

5. Khunweeraphong N, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Nishinaka Y, Wongthai P, Ohgaki R, Tanaka H, Tominaga H, Sakurai H, Kanai Y. Establishment of stable cell lines with high expression of heterodimers of human 4F2hc and human amino acid transporter LAT1 or LAT2 and delineation of their differential interaction with α -alkyl moieties. *J Pharmacol Sci.* 2012; 119: 368-380.
6. Hagiwara K, Nagamori S, Umemura YM, Ohgaki R, Tanaka H, Murata D, Nakagomi S, Nomura KH, Kage-Nakadai E, Mitani S, Nomura K, Kanai Y. NRFL-1, the *C. elegans* NHERF orthologue, interacts with amino acid transporter 6 (AAT-6) for age-dependent maintenance of AAT-6 on the membrane. *PLoS One.* 2012; 7: e43050.
7. Sharman JL, Benson HE, Pawson AJ, Lukito V, Mpamhanga CP, Bombail V, Davenport AP, Peters JA, Spedding M, Harmar AJ, NC-IUPHAR; Alexander SP, Bonner TI, Catterall WA, Christopoulos A, Davenport AP, Dollery CT, Enna S, Harmar AJ, Kaibuchi K, Kanai Y, Laudet V, Neubig RR, Ohlstein EH, Peters JA, Pin JP, Ruegg U, Spedding M, Wright MW, du Souich P. IUPHAR-DB: updated database content and new features. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: D1083-D1088.
8. Rosario FJ, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Mammalian target of rapamycin signalling modulates amino acid uptake by regulating transporter cell surface abundance in primary human trophoblast cells. *J Physiol.* 2013; 591: 609-625.
9. Segawa A, Nagamori S, Kanai Y, Masawa N, Oyama T. L-type amino acid transporter 1 expression is highly correlated with Gleason score in prostate cancer. *Mol Clin Onc* 2013; 1: 274-280.
10. Kanai Y, Clemenccon B, Simonin A, Leuenberger M, Lochner M, Weisstanner M, Hediger MA. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med.*, in press
11. Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.*, in press
12. Bodoy S, Fotiadis D, Stoeger C, Kanai Y, Palacin M. The small SLC43 family: facilitator system L amino acid transporters and the orphan EEG1. *Mol Aspects Med.*, in Press
13. Ohshima Y, Hanaoka H, Tominaga H, Kanai Y, Kaira K, Yamaguchi A, Nagamori S, Oriuchi N, Tsushima Y, Endo K, Ishioka NS. Biological evaluation of 3-[(18)F]fluoro- α -methyl-D-tyrosine (D-[(18)F]FAMT) as a novel amino acid tracer for positron emission tomography. *Ann Nucl Med.*, in press.
14. 金井好克. アミノ酸トランスポーターを標的とした癌デリバリー. *Drug Delivery System.* 2012; 27: 342-349.
15. 金井好克. アミノ酸トランスポーターとがん代謝. *実験医学.* 2012; 30: 2494-2500.
16. 金井好克. 悪性腫瘍の診断と治療の分子標的としてのトランスポーター. *細胞工学.* 2012; 31: 567-571
17. 金井好克. 膜輸送系の異常概論. 2012; 日本臨床別冊新領域別症候群シリーズ No.20 先天代謝異常症候群 (第2版) 下: 759-766.
18. 金井好克. トランスポートソーム: その生理的意義と疾患. 富野康日己、柏原直樹、成田一衛編. *Annual Review 腎臓* 2013. 東京. 中外医学社. 2013年. 17-24
2. 学会発表
1. 西山俊、永森收志、高藤和輝、金井好克. ショ糖と人工甘味料による小腸上皮トランスポーター発現の網羅的変動解析. 第7回トランスポーター研究会. 京都市. 2012年6月9日.
2. 西山俊、永森收志、高藤和輝、金井好克. 小腸上皮トランスポーター発現の網羅的変動解析. 第121回日本薬理学会近畿部会. 2012年6月29日.
3. Shushi Nagamori, Yasuhiro Umemura, Pattama Wiriyasermkul, Saya Nakagomi, Yumiko Nishinaka, Kazuaki Takafuji, Ryuichi Ohgaki, Yoshikatsu Kanai. Functional coupling between a Na^+ -dependent anion transporter SMCT2 and a urate-anion exchanger URAT1 through a scaffold protein PDZK1. *Gordon Research Conferences, Membrane Transport Proteins. Les Diablerets, Switzerland.* 2012年7月4日-5日.
4. 西山俊、永森收志、高藤和輝、金井好克. 定量プロテオミクスを用いた小腸トランスポーターの網羅的変動解析. 日本プロテオーム学会 2012年大会. 東京. 2012年7月26日.
5. Yoshikatsu Kanai. "Transportsome", the

