

D. 考察

HBV の侵入阻害剤は、初期感染に対しては、有効であると考えられるが、一旦感染して HBV が cccDNA としてインテグレートされた肝細胞や動物モデルに対しても有効であるかどうかを検証する必要がある。NTCP は HBV 侵入の一部分を担うことは確かだが、HBV がに依存しない機構もあることがわかっている。BNC の取り込み量が HepG2-hNTCP- C4 細胞とその親株である HepG2 細胞とでそれほど変わらなかったことから、BNC を用いた侵入阻害剤スクリーニング系では、NTCP 非依存の HBV 侵入を阻害する化合物を得ることができると期待される。

HBc の二量体形成 (カプシド形成) を阻害する化合物の中には、確かに抗ウイルス活性を有する非核酸アナログがあり、今後構造活性相関研究を経てリード候補化合物を得れば、新規の抗ウイルス創薬リード化合物が得られると期待できる。HBV 感染・増殖阻害剤候補として選定した 80 化合物は、いずれも indole を含む Ergolin 誘導体、carbazole 誘導体、dioxypyrrrolopyrrole 誘導体の化合物群 I の 30 化合物および Nor-alantolactone 誘導体群 II の 50 化合物に分類される。構造活性相関解析に基づいた、これら 4 種の骨格を持つ誘導体の合成展開を進める。

来年度は、リード候補薬剤と標的タンパクとの構造解析の結果に基づき“京”コンピュータを用いたインシリコスクリーニングにより、IC50 が 2 桁低く、特異性が高い薬剤候補化合物を得る予定である。まず最初に IFN 疑似薬 RO8191 の誘導体について、このストラテジーを適用する。Science 誌 2014 年 3 月 14 日号 IFN 刺激下のリンフォトキシンβ受容体を介するシチジンデアミダーゼ活性化を介する cccDNA 分解が報告された。このような活性を有する RO8191 誘導体を得ることを目指す。RO8191 ならびにその類縁化合物の合成経路の確立ができたので、今後、本化合物の溶解性等の克服を期した分子設計・創製が可能になった。なお、合成経路の全収率に関しては、改善の余地が残されている。

E. 結論

過去 2 年間の研究から、化合物スクリーニング系の確立・導入に半年～1 年、スクリーニングの

実施に半年～1 年、リード候補化合物取得に 1 年、動物実験、毒性評価に 1 年かかることがわかった。残り 3 年間で、HBV 侵入阻害候補薬、カプシド形成阻害候補薬、転写阻害候補薬 and/or RNase H 阻害候補薬、上記 RO8191 誘導体を得ると共に、先行して進んでいる HBV 線維化阻害候補薬、劇症肝炎阻害候補薬を世の中に提示できる見込みである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- 1) Fustin, JM, Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, MS, Takeya, H., Manabe, I., Okamura, H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, 155, 793-806, 2013
- 2) Sakata, K., Hara, M., Terada, T., Watanabe, N., Takaya, D., Yaguchi, S., Matsumoto, T., Matsuura, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Yamaguchi, T., Miyazawa, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Wakita, T., Imoto, M., and Kojima, S. (2013) HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF-β type I receptor. *Sci. Rep.* 3:3243.
- 3) Qin, X-Y., Wei, F., Tanokura, M., Ishibashi, N., Shimizu, M., Moriwaki, H., and Kojima, S. (2013) Comparative studies on the effect of acyclic retinoid on metabolomics profiling of hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells. *PloS One* 8(12):e82860.
- 4) Ohno, Y., Hattori, A., Yoshiki, T., Takeya, H. Association of epigenetic alterations in the human C7orf24 gene with the aberrant gene expression in malignant cells. *J. Biochem.*, 154, 355-362, 2013.
- 4) 笠井昭太, 西村慎一, 掛谷秀昭. 熱ショックタンパク質阻害剤の現状と可能性, がん分子標的治療, メディカルレビュー社, 11, 59-64,

2013.

