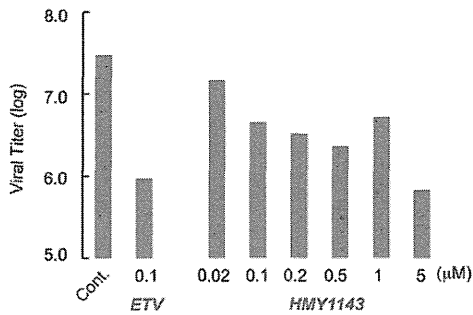
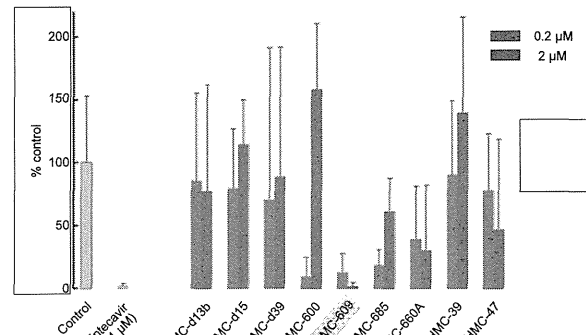


Potential Hit Compound: HMY1143



Tanaka/Mitsuya Unpublished 2013

HMC609 Appears To Be Active against HBV In Vitro



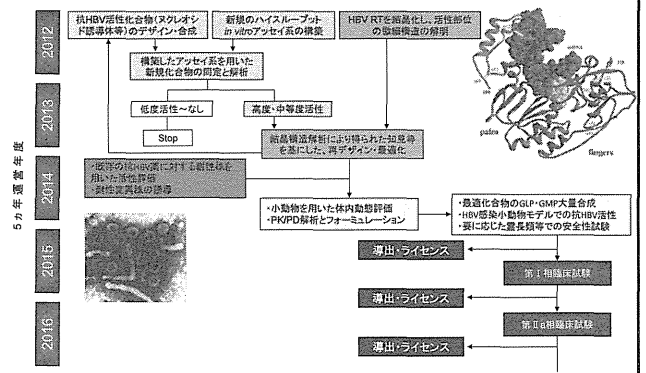
Tanaka/Mitsuya Unpublished 2013

リード化合物候補の初期同定に一部成功

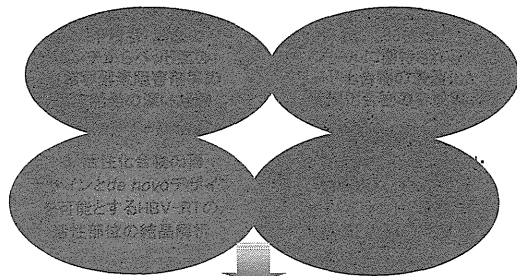
Drug	抗 HIV 活性	抗 HBV 活性	IC_{50} (nM)
HMY 1143	4	~20	
HMC 609	<100	~20	
3TC (lamivudine)	480	100 - 500	
TDF (tenofovir)	30	60 - 200	
ETV (entecavir)	1,000	3	
EFdA	0.5	2,900	

- HMY1143とHMC609のETV耐性HBVに対する活性などの評価
- HMY1143とHMC609については最適化(抗HBV活性を上げる)に着手

抗HBV化合物開発のアルゴリズムとタイムライン



本『B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発』プロジェクトの特長



必ず一定の成果と結論を得て、目に見える形で確実なインパクトをもたらす

合同研究班会議開催状況

他の研究班と合同での研究班会議開催状況(24年度)

「次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制御のための創薬研究」(小嶋 聡一代表)との合同情報交換会を平成25年 2月 3日(日) 東京で開催の決定

他の研究班への参加状況

研究代表者(満屋)は、「肝炎等克服緊急対策研究事業」, 「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)」研究班の何れにも研究代表者として参加していない

利益相反について

無し

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成24年度)

- ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
 イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
 (開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成25年 2月 3日(日) 東京で開催
 「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」(小嶋 聡 - 代表)との合同情報交換会

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「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)」研究班に研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

- ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
 イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。
 (以下①、②を記載)
 ①(研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名:〇〇〇〇)
 ②他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

ア
 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

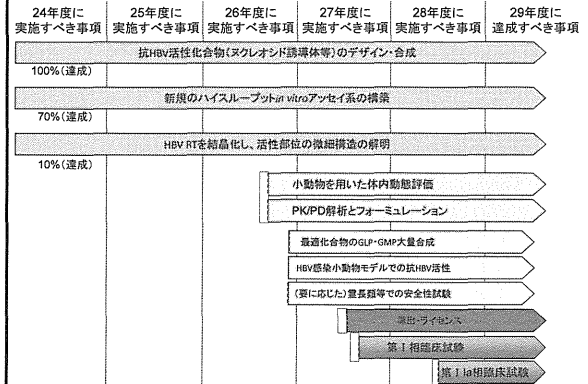
利益相反について

利益相反の有無等(平成24年度)

- ア 利益相反の有無 有・無(いずれかを記載)
 イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

無

工程表(研究代表者 満屋 裕明)



平成24年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：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課題番号：H24-B創-肝炎-一般-003予定期間：H24年度からH28年度まで研究代表者：小嶋 聡一所属研究機関：独立行政法人 理化学研究所所属部局：基幹研究所 分子リガンド生物研究チーム職名：チームリーダー年次別研究費(交付決定額)：1年目 390,000,000円**I. 研究の意義**

- (1) B型肝炎(HBV)は、C型肝炎と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はわかっておらず、基礎研究・創薬研究が大きく立ち遅れている
- (2) 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

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 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理研小嶋、慈恵医大松浦、感染研相崎を中心とし、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実施
- (2) “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)、次世代シーケンサー、ハイスループット(HTP)ケミカルスクリーニングシステム、分子イメージング等を駆使したHBV創薬研究を展開
- (3) 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6つ以上同定(松浦グループ)
- (4) HTPケミカル&“京”コンピュータを用いた*in silico*スクリーニングを行い、SPring-8/SACLA(XFEL)による構造活性相関(SAR)研究を経て新規作用機序の候補化合物を取得(小嶋グループ)
- (5) 細胞から小動物までHBV感染・病態/有効・安全性を評価(相崎グループ)
- (6) 理研創薬医療技術基盤プロジェクト(創薬支援ネットワーク)を活用して、「実用化に耐えうる」抗HBV薬候補3つ以上を取得、HBVを完全に排除可能な薬剤を開発
- (7) 5年後に製薬企業とタイアップして臨床試験実施を目指す