- multi-molecular assemblies for transport-transport and transport-metabolism couplings. International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012. Kusatsu/Shiga, Japan. 2012 年 9 月 15 日.
6. Takashi Nishiyama, Shushi Nagamori, Kazuaki Takafuji, Yoshikatsu Kanai. Comprehensive variability analysis of nutrients absorption mechanism in small intestine by quantitative proteomics. 第 19 回国際質量分析会議. 京都市. 2012 年 9 月 19 日.
 7. 永森收志, Pattama Wiriyasermkul, 世良田聡, 仲哲治, 金井好克. アミノ酸トランスポーターLAT1 を介したロイシンの取り込みと mTOR 系活性化の網羅的解析. 日本アミノ酸学会第 6 回学術大会. 松戸市. 2012 年 9 月 28 日~29 日.
 8. Pattama Wiriyasermkul, 永森 收志, 世良田 聡, 仲 哲治, 金井 好克. Comprehensive phosphoproteomics analysis of cellular responses induced by LAT1-mediated leucine uptake. 第 122 回日本薬理学会近畿部会. 豊中市. 2012 年 11 月 16 日.
 9. 金井 好克. Metabolomics and proteomics in transporter research (トランスポーター研究におけるメタボロームとプロテオーム解析). 日本薬物動態学会第 27 回年会シンポジウム「トランスポーターの生理機能: 統合的理解に向けて」東京. 2012 年 11 月 20 日.
 10. 金井 好克. 網羅的比較定量プロテオミクスによるタンパク質の変動解析. 厚生労働科学研究費補助金感染症対策総合研究事業 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」(次世代 HBV 創薬研究班)第 2 回班会議. 大阪. 2012 年 11 月 22 日.
 11. 永森收志, 奥山 裕久, Pattama Wiriyasermkul, 中込 咲綾, 西中 由美子, 高藤 和輝, 大垣 隆一, 金井 好克. 質量分析計と再構成プロテオリポソームを用いた新規トランスポーター複合体の解析—腎尿細管に残された第二のシスチントランスポーターの分子同定. 第 85 回日本生化学会大会. 福岡市. 2012 年 12 月 15 日.
 12. 金井 好克. 悪性腫瘍のアミノ酸トランスポーター. 第 85 回日本生化学会大会シンポジウム「分子標的トランスポーター」. 福岡市. 2012 年 12 月 15 日.
 13. Pattama Wiriyasermkul, Shushi Nagamori, Satoshi Serada, Masaki Matsumoto, Keiichi I Nakayama, Tetsuji Naka, Yoshikatsu Kanai. Cellular responses to LAT1-mediated leucine uptake revealed by comprehensive phosphoproteomics. 2012 American Society of Cell Biology (ASCB) Annual Meeting. San Francisco, USA. 2012 年 12 月 17 日.
 14. Shushi Nagamori, Pattama Wiriyasermkul, Satoshi Serada, Masaki Matsumoto, Keiichi I Nakayama, Tetsuji Naka, Yoshikatsu Kanai. Cellular responses to LAT1-mediated leucine uptake are revealed by using an LAT1 inhibitor and comprehensive phosphoproteomics. 第 86 回日本薬理学会年会, 福岡市, 2013 年 3 月 23 日.
 15. 永森收志, 平田拓, 何新, Pattama Wiriyasermkul, 中込咲綾, 石川貴正, 曾我朋義, 金井好克. 比較定量オミクスを用いた新規ケトン体トランスポーターの生体における機能の解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会. 2013 年 3 月 26 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特許出願中: 多数回膜貫通膜タンパク質の比較変動解析を可能とする網羅的プロテオミクス技術, 出願番号: 特願 2012-37919、出願日: 平成 24 年 2 月 23 日、出願人: 大阪大学、発明者: 金井好克・永森收志他
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

HBV 感染における網羅的翻訳後修飾解析基盤に関する研究

-抗 HBV 薬剤の開発や翻訳後修飾マーカーの探索のためのモディフィコーム解析-

研究報告者 堂前 直 独立行政法人理化学研究所バイオ解析チーム チームヘッド

【研究要旨】

本研究では、B型肝炎ウイルス（HBV）の感染や病態の進行によるエピジェネティック制御の変化を解明し、エピジェネティック医薬品の開発や翻訳後修飾マーカーの探索を行うためにショットガンプロテオミクスを用いた網羅的翻訳後修飾解析（モディフィコーム解析）系を開発することを目的とする。その他のオミックス研究（トランスクリプトーム、プロテオーム）解析班と協力して、新規薬剤スクリーニングのための標的分子の探索や、新規薬剤候補の作用メカニズムの解明に寄与する。本年度は、モディフィコーム解析のためのショットガン分析法を確立し、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明らかにした。

A. 研究目的

疾患とエピジェネティクスの研究が進み、DNAのメチル化に並んでヒストンのアセチル化やメチル化が疾患と関連することがわかってきた。特に脱アセチル化酵素の阻害剤ががん治療のためのエピジェネティック医薬品として認可されるように、ヒストンをはじめとするタンパク質の翻訳後修飾と疾病の関連に興味を持たれている。HBVに関しても、感染、肝炎の発症、がん化など病態の変化にエピジェネティックな変化が生じていることが予想されており、病態マーカーや治療薬へ向けたタンパク質の翻訳後修飾解析が有用であると考えられる。しかし、現在のタンパク質の翻訳後修飾解析は既存の修飾部位に対する抗体反応を確認することで解析されており、新たな発見に結び付きにくい。我々は、プロテオーム解析の高い技術を持ち、がん注目されているメチル化酵

素のメチル化部位の決定（1、2）を発見してきた。このような新規な修飾も含めて、エピジェネティックな変化を調べるために網羅的な翻訳後修飾解析（モディフィコーム）基盤を確立し、臨床検体を含めて分析することで、これをHBV研究に役立てることを目的にする。これは、松浦班の中でオミックス解析を行う鈴木班（トランスクリプトーム解析）や金井班（膜プロテオーム解析）と協力することで、強力に推し進められる。本年度は特にショットガン分析によるモディフィコーム解析の立ち上げと、モデル細胞でどこまでわかるかを調べることを目的とした。

B. 研究方法

我々は、ショットガンプロテオミクスを基盤とするモディフィコーム解析を目指した。そのため、標準ヒト細胞（急性単球性白血病由来細胞 THP）を還元カルボキシメチル化

後にトリプシン消化し、この消化混合物を用いてショットガン分析を行った。

ショットガン分析は、サーモサイエンティフィック社の Q-Exactive を本予算で整備し、既存のナノ LC と組み合わせて、データ依存的なタンデム質量分析 (MS²) を行った。標準的な分析は 2 時間程度の分析で約 4 万回程度の MS² を行い、その結果は直接同社ソフト PD (Proteome Discoverer) を用いて MASCOT 検索、アノテーションおよび定量した。

また、3 種の抗ウイルス剤 (ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル) 処理の Hep2.2.15 細胞 (HBV 産生細胞) とそのコントロールの HepG2 細胞を慈恵医大より譲り受けた。これらは、ウイルス粒子を破壊するために、SDS 処理がなされており、そのまま SDS-PAGE を行い、12 区間に切り取り後にトリプシンによるインゲル消化を行った。消化液は、それぞれ 20 分程度の短いグラジエントで各 3 回ショットガン分析し、同様にデータ処理を行った。また、高感度アミノ酸分析も行った。

(倫理面への配慮)

