクリーニング系を確立した。

パイロット実験として HBV に伴う肝線維化を動物実験で抑える化合物を取得した。

HTP スクリーニングに4か月、インシリコスクリーニングから動物実験まで10か月で終了できることがわかった。

松浦グループの調査・検討では、新規スクリーニング系としての genotype Ae と C の HBV 産生細胞の樹立をめざして、各 HBV 由来 HBs 遺伝子と全長遺伝子の発現実験を行い、genotype A と C の間で3種の S 抗原の発現に違いを認めた。また、新規治療標的の解明をめざし、既存 HBV 産生細胞で核酸アナログ体処理時のオミック解析を開始した。

最後に相崎グループの調査・検討では、HBV を完全に排除可能な薬剤の開発を目指す本研究班の中で、スクリーニンググループへの

細胞および技術供与を行うと共に、候補薬物の有効性・安全性の評価手段として、一般安全性試験以外にトキシゲノミクス、メタボロミクス解析の準備を行い、小動物、大動物を用いた評価系を構築している。

次年度は、より緊密に研究分担者、主任研究者、そして他の研究班との連携と情報交換に務め、「新規標的の同定」を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 山本由佳、原詳子、小嶋聡一 TGF- β 活性化反応と治療・診断への応用、医学のあゆみ「肝線維化研究 Update—基礎から臨床へ」特集号 244(6):533-537 (2013)

(2) 平野秀典、沖本憲明、泰地真弘人(2012) 「スーパーコンピュータ「京」の医薬分野への応用」ファルマシア誌 12 号

(3) 松浦知和、池脇克則、前橋はるか、大川清、松本喜弘、田中賢、永妻啓介、高木一郎. 肝臓星細胞に発現するビタミン A 貯蔵酵素 lecithin:retinol acyltransferase による血中レチノール濃度の調節—還流培養系での代謝シミュレーション—. Vitamins (Japan) 2012;86:432-40.

(4) Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape. J Cell Physiol 2012;227:2898-906.

(5)Liu HM, Aizaki H, Machida K, Ou JH, Lai MM. Hepatitis C virus translation preferentially depends on active RNA replication. PLoS One. 2012;7:e43600.

(6)Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. Virology. 2012;10:29-38

2. 学会発表

(1)Kojima S, Sakata K, Yamamoto Y, Hara M. “Targeting PLK-dependent TGF- β Activation Reaction” 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (The Liver Meeting 2012) Boston. Nov 2012.

(2)Nakao M, Nakayama N, Uchida Y, Nagoshi S and Mochida S. “Nationwide prospective survey to evaluate the significance of viral reactivation in patients with prior HBV infection receiving immune-suppressive or anticancer agents other than rituximab in Japan” 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (The Liver Meeting 2012) Boston. Nov 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

分担研究報告