

II. 分担研究報告

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

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

所属 熊本大学大学院生命科学研究部・血液内科学分野

研究代表者 満屋 裕明

研究協力者 天野 将之

研究協力者 鎌田 伸好

研究要旨：本研究は日本と世界で広く用いられている B 型肝炎ウイルス (HBV) の核酸系逆転写酵素 (RT) 阻害剤である entecavir (ETV) 等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロフィールが ETV 等とは異なり、耐性発現の出現を許さない (又は著しく遅延させる) 新規の薬剤をデザイン・合成・同定し、臨床開発へと進めようとするものである。本プロジェクトは新規の HBV 感染症治療薬の臨床開発に特化、焦点を定め、新規の候補薬の合成・探索・同定を一義的な目的とし、HBV をトランスフェクトした肝癌細胞株によるハイスループットな薬剤評価系を開発、HBV 各遺伝子型感染肝炎モデル動物を用いてリード化合物を評価、要に応じて特許申請等を行いながら、最適化 (optimization) を進め、PK/PD 及び安全性の検討を同時的に行い、前臨床、早期臨床試験を視野に入れたプロジェクトとし、実用化に繋ぐ。

A. 研究目的

本研究では抗 HBV 活性を有する新規化合物のデザイン・合成を目途 (もくと) として、結晶解析学などを駆使した HBV の逆転写酵素の活性部位の微細構造の解明に着手する。既に満屋研究グループは未発表誘導体を始めとして 100~150 個のヌクレオシド誘導体を手にしており、少なくともその一部は HIV-1 の RT に対して一定の阻害能を有している事を確認している。本プロジェクトではヌクレオシド系 RT 阻害剤に必ずしも限定せず、必要に応じて抗 HIV 剤として既に確立されている非ヌクレオシド系 RT 阻害剤で HBV 活性を有する物質をも

対象として探索・デザイン・合成・同定を進める。研究代表者 (満屋) は既に 3 種類の HIV の逆転写酵素 RT 阻害剤の臨床応用に成功しており、HBV の RT 阻害剤の初期開発の経験も有することから実薬の開発に成功する可能性は高いと期待される。また第二世代のプロテアーゼ阻害剤で HIV 感染症/AIDS のファーストライン治療薬として世界中で汎用されている darunavir の開発にも成功しており、本プロジェクトによって RT 阻害剤とは異なったクラスの実薬開発に成功する可能性も低くないと期待される。そのようなリード化合物が同定されれば、HBV ウイルス変異株をヒト肝細胞キメラ

マウスに感染させた肝炎モデルを用いて、HBV 遺伝子型や各種変異体における新規抗ウイルス薬の評価を行い、劇症肝炎や肝線維、肝発癌などの病態に与える影響についても検討を重ねる。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗HIV-1活性評価：抗HIV-1活性の評価には実験室内野生株であるHIV-1_{LAI}株およびヒトT細胞由来MT2細胞を用いたMTTアッセイ法を用いた。また各化合物の細胞毒性は、MT2細胞及びヒト肝癌由来の細胞株であるHuh-7細胞、HepG2細胞を用いたMTTアッセイにより評価した。

2) 検討中の化合物の抗HBV活性評価：抗HBV活性の評価にはHBVを持続的に産生するHep2.2.15.7細胞を用いた。Ficoll-Paqueを用い選択することでHep2.2.15.7細胞のviabilityを高めた後、 4×10^3 個ずつ96穴プレートに播き、day 3で化合物を含む液体培地と上清を交換し、day 7で全wellの培養上清をそれぞれ回収し、viral DNAを抽出した後、Primerdesign社のqPCR detection kitおよびIllumina社のPCR機器を用いたreal time PCR法を用いて各化合物の抗HBV活性を評価した。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当するIRBで倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。他方で臨床応用に必要な検討事項についても検討して、同時に大手製薬企業へのライセンス化を図る。

C. 研究結果

B型肝炎の治療薬、lamivudine (3TC; Zeffix®)、tenofovir (TDF)、entecavir (ETV)、更に最近我々が同定して初期開発に成功、米国メルク社に導出して臨床開発途上にある、野生型と多剤耐性HIV-1株の双方に強力な活性を発する次世代型逆転写酵素阻害剤 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) のHBV及びHIVに対する活性を定量して次のような結果を得た。

3TCとTDFはHBVとHIVの双方に対して中等度の活性を発揮したが、ETVはHBVに強力な活性を示すものの、HIVには殆ど活性を示さなかった。対してEFdAはHIVに対して強力な活性を発揮するが、HBVには殆ど活性を発揮しなかった。このようなデータは (i) HIVのRTの活性部位(結晶解析データあり)の構造がHBVのRTの構造(結晶構造は知られていない)とは可成り異なること、更に(ii)これ迄にHIVに対する活性が低い事でdeep freezerに「保存」されたままになっているcompoundsのある種のものがHBVに対して強力な活性を発揮する可能性がある事を示唆した。次いで我々は抗HBV活性と抗HIV-1活性を有すると期待される新規に合成されたヌクレオシド誘導体67種類(分子量:239.2-455.3)について、MT2細胞を標的細胞としたMTT assay法により野生株(HIV-1_{LAI})に対する抗HIV活性、及びヒトT細胞由来の細胞株であるMT2細胞に対する細胞毒性、加えてヒト肝癌由来の細胞株であるHuh-7細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、67化合物中23化合物が野生HIV-1株に対し1 μ M未滿のEC₅₀値を有し、実測値はEC₅₀:0.0001-0.9104 μ Mであった。また、67化合物中52化合物はMT-2細胞に対してCC₅₀