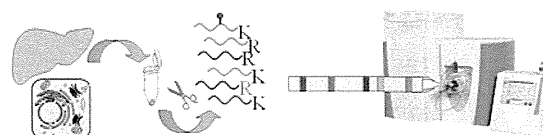
本年度は、臨床試料等の材料を取り扱わなかった。今後、臨床サンプルは核研究施設の倫理委員会の承認を得たうえで、対象患者のインフォームドコンセントを書面で得た埼玉医大名越班に集められた検体を倫理委員会の承認や MTA を交わして解析に用いることを予定している。

C. 研究結果

標準消化物を用いたショットガン分析では、一回 2 時間程度の分析で、4 万回程度

のデータ依存的 MS² を行った。これをソフトウェアで解析すると、一度の分析でタンパク質 1,500-2,000 種類のタンパク質グループに由来する 10,000-15,000 個のペプチドが同定できた。しかし、データ依存的 MS² は、有効な親イオンを自動で選択するため多くのペプチドが同定できる反面、分析ごとに違うペプチドを分析してしまうため、同定されるペプチドが分析ごとに異なるため比較が難しい。同じ分析を繰り返すとタンパク質グループとしては、90% ぐらい共通するが、同定されるペプチドで見ると 60% ぐらいしか重複しないため同一ペプチドに着目した定量は難しい。逆に、同じ分析でも回数を増やすと同定できるペプチド数は増え、全体で 34 回の分析をまとめると、タンパク質数は 3500 個でペプチド数は 23,000 個と一回の分析の約と約倍に増えた。さらに、これらのペプチドは偽遺伝子に対して検索した場合の (誤) 同定率 (FDR) が 1% 以下となるよう基準を決めているが、この基準をたとえば 5% 以下と下げることによって、ペプチド数は 50,000 個程度とさらに倍増した。(図 1) 後述するが、同定されやすさは、MS² のフラグメントの数に依存するためアミノ酸配列によって大きく異なる。配列によっては、同定されにくく基準を厳しくした場合検出できるペプチドが限定される。

図 1 モディフィコム解析



テスト細胞 (THP) でのショットガン分析 (34 回) を行い、修飾ペプチドの同定を行った。

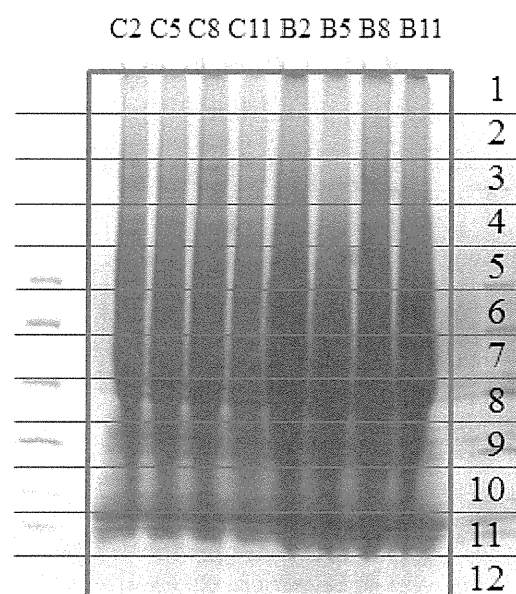
Confidence level	High (FDR1%)	medium (FDR5%)	Low (FDR10%)	
Protein Groups	3,467			今後、B型肝炎ウイルス感染モデルでの分析を行い、MSピーク高から定量を行うと共に、未年度からは臨床試料と合成ペプチドを利用して信頼性の低い修飾ペプチドの同定・定量を行い、感染特異的翻訳後修飾を探索する。
All peptides	23,177	49,633	78,314	
Acetyl peptides	281	630	1,087	
Methyl peptides	271	605	1,030	

*FDR(False discovery rate) 偽陽性率。信頼性の指標に利用される。

この中で、アセチル化ペプチドやメチル化ペプチドはそれぞれ同定されたペプチドの約 1%程度であり、230 個程度であった。さらに、同定の基準を下げると修飾ペプチドの候補は 500 個程度に増加した。今後、ペプチド合成を行い、合成的な同定を行うことで、より多くの修飾ペプチドを分析の対象ができる可能性がある。

また、慈恵医大より譲渡を受けた Hep2.2.15 細胞 (HBV 産生細胞) とそのコントロールの HepG2 細胞に核酸アナログ抗ウイルス剤 (ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル) を処理した試料を、SDS-PAGE をした。(図 2) 各レーンを 12 等分し、それぞれインゲル消化したのちにショットガンプロテオミクス解析を行った。8 種類 x 12 ストリップの合計 96 試料を各 3 回分析し、Hep2.2.15 細胞、HepG2 細胞ともに、2800 程度のタンパク質に由来する 20,000 種類のペプチドを同定できた。抗ウイルス処理済みの細胞も含めて約 4500 タンパク質グループに由来する 40,000 種のペプチドが同定できた。MS² のスペクトルを確認するとヒトモデル細胞の分析の際アセチル化タンパク質に N 末端アセチル化が混在していたため、N 末端のアセチル化を含めて検索すると、アセチル化ペプチドは 1,500 種以上存在したが、このうち 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 個程度であった。(すべて FDR 1%での値) これらの変動については、個別に面積値の集計が終わっていない。引き続き分析条件の探索とデータの解析を進める。また、高感度アミノ酸分析でリジン修飾を調べた。

図 2 HBV感染モデル細胞とその薬剤処理を行った細胞の SDS-PAGEゲルの写真



HBV産生細胞であるHep2.2.15(B)とその母細胞のHepG2(C)に3種類の核酸アナログ製剤、無添加(2)ラミブジン(5)、アデフォビル(8)、テノフォビル(11)を添加したもの。これをレーンごとに12等分してインゲル消化した。

D. 考察

本課題のために、多くの質量分析装置の中からモデル細胞消化物中から最も多くのペプチドを同定できるシステムとして Q-Exactive を選択し、導入した。これにより、一度に数万種類のペプチドが同定でき、この中にある翻訳後修飾を含むペプチドを数多く同定でき本格的な網羅的翻訳後修飾解析(モディフィコム解析)が可能であることが示された。しかし、その多大なデータ量に対してドライ環境の整備が遅れてしまっている。また、修飾の同定の精度や定量の精度は現在の MS² データ単独では、向上できない。来年度からは、ペプチド合成装置を導入し、少量多品種の修飾ペプチドを合成し、翻訳後修飾を合成的に同定すると共

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)
分担研究報告書

に、同位体を含むペプチドを利用した絶対定量を行うことが必要と考えている。

E. 結論

ショットガンプロテオミクスをベースとしたモディフィコーム解析の基盤を開発して、その他のオミクス基盤と共にエピジェネティック医薬品の開発や翻訳後修飾マーカの探索のための基盤を構築した。これを用いて、新規な治療標的を探索するために、慈恵医大松浦班より譲渡された HBV 産生細胞とそのコントロール細胞について解析を進めている。

F. 参考文献

(1) Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, Suzuki T, Dohmae N, Kogure M, Kang D, Neal DE, Ponder BA, Yamaue H, Nakamura Y, Hamamoto R.

RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia*. 14 (6),476-86 (2012)

(2) Cho HS, Suzuki T, Dohmae N, Hayami S, Unoki M, Yoshimatsu M, Toyokawa G, Takawa M, Chen T, Kurash JK, Field HI, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R.

Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. *Cancer Res*. 71(3),655-60 (2011)

G. 研究発表

1. 論文発表

Unoki M, Masuda A, Dohmae N, Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, Fukui Y, Ueda K, Hamamoto R, Shirakawa M, Sasaki H, Nakamura Y. Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6). *J Biol Chem*. 288,6053-6062 (2013)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 有効・安全性評価に関する研究

HBV 候補薬の有効性と毒性の評価に関する研究

研究分担者 相崎英樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究協力者

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 教授）

水上拓郎（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長）

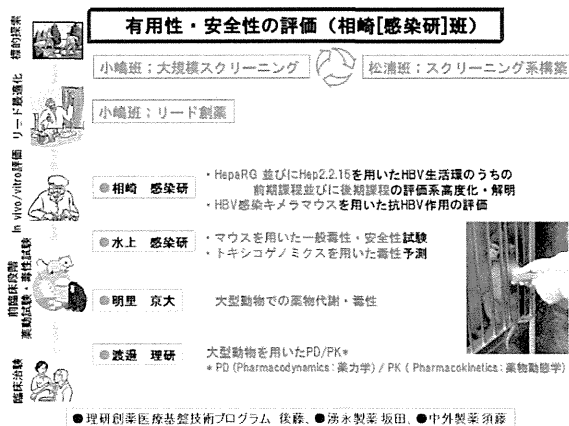
【研究要旨】

B型肝炎ウイルス(HBV)のキャリアは約130万人が存在すると推定されているものの、現行のB型肝炎治療薬はHBVを完全に排除することはできないため、一生服用し続ける必要があり、副作用、抵抗性ウイルス出現、免疫低下によるB型肝炎の再活性化などの問題がある。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、我々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うと共に、候補薬物の有効性・安全性の評価体制を構築した。

A. 研究目的

肝炎ウイルスによる慢性肝炎は国民病とも呼ばれている。新規感染者は激減したものの、HBVのキャリアは約130万人が存在すると推定されている。現行のB型肝炎治療薬はHBVを完全に排除することはできないため、一生服用し続ける必要があり、副作用、抵抗性ウイルス出現、免疫低下によるB型肝炎の再活性化などの問題がある。本研究班ではHBVを完全に排除可能な薬剤の開発を目指す。

具体的に本年度は、下記に示した研究グループの構成の中で仕事を分担し、相崎分担研究者はスクリーニンググループへの技術供与を行う。相崎分担研究者および水上協力研究員は候補薬物の毒性の評価に用いるためトキシゲノミックス、メタボロミックスの肝細胞、肝臓などのプロファイルを作成し、既に公開されている情報と比較し、毒性予測を試みる。水上、明里協力研究員は小動物、大動物を用いるための準備実験に入る。



(図1：研究協力体制)

スクリーニング班に細胞等を提供するとともに技術指導を行う。スクリーニングで見出された候補薬物について、感染研相崎は細胞系、小動物系で有効性の評価を行う。感染研水上は小動物、京大明里は大動物を用いて安全性の評価を行う。理研渡辺は PET プローブ化した候補薬物を用いた残存ウイルス検出と PD/PK を行う（渡辺分担研究者報告書参照）。

B. 研究方法

(1) スクリーニンググループへの細胞および技術供与（相崎分担研究者）

HBV 初期感染過程の解析のために HepaRG 細胞を提供する。DMSO, hydrocortisone 等を加え、1ヶ月培養した differentiated HepaRG 細胞に HBV を感染させ、12日間培養後、細胞上清中の HBs 量を ELISA 法で測定する。

HBV 後期感染過程の解析には Hep2.2.15 株由来の HepAD38 細胞株を提供する。テトラサイクリンを除くことで HBV pgRNA を産生する HepAD38 細胞株を用いて、6日後の培養上清中の HBV DNA 量を realtime PCR 法で測定する。

(2) 培養細胞における HBV 感染に伴う代謝変化の解析（相崎分担研究者）

今年度は、候補薬物が見出される前に、HBV 感染に伴う宿主の代謝変化の解析を目指す。前述の TetON/OFF 細胞系で HBV の産生をさせ、非産生細胞と比較メタボローム解析を行う。

(3) 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（水上協力研究員）

HBV 治療の第一治療薬として用いられている Entercavir 等を用いて、一般毒性試験を行うとともに、トキシコゲノミクスのアプローチを用い、肝臓などの組織のプロファイルを作成し、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。

(4) 実験用霊長類を用いた安全性評価系の確立（明里協力研究員）

抗 HBV 候補薬剤の安全性評価は細胞レベルやマウス等小動物レベルでは不十分と考えられるので、実験用霊長類を用いた抗 HBV 候補薬剤の安全性の評価系を準備する。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

(1) スクリーニンググループへの細胞および技術供与（相崎分担研究者）

HepAD38 細胞を提供すると共に、スクリーニング班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。下記の図に示したように、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、赤字で示した 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う。(図2)