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- | | |
|---|--|
| <p>5) Itoh, M., Tatsukawa, H., Lee, E-S., Yamanishi, K., <u>Kojima, S.</u>, and Hitomi, K. (2013) Tissue distribution of in situ activities for transglutaminases during mouse embryo development. <i>J. Histochem. Cytochem.</i> 61(11):793-801.</p> <p>6) Miura, A., Kambe, Y., Inoue, K., Tatsukawa, H., Kurihara, T., <u>Kojima, S.</u>, and Miyata, A. (2013) PACAP type 1 receptor (PAC1) gene is suppressed by transglutaminase 2 activation through crosslinking of Sp1. <i>J. Biol. Chem.</i> 288(45):32720-32730.</p> <p>8) Sakata, K., Eda, S., Lee, E-S., Hara, M., Imoto, M., and <u>Kojima, S.</u> (2014) Neovessel formation promotes liver fibrosis via providing latent transforming growth factor-β. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 443(3):950-956.</p> | <p>①特許取得
なし</p> <p>②実用新案登録
なし</p> <p>③その他
なし</p> |
|---|--|

2.学会発表

- 1) Kojima, S. "Non-genomic and genomic actions of acyclic retinoid" 1st International Retinoids Meeting 2013, Calabria, Italy, September, 2013.
- 2) Takeya, H. Natural Products-Initiated Chemical Biology: Screening, Discovery, and Target Identification. 13th International Conference on the Chemistry and other bioactive compounds (ICCA-13), Yamanashi, Sep. 2013.

等温核酸増幅法 OmegaAmp による HBV 迅速検出系構築

研究協力者 白井 健悟 独立行政法人理化学研究所 ユニットリーダー

研究要旨

単一の反応温度(60°C)で 30 分程度の短時間で核酸増幅を達成する等温核酸増幅技術 (OmegaAmp 法) を応用し、培養上清中から HBV 放出の有無を迅速に判断できる OmegaAmp 検出系の構築を行った。HBV ゲノム上で変異頻度の低い S 領域に着目し、異なる subtype が共通して検出できる OmegaAmp primer のスクリーニングを実施、4 組の良好な増幅を示す primer 候補を選抜した。現在、低コピー ($10^2 \sim 10^3$ コピー相当) の鋳型 DNA 存在化で 30 分程度での増幅の立ち上がり検出が可能な primer を達成できるよう改良を行うとともに、384 well plate 下での HBV 培養上清を用いた薬剤スクリーニングシステムを構築中している。

B.研究方法

OmegaAmp Primer 設計にあたり、HBV database (<http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/>) に登録されている Genotype A~H の配列をすべて取得し、各 HBV の genomic region (PreC, C, X, PreS1, PreS2, S, P 及び SP)毎に、Muscle (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) を用いたアラインメントを実施し、HBV コンセンサス配列を作成した。コンセンサス配列を元に、実際のゲノム配列との比較を行い、進化的に変異頻度の低い共通保存領域を選抜し、異なる HBV subtype を共通して増幅できる primer の設計を行った。

また、HBV 培養上清からの(核酸精製を伴わない)直接的な増幅が可能かを検討するため、HBV 培養に用いる細胞株の培養上清を添加した条件での OmegaAmp 増幅を実施し、増幅効率の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における現段階においては、ヒト由来試料(臨床検体)の使用はなく、またヒトゲノムに関する情報を用いていない。

HBV ゲノム上の変異頻度の低い領域と判断された S 領域をターゲットとし、128 組の primer を設計、60 分以内の増幅を示した primer 候補を 4 組選抜した。現在、30 分で陽性検出が可能な primer 及び増幅試薬の改良に着手している。また、HBV 宿主である HepaRG 又は Hep2.2.15.7 の培養上清を添加し、鋳型 DNA に HBV ゲノムを含む プラスミド DNA を用いた増幅反応を調べた。結果、培養上清中の成分に増幅反応を阻害するものではなく、直接増幅が可能であった(下図)。今後、ウイルス株を用いた検出によりウイルスからのゲノム除放を含めた反応工程を確立する。

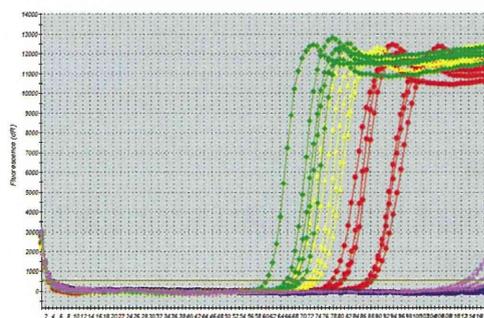


図 Hep2.2.15.7 培養上清を含む OmegaAmp 増幅
緑, 上清(-)/DNA(+); 黄, 上清(+)/DNA(+); 赤: 上清(+)/DNA(+)/熱処理(95°C, 3 min); 青, 上清(+)/DNA(-); 桃, 上清(-)/DNA(-)