(50% cytotoxicity concentration : 50 % 細胞毒性濃度) 値が 100 μM を超え、明らかな毒性を示さなかった。また、このうち 37 化合物中 24 化合物は Huh-7 細胞に対して明らかな毒性を示さなかった。これら新規の核酸アナログ候補化合物のうち、37 化合物について HBV 持続産生細胞 Hep2.2.15 細胞と real-time PC 法を用いることにより抗 HBV 活性を評価した結果、YMS-1143, -1144, -1145, -3072 の 4 化合物において、0.043 ~ 0.0004 μM の EC_{50} 値で HBV の DNA 合成を阻害することが判明した。

また研究分担者原口博士のグループが新規に合成した 21 種類の核酸アナログの抗 HBV 活性評価を終了し、このうち adenine analog である KMA-35-52, -36-177, -XL-52 において中程度の抗 HBV 活性 (EC_{50} : 0.019 ~ 0.046 μM) と低い細胞毒性 (HepG2 細胞に対する CC_{50} : > 100 μM) を認めた。またデオキシリボースの 4' 位に fluoromethyl を付加した guanine analog である SK13-092b において高い抗 HBV 活性 (EC_{50} : 0.004 μM) を認めたが、MT2 細胞、HepG2 細胞に対する CC_{50} が 3.3 ~ 2 μM と比較的強い細胞毒性を有することが判った。また ETV analog である TOM-II-20 において、ETV とほぼ同程度の抗 HBV 活性および ETV よりも軽度な細胞毒性を認めた。

D. 考察

我々 (満屋研究グループ) は未発表誘導体を始めとして 150~200 個のヌクレオシド誘導体を手にしており、少なくともその一部は HIV-1 の RT に対して一定の阻害能を有している事を確認している。本研究ではヌクレオシド系 RT に必ずしも限定せず、必

要に応じて抗 HIV 剤として既に確立されている非ヌクレオシド系 RT 阻害剤で HBV 活性を有する物質も対象として探索・デザイン・合成・同定を進めていくが、既に候補化合物群において抗 HBV 活性を示す複数の化合物を同定し得た。これら抗 HBV 剤候補化合物のうちいくつかは、分担研究者である田中博士のグループで HBV 感染マウスモデルを用いた評価が進行中である。

今後本研究において得られるであろう HBV RT の微細立体構造の知見も基にしながら、これら hit 化合物の構造最適化・合成展開を図り、更に強力な抗 HBV 感染症治療薬の開発に推進していく。

E. 結論

近年に至って、C 型肝炎ウイルス (HCV) による肝炎の治療は長足の進歩を遂げて、現在開発中の抗 HCV 薬が臨床で使用可能となると、殆どの HCV 感染者で「治癒」が得られると期待される。しかし、HBV に対する新規の治療薬の開発は遅々として進まず、HBV を体内から除去するという意味での「治癒」をもたらす治療法は極めて困難とされており、また現在使用されている治療薬に対しても耐性を獲得した HBV 変異株の出現が大きく懸念されている。本プロジェクトで、これ迄より強力で HBV の耐性獲得に抵抗する新規の治療薬の開発が成功すれば、現在日本国内に 150 万人存在すると推定される HBV 保有者に大きく裨益すると思われる。殊にそうした保有者の 5% が慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症するとされるので、QOL のみならず救命も可能となり、国民衛生に大きく資する事となると期待される。また本プロジェクトでは HBV

逆転写酵素の活性部位の微細構造の解明をも併せて行い、HBVの生物学を明らかにする事で、HBVの更に効果的な制御をも視野に入れており、他のウイルス感染症の制御の方途を探る上でも貢献するものと期待される。また本プロジェクトではキメラマウスを用いたB型肝炎モデルを作製する事で、HBV変異株に対する新規薬剤の作用の観察が可能となることで新規治療薬の開発のタイムスケールの大幅短縮が期待され、将来のHBVの新規の治療薬開発にも大きく貢献すると強く期待される。

F. 研究発表

論文発表（当該年度のみ）

該当なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

PK/PDの解析と毒性評価に関する研究

分担研究者 小田切 優樹 崇城大学薬学部・教授

研究要旨

新規薬物の開発段階で、吸収 (Absorption)・分布 (Distribution)・代謝 (Metabolism)・排泄 (Excretion) を始めとした ADME に、毒性評価 (Toxicity) を加えた、いわゆる ADMET を動物実験において詳細に明らかにすることは、臨床試験時の基盤的な予備情報 (薬物の薬効や安全性) を構築する上で有用である。そのため、薬物動態試験及び毒性評価は前臨床、臨床試験段階において必要不可欠な検討項目である。これらの ADMT を評価する上で、健常動物における評価に加え、病態モデルを用いた評価は非常に重要である。そこで本年度は、B型肝炎モデル動物を用いた評価を想定し、肝機能の評価法と肝組織評価法の構築を目的にした。その際、B型肝炎モデル動物の代替としてアセトアミノフェン (APAP) 誘発急性肝障害モデル及び四塩化炭素 (CCl₄) 誘発慢性肝障害モデルを用い行った。