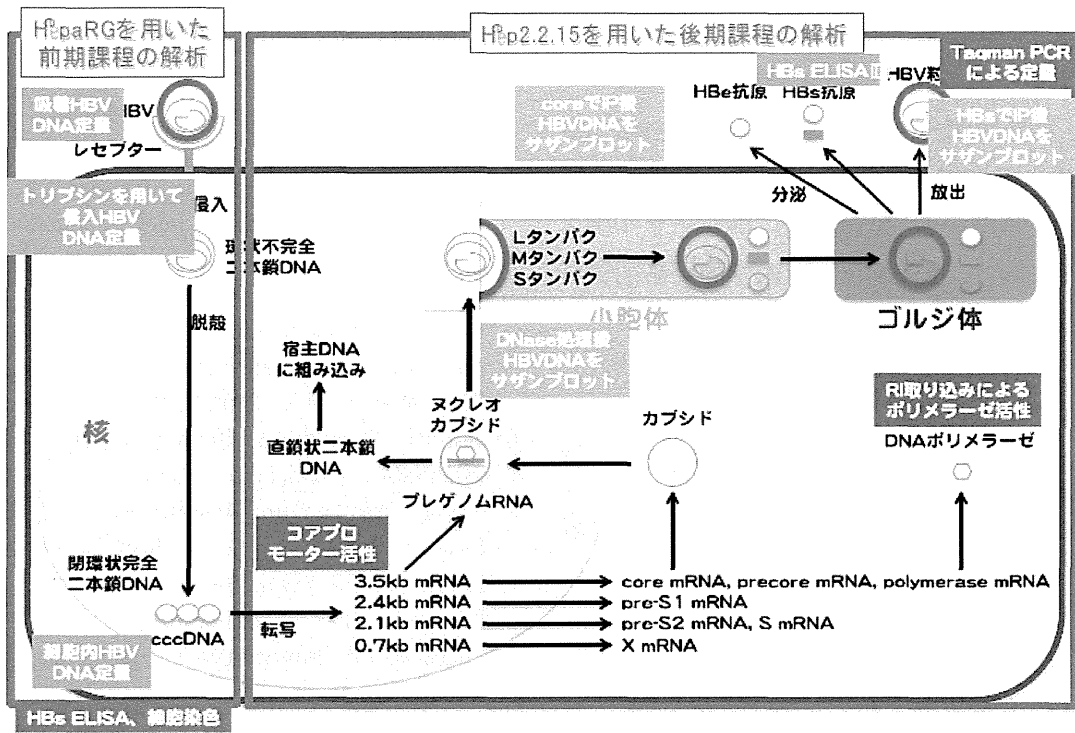
(2) HBV 感染に伴う宿主の代謝変化の解析（相崎分担研究者）

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。

(3) 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（水上協力研究員）

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、毒性予測を行う。

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）
 分担研究報告書



(図2：HBV 生活環実験手法)

(4) 実験用霊長類を用いた安全性評価系の確立 (明里協力研究員)

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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、我々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うと伴に、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y,

Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. Virology. 2012;10:29-38.

- 3) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. J Clin Microbiol. 2012;50:1943-9.
- 4) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. PLOS Pathogen 2012;8:e1002561.
- 5) Takizawa K*, Nakashima T*, Mizukami T*, Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta RA, Yamaguchi K, Hamaguchi I.*These authors equally contributed. Degenerate PCR strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus in the blood screening. Transfusion in press
- 6) Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ, Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C, Blackburn C, Godin I, Jacobsen SE. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. Nat Immunol. 2012; 13: 412-419.
- 7) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with

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)
分担研究報告書

- Matsuura Y, Saito I, Wakita T,
119:2376-2384.
- 8) 田中純子、小山富子、相崎英樹. C型肝炎ウイルス(HCV)による感染. 日本臨床ウイルス学会、臨床とウイルス、2012;40:28-35.
 - 9) 相崎英樹、HCV感染と代謝異常(脂質・エネルギー)、医学の歩み、2012; in press.
 - 10) 相崎英樹、HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、Liver Forum in Kyoto 第14回学術集会記録集、メディカルトリビューン、2012;30-33.
 - 11) 相崎英樹、C型肝炎ウイルスの生活環、細胞、ニューサイエンス社、東京、2012; in press.
2. 学会発表
- 1) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Kuroda M, Wakita T. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a single HCV carrier. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 2) Watashi K, Uchida N, Saeed M, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 3) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyaura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 4) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived Hepatitis C virus was effective both in vitro and in vivo. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 5) Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 6) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Phospholipase D regulates membrane trafficking during Hepatitis C virus egress. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 7) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 8) Watanabe N, Date T, Hussein Aly H, Aizaki H, Wakita T. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
 - 9) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Ichinose S, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 2012.
 - 10) Matsumoto Y, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
 - 11) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis virus NS2 protein and participates in the viral assembly. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.

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)
分担研究報告書

- 12) Matsuda M, Suzuki R, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of hepatitis C virus. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 13) Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 14) Watanabe N, Date T, Aizaki H, Wakita T. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 15) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 16) Aizaki H, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, The 1st International Symposium on Latent TGF- β Activation Reaction • RIKEN Symposium, Hyogo, 2012.
- 17) 相崎英樹, HCV感染に伴う宿主の代謝の変化-脂質代謝、エネルギー代謝を中心に、The 11th Hepatitis Expert Meeting • 学術講演会 • 教育講演、東京、2012.
- 18) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲郎、相崎英樹、脇田隆字、小嶋聡一、C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- β 疑似活性の発現、第48回日本肝臓学会総会 • シンポジウム、金沢、2012.
- 19) 相崎英樹、HCV粒子形成に関与する宿主因子の同定と解析、平成24年度遺伝子病制御研究所研究集会、感染 • 免疫 • 炎症 • 発癌、北海道、2012.
- 20) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 21) 渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、IL-1およびTNF-alphaのB型肝炎ウイルス感染阻害効果、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 22) 安東友美、相崎英樹、杉山真也、溝上雅史、黒田誠、脇田隆字、C型肝炎ウイルスのquasispecies解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 23) 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、脇田隆字、相崎英樹、グリチルリチンのC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 24) 渡邊則幸、伊達朋子、Aly Hussein、相崎英樹、脇田隆字、異なる細胞を用いて作成したE2タンパク質の中和抗体誘導効果、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 25) 相崎英樹、HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、Liver Forum in Kyoto 第14回学術集会、京都、2012.
- 26) Takuo Mizukami, Identification and characterization of cancer stem cells in a Tax-transgenic mouse model of adult T-cell leukemia/lymphoma. グローバルCOEリエゾンラボ研究会 熊本大学 2012年2月1日
- 27) 水上拓郎、滝澤和也、山崎淳平、倉光球、百瀬暖佳、益見厚子、長谷川秀樹、山口一成、浜口功. 動物モデルを用いたATL癌幹細胞及びそのニッチの解析. 第154回日本獣医学会学術集会 岩手 2012年9月14-16日
- 28) Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Jumpei Yamazaki, Atsuko Mausmi, Hideki Hasegawa, William W Hall, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi. Identification of cancer stem cell niche in Adult T-Cell Leukemia / lymphoma (ATL) model mouse. 第74回日本血液学会学術集会 京都 2012年10月19日-21日
- 29) 斎藤益満 • 水上拓郎 • 倉光球 • 百瀬暖佳 • 石井健 • 浜口功. 網羅的遺伝子発現解析を用いたアジュバント含有ワクチン安全性評価法の開発と展開 第16回日本ワクチン学会 横浜 2012年11月17-18日