D.考察

現段階においては、増幅の有無を判断できる primer の選抜を終えているが、宿主細胞からの放出過程に有効な薬剤スクリーニング系を達成するために、OmegaAmp 増幅系に関わる周辺技術(蛍光プローブ”Eprobe”等)を組み合わせ、宿主細胞

胞からの放出されるウイルスを低コピーから高コピー数までワイドに、且つ定量的に検出が可能な技術への改良を目指す。更に、OmegaAmp増幅の反応ボリュームの最適化と自動分注システムを利用した多検体反応工程を検討中であり、薬剤スクリーニングの加速化につなげる。

E.結論

従来までのPCRによる検出に比べ、煩雑な検体処理工程を省くことが可能で、且つ増幅時間も短縮できる等温増幅法OmegaAmpを利用し、新たなHBV薬剤スクリーニング系を確立／実施することで、従来までの核酸アナログ薬以外の有効な薬剤の選抜に貢献できると考えられる。またHBVゲノムのアラインメント結果を有効活用し、HBVの亜型特異的増幅を可能とするprimer設計を行うことで、医療現場での亜型検出を行う技術としても発展を目指す。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

2.論文発表

なし

2.学会発表

Diane Delobel、木村靖将、臼井健悟、Genotyping HBV using nucleic acid amplification: a method to design specific primers. 第36回日本分子生物学会年会（2013年12月3-6日）神戸国際会議場

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

WO 2013/035875 A1 「プライマーセット及びそれをを用いた標的核酸配列の増幅方法並びに変異核酸の検出方法」発明者/出願人：林崎良英、木村靖将、臼井健悟、田中有希、川井雄輝

②実用新案登録

なし

③その他

慢性 B 型肝炎線維化予防・治療候補薬開発

研究分担者 白水 美香子 独立行政法人理化学研究所 副センター長
研究協力者 新野（柊元）睦子 独立行政法人理化学研究所 上級研究員
津曲（三嶋）千恵美 独立行政法人理化学研究所 技師

研究要旨

- (1) 治療薬候補 NPD8673 (CMR-05) とその誘導体について、NMR により化合物の物性および TGF β LAP との結合に関する情報を収集
- (2) 構造解析を目的として TGF β LAP タンパク質を調製し、治療薬候補 CMR-046 存在下での結晶化に成功

A. 研究目的

TGF β LAP-D を標的とした HBV 付随肝線維化治療薬開発を目的として、SPpring-8 や NMR を用いて候補化合物と TGF β LAP の複合体の立体構造解析を行い、より良い阻害剤の設計に利用可能な構造情報を提供する。

B. 研究方法

構造解析を目的として、糖鎖修飾アミノ酸残基に変異を導入したヒトおよびブタ由来 TGF β LAP を HEK293-F 細胞を用いて発現、タンパク質精製を行った。調製したタンパク質を用いて NMR による STD (saturation transfer difference) 実験および化合物との結晶化実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う遺伝子組み換え実験に関しては理化学研究所横浜研究所遺伝子組換え安全委員会の承認のもと、関連する法令に従う。また、本研究で使用するヒトの遺伝子については、市販の cDNA ライブ・ラリーより取得されたものを使用するため、生命倫理上および法令上の問題は生じない。市販されていない遺伝子を取り扱う場合には、所内の倫理規程ならびに関連法令に従う。

C. 研究結果および D. 考察

HBV 付随肝線維化治療薬候補 NPD8673 (CMR-05) の誘導体 CMR-017, CMR-026, CMR-046 について、NMR 実験により化合物の物性を調べた。100% DMSO と 90% DMSO+10%

D₂O (v/v) の 2 種類の溶媒中で ¹H の 1 次元を測定した結果、D₂O の有無により ¹H のシグナルパターンが若干異なっていた。これは、D₂O が存在することで、例えば D₂O-CMR-017 間の水素結合形成など、化合物の状態に違いがあることが考えられる。また、10 日後に再度測定した結果、シグナルの移動および消失などがほぼ無いことから、これらの誘導体は CMR-05 と比較して溶液中で安定に存在することがわかった。また、NMR を用いた STD 実験により、CMR-017 のシグナルが微妙に変化したことから、化合物と TGF β LAP が相互作用している可能性が示唆された。

動物実験での活性評価へと進んだ CMR-046 について、構造解析を目的としてブタ由来 TGF β LAP タンパク質との共結晶化を行った。その結果、CMR-046 存在下および非存在条件下で結晶が析出し、条件精密化の後、最大 1.0 x 0.4 x 0.05mm の板状結晶を得た。