A. 研究目的

新規薬物が臨床試験に導入されるためには、前臨床試験での製剤化試験・薬物動態試験・薬理試験・毒性試験など数多くの試験をクリアする必要がある。中でも、吸収 (Absorption)・分布 (Distribution)・代謝 (Metabolism)・排泄 (Excretion) を始めとした ADME に、毒性 (Toxicity) を加えた、いわゆる ADMET を詳細に明らかにすることは臨床試験時の基盤的予備情報 (薬物の薬効や安全性) を構築する上で必要不可欠な検討項目である。これらの ADMT を評価する上で、健常動物を用いた評価はもちろんのこと、新規薬物の適応疾患モデル動物を用いた評価は臨床状態に近い所見を観察する可能性が高く、有用な情報を提示すること

が期待できる。特に、本事業で開発中の新規薬物は B型肝炎を標的にしており、肝機能が低下している状態である。一般的に、肝臓の状態の変化は薬物の ADME に影響を与える結果、薬理効果や毒性の発現にも大きく寄与することが知られている。そのため、新規薬物の ADMT の評価には一般的な健常動物を用いた検討に加え、肝機能障害の度合いを考慮した評価が必要と考えられる。そこで、昨年度行った定量用質量分析計 Xevo G2 TOF システム (Waters) のセットアップに続き、本年度は B型肝炎モデル動物の代替としてアセトアミノフェン (APAP) 誘発急性肝障害モデル及び四塩化炭素 (CCl₄) 誘発慢性肝障害モデルを作成し、肝機能の評価法の確認及び確立を行った。

B. 研究方法

1. CCl₄誘発慢性肝障害モデルラットの作成

SD 系雄性ラット (3 週齢) にミネラルオイルに溶解した CCl₄ (CCl₄ : mineral oil = 1 : 4) を 400 mg/kg の投与量で週 3 回、8 週間腹腔内投与し、CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルを作成した。また、実験期間中は水及び固形飼料を自由に摂水及び摂食させた。

2. APAP 誘発急性肝障害モデルマウスの作成

ICR マウス (8 週齢) に APAP を 300 mg/kg (i.p.) で投与することで作成した。日内変動を考慮し、投与時間は午後 9 時とした。また、実験期間中は水及び固形飼料を自由に摂水及び摂食させた。

3. 生化学パラメータの測定

CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラットはモデル作成終了後、APAP 誘発急性肝障害モデルマウスは APAP 投与 12 時間後に下腹静脈より採血した。血液は遠心分離 (3000 rpm、10 分間) により血漿を回収し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) を測定した。AST 及び ALT はトランスアミナーゼ CII-テストワコーを用い評価した。

4. 病理組織学的検査

採血後、各モデル動物より肝臓を摘出し、4 % パラホルムアルデヒドに浸し (4°C, overnight)、固定した。その後、厚さ 5 µm の切片となるようスライスし、パ

ラフィン包埋切片を作製した。

4-1. H.E.染色 (Hematoxylin-Eosin stain)

脱パラフィン後、流水水洗し、ヘマトキシリン液で 4 分間染色した。再び流水水洗した後、エオシン液で 60 秒間染色し、流水水洗、脱水、透徹、封入を行い、組織像を観察した。

4-2. EVG 染色 (Elastica van Gieson stain)

脱パラフィン後、ワイゲルト・レゾルシンフクシン液 で6時間染色し、100 % エタノールで分別を行った。流水水洗後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液で5分間染色し、再び流水水洗し、ワンギーソン液 (1.25 w/v % picric acid, 1 % acid fuchsin solution) で10分間染色した。その後、分別、脱水、透徹、封入を行い、組織像を観察した。

C. 研究結果

1. APAP誘発急性肝障害モデルマウスを用いた肝障害の評価

まず初めに、APAP誘発急性肝障害モデルを作成し、肝障害マーカーの一種であるAST及びALTを測定することで肝機能を評価した。その結果、健常マウスに比べ、APAP誘発肝障害モデルマウスにおいてAST及びALTの著しい上昇が確認された (Figure 1A and B)。また、肝組織切片を作成し、H.E.染色により肝組織の評価を行った結果、APAP誘発肝障害時に見られる血管周囲の壊死が確認された (Figure 1C)。

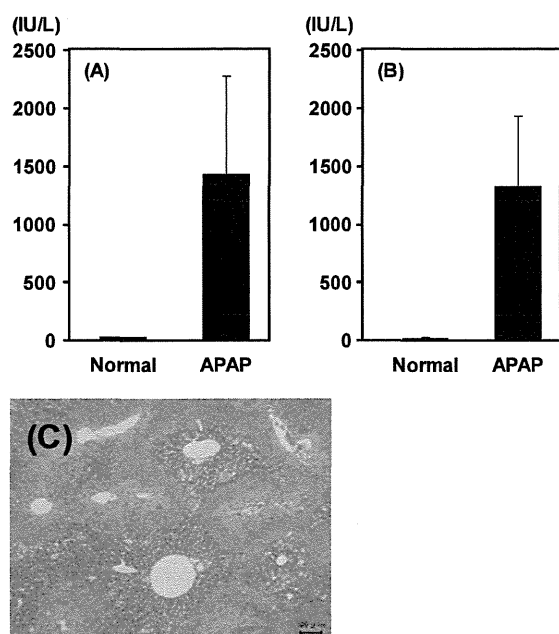


Figure 1
Biochemical parameters (A) AST and (B) ALT in normal mice and a APAP induced acute liver injury model mice. (n=6) (C) Light micrographs of liver stained with H&E.