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）
分担研究報告書

- 30) 百瀬暖佳, 水上拓郎, 倉光球, 滝澤和也, 益見厚子, 浜口功. 遺伝子発現解析による安全性評価法の新規製法インフルエンザHA ワクチンへの適応に向けた試み 第16回日本ワクチン学会 横浜 2012年11月17-18日
- 31) Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Haruka Momose, Jumpei Yamazaki, Atsuko Masumi, William W Hall, Hideki Hasegawa, Kazunari Yamaguchi and Isao Hamaguchi. Identification of Leukemic Stem Cells and Their Niche in Adult T Cell Leukemia Using the Tax-Transgenic Mouse Model. 54th Annual meeting of American Society of Hematology meeting, Atlanta GA, December 8-11, 2012
- 32) Luis TC, Luc S, Mizukami T, Boukarabila H, Woll PS, Carrelha J, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Loughran SJ, Mead AJ, Macaulay IC, Hultquist A, Matsuoka S, Ferry H, Atkinson D, Farley A, Sanjuan-Pla, Carella C, Patient R, Nerlov C, de Bruijn M, Blackburn C, Godin I, Jacobsen SEW. Embryonic thymopoiesis is initiated by immune-restricted lympho-myeloid progenitor cells. Keystone Symposium. 14-19. January 2013
- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

標識ナノバブルシステムを用いた抗 HBV 薬キャリアーの開発

研究報告者 土屋好司 東京理科大学理学部第一部応用化学科 分担研究者

共同研究者 該当なし

【研究要旨】

本研究では、超音波診断用造影剤として有用な微小気泡（マイクロ・ナノバブル）に抗 HBV 薬物を標識させた薬物キャリアーを開発することにより、候補薬物の有用性を評価するとともに、診断と加療を同時に実現可能なシステムを構築することを目的とする。

抗 HBV 薬物を肝組織に局所的に徐放・加療するためには肝細胞または肝類洞壁細胞へのターゲティングが重要となる。そこで、抗 HBV 薬物およびリガンド分子（アシアロ糖蛋白、ビタミン等）を標識するためのモデル物質として、葉酸を標識したナノバブルの調製を試みた。葉酸を PEG 鎖末端に標識した PEG 化リン脂質を用いて微小気泡の調製を行ったところ、生体内類似環境下においても微小かつ安定性の高い葉酸標識ナノバブルの調製に成功した。また、葉酸標識ナノバブルは葉酸受容体陽性の KB 細胞への特異的な集積性が観測された。モデル物質を標識しても安定な微小気泡が調製できたことから、抗 HBV 候補薬物においても、分散安定性の高いマイクロ・ナノバブルの調製が期待される。

A. 研究目的

超音波診断用造影剤として、超音波照射により強いエコーを発する微小気泡が用いられ、主に血管部分のより鮮明な描出に貢献している。我々はこれまでに、EPR 効果を利用した腫瘍組織への受動的集積性の向上を目的として、粒子径数 100nm の新規ナノバブルの調製を行ってきた。その結果、生体安全性の高いシクロアミロース修飾界面活性剤およびタウリン誘導重合性ジェミニ型界面活性剤にポリエチレングリコール(PEG)化リン脂質を混合することで、生体環境下においても微小かつ安定なナノバブルを調製できることを見出している。

本研究では、この PEG 鎖末端に抗 HBV 薬物を標識させた標識ナノバブルシステムを開発することを目的とする。抗 HBV 薬物

を肝組織に局所的に徐放・加療するためには肝細胞または肝類洞壁細胞へのターゲティングが重要となる。そこで、抗 HBV 薬物およびアシアロ糖蛋白などのリガンド分子を標識するためのモデル物質として、葉酸 (FA) を標識したナノバブルの調製と葉酸受容体陽性細胞への集積性について検討した。

B. 研究方法

葉酸標識ナノバブルを調製するため、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。

(倫理面への配慮)

気泡の調製および評価には市販の試薬をしており、倫理面には該当しない。

C. D. 研究結果、考察

葉酸標識微小気泡の粒子径および分散安定性について評価するため、動的光散乱法(DLS)により 37°C、PBS 中における粒子径の経時変化を測定した。その結果を図 1 に示す。

調製直後の平均粒子径は 1 μ m 程度と大きかったが、時間経過に伴い粒子径は減少し、調製 60 分後からはほぼ一定となった。調製直後に平均粒子径が大きかったのは、サイズの大きな気泡 (ミリバブルやマイクロバブル) と小さな気泡 (ナノバブル) が混在したためである。大きな気泡は浮力により気液界面に上昇して消失するため、最終的には粒子径の小さなナノバブルだけが残存すると考えられる。

次に葉酸標識ナノバブルの数密度をナノ粒子解析システム(NanoSight)により評価した結果を図 2 に示す。その結果、葉酸標識ナノバブルの数密度は 1mL あたり 4 \times 10⁸ 個程

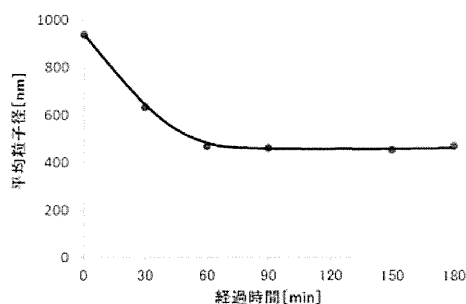


図1 葉酸標識微小気泡における平均粒子径の経時変化 (CA-LA:DPPS:DSPE-PEG(5000)-FA=25:75:10, PBS中, 37°C)