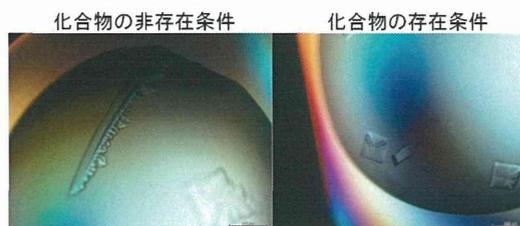


図1 ブタ由来 TGF β LAP の結晶化

結晶化条件は化合物の存在下・非存在下ともに

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

14% PEG3350, 7.5% iso-propanol, 5% glycerol, 0.1M Sodium citrate(pH5.6)であった。大型放射光施設 SPring-8 BL32XU ビームラインにおいて約 4.5Å 分解能のタンパク質由来の反射を確認した。現在、構造決定を目指して結晶化条件の精密化を行っている段階である。

E. 結論

NMR による実験で化合物の安定性ならびに標的タンパク質との相互作用に関する知見を得た。標的タンパク質の結晶化に成功したが、未だ結晶構造解析に十分な質の結晶が得られていないことから、今後はタンパク質調製方法の再検討も視野に入れて条件検討を行う計画である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

3. 論文発表

4.

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

①特許取得

②実用新案登録

③その他

該当なし

B型肝炎ウイルス Core タンパク質の二量体化形成を阻害する化合物の探索

研究分担者 小川健司 独立行政法人理化学研究所 専任研究員

研究協力者 市川保恵 独立行政法人理化学研究所 テクニカルスタッフ

研究要旨

本研究の目的は、B型肝炎ウイルスの複製に働くウイルス由来タンパク質を標的とした高速評価系を構築し、HBVの感染、増殖を阻害する創薬リード化合物を探索する事にある。昨年度構築したB型肝炎ウイルス Core タンパク質 (HBc) によるカプシド形成を可視化、数値化する HTS 系を用いて、理研天然化合物バンク (NPDepo, 19,839 化合物)、HBV ライブラリ (1,073 化合物)、ハイファジェネシス社カビ・きのこ抽出物ライブラリ (ExMyco, 800 抽出物フラクション) および東京大学創薬オープンイノベーションセンター化合物 (OCDD, 141,120 化合物) の大規模スクリーニングを実施した。HBc の二量体化による Gluc の再構成を阻害し、全長 Gluc の活性を阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない化合物またはフラクション (NPDepo: 15 化合物; HBV: 0 化合物; HG-ExMyco: 4 フラクション; OCDD: 25 化合物) が得られた。これらの化合物およびフラクションを、生細胞を用いたウイルス感染実験に供し、創薬リードとしての可能性を検討する。

A. 研究目的

B型肝炎は、B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) の出生時の母子感染 (垂直感染) や輸血、刺青などによる感染 (水平感染) により引き起こされる感染症である。免疫機能を確立した成人が感染した場合、多くは一過性感染となり、その70~80%は不顕性感染となる。残り20~30%は急性肝炎を発症するが、ほとんどの場合、HBs抗体が誘導され、終生免疫を獲得する。一方、出生時に母子感染した場合 (または乳幼児期にその他の経路から感染した場合) には、持続感染が成立する。持続感染者の大部分は正常な肝機能を維持する「キャリア」として経過する。このうち85~90%はセロコンバージョンを起こして無症候性キャリアとなるが、残り10~15%が慢性肝疾患 (慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌) へと移行する。

現在、全世界で総人口 (66億人) の約6%に相当する4億人、我が国では100万人以上がHBVに持続感染していると考えられている。HBVによる持続感染の成立、慢性肝炎、肝硬変および肝細胞癌の発症に関する分子機構の詳細は不明の部分も多く、これらを根本的に解決する薬剤の開発は、基礎および臨床の双方に重要であり、B型肝炎制圧のために特に焦眉の急である。

本研究の目的は、HBVの複製に働くウイルス由来タンパク質を標的として、この機能を可視化するユニークな高速評価系 (HTS) を構築し、これを利用してHBVの感染、増殖を阻害する創薬リード化合物を探索する事にある。現在まで、HBVの治療薬として臨床応用されているものの多くは、核酸アナログを主体とした逆転写酵素阻害剤である。本研究では、基本戦略として核酸アナログ以外の化合物を探索するために、逆転写酵素以外のタンパク質をターゲットとしたHTSを構築する。また、生細胞を用いたHTSを構築する事により、細胞への浸透性に問題のある化合物や細胞毒性を示す化合物を1次スクリーニングで排除し、確実に生体に作用する分子を評価、選抜する事を目標としている。