2. CCl₄誘発慢性肝障害モデルラットを用いた肝線維化の評価

次に、B型肝炎時には肝硬変に進展する場合は考えられる。そこで、肝臓の線維化の評価を行うためにCCl₄誘発慢性肝障害モデルラットを作成し、肝線維化の評価を行った。評価法は、線維化部位を赤く特異的に染色するEVG染色を選択し、評価した。その結果、健常時には確認されなかった肝臓の線維化がCCl₄誘発慢性肝障害モデルラットでは確認された (Figure 2)。

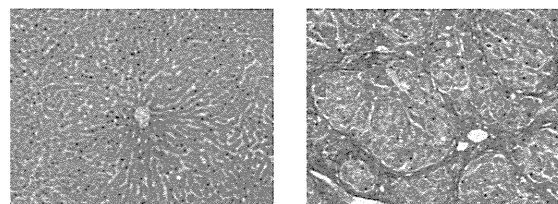


Figure 2
Light micrographs of livers stained with EVG stains: Normal group (left) and CCl₄ treated group (right).

D. 結論

今回、APAP誘発急性肝障害モデル及びCCl₄誘発慢性肝障害モデルを用いた検討ではあったが、一般的な肝機能の評価法の確認及び確立に成功した。将来的には他の分担研究グループの協力によりB型肝炎モデル動物の作成を作成し、ADMETの評価に用いる予定である。また、来年度以降には、新規化合物が完成することが予想され、完成し次第、まずは定量用質量分析計Xevo G2 TOFでの測定条件の設定を行い、その後、健常動物及び病態モデル (B型肝炎モデル動物) を用いたADMETの評価を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, T G Chuang V, **Otagiri M**, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced

- hepatitis. *Mol Pharm.* (2014) *in press*
2. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirono S, **Otagiri M**, Maruyama T. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. *PLoS One.* (2014) 9(2):e87919.
 3. Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, **Otagiri M**. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int.* (2013) 353892.
 4. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* (2014) 9(1):e85216.
 5. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* (2014) 1840(3):1152-62.
 6. Chuang VT, **Otagiri M**. Photoaffinity labeling of plasma proteins. *Molecules.* (2013) 18(11): 13831-59.
 7. Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, **Otagiri M**. Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci.* (2013) 93(25-26):1017-22.
 8. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko KI, Iwata H, Kotani S, Nakajima M, Ishima Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clin Exp Nephrol.* (2013) *in press*
 9. Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci.* (2013) 102(10):3852-9.

10. Nishijima M, Kato H, Fukuhara G, Yang C, Mori T, Maruyama T, **Otagiri M**, Inoue Y. Photochirogenesis with mutant human serum albumins: enantiodifferentiating photo-cyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate. *Chem Commun.* (2013) 49(67):7433-5.
11. Altaf A, Aldawsari H, Banjar MZ, Anraku M, Iohara D, **Otagiri M**, Uekama K, Hirayama F. Preparation of soluble stable C₆₀/human serum albumin nanoparticles via cyclodextrin complexation and their reactive oxygen production characteristics. *Life Sci.* (2013) 93(7):277-82.
12. Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate- encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(8):1584-91.
13. Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5435-43.
14. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(12):5465-72.
15. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, **Otagiri M**, Maruyama T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* (2013) 345(2):271-83.
16. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, **Otagiri M**, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide.* (2013) 30:36-42.
17. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, **Otagiri M**. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1830(4):2917-23.
18. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* (2013) 83(4):582-92.

19. Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, **Otagiri M**, Kawai K. Pharmacokinetic alteration of (99m)Tc-MAG3 using serum protein binding displacement method. *Nucl Med Biol.* (2013) 40(3):366-70.
20. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* (2013) 83(3):446-54.
21. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(1):141-8.
2. 学会発表
(主な国際発表)
1. S-nitrosated a-1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. Kaori Watanabe, Yu Ishima, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
2. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidative and anti-inflammatory modulator, against acetaminophen-induced acute liver failure. Ryota Tanaka, Hitoshi Maeda, Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Toru Maruyama, **Masaki Otagiri** (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
3. Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. Shigeru Ogaki, Kazuaki Taguchi, Hitoshi Maeda, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
4. Mechanism of enhanced cysteinylolation of Cys34 in human serum albumin in chronic liver disease. Kohei Nagumo, Tadashi Imafuku, Naoyuki Yamada, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)
5. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. Hiroshi Watanabe, Azusa Kodama, Ryota Tanaka, Hisae Tanaka, Victor Tuan Giam Chuang, Yu

Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri, Toru Maruyama (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

6. Safety and pharmacokinetic evaluation after a massive intravenous infusion of hemoglobin- encapsulated liposome (Hemoglobin-vesicles) in cynomolgus monkeys. Kazuaki Taguchi, Hiroshi Watanabe, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013, Jeju, Korea, 2013/11/21-22)

7. Preclinical studies of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier in non-human primate. Kazuaki Taguchi, Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Koichi Kobayashi, Toru Maruyama, Masaki Otagiri (The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

8. Artificial red cells (hemoglobin-Vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics. Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Horoshi Azuma, Masaki Otagiri, Koichi Kobayashi (The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Chengdu, China, 2013/10/18-21)

9. Albumin -Thioredoxin Fusion Protein is

Effective in Suppressing Lung Injury. Masaki Otagiri (9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Orlando, 2013/5/12-15)

10. Development of recombinant serum albumin. Masaki Otagiri (The International Liver Congress 2013 48th annual meeting of the European association for the study of the liver, Amsterdam, the Netherlands, 2013/4/24-28)

(主な国内発表)

1. 健常及び病態時における血小板代替物 H12(ADP)リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響 橋本麻衣、大柿滋、氏平隼人、田口和明、渡邊博志、藤山淳史、土井麻美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹、丸山徹 (第20回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

2. 一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製 田口和明、永尾紗理、丸山徹、小田切優樹 (第20回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

3. 出血性ショック輸血後の肝障害に対する一酸化炭素付加赤血球の保護メカニズム 丸山 徹、大柿滋、田口和明、前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹 (第20回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

4. 妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発 太田英伸、李コ

ウ、田口和明、大柿滋、泉仁美、稲垣真澄、岡村州博、小田切優樹、酒井宏水、八重樫伸生 (第20回日本血液代替物学会年次大会, 奈良, 2013/12/6-7)

5. クッパー細胞選択的チオール送達によるアセトアミノフェン肝障害治療法の開発 前田 仁志、平田憲史郎、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第28年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

6. アルブミン-チオレドキシシン融合体によるシスプラチン腎症予防効果 小玉あずさ、田中遼大、渡邊博志、異島優、深川雅史、小田切優樹、丸山 徹 (日本薬剤学会第28年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

7. 高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高めるS-ニトロソ化アルブミンダイマーのEPR効果増強作用 異島優、方軍、前田浩、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第28年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

8. クルクミンと血清アルブミンの相互作用と抗酸化活性への影響 佐藤弘樹、異島優、渡邊博志、山崎啓之、安楽誠、小田切優樹、丸山 徹 (日本薬剤学会第28年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

9. インフルエンザ肺障害に対するニューキノロン系抗菌薬の有効性評価 榎木裕紀、田中遼大、宮本洋平、異島優、渡邊博志、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第28年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

10. 尿毒症物質p-クレジル硫酸の腎排泄過程におけるhOATsの関与 坂口義明、渡邊博志、宮本洋平、異島優、金子健一、岩田宏、小田切 優樹、丸山徹 (日本薬剤学会第28年会, 愛知, 2013/5/23-5/25)

11. アルブミン-チオレドキシシン融合蛋白質はヨード造影剤腎症の発症を予防する 渡邊博志、小玉あずさ、田中遼大、田中寿絵、異島優、深川雅史、小田切優樹、丸山徹 (第56回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013/5/10-5/12)

12. 骨髄標的化エリスロポエチンの製剤設計と腎性貧血治療への応用 丸山徹、宮崎裕理、田口和明、渡邊博志、宗慶太郎、田中元子、松下和孝、深川雅史、小田切優樹 (第56回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013/5/10-5/12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

臨床試験データマネジメント

分担研究者：新保卓郎 国立国際医療研究センター医療情報解析研究部

研究要旨： 本分担研究では、JCRAC データセンターの整備を実施している。本年度の活動は主に、(1) データマネジメント業務の標準化、(2) 品質管理体制の強化、であった。(1) について、SOP 検討会議を 24 回開催した。今年度、新規に作成した SOP やマニュアルは 9 種類であった。また既に作成されたものに関して、今年度 23 件の改訂を行った。SOP の周知のため、データマネージャーによる再確認やクイズの作成、実施を行った。(2) のために、データセンター内に品質保証部門を設置した。またデータセンター内で自主点検を平成 25 年 11 月 5 日、7 日に実施した。自主点検内容は、1) SOP、マニュアルの確認、2) 複数の研究でデータセットと原本の一致の確認、3) 契約書類の確認、4) 各研究の保管すべき資料の確認、などであった。点検後の指摘事項を受け、改善作業を実施している。今後国内においてより信頼性の高い臨床研究を実施していく必要がある。アカデミアでのデータセンター機能を強化し、試験データの品質保証、品質管理が着実に実施されるべきである。

A. 研究目的

最近、国内では降圧剤臨床試験に関わる事件が報告され、その中で利益相反の管理や臨床試験のデータの品質管理の在り方が問題とされている。本研究班の分担研究課題の遂行のため、研究開発の出口戦略の一環として、JCRAC データセンターの整備を実施している。本年度の活動は主に、(1) データマネジメント業務の標準化、(2) 品質管理体制の強化、であった。このようなアカデミアでの独立したデータセンターによるデータ管理の体制が確立されれば、アカデミアにおいてデータマネジメントの方法を蓄積し臨床医に還元できると考えた。

B. 研究方法

(1) データマネジメント業務の標準化のために、Standard Operating Procedure (SOP) やマニュアルの整備を行った。また SOP 準拠のための教育体制を整備した。(2) 品質管理体制の強化のために、品質保証部門の設置、DM 計画書の承認体制、自主点検の導入、他施設データセンターとの相互監査の可能性を模索した。

C. 研究結果

データマネジメントの業務フローは図 1 のように整理できると考えられた。そしてこれに対応した SOP を作成することとした。SOP 検討会議を 24 回開催した。今年度、新規に作成した SOP やマニュアルは 9 種類であった。また既に作成されたものに関して、今年度 23 件の改訂を行った。

全体として、付表 1 のような SOP を整備した。

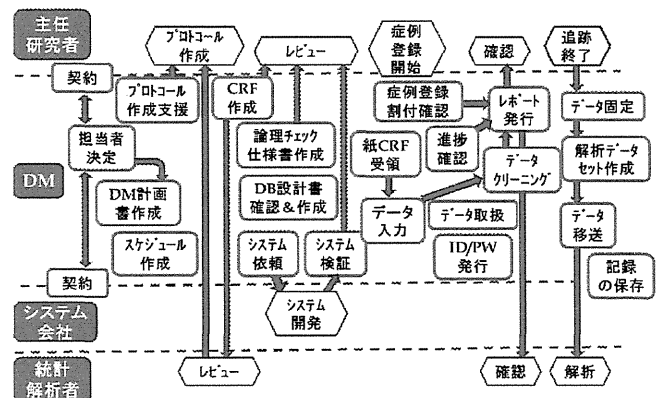


図 1：データマネジメントの業務フロー

作成した SOP 等の周知を図るため、データマ

ネージャー全員による SOP の再確認を実施した。SOP ごとに理解度確認クイズ 2 問を作成し、データマネージャーの SOP 理解度を評価・確認した。正答率は平均 95%であり、SOP を熟知していると思われた。

品質管理の体制構築を進めた。図 2 のような形でデータセンター内に品質保証部門を設置した。そして DM 計画書の承認体制を明確化した。

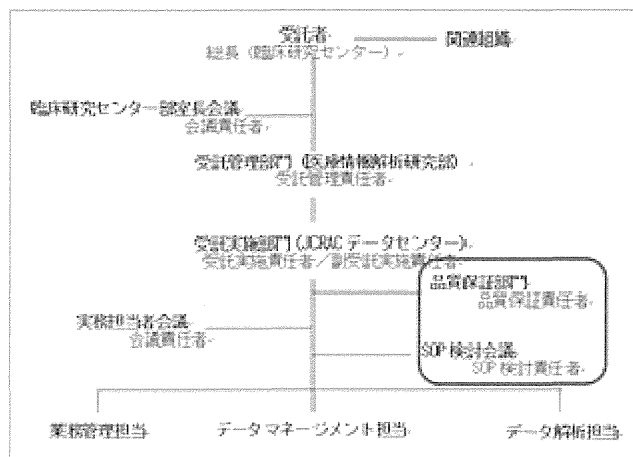


図 2 : JCRAC データセンターの組織体制

他部署の独立した立場から点検を受ける形で、データセンター内で自主点検を実施した。これは内部監査を模したものである。平成 25 年 11 月 5 日、7 日に実施した。

自主点検内容は下記のようなものである。

- 1) SOP、マニュアルの確認
- 2) 下記 3 研究のデータセットと原本の一致の確認。
 - ①自殺企図の再発防止に対する複合的ケースマネジメントの効果：多施設共同による無作為化比較研究
 - ②2 型糖尿病における経口血糖降下薬療法に関する研究- メトホルミン、シタグリプチンの認容性と有効性の比較に関する臨床研究、
 - ③胎児尿路閉塞性疾患に関する全国実態調査
- 3) 契約書類の確認
- 4) 各研究の保管すべき資料の確認

点検の結果、指摘事項として例えば、治験レベルを目指し ICH-GCP 準拠を検討、品質管理・

品質保証の運用記録の作成、データマネージャーの研修履歴作成、内部でプログラム作成を行った場合の検証、などが指摘された。これらの事項について、現在検討し改善中である。

また国立がん研究センター (JCOG データセンター) を訪問し、データセンター間での相互監査の可能性に関して討議し、前向きに検討していくこととした。

D. 考察

国内では臨床試験データの品質管理の在り方が問題とされている。現在、疫学研究に関する倫理指針と臨床研究に関する倫理指針を統合した新たな倫理指針の改訂作業が行われている。臨床研究においても、品質に関する要求水準が高くなる可能性がある。アカデミアでのデータセンター機能を強化し、臨床医が主体となった信頼性のある臨床試験を実施できる体制を構築する必要がある。

E. 結論

JCRAC データセンターにおいて (1) データマネジメント業務の標準化、(2) 品質管理体制の強化をはかった。これにより、本研究班の出口段階において信頼性のある臨床試験が実施できることを目指した。またアカデミアで品質の高い臨床試験が実施できる基盤構築に寄与することを目指した。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表 :

- 1) 新保卓郎 3. 診療ガイドラインの社会的意義と問題点 3) ガイドライン作成の社会的意義と評価および法的側面: 信頼されるガイドラインへ 日内会誌 2013;102: 2307-2312

2. 学会発表 :

- 1) 第 110 回日本内科学会総会・講演会、シンポジウム 「ガイドライン作成の社会的意義と評価、法的側面」 平成 25 年 4 月 14 日、東京
- 2) 第 4 回日本プライマリ・ケア連合学会学術

大会、Meet the Expert、「臨床研究に関する倫理指針」と介入研究の倫理、2013年5月19日、仙台

3) 第86回日本整形外科学会学術総会
教育講演「トップジャーナルを目指す臨床研究の進め方」、2013年5月24日、広島

4) 第51回日本癌治療学会学術集会 シンポジウム「がん研究の透明性と出版倫理」、診療ガイドラインの利益相反管理、11月25日、京都

G. 知的財産権の出願・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

付表 1 : SOP 一覧

文書番号	文書名	文書番号	文書名
CR 01	受託研究契約等に関する標準作業手順書	DM 06-26	XX 研究 EDC システム検証結果
CR 02	受託研究契約締結までの手順	DM 06-16	EDC システム新規・変更マニュアル
CR 03	新規受託研究契約の進め方	DM 06-25	XX 研究システム依頼管理台帳
CR 04	NCGM 内研究のデータマネジメント業務支援について	DM 06-15	EDC システム障害時マニュアル
CR90	料金設定の基本的考え方	DM 07	研究参加者名簿管理マニュアル
GR 01	JCRAC データセンター標準作業手順書総則	DM 08	ID パスワード発行マニュアル
GR 01-01	様式責任者任命書	DM 09	症例登録割付の DM マニュアル
GR 01-02	様式 SOP 逸脱記録	DM 10-22	データクリーニングマニュアル
GR 02	JCRAC データセンター会議体規定	DM 10-28	XX 研究データハンドリングレポートマニュアル
GR 03	標準業務手順書 (SOP) およびマニュアルの修正手順書	DM 10-29	XX 研究モニタリングレポート
GR 04	JCRAC データセンター個人情報取扱いのための安全管理規程	DM 11	データ取扱マニュアル (修正手順を含む)
GR 05	職員教育マニュアル	DM 12	データおよび資料等の保管・廃棄マニュアル
GR 06	TQM マニュアル	DM 12-30	XX 研究 DM 資料管理記録
GR 07	SOP 検討会議運営規程	DM 13	安全性情報の対応マニュアル
GR 99	JCARC データセンター標準作業手順書総則変更履歴	DM13_1	安全性情報の対応マニュアル_様式 1
AR 01	JCRAC データセンター業務概要/運用手順書	DM13_2	安全性情報の対応マニュアル_様式 2
DM 00	データマネジメント業務に関する標準作業手順書	DM 14	提出資料等の作成マニュアル
DM 01	データマネジメント業務に関するマニュアル	DM 17	データ入力マニュアル
DM 01-00	データマネジメント業務に関する作業工程	DM 17-27	XX 研究データ読替えマニュアル
DM 01-23	XX 研究 DM 担当者等指名書	DM 17-32	紙 CRF 受領マニュアル
DM 01-24	XX 研究に関する研究開始時までのスケジュール	DM 18	データ移送マニュアル
DM 02	研究計画書作成支援マニュアル	DM 19	データ固定マニュアル
DM 03	CRF 新規作成と変更マニュアル	DM 20	解析データセット作成マニュアル
DM 04	論理チェック仕様書作成マニュアル	DM 21	問い合わせ・苦情対応マニュアル
DM 05	データベース設計書確認マニュアル	DM 31	バックアップマニュアル
DM 06	EDC システム検証マニュアル		

厚生労働省科学研究費補助金
(B 型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書

候補化合物の生体内での抗 HBV 効果の評価と HBV ゲノム変異の動態解析
分担研究者： 山梨大学大学院医学工学総合研究部・教授

榎本 信幸

研究要旨:分担者は、本研究班の目的である B 型慢性肝炎に対する新しい核酸アナログの開発に向けての研究を進めていくにあたり、HBV 治療の現状とその予後についての情報収集と解析を行うことにより、新規薬剤の治療対象・治療目標を明らかとし、一方で大量に存在する臨床情報とリンクした血液検体を用いた HBV ゲノムを次世代シーケンサーにて解析することにより HBV 変異体の臨床的意義や新規薬剤に対する HBV 変異体の動態解析を行ってゆく。

平成 25 年度は臨床的な検討において、エンテカビル導入後ウイルス量が減少しても、肝臓は十分に減っておらず、HBs 抗原の減少も不十分であることを明らかにした。一方、次世代シーケンサーを用いた HBV の preS 領域、ポリメラーゼ領域の deep sequence 解析を行い、preS 領域の変異・欠失が肝病態の進展と HBs 抗原量低下に関与すること、ポリメラーゼ領域には核酸アナログ未投与でも耐性変異はわずかに存在することを示した。

共同研究者氏名

坂本 穰

山梨大学医学工学総合研究部 准教授

前川 伸哉

山梨大学医学工学総合研究部 講師

ものとは言えない。すなわち、核酸アナログは単剤投与が治療の中心であるが、HIV 治療におけるカクテル療法などと比べて耐性出現の確率は高いことが考えられる。また現行のアデホビルは腎機能障害症例に使いにくい。一方、従来の核酸アナログの肝発癌に対する進展抑制が実際に生じているのか、未だ明らかとはなっていない。

分担者は本研究班において HBV 治療の現状とその予後についての情報収集と解析を行うことにより、新規薬剤の治療対象・治療目標を明らかとし、一方で大量に存在する臨床情報とリンクした血液検体を用いた HBV ゲノムを次世代シーケンサーにて解析することにより HBV 変異体の臨床的意義

A. 研究目的

B 型慢性肝炎感染は肝硬変・肝発癌のハイリスクである。近年、核酸アナログ製剤の開発により肝炎の治療は大きな進歩が認められ、慢性肝炎から肝硬変への進展抑制は効率よく抑えることが可能となった。一方、現行の HBV 治療も、現在は使用できる核酸アナログが限られており、未だ十分な

や新規薬剤に対する HBV 変異体の動態解析を行ってゆく。

B. 研究方法 (2013 年度)

(1) 核酸アナログを投与した症例において、臨床的ウイルス反応性、ウイルスマーカーの消長、核酸アナログ投与後の発癌リスクについて 2012 年度よりも症例を増やして検討した。

(2) 核酸アナログ未投与 HBV 感染症例における HBV ゲノムの preS 領域に注目し、同部位の変異・欠失と肝病態との関連を次世代シーケンサーを用いた deep sequence によって検討した。

(3) 核酸アナログ自然耐性変異の有無について 23 症例 (inactive carrier 12 症例 vs. HCC 11 症例) におけるポリメラーゼ領域に注目して次世代シーケンサーを用いた deep sequence によって検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究成果

(1) 山梨大学通院中の 411 例の HBV 患者を対象とした。核酸アナログ投与によるウイルス消失率は 1 年目から 4 年目まで階段状に上昇するが 4 年で 94% に達して以降プラトーとなり、症例を昨年度より増加させ、観察期間が延長しても変化は認めなかった。HCC 発症率は、核酸アナログ投与開始後、毎年 10-30% に新たに認め、5 年以上経過しても 20-30% に認め、肝発癌抑制効果を核酸アナログが有するのかわ明らかなではなかった。一方、核酸アナログ投与後 HBc 関連抗

原の低下する症例では発癌率が低下する可能性を明らかとした。一方、HBs 抗原が低下しても肝発癌率は低下しなかった。

(2) PreS2 欠失が混在する症例は、Asc16.7%、CH56%、LC62% ($p < 0.01$) と肝病態の進展につれてその割合は増大してくることが明らかになった。また HBs 抗原量と PreS 経度の関連を検討すると、PreS2 欠失 ($p < 0.01$) あるいは変異 ($p = 0.03$) HBV の混在率が高まるほど、HBs 抗原量が低下することが明らかとなった。

(3) ラミブジン (L180M、M204V/I)、エンテカビル (L180M or M204V/I+T184A or S202G or M250V)、アデフォビル (A181T、N236T) における自然耐性変異は、特に活性中心である M204V/I に加え M250I は HCC 群で 55%、inactive 群で 42% の症例に 1% 弱の比率ではあるものの有意な変異型の混在を認めた。一方、これらの混在の存在は核酸アナログ耐性と直接の関連を認めなかった。

D、E. 考察と結論

現行の核酸アナログ製剤が肝発癌に対して十分な抑制効果を持っていない可能性が示唆された。一方、近年中国などで肝病態進展・肝発癌の予測マーカーとしての有用性が報告されている HBs 抗原量は、HBV 肝疾患を取り巻く状況の異なる本邦では (高齢者が多い、核酸アナログ服用症例が多いなど)、必ずしも有用とは言えないことが明らかとなった。しかしながら、HBc 関連抗原、preS 領域の変異・欠失は肝発癌・肝病態進展のマーカーとして有用性が示され、さらなる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K. Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One*. 2013 Dec 17;8(12):e82299.
2. Maekawa S, Enomoto N. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2014 Jan;49(1):163-4.
3. Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa S, Sano K, Ichikawa T, Enomoto N. Association of splenic MR elastographic findings with gastroesophageal varices in patients with chronic liver disease. *J Magn Reson Imaging*. 2013 Nov 14.
4. Tsuchiya K, Asahina Y, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2014 Jan 15;120(2):229-37.
5. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression. *J Virol*. 2013 Dec;87(23):12541-51.
6. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2013 Jul 17.
7. Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa T, Sano K, Ichikawa S, Araki T, Enomoto N. MR-based measurements of portal vein flow and liver stiffness for predicting gastroesophageal varices. *Magn Reson Med Sci*. 2013;12(2):77-86.
8. Ichikawa S, Ichikawa T, Motosugi U, Sano K, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H, Araki T. Presence of a hypovascular hepatic nodule showing hypointensity on hepatocyte-phase image is a risk factor for hypervascular hepatocellular carcinoma. *J Magn Reson Imaging*. 2014 Feb;39(2):293-7.