度であり、調製 60 分後以降において気泡数は減少せず一定となった。

以上より、本研究で調製した葉酸標識微小気泡は生体内類似環境下において、微小かつ安定性が高いことが分かった。

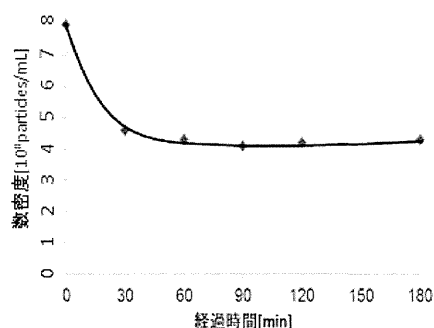


図2 葉酸標識微小気泡における数密度の経時変化 (CA-LA:DPPS:DSPE-PEG(5000)-FA=25:75:10, PBS中, 37°C)

本研究で調製した葉酸標識ナノバブルの高い分散安定性要因について検討するため、ゼータ電位測定を行った。その結果、葉酸を標識していないナノバブルのゼータ電位は -60mV (水中) であり、負に大きい表面電位を有していたが、葉酸標識ナノバブルのゼータ電位は、ほぼゼロであった。このことから、葉酸標識ナノバブルの高い分散安定性は表面電位の影響ではなく、気泡表面の PEG 鎖による立体排除体積効果の影響が大きいことが示唆された。

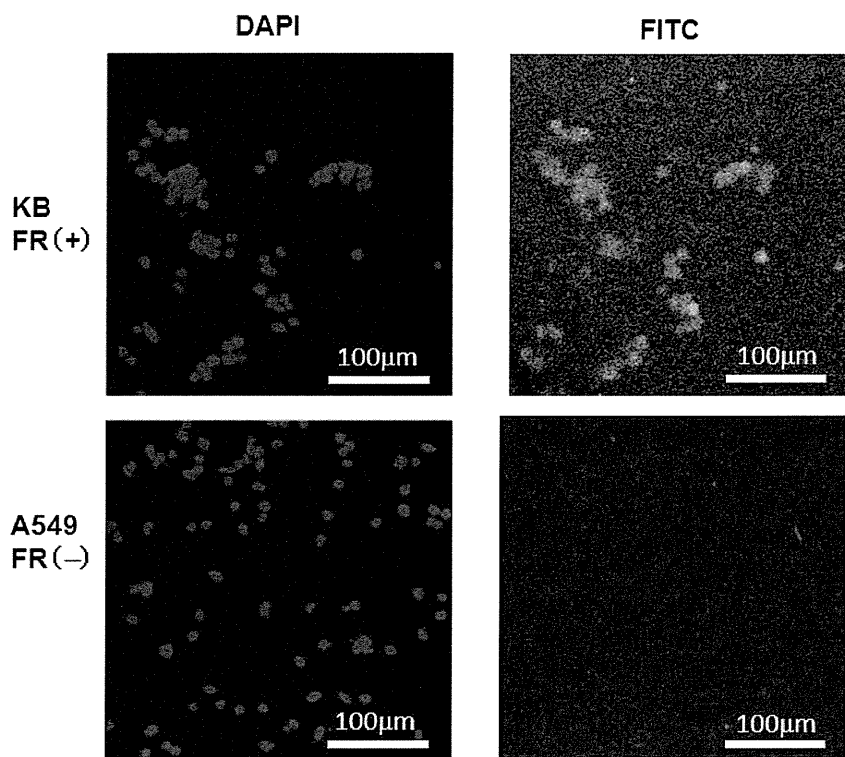


図3 葉酸標識ナノバブル(FITC標識)を用いた共焦点レーザー顕微鏡観察像

次に、葉酸標識バブルの集積性について、葉酸受容体陽性のヒト口腔癌(KB)細胞および陰性のヒト肺腺癌(A549)細胞を用いて比較検討した。まず、細胞毒性について MTT アッセイにより検討したところ、分散剤濃度 0.1µmol/L までは、いずれの細胞においても顕著な細胞毒性を示さないことが分かった。

次に、FITC により蛍光ラベルした葉酸標識ナノバブルを用いて、KB 細胞および A549 細胞への集積性を共焦点レーザー顕微鏡により観察した(図3)。細胞核は DAPI により蛍光ラベルした。その結果、葉酸受容体陽性の KB 細胞へは葉酸標識ナノバブルの顕著な集積性が認められたのに対して、葉酸受容体陰性の A549 ではほとんど集積していないことが分かった。

以上より、本研究で調製した葉酸標識ナノバブルは葉酸受容体陽性細胞へ特異的に集

積することが分かった。

E. 結論

抗 HBV 薬物およびリガンド分子のモデル物質として葉酸を PEG 化リン脂質末端に標識し、これを用いて葉酸標識ナノバブルの調製を行った。その結果、葉酸を標識してもナノバブルの分散安定性が高いことが分かった。このことから、① PEG 化リン脂質末端の活性官能基を利用した抗 HBV 薬物およびリガンド分子の標識化に向けた知見が得られ、② 抗 HBV 薬物を標識してもナノバブルの分散安定性も保持できることが期待された。

今後は肝細胞へのターゲティング能の向上を目指して、アシアロ糖蛋白、ビタミン B12-キャリアー蛋白複合体²⁾、レチノールなどを標識したナノバブルの開発を行い、肝

細胞および肝臓類洞壁細胞への集積性についても評価・検討する。また、抗HBV候補薬物モデルとしてインターフェロンなどを標識したマイクロ・ナノバブルについても検討する予定である。