B. 研究方法

HBVは、全長約3.2kbの環状不完全二本鎖DNAをゲノムとするDNAウイルスであり、ゲノム上には、C、P、SおよびXの4種類のORFが存在する。C-ORFはCoreタンパク質 (HBc) およびHBc抗原を、P-ORFはPタンパク質 (逆転写酵素) を、S-ORFはエンベロップを構成する3種類のSタンパク質領域 (preS1、preS2 および

S) を、また X-ORF は転写制御因子であり、肝細胞癌の成立に重要と考えられる X タンパク質をそれぞれコードしている。この内ヌクレオカプシドを構成する HBc は pgRNA や P タンパク質と相互作用し、ゲノムの複製に際しては pgRNA の逆転写と 2nd strand DNA の合成に重要な役割を担っている。ウイルス感染細胞で発現した HBc は、ホモ二量体を形成し、さらにこの二量体を単位として多量体が形成され、HBV のヌクレオカプシドが作られる。我々は、HBc の二量体形成を *in vitro* で可視化および数値化する HTS を構築した。

HBc は、全長 183 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端のアッセンブリドメイン (1-144 残基) と C 末端の RNA/DNA 結合ドメイン (145-183 残基) からなる。我々は、分泌型の海洋性カイアシ由来のルシフェラーゼ (Gluc) を N 末端の 92 アミノ酸 (18-109 残基) と C 末端の 76 アミノ酸 (110-185 残基) に分割し、それぞれの断片を HBc のアッセンブリドメイン 144 アミノ酸の N 末端、C 末端および c/e1 ループに相当するアミノ酸 78 から 81 残基に、フレキシブルリンカー配列 (10 残基) でつないだ融合タンパク質をコードする哺乳動物細胞発現ベクターを作製した。また、ヒト培養細胞で効率的に細胞外に分泌される様に、それぞれの融合タンパク質の N 末端にヒト免疫グロブリン κ 鎖の分泌シグナル配列 (22 残基) を導入した。作製した発現ベクターを HeLa 細胞に遺伝子導入し、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した結果、GlucN-HBc と HBc-GlucC を発現するベクターを導入した場合に、高いレベルのルシフェラーゼ活性が認められ、HBc の二量体形成を可視化および数値化する事に成功した。我々は、このシステムを用いた大規模スクリーニングを実施した。

GlucN-HBc および HBc-GlucC 発現するベクターを Nepa21 (ネッパジーン社) を用いたエレクトロポレーションにより HeLa 細胞に導入し、化合物を添加した 384-well-plate で培養した。24

時間後の培養上清のルシフェラーゼ活性を測定し、細胞生存率を WST8 アッセイによって測定した (図 1)。

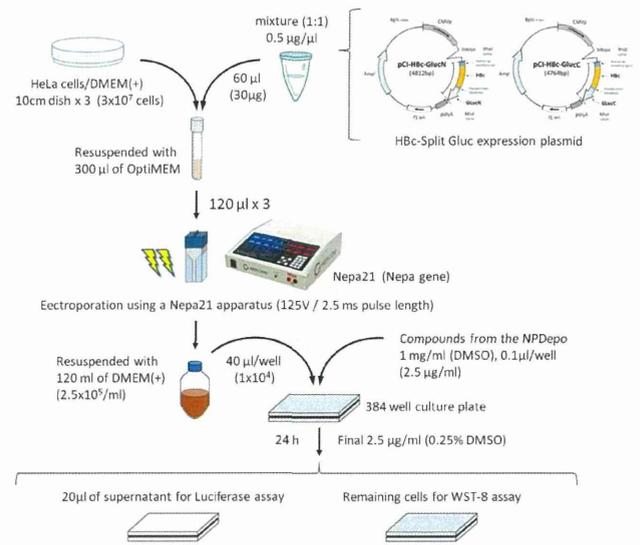


図 1 HBc の二量体化を可視化、数値化する HTS

(倫理面への配慮)

理化学研究所遺伝子組換え実験安全委員会承認
済み (承認番号: 承 2012-062(1))