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 既にある候補化合物の展開: Imidazonaphthyridine(略INd)というIFN様作用を示す経口剤(Sci Rep 2012)のスクリーニング系を導入、展開を始め、HBVキメラマウス実験を計画
- (2) 既にあるヒット化合物の展開: NPDepo NPD8673というHBV患者でみられるTGF- β 活性化反応抑制剤の*in silico*スクリーニング、類縁体合成、SARを開始、HBVキメラマウス実験を計画
- (3) 既に確立しているスクリーニング系のHTS化: 相崎班で確立したHepaRG/Hep2.2.15を用いるcell-based screening系を導入し、ハイスループット化を開始
- (4) スクリーニング用ライブラリーを充実するために天然化合物とその誘導体、糸状菌培養エキス計1,150種(年度内に計2,000種)、カビ培養液抽出濃縮物800種を選抜・購入

- ・研究分担者（小川健司）
 - (1) 分泌型の 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構築
- ・研究分担者（平野秀典）
 - (1) IFN α 受容体 2 の Ind 結合/LAP の NP8673 結合の予測に基づく in silico スクリーニング
- ・研究分担者（鈴木正昭）
 - (1) IFN α 2 型受容体アゴニスト Ind をベースにした SAR 研究を開始
- ・研究分担者（吾郷日出夫）
 - (1) IFN α 2 型受容体細胞外ドメイン (IFNAR2-EC) と IFN α 2 の発現コンストラクト構築
- ・研究分担者（松浦知和）
 - (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構築、2013 年 1 月よりサンプル（血液、肝臓等）収集開始
 - (2) Genotype Ae, C, Bj で特徴ある臨床病型症例での HB s 抗原、または HBV 発現系作製のためのプレ実験を開始
 - (3) 既存の HBV 産生株細胞 Hep2. 2. 15 とコントロールである HepG2 細胞の比較オミックス（トランスクリプトーム解析、モディフィコーム解析）のサンプル調製
 - (4) 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
- ・研究分担者（名越澄子）
 - (1) 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 への申請と承認
- ・研究分担者（鈴木治和）
 - (1) HBV 感染 Hep2. 2. 15 細胞および核酸アナログ投与同細胞を用いて、HBV 感染・及びその薬剤治療における宿主側の関与因子のトランスクリプトーム解析を開始
 - (2) 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
- ・研究分担者（金井好克）
 - (1) 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進めた
 - (2) 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
- ・研究分担者（堂前直）
 - (1) 質量分析装置を導入し、ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1) を用いてモディフィコーム解析系を立ち上げ中。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各種修飾の解析中
- ・研究分担者（相崎英樹）
 - (1) HBV 遺伝子型 Ae の HBV 持続複製細胞株を樹立
 - (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
- ・研究分担者（土屋好司）
 - (1) 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
- ・研究分担者（種村健太郎）
 - (1) 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
- ・研究分担者（渡辺恭良）
 - (1) 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

IV. 平成 25～28 年度の課題

- (1) 分子ドッキング、分子動力学計算、量子化学計算等の計算化学的手法を組合せることで、インシリコ創薬支援手法を確立し、B型肝炎制圧の為の新規薬剤開発へとつなげる。
- (2) 既存リード・ヒット化合物(Ind, NPD8673)の展開・最適化
- (3) Cell-based screening に用いる Genotype Ae, C, Bj の HBV 持続複製細胞株を樹立
- (4) 樹立した細胞株を用いた抗ウイルス薬 HTS スクリーニング・最適化
- (5) HBV 創薬へ向けて劇症肝炎、若年発癌などの特徴ある臨床病態を示した HBV 感染症例や樹立した細胞株からオミックス解析による病態解明と 6 つ以上の新規標的の同定
- (6) 同定した新規標的 HTS スクリーニング・最適化
- (7) 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ックス解析
- (8) 細胞から小動物まで HBV 感染・病態/有効・安全性の評価系(薬物動態・輸送系・候補薬物動態、肝輸送系)の確立とこれを用いた候補薬評価
- (9) 治療候補化合物のマイクロドーズ薬物動態・薬効評価研究を動物モデルからヒトで実施
- (10) 理研創薬医療技術基盤プロジェクト(創薬支援ネットワーク)を活用して「実用化に耐えうる」抗 HBV 薬候補 3 つ以上を取得、HBV を完全に排除可能な薬剤を開発
- (11) 治験開始に向けた製薬企業とのタイアップ

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HBV 制圧の為の創薬基盤を形成、治療薬開発、日本発革新的医薬品創出に繋がり、副作用の少ない新薬開発に貢献、国民に安全・安心を提供
- (2) 生命基盤施設の創薬研究への有用性を示すモデルケース、産学官連携研究への布石となる。大規模化合物バンクと HTS の組合わせに加えて、次世代シーケンサーや次世代プロテオミクス、メディコミクス技術を組合わせた次世代生命基盤技術の融合は多くの疾病克服に役立つ
- (3) 臨床治験における合理的創薬プロセスの構築
- (4) “創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業”の活用、インシリコ創薬支援手法の確立 SPring-8 での創薬ターゲットタンパク質と薬剤複合体の結晶構造解析および SACLA での創薬に向けた構造機能解析(ナノ結晶や将来的な単分子解析)、分子イメージングを用いた薬物動態解析と DDS 合理的開発の技術開発を通して HBV 創薬に貢献

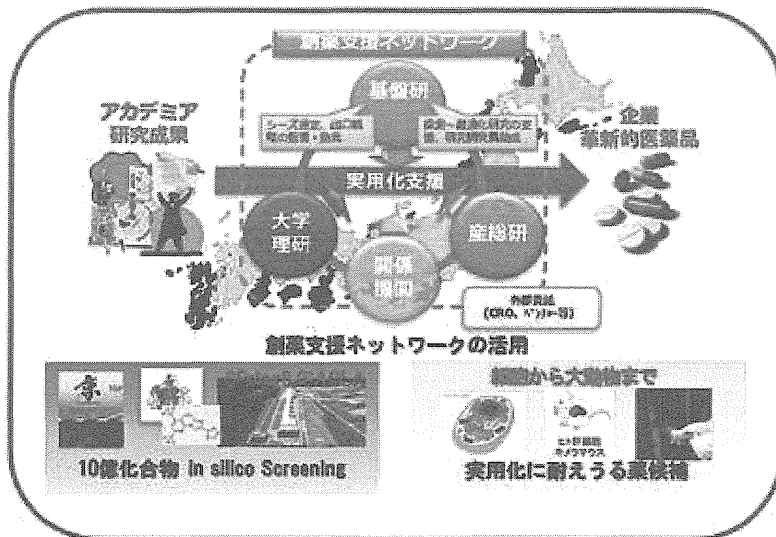
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) 山本由佳、原詳子、小嶋聡一 (2012) 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」印刷中
- (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) 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
- (5) 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.
- (6) 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 immunosuppressive 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
- (7) 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.
- (8) 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.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

H24-B創-肝炎-一般-003 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 H24.12.12現在成果

(独) 理化学研究所 分子リガンド生物研究チーム 小嶋駿一



松浦 G
(慈恵医大)
**独創的新規
標的の同定**



(1)臨床検体収集体制確立
各施設IRB承認

【臨床検体収集体制の確立】
慈恵医大・埼玉医大・東京医大・慶応医大(目黒)・岐阜大・山口大
【臨床検体収集体制の確立】
血液検体
1. BIL (BTA-2) (胆汁) → 2. BIL (胆汁) → 3. BIL (胆汁) → 4. BIL (胆汁) → 5. BIL (胆汁)
【臨床検体収集体制の確立】
1. 血液検体
2. 尿検体



(2)解析系整備



(3)細胞株確立

HBV遺伝子型Ae持続産生
細胞株Huh HBAeの作製

小嶋 G
(理研)
**大規模スク
リーニング**



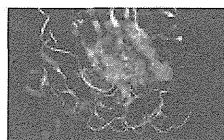
(1)既存リード・ヒット
化合物の展開開始
("京"/SPring8/合成/活性)
・経口IFN様化合物Ind



SAR研究

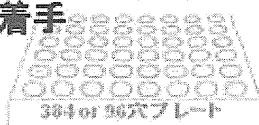
・TGFβ活性化阻害NPD8673

- Target 3R.Rpd
- BOLD 5.1
- Radius = 10A
- BofMassore
- No constraint



"京"を用いたin silicoスクリーニング

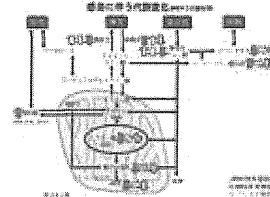
(2)HepaRG/Hep2.2.15 細胞
cell-based screening系導入、
HTP化着手



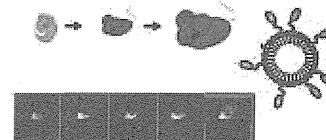
相崎 G
(感染研)
**有効性・
安全性評価**



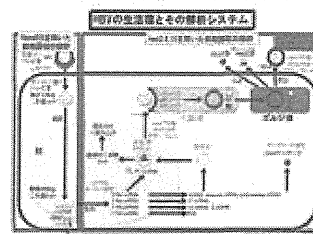
(1)評価系整備
・メタボローム



・薬物動態/輸送系



(2)HepaRG/Hep2.2.15 細胞
cell-based screening系確立



●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

1981年4月～1990年3月 東京工業大学
1990年4月～1993年3月 ニューヨーク大学医療センター
1993年4月～現在に至る 独立行政法人理化学研究所

▪ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

Daniel B. Rifkin (ニューヨーク大学医療センター・教授)、
Scott L Friedman (マウントシナイ医療センター・教授)、
掛谷秀昭 (京都大学・教授)、佐藤靖史 (東北大学・教授)、森脇久隆 (岐阜大学・教授)、
池嶋健一 (順天堂大学・准教授)、河田則文 (大阪市立大学・教授)
松浦知和 (東京慈恵会医科大学・准教授)、相崎英樹 (国立感染症研究所・室長)

<指導教官> 広瀬茂久 (東京工業大学大学院)、 斉藤佑尚 (東京工業大学大学院)

▪ 主な研究課題

ケミカルバイオロジー的手法を用いて病気、特に肝疾患の病態形成機構に関わる蛋白質修飾反応を見出し、創薬基盤のための基礎研究を展開、実用化に向けて医学部や企業と応用研究を実施し、ユニークなスクリーニング系を構築、展開した。

具体的な研究課題は以下の通りである。

- ① レチノイド(ビタミンAとその誘導体)による新規転写調節機構
- ② 核内レチノイド受容体のリン酸化に関する研究
- ③ 非環式レチノイドの作用機構解析
- ④ TGF- β 活性化反応を標的とした肝疾患の新規診断法、治療・予防法開発
- ⑤ トランスグルタミナーゼによる転写因子架橋不活性化を介する肝細胞死に関する研究
- ⑥ 腫瘍血管新生の制御

▪ これまでの研究実績

<欧文>

1. Kuo, T.-F., Tatsukawa, H., and Kojima, S. (2012) Regulation of transglutaminase-mediated hepatic cell death in alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. *J. Gastro. Hepatol.* 27(suppl 2) : 52-57.
2. Kuo, T.-F., Tatsukawa, H., Matsuura, T., Nagatsuma, K., Hirose, S., and Kojima, S. (2012) Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J. Cell Physiol.* 227(3):1130-1137.
3. Kuo, T.-F., Tatsukawa, H., and Kojima, S. (2011) New insights into functions and localization of nuclear transglutaminase 2. (Review) *FEBS J.* 278(24) : 4756-4767.
4. Watanabe, N., Aizaki, H., Matsuura, T., Kojima, S., Wakita, T., and Suzuki, T. (2011) Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(1):135-140.

5. Tatsukawa, H., Sano, T., Fukaya, Y., Ishibashi, N., Watanabe, M., Okuno, M., Moriwaki, H., and Kojima, S. (2011) Dual induction of caspase 3- and transglutaminase-dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer* 10(1):4 (11pages).
6. Kojima, S., Kuo, T.-F., Tatsukawa, H., and Hirose, S. (2010) Induction of crosslinking and silencing of Sp1 by transglutaminase during liver injury in ASH and NASH via different ER stress pathways. *Digestive Diseases*. 28(6):715-721.
7. Furumai, R., Uchida, K., Komi, Y., Yoneyama, M., Ishigami, K., Watanbe, H., Kojima, S., and Yoshida, M. (2010) Spliceostatin A blocks angiogenesis by inhibiting global gene expression including VEGF. *Cancer Sci.* 101(11):2483-2489.
8. Mukhopadhyay, B., Liu, J. Osei-Hyiaman, D., Godlewski, G., Mukhopadhyay, P., Wang, L., Jeong, W., Gao, B., Duester, G., Mackie, K., Kojima, S., and Kunos, G., (2010) Transcriptional regulation of cannabinoid receptor-1 expression in the liver by retinoic acid acting via retinoic acid receptor- γ . *J. Biol. Chem.* 285(25):19002-19011.
9. Komi, Y., Sogabe, Y., Ishibashi, N., Sato, Y., Moriwaki, H., Shimokado, K. and Kojima, S. (2010) Acyclic retinoid inhibits angiogenesis by suppressing the MAPK pathway. *Lab. Invest.* 90(1):52-60.
10. Tatsukawa, H., Fukaya, Y., Frampton, G., Martinez-Fuentes, A., Suzuki, K., Kuo, T.-F., Nagatsuma, K., Shimokado, K., Okuno, M., Wu, J., Iismaa, S., Matsuura, T., Tsukamoto, H., Zern, M. A., Graham, R. M., and Kojima, S. (2009) Role of transglutaminase 2 in liver injury via crosslinking and silencing of transcription factor, Sp1. *Gastroenterology* 136(5):1783-1795.
11. Botella, L. M., Rodriguez-Sanz, F., Komi, Y., Fernandez-L, A., Varela, E., Garrido-Martin, E. M., Narla, G., Friedman, S. L., and Kojima, S. (2009) TGF- β regulates expression of KLF6 and its splice variants, and promotes cooperative transactivation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction. *Biochem. J.* 419(2):485-495.
12. Komi, Y., Suzuki, Y., Shimamura, M., Kajimoto, S., Nakajo, S., Masuda, M., Shibuya, M., Itabe, H., Shimokado, K., Oettgen, P., Nakaya, K., and Kojima, S. (2009) Mechanism of inhibition of tumor angiogenesis by β -hydroxyisovalerylshikonin. *Cancer Sci.* 100(2):269-277.
13. Komi, Y., Ohno O., Suzuki, Y., Shimamura, M., Shimokado, K., Umezawa, K., and Kojima, S. (2007) Inhibition of tumor angiogenesis by targeting endothelial surface ATP synthase with sangivamycin. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 37(11):867-873.
14. Yamazaki, K., Shimizu, M., Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Kanemura, N., Araki, H., Tsurumi, H., Kojima, S., Weinstein, I. B., and Moriwaki, H. (2007) Synergistic effects of RXR α and PPAR γ ligands to inhibit growth in human colon cancer cells-phosphorylated RXR α is a critical target for colon cancer management. *Gut.* 56(11):1557-1563.
15. Kojima, S. (2006) Change erythrocytes into thrombolytic agents. *Blood* 108(6):1789-1790.
16. Furutani, Y., Kato, A., Fibriani, A., Hirata, T., Kawai, R., Jeon, J.-H., Fujii, Y., Kim, I.-G., Kojima, S., and Hirose, S. (2005) Identification, evolution, and regulation of expression of guinea pig trappin with an unusually long transglutaminase substrate domain. *J. Biol. Chem.* 280(21):20204-20215.
17. Suzuki, Y., Komi, Y., Ashino, H., Yamashita, J., Inoue, J., Yoshiki, A., Eichmann, A., Amanuma, H., and Kojima, S. (2004) Retinoic acid controls blood vessel formation by modulating endothelial and mural cell interaction via suppression of Tie2 signaling in vascular progenitor cells. *Blood* 104 (1) :166-170.
18. Kojima, S., Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Friedman, S. L., and Moriwaki, H. (2004) Acyclic retinoid in the chemoprevention of hepatocellular carcinoma (Review). *Int. J. Oncol.* 24(4): 797-805.
19. Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Takano, Y., Kojima, S., Friedman, S. L., and Moriwaki, H. (2003) Molecular mechanism for growth suppression of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid. *Carcinogenesis*. 24 (8): 1353-1359.
20. Akita, K., Okuno, M., Enya, M., Imai, S., Moriwaki, H., Kawada, N., Suzuki, Y., and Kojima, S. (2002) Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- α /kallikrein-mediated activation of latent TGF- β . *Gastroenterology* 123 (1): 352-364.

21. Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Adachi, S., Sano, T., Akita, K., Moriwaki, H., Friedman, S. L., and Kojima, S. (2001) Phosphorylation of retinoid X receptors at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 61 (20): 7675-7682.
22. Shimada, J., Suzuki, Y., Kim, S.-J., Wang, P.-C., Matsumura, M., and Kojima, S. (2001) Transactivation via retinoic acid receptor/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol. Endocrinol.* 15 (10): 1677-1692.
23. Okuno, M., Akita, K., Moriwaki, H., Kawada, N., Ikeda, K., Kaneda, K., Suzuki, Y., and Kojima, S. (2001) Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterology* 120 (7):1784-1800.
24. Kojima, S., Hayashi, S., Shimokado, K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M. P., and Friedman, S. L. (2000) Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF- β 1 in vascular endothelial cells. *Blood* 95 (4): 1309-1316.
25. Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., and Kojima, S. (1999) Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- β mediated fibrogenesis in vivo. *J. Hepatol.* 30 (6): 1073-1080.
26. Suzuki, Y., Shimada, J., Shudo, K., Matsumura, M., Crippa, M. P., and Kojima, S. (1999) Physical interaction between retinoic acid receptor and Sp1: mechanism for induction of urokinase by retinoic acid. *Blood* 93 (12): 4264-4276.
27. Okuno, M., Moriwaki, H., Muto, Y., and Kojima, S. (1998) Protease inhibitors suppress TGF- β generation by hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 29(6): 1031-1032.
28. Matsuura, T., Kawada, M., Hasumura, S., Nagamori, S., Obata, T., Yamaguchi, M., Hataba, Y., Tanaka, H., Shimizu, H., Unemura, Y., Nonaka, K., Iwaki, T., Kojima, S., Aizaki, H., Mizutani, S., and Ikenaga, H. (1998) High density culture of immortalized liver endothelial cells in the radial-flow bioreactor for development of an artificial liver. *Int. J. Artificial Organs.* 21(4): 229-234.
29. Yoshizawa, M., Miyazaki, H., and Kojima, S. (1998) Retinoids potentiate TGF- β activity in bovine endothelial cells through up-regulating the expression of TGF- β receptors. *J. Cell. Physiol.* 176(3): 565-573.
30. Okuno, M., Moriwaki, H., Imai, S., Muto, Y., Kawada, N., Suzuki, Y., and Kojima, S. (1997) Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF- β in liver stellate cells. *Hepatology* 26 (4): 913-921.
31. Imai, S., Okuno, M., Moriwaki, H., Muto, Y., Murakami, K., Shudo, K., Suzuki, Y., and Kojima, S. (1997) 9, 13-di-cis-Retinoid acid induces the production of tPA and activation of latent TGF- β via RAR α in a human liver stellate cell line, LI90. *FEBS Lett.* 411 (1): 102-106.
32. Kojima, S., Inui, T., Muramatsu, H., Suzuki, Y., Kadomatsu, K., Yoshizawa, M., Hirose, S., Kimura, T., Sakakibara, S., and Muramatsu, T. (1997) Dimerization of midkine by tissue transglutaminase and its functional implication. *J. Biol. Chem.* 272 (14): 9410-9416.
33. Nunes, I., Kojima, S., and Rifkin, D. B. (1996) Effects of endogenously activated transforming growth factor- β on growth and differentiation of retinoic acid-treated HL-60 cells. *Cancer Res.* 56 (3): 495-499.
34. Kojima, S., Muramatsu, H., Amanuma, H., and Muramatsu, T. (1995) Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270 (16): 9590-9596.
35. Kojima, S., Nara, K., and Rifkin, D. B. (1993) Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor- β in bovine endothelial cells. *J. Cell Biol.* 121(2): 439-448.
36. Kojima, S., and Rifkin, D. B. (1993) Mechanism of retinoid-induced activation of latent transforming growth factor- β in bovine endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 155(2): 323-332.
37. Kojima, S., Harpel, P. C., and Rifkin, D. B. (1991) Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor β : an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J. Cell Biol.* 113(6): 1439-1445.
38. Kojima, S., Sekiya, F., Inada, Y., Sato, F., Tsukada, T., and Saito, Y. (1990) Cooperativity between platelet-activating factor and collagen in aggregation of bovine platelets III. *FEBS Lett.* 267(2): 226-228.

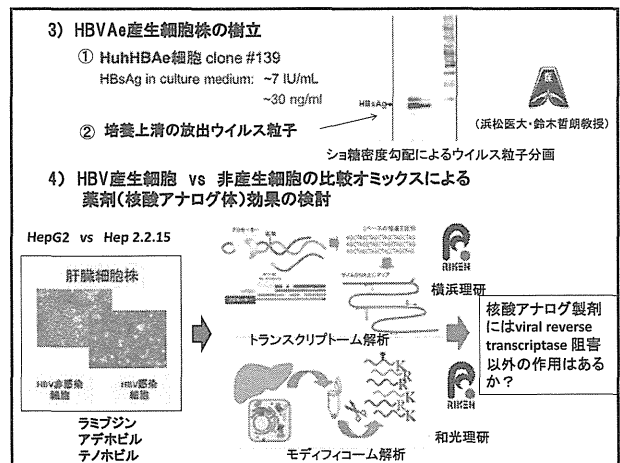
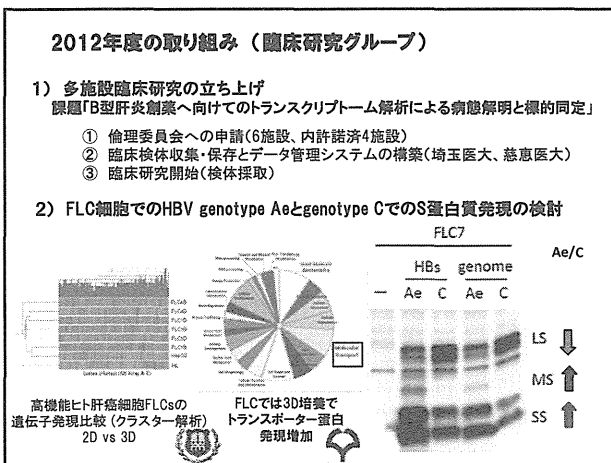
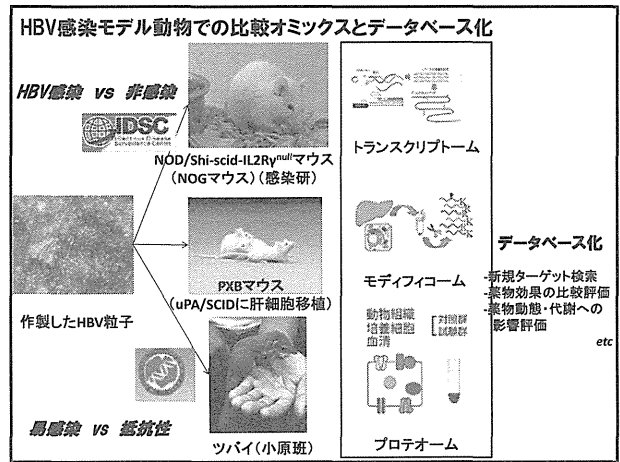
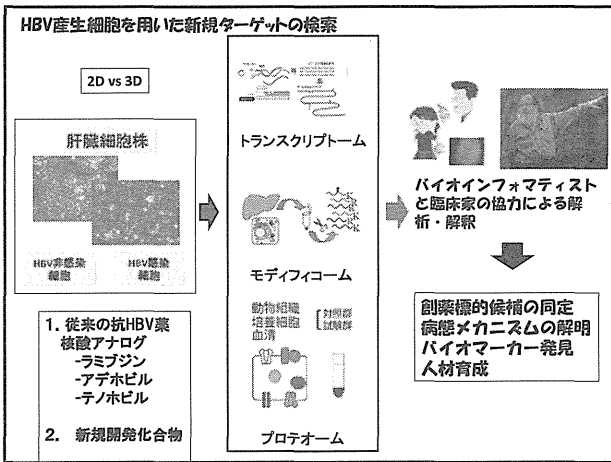
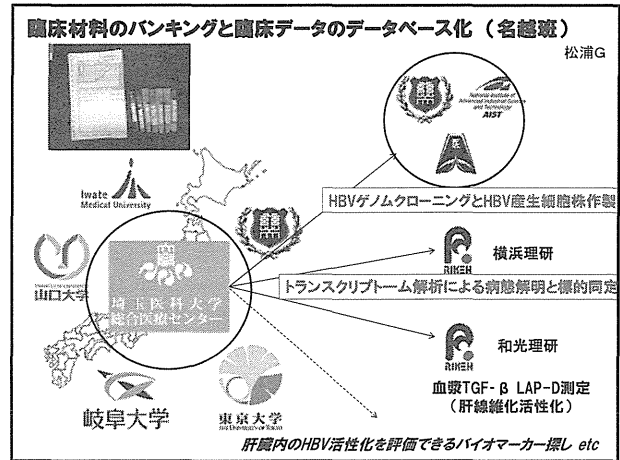
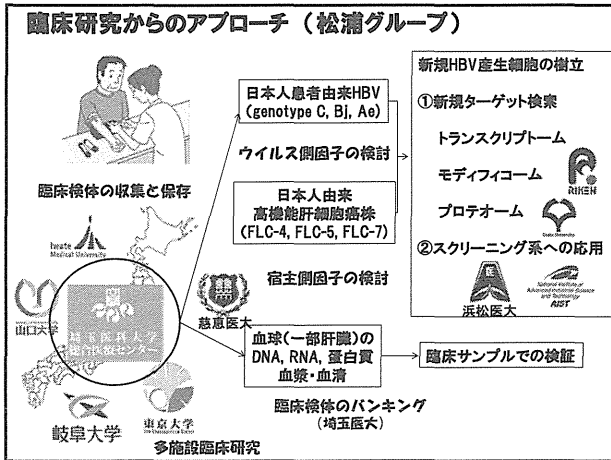
39. Nara, K., Nakanishi, K., Hagiwara, H., Wakita, K., Kojima, S., and Hirose, S. (1989) Retinol-induced morphological changes of cultured bovine endothelial cells are accompanied by a marked increase in transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 264(32): 19308-19312.
40. Kojima, S., Tadenuma, H., Inada, Y., and Saito, Y. (1989) Enhancement of plasminogen activator activity in cultured endothelial cells by granulocyte colony-stimulating factor. *J. Cell. Physiol.* 138(1): 192-196.
41. Kojima, S., Hagiwara, H., Soga, W., Shimonaka, M., Saito, Y., and Inada, Y. (1987) Transglutaminase in endothelial cells from bovine carotid artery. *Biomed. Res.* 8(1): 25-29.
42. Kojima, S., Soga, W., Hagiwara, H., Shimonaka, M., Saito, Y., and Inada, Y. (1986) Visible fibrinolysis by endothelial cells: effect of vitamins and sterols. *Biosci. Rep.* 6(12): 1029-1033.

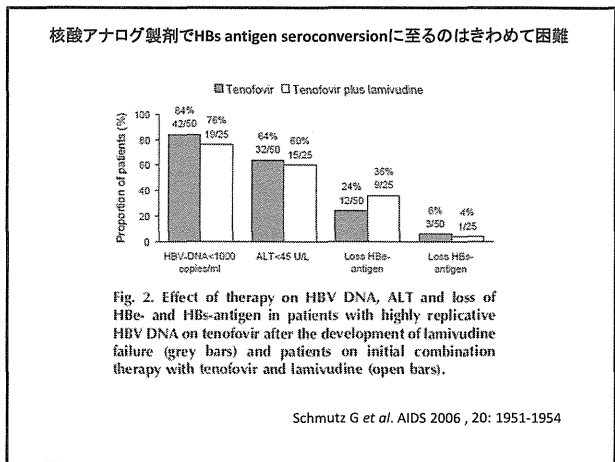
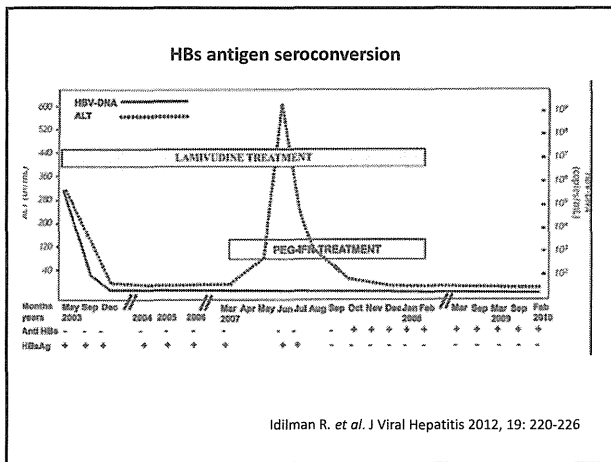
<邦文>

1. 山本由佳、原詳子、小嶋聡一 (2012) 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」印刷中
2. 桐田暁子、原詳子、小嶋聡一 (2012) 肝線維症とサイトカイン, TGF- β 、*肝胆膵*, 65(2):211-218
3. 原詳子、小嶋聡一 (2010) TGF- β と線維症、医学のあゆみ 第1土曜特集「TGF- β シグナル研究—メカニズムの解明から新たな治療へ」■疾病と TGF- β シグナル伝達異常・TGF- β を標的とした線維症の予防・治療法、診断法開発の試み、234(10):977-982
4. 大原麻由、武田令子、梅平和孝、佐藤希美、Eun-Seo LEE、五十嵐則夫、山野幹夫、小嶋聡一(2010) 琥珀アルコール抽出画分の皮膚ターンオーバー促進、およびヒアルロン酸産生促進効果について、*日本化粧品学会誌*, 34(2) : 89-101
5. 辰川英樹、小嶋聡一 (2009) アルコール性肝障害の新規肝細胞死誘導経路の発見、*バイオサイエンスとインダストリー* 67(8):423-427
6. 辰川英樹、小嶋聡一 (2003) 生体内バイオハイブリッド反応: 架橋多機能性酵素トランスグルタミナーゼによるタンパク質の機能変換 *化学工業* 54(12): 908-915
7. 小嶋聡一、奥野正隆 (2002) ビタミンAと肝障害. 特集: ビタミンA研究の最前線、*細胞* 34(3): 104-107.
8. 一瀬白帝、小嶋聡一 (2000) トランスグルタミナーゼ関連疾患の分子病態、*実験医学* 18(10): 1421-1425.
9. 小嶋聡一、一瀬白帝 (2000) トランスグルタミナーゼとアポトーシス、*生化学* 72(3): 198-202.
10. 奥野正隆、秋田國治、森脇久隆、小嶋聡一 (2000) 肝星細胞をターゲットにした肝線維化の治療、*肝胆膵* 40(2): 263-272.
11. 小嶋聡一、一瀬白帝 (1999) トランスグルタミナーゼ: タンパク質架橋反応が司る多彩な生命現象、*細胞工学* 18(7): 1030-1038.
12. 奥野正隆、小嶋聡一 (1998) 肝星細胞とレチノイド、*細胞* 30(14): 572-575.
13. 小嶋聡一 (1998)線溶系因子の発現調節機構、*現代医療* 30(6): 1549-1556.
14. 小嶋聡一 (1997)線溶因子の発現調節機構-レチノイドによる組織線溶の調節-、*医学のあゆみ* 182(5): 293-298.
15. 小嶋聡一 (1997) レチノイドによる組織線溶の調節: レチノイド-PA-TGF- β システムの機序と意義、*生化学* 69(2): 104-108.
16. 小嶋聡一、稲田祐二 (1994) ビタミンAによる血管内皮細胞の機能調節、*蛋白質核酸酵素* 39(1): 66-73.
17. 小嶋聡一、齊藤佑尚、稲田祐二 (1989)血管内皮細胞 7・5 血小板との相互作用、*現代化学増刊* 16: 67-71.

<特許出願>

1. 掛谷秀昭、服部明、高須康明、藤井信孝、大石真也、小嶋聡一、原詳子
「新規 TGF- β シグナル伝達阻害剤」
JP2011/53428 平成 23 年 2 月 17 日 PCT 出願
2. 小嶋聡一、原詳子、松本武久、高谷大輔
「TGF- β 受容体の活性化を抑制する活性を有する化合物、そのスクリーニング方法、並びに C 型肝炎ウイルスに起因する疾患の予防又は治療のための組成物」
特願 2010-192803 平成 22 年 8 月 30 日出願 (国内優先取下)
JP2011/069620 平成 23 年 8 月 30 日 PCT 出願
3. 助永義和、小嶋聡一、原詳子
「アイソフォーム特異的 TGF- β 活性化反応を抑制する抗体」
特願 2010-34449 平成 22 年 2 月 19 日出願 (国内優先取下)
JP2011/053559 平成 23 年 2 月 18 日 PCT 出願
4. 小嶋聡一、寺岡龍太郎
「TGF- β 活性化反応阻害物質」
特願 2007-058222 平成 19 年 3 月 8 日出願 (国内優先取下)
平成 20 年 3 月 7 日出願
US 優先権出願 12/044463 登録番号 7, 732, 401 (平成 22 年 6 月 8 日)
EU EPC 出願 08004355.7 登録番号 EU 1967526 (平成 22 年 2 月 24 日)
JP PCT 出願 特願 2008-058486
5. 小嶋聡一、近藤和嘉子、掛谷秀昭、長田裕之、坂本康治、中田忠
「TGF- β 情報伝達経路阻害剤」
特願 2003-367654 平成 15 年 10 月 28 日出願 (国内優先取下)
JP2004/016370 平成 16 年 10 月 28 日 PCT 出願
JP PCT 出願 特願 2005-515065 登録番号 4688680 (平成 23 年 2 月 25 日)
6. 小嶋聡一、近藤和嘉子、堂前直
「TGF- β 活性化制御領域の切断面を認識する抗体」
特願 2003-313014 平成 15 年 9 月 4 日出願 (国内優先取下)
JP2004/013189 平成 16 年 9 月 3 日 PCT 出願 US, EP, JP 移行手続き済
US 優先権出願 10/570606 登録番号 7, 803, 553 (平成 22 年 9 月 28 日)
US 優先権出願 12/856195 登録番号 8, 198, 412 (平成 24 年 6 月 12 日)
EU EPC 出願 04772928.0
JP PCT 出願 特願 2005-513729 登録番号 4653660 (平成 22 年 12 月 24 日)

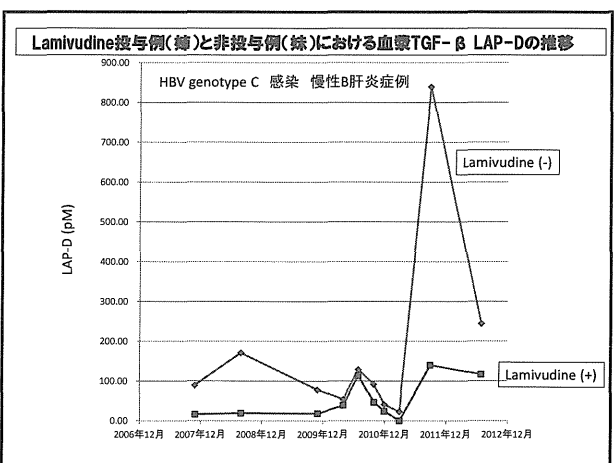
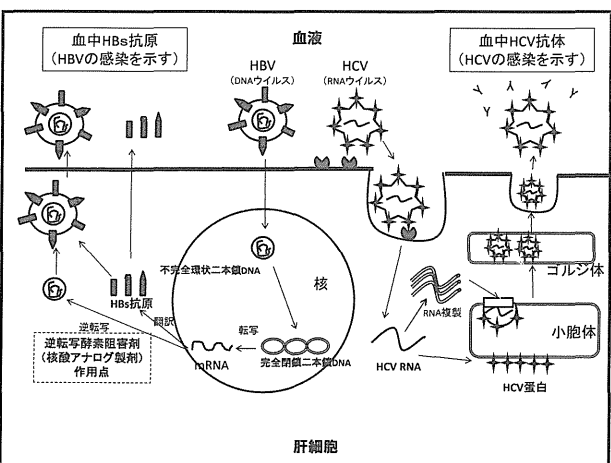
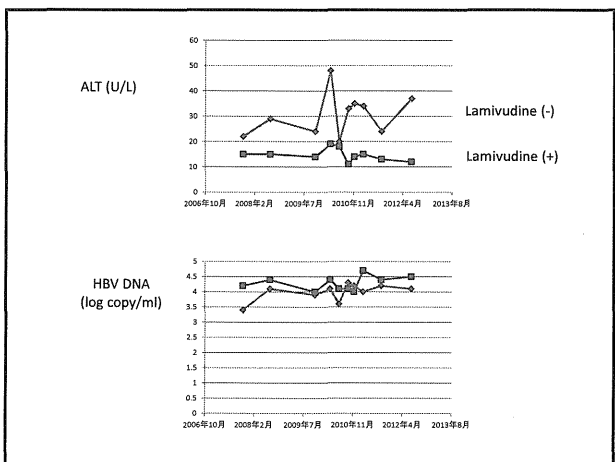




慢性B型肝炎症例

	姉 (49歳)	妹 (45歳)
HB _e Ag	陰性	陰性
HB _e Ab	陽性	陽性
HB _c Ab (s/co)	13.6	11.5
HB _s Ab	陰性	陰性
HB _s Ag (IU/ml)	754	16,500
Lamivudine	投与	非投与
HBV DNA (log copy/ml)	4.2	3.9
ALT	14	42

2013年1月現在



薬効メカニズムの解析や毒性の早期予測のためのメタボロミクスの応用

相崎(感染研)

- 製薬分野
 - 薬効メカニズムの解明
 - 作用機序メカニズムへの理解を深める。
 - 鍵となるパスウェイを同定する。
 - 毒性の早期予測 (MetaMap®Tox)
 - 毒性ターゲット・毒性メカニズムへの理解
 - 臨床バイオマーカーへの応用
 - PK/PD
 - 薬剤の有効性 / 代替薬の有効性
 - 薬剤の応答性 (コンパニオン診断)
 - 病態の進行
 - 診断分野
 - 診断バイオマーカー & 疾病の早期診断への応用
 - 栄養分野
 - エビデンスに基づく効果の実証 (保健機能食品など)

候補薬物については、メタボロミクスにより毒性の早期予測を目指す。既にラットにて薬物の代謝物がデータベース化されており、候補薬物のメタボローム解析の結果と比較することで安全性評価をより迅速に的確にできるものと期待される。

種村(東北大)

- 飼育ケージ内モニタリング装置を用いた一般状態観察の自動化
 - マウスの本来の活動時間である夜間の一般状態を観察することができる。
- サーモグラフィを利用した熱画像診断の導入
 - 非侵襲的にマウスの体温変化に現れる異常の有無を検出できる。
- 網羅的遺伝子発現解析(肝、及び腎)
 - 遺伝子発現レベルでの有害情報を含めた生態影響を見落としなく評価することができる。

① 飼育ケージ内モニタリング装置 ② 化学物質暴露影響の熱画像 ③ 網羅的遺伝子発現解析と毒性パスウェイ解析: IPA-Tox (本研究遂行にてライセンス購入希望)

トキシコゲノミクスを用いた新しい毒性試験法の開発

水上(感染研)

- 有効な新規化合物がスクリーニングされた際、その化合物の特性を既存の動物試験で解析するとともに、トキシコゲノミクスのアプローチを利用し、マイクロアレイデータとして保存し、既存の150種類の化合物データベース(TG-GATES)と比較し、毒性予測が可能かを検討する。
- ヒトにブリッジングできる様に、ヒト化マウス(ヒト肝細胞置換uPA/SCIDマウス)及びHuPBL-NOGを用いて毒性プロファイルを作成し、有効なバイオマーカーを同定し、新規安全性評価法の有効性を検討する

H24-27年度:HBV治療薬(エンテカビル等)及新規化合物を用いた実験系の開発

一般毒性 | トキシコゲノム | TG-GATES | 毒性分類・予測

C57BL/6 用量・接種法 解析時間等の設定

肝臓 末梢血 cDNA/miRNA

Informatics バイオマーカーの同定 QGPによる迅速化

HBV感染に伴う宿主の代謝変化の解析

相崎(感染研)

細胞培養系 | キメラマウス

Tet OFF

感染

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した。TetON/OFF細胞系でHBVを産生をめざしたものの、コントロールが不完全であり、比較メタボロームはできなかった。キメラマウスを用いることも検討したが、血中HBV量は安定して多かったものの、感染細胞の数は少なく、均一でなかった。

明里(京大)

<平成24年度の preliminary な結果>

- 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。

<平成24年度末(H25 年 3 月)までの計画>

- コモンマーモセットへのHBV感染実験を実施する

<平成25年度の計画>

- コモンマーモセットへの HBV 感染実験において、血中 HBV RNA を経時的に定量し、HBV のサル個体における増殖について評価する。
- 本研究班で作成された抗 HBV 候補薬剤について、実験用霊長類を用いた安全性評価を実施する。

<5年間の目標>

- 本研究班で作成された抗HBV候補薬剤について実験用霊長類を用いた安全性評価を実施
- HBVに感受性の高い実験用霊長類の同定、および個体内でのHBV動態解析
- 確立されたHBV感染霊長類モデルによる抗HBV候補薬剤の有効性評価

HBV感染モデルマウス撮像環境の整備: 渡辺(理研)

PET撮像用アイソレーションボックス

■ 理研OMISでPET撮像用に開発したアイソレーションボックスに、長時間の撮像を可能にするため麻酔ガス導入口と体温調節用のホットパッド、直読プローブを導入(作成中)。

■ ULPA (Ultra Low Penetration Air) フィルタ 捕集効率: 0.15 μm の粒子を99.9995%以上 粒径がこれ以下でも以上でも、捕集効率は増加することから、HBVウイルスのサイズにも対応可能。

ULPA フィルタを装着

HBV感染動物のPET観察用の機材を備え付けた。

平成24年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

課題番号：H24-B創-肝炎-一般-004

予定期間：H24年度からH28年度まで

研究代表者：脇田隆字

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：部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 200,000,000円

I. 研究の意義

(1) これまでの肝炎対策研究により HCV の基礎研究は飛躍的に進み、HCV キャリアに対する抗ウイルス療法は改善されてきた。しかし、HBV キャリアに対する治療法は未だに不十分であり、より良い治療法を提供することが必要である。HCV 研究の経験からもウイルスの基礎研究の進展が効果的な新規抗ウイルス薬の開発に最も重要と考えられる。従って、B型肝炎に対する創薬研究を進めるために HBV の感染複製増殖機構の解析はすべての研究の要となる。本研究により我が国における HBV 研究のレベルを世界最高水準に引き上げることを目指す。

(2) B型肝炎創薬研究では研究班の間の連携が重要である。本研究の研究成果はウイルス培養系・動物モデル開発・創薬スクリーニングなどの研究班に提供する。また、肝炎ウイルス研究にかかわる若手研究者の育成をおこなう。

(3) 肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。また、HBV の新規創薬ターゲットの発見および新規治療法の開発に繋がることを期待でき、本邦のみならず世界の保健・医療福祉向上に多大な貢献が期待される。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) B型肝炎の治療には逆転写酵素阻害剤が導入されたが、単剤の治療ではウイルス排除は困難で、また抗ウイルス薬を中止することも難しい。さらに薬剤耐性ウイルス出現のリスクがある。従って、多くのHBVキャリアの治療法開発、改善のために新たな抗HBV治療薬の開発が必要である。

(2) B型肝炎の新規治療薬開発に向けて、HBVの感染複製増殖機構の解明を目指す。HBVは細胞表面から細胞内へ侵入し、核へ運ばれる。核内で不完全二重鎖DNAが完全二重鎖となり、cccDNAとなる。複数のウイルスRNAが転写され、翻訳されたコアタンパクが形成するキャプシドにpregenomic RNAが逆転写酵素と共にパッケージングされ、ヌクレオキャプシドを形成する。pregenomic RNAはキャプシド内でマイナス鎖DNAに逆転写され、さらにプラス鎖DNAが合成され不完全二重鎖DNAとなる。ヌクレオキャプシドはHBs抗原を表面に持つエンベロープを被り、ウイルス粒子が完成して細胞外へ分泌される。このウイルスの生活環の各過程を詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明して新たな抗ウイルス薬標的を同定する。

(3) 研究代表者はHBVが持続的に複製増殖し、ウイルス粒子を産生する培養細胞や、HBV感染感受性を有する培養細胞を用いて、ウイルス複製増殖過程の解析を開始している。また、研究分担者に必要な研究材料を配布できる体制にある。HBVのウイルス感染、複製増殖系を抑制する化合物の探