F. 参考文献

1. Abe, M.; Tsubone, K.; Koike, T.; Tsuchiya, K.; Ohkubo, T.; Sakai, H. Polymerizable Cationic Gemini Surfactant. *Langmuir*, 2006; 22: 8293-8297.
2. Sato, Y.; Murase, K.; Kato, J.; Kobune, M.; Sato, T.; Kawano, Y.; Takimoto, R.; Takada, K.; Miyanishi, K.; Mutsunaga, T.; Takayama, T.; Niitsu, Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26: 431-442.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 酒井健一、西山広徳、小椋孝介、黒木悠平、遠藤健司、土屋好司、酒井秀樹、阿部正彦「モノメリック型およびジェミニ型カチオン界面活性剤の相挙動に及ぼす重合性基の影響」*Journal of the Japan Society of Colour Materia*, 85, 317-320 (2012)
- 2) 酒井秀樹、鈴木菜津美、遠藤健司、酒井健一、土屋好司、阿部正彦「微小気泡を铸型としたシリカ中空粒子の調製」*Material Technology*, 30, 147-153 (2012)

2. 学会発表

- (1) K. Tsuchiya, K. Hayashi, K. Fujiwara, T. Matsuura, K. Ohkawa, H. Sakai, M. Abe, H. Yajima “Preparation of Nanobubbles with High Dispersion Stability Using Mixture of Cycloamylose Laurate and PEGylated Phospholipids for Ultrasound Contrast Agents” International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IACIS 2012), Sendai, Japan, May 13-18, 2012.
- (2) K. Tsuchiya, K. Hayashi, K. Fujiwara, T. Matsuura, K. Ohkawa, H. Sakai, M. Abe, H. Yajima, “Preparation of Nanobubbles with High Dispersion Stability in Blood Serum”, World Congress on Oleo Science and 29th ISF congress (WCOS2012), Sasebo, Japan, Sep. 30-Oct. 4, 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

新規B型肝炎治療薬候補化学物質の安全性・毒性評価に資する研究

研究報告者 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

【研究要旨】

一般毒性試験実施にむけた環境整備に加えて、ケージ内行動測定装置による影響評価を取り入れることで、従来手法でカバーしきれなかった夜間における投与影響を評価できるものと考えられた。また、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た生殖細胞への影響評価系作出を目的とした卵巣中の卵丘細胞-卵母細胞(以降、COC)を用いた体外培養下の生殖細胞影響評価を行った結果、新たな生殖細胞毒性評価系作出が期待できることが明らかとなった。今後、評価指標の追加による、評価系としての頑強性の強化と、スループット性の向上が求められる。

A. 研究目的

本研究班にて開発されつつある、新規B型肝炎治療薬候補化学物質の安全性・毒性評価に資することを目的とする。B型肝炎は母子感染が問題視されるが、特に、現行の第一選択薬のひとつとされるエンテカビルは催奇形性が疑われている為、単回強制経口投与による一般毒性のみならず、次世代（配偶子）影響解析を含めた生殖発生毒性をも評価しうることを目指す。その際、スループット性、網羅性を担保しつつ、モデル動物から得られた結果をヒトに外挿するための毒性発現メカニズムを伴うものとする。H24年度は一般毒性発現解析系の整備とともに、化学物質投与後の①一般状態監察の自動化、②サーモグラフィを利用した熱画像診断の導入、また③卵子細胞を用いた影響評価、といった、新規の毒性評価法の開発を行うとともに、網羅的遺伝子発現解析による、分子レベルでの毒性メカニズム解明を目指す。

B. 研究方法

H24年度は、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。

また、生殖細胞への影響評価系を作出する目的で、ICR 系統のマウスに PMSG を 5IU/ml の濃度で投与し卵胞の成熟を促し、L15 培地中で卵巣中の卵丘細胞-卵母細胞(以降、COC)を培地中に露出させ、回収した。COC については卵丘細胞が十分に卵母細胞を層状に覆っているものを選抜した。その後、COC をミネラルオイルによって重層した体外培養用培地(Waymouth's 751/1)中で、20 個/50 μ l の条件で 18 時間、37°C、5%CO₂ の条件下で培養を行った。このとき培地に DMSO で溶解したエンテカビルを 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M および 100 μ M の終濃度で添加し、卵母細胞の減数分裂再開への影響を検討した。その指標として、今回は卵核胞崩壊を選定した。卵核胞崩壊は卵母細胞が受精能力を獲得する上で必須の現象であり、エンテカビルが卵母細胞の卵核胞崩壊に対して影響することは雌側において重篤な受精障害に繋がる可能性がある。そこで本研究では、培養後卵丘細胞を卵母細胞から先端を細く加工したガラスピペットを用いることで分離し、実体顕微鏡下で卵核胞崩壊の有無を観察した。尚、各添加区における卵核胞崩壊を引き起こした卵母細胞の割合を算出した。

(倫理面への配慮) 動物実験の際は科学のおよび動物愛護的配慮を十分に行い、3R の原則に基づき、所属機関の定める規定、指針を遵守し遂行した。

C. 結果

エンテカビル 100mg/kg 単回強制経口投与の結果、急性症状は認められなかった。

投与8時間後から7日間のケージ内活動量解析の結果、夜間(本来のマウスの活動時間帯)における活動量の減少傾向が認められるものの、それは重篤なものではなかった。また、解剖所見としても異常の検出はなく、病理組織像も認められなかった。

生殖細胞への影響評価系作出を目的とした卵巣中の卵丘細胞-卵母細胞(以降、COC)へのエンテカビル添加実験は、コントロール区に対して 10 μ M までの濃度では差が認められなかったが、100 μ M 添加区において顕著に卵核胞の崩壊が阻害されることを見いだした。そこで、コントロール区と 100 μ M 添加区において DNA マイクロアレイ法による網羅的転写発現解析を計画したが、卵母細胞の裸化(卵丘細胞の分離)時に RNA ダメージが生じることが判明したため、現在、RNA の抽出法について条件検討を重ねている。

D. 考察

一般毒性解析に関し、エンテカビルの用量設定は、安全係数を 100 として 100mg/kg(溶媒は 0.5%メチルセルロース溶液)と設定した。よって、重篤な投与影響(毒性)は検出されなかった。一方で、投与後のケージ内活動量測定結果から、夜間における活動量の減少傾向が認められたことは、副作用情報に対応するものである可能性もあると考えられる。

生殖細胞への影響評価として、卵丘細胞-卵母細胞(以降、COC)を用いた結果、エンテカビルの影響を捉えることに成功した。しかしながら、本手法は COC を 20 個/50 μ l で