C. 研究結果

本研究で使用した化合物は、理研天然化合物バンク (NPDepo, 19,839 化合物)、HBV ライブラリ (1,073 化合物)、ハイファジェネシス社カビ・きのこ抽出物ライブラリ (ExMyco, 800 抽出物フラクション)、東京大学創薬オープンイノベーションセンター化合物 (OCDD, 141,120 化合物) に含まれる総計 162,032 化合物および 800 フラクションである。これらの化合物ライブラリの大規模スクリーニングを実施した結果、HBc の二量体形成 (ルシフェラーゼ活性) を 50% 以上阻害し、細胞生存率 (WST8 活性) の阻害が 25% 以下を示した NPDepo の 127 化合物、HBV ライブラリの 62 化合物、ExMyco の 55 フラクション、また OCDD からはルシフェラーゼ活性を 44.83% 以上阻害し、WST8 活性の阻害が 24.73% 以下の 1,099 化合物が得られた (図 2)。

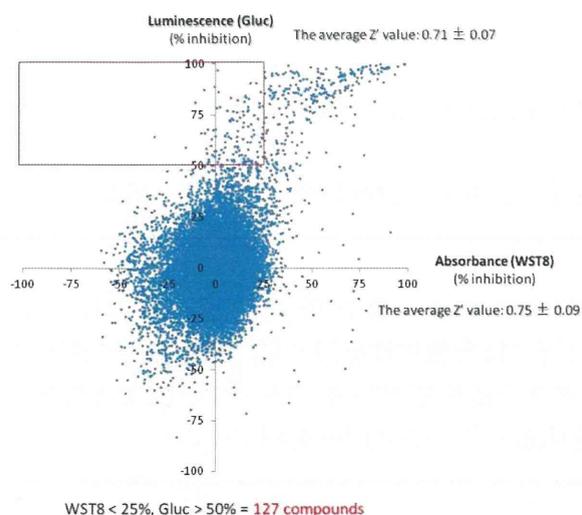


図2 理化学研究所天然化合物 (NPDepo) 19,839 化合物を用いた HBc 二量体化阻害剤の探索

二次スクリーニングでは、一次ヒット化合物を 8 段階 2 倍希釈 (n=4) し、HBc 二量体形成による Gluc 再構成と同時に、全長 Gluc 活性に対する効果を検討した。その結果、HBc の二量体化による Gluc の再構成を阻害し、全長 Gluc の活性を阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない NPDepo の 15 化合物、HG-ExMyco の 4 フラクション、OCDD の 25 化合物が得られた。

D. 考察

今回スクリーニングに供した 162,032 化合物の内約 0.02% に相当する 40 化合物、また 800 抽出フラクションの 0.5% に相当する 4 フラクションを一次ヒットと判定した。今後、これらの化合物およびフラクションを、生細胞を用いたウイルス感染実験に供し、創薬リードとしての可能性を検討する。予備実験の結果、HBV の複製を濃度依存的に阻害する傾向を有する化合物も認められており、これらが創薬リード化合物となる事が期待される。しかし、現在行われている感染実験系

はスループット性に問題があり、これが HBV 創薬の進展の大きな妨げとなっている。そこで、感染実験に代わる実験系として、感染性のあるウイルス粒子を使用せずに HBV の逆転写を生細胞内で再現し、これを可視化および数値化する新たなシステムの構築が必要不可欠である。今後、このシステムの構築も並行して行いたい。

E. 結論

本研究では、昨年度に構築した HBc 二量体化を可視化、数値化する HTS 系を用いて、NPDepo、HBV、ExMyco および OCDD に含まれる 162,032 化合物および 800 フラクションの大規模スクリーニングを実施した。その結果、HBc の二量体化による Gluc の再構成を阻害し、全長 Gluc の活性を阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない 40 化合物および 4 フラクションが得られた。これらの化合物は、新規 HBV 薬の創薬リードとして期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

5. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況 (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

分子ドッキングによる TGF- β 活性化阻害候補化合物の探索

研究分担者 平野 秀典 独立行政法人理化学研究所 計算分子設計研究グループ 研究員

研究要旨

TGF- β の活性を制御する薬剤候補分子の探索を行うために、潜在型 TGF- β -LAP (Latency associated protein) 部分の 56Lys-57Leu-58Arg-59Leu 付近に結合親和性を持つ薬剤候補分子の探索を行った。その結果、ligand のクマリン骨格が α ヘリックスと活性型 TGF- β のループに挟まれたスポットに入り、4 位から伸びた官能基が R58-L59 の切断を阻害している可能性を示した。

A. 研究目的

TGF- β は、LAP (Latency associated protein) と呼ばれる不活性の「潜在型」複合体として産生される。刺激を受けると 25kD の活性型 TGF- β が潜在型複合体から放出されて受容体と結合し、様々な生理機能を発揮すると考えられている。この反応は潜在型 TGF- β 活性化反応と呼ばれ、生理的な活性化因子には、トロンボスポンジンやインテグリンなどの細胞接着分子や、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、MMP などのタンパク分解酵素などがあり、それらは臓器特異的であるとされている。

小嶋らはプラスミンと血漿カリクレインのセリンプロテアーゼ 2 種が TGF- β の放出や活性化を誘導して肝疾患に関与することに着目し、その切断部位が潜在型 TGF- β 1 分子 LAP (Latency associated protein) 部分の 56Lys-57Leu (プラスミン)、58Arg-59Leu (血漿カリクレイン) であることを見出した。

これまでに TGF- β LAP に結合し、TGF- β 活性化反応を抑える化合物が知られている。しかしながら TGF- β -薬剤複合体構造は得られていない。そこで、分子ドッキングを行い、複合体の構造を予測し、結合様式を予測することも本研究の目的の一つとした。

また、TGF- β の活性を制御する薬剤を探索する際には、活性型 TGF- β そのものをターゲットとするアプローチと潜在型 TGF- β 活性化反応を抑制するアプローチの 2 つが考えられる。本研究では後者を対象とした分子ドッキングを行い、TGF- β の活性を制御する薬剤候補分子の探索を行った。

B. 研究方法

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) 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) (図 1) を用いた。生化学実験により見付けられた活性化抑制候補物質 (CMB) および分子ドッキングにより予測した複合体構造に基づいて合成展開を行った類縁体についても検討を行った。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。

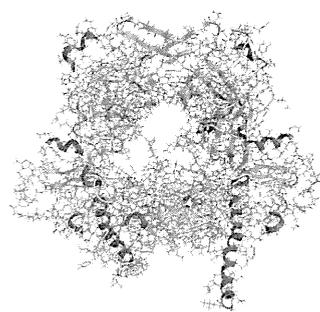


図 1: TGF- β 1 タンパク質の立体構造 (PDB entry: 3RJR)¹⁾

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

TGF- β 1 タンパク質の構造と生化学実験により見付けられた活性化抑制物質 (CMB) についても分

分子ドッキングを行い、複合体構造を予測した。その結果を基に、CMB 類縁化合物の合成展開を行い、それらの化合物についても同様に分子ドッキングを行った。CMB およびその類縁化合物では、クマリン骨格が α ヘリックスと活性型 TGF- β のループに挟まれたスポットに入り、図 2 の様な結合様式を多くとることが分かった。

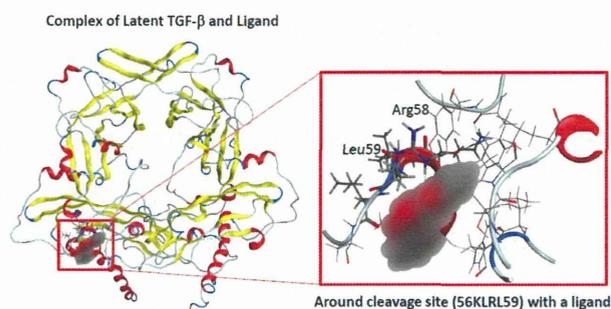


図 2：分子ドッキングにより予測された TGF- β -CMB 類縁化合物の複合体構造。化合物の構造は、ぼかして表示している。

D. 考察

分子ドッキングの結果から、CMB およびその類縁化合物のもつクマリン骨格が α ヘリックスと活性型 TGF- β のループに挟まれたスポットに入っていることが示唆された。このことから、クマリン骨格をもつ化合物が活性化反応を抑えるのであれば、クマリン骨格の 4 位から伸びた官能基が R58-L59 の切断を阻害している可能性が考えられる。今後、類縁化合物の合成展開を行う際の方針となることが期待される。

今年度はタンパク質の構造を 1 つの X 線結晶解析構造とした。今後は分子動力学計算の実行や複合体の結晶解析構造などから複数の立体構造を用意し、他の大規模化合物データベース等も考慮

に入れたドッキングシミュレーションを行うことで、新規薬剤候補化合物選定へとつなげたい。

E. 結論

本研究では TGF- β 1 を標的タンパク質として CMB およびその類縁化合物に対し分子ドッキングを行い、結合様式の予測を行った。その結果、CMB およびその類縁化合物のもつクマリン骨格が α ヘリックスと活性型 TGF- β のループに挟まれたスポットに入り、4 位から伸びた官能基が R58-L59 の切断を阻害している可能性を示した。

今後は複数の探索方法を階層的に組み合わせ薬物候補化合物群の絞り込みを行うと共に、他のターゲットタンパク質を用いて同様の分子ドッキングを実行し、計算化学的手法を用いた B 型肝炎創薬の効率化および確立を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

6. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

該当なし

低分子化合物による IFN 受容体活性化の構造基盤に関する研究

研究分担者 吾郷日出夫 独立行政法人理化学研究所 専任研究員

研究協力者 浮田 陽子 独立行政法人理化学研究所 リサーチアソシエイト

研究要旨

1 型 IFN と同様の生物活性を持つ経口投与可能な RO8191 のシグナル伝達の構造基盤を明らかにする為、RO8191 の受容体と提唱されている IFNAR2 との相互作用解析を行った。IFNAR2 細胞外ドメイン上で、RO8191 と IFN α の結合部位が競合する可能性を見出した。また、これまで提唱されてきた IFNAR2 の会合を経ること無く RO8191 のシグナル伝達が起こる可能性も示した。

A. 研究目的

RO8191 (R0) は、1 型インターフェロン (1 型 IFN) と同様の生物活性を持ち経口投与可能な低分子化合物である。R0 は、C 型肝炎ウイルスに対しウイルス粒子複製抑制活性やゲノム複製抑制活性、さらに 1 型 IFN と同等の細胞保護活性を示す。分子レベルでは、1 型 IFN によって活性化する遺伝子群を濃度依存的に活性化する。生物活性を示す作用機序として、R0 による IFNAR2 の多量体形成促進が提案されている。これは、IFNAR2 の細胞外ドメイン (IFNAR2-ECD) とモル比で 1:1 の複合体を形成する事¹、人為的な IFNAR2 のホモ二量体も情報伝達可能であるという報告に基づいている。1 型 IFN と同様の生物活性を持ち経口投与可能な低分子は、患者の生活の質の向上、治療機会の拡大、投薬コストの削減など様々な利点が期待でき、薬剤開発の新しい方向性を示す画期的な結果である。

本研究では、1 型 IFN と同様の生物活性を持つ経口投与可能な薬剤候補化合物探索への構造情報の提供を目的とし、IFNAR2-ECD と R0 の溶液中での相互作用について検討した。

B. 研究方法

IFNAR2-ECD の大量発現と精製 IFNAR2-ECD (シグナル配列を含めた前駆タンパク質のアミノ酸配列では 37 番から 232 番) に対応する遺伝子フラグメントを持つ pPIC3.5K (インビトロジェン) で

形質転換した *P. pastoris* を 30°C の BMMY 培地 (8 L) で 24 時間培養し分泌発現した。培養上清は分子量分画 10kDa の透析膜で 100 ml x 4 本まで濃縮し、-80°C で凍結保存した。

100 ml の培養液を分子分画 8kDa の透析膜に封入し、0.2 M NaCl 水溶液 1 L x 1 時間 x 2 回、リン酸緩衝液 (10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0), 0.2 M NaCl) 1 L に対し一晩透析した。遠心上清を NaOH 水溶液にて pH8.0 とし Probond (ライフテクノロジー) に供した。得られた粗精製タンパク質を Superose12 (SR12) (GE ヘルスケア) に供した。非還元 SDS ページで約 50 kDa にバンドが現れる溶出画分に Endo-Hf (ニューイングランドバイオラボ) (1 μ g/320 μ g 総タンパク) を加え糖鎖を切断した。Endo-Hf を含む夾雑タンパク質の除去を目的に Resource S (GE ヘルスケア) (5 mM MES (pH5.5), 0.01 % (w/v) n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM), \pm 1M NaCl) と N 末の Flag-tag が部分消化された IFNAR2-ECD の除去のために Resource Q (GE ヘルスケア) (5 mM Tris (pH8.0), 0.01 % (w/v) n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM), \pm 1M NaCl)、最終カラムとして Superdex200 (GE ヘルスケア) (5 mM HEPES (pH7.4), 0.15 M NaCl, 1 mM GSH) を用いた。

IFN α の大量生産精製 平成 24 年度の研究報告書に従い生産精製した。

RO の溶解度試験 RO8191 (PubChem: CID 2768133)

はナカライテスクから購入した。5 % (v/v) DMSO 水溶液 (室温) に対する溶解度を、50 μ M 懸濁液を 30, 20, 10, 5, 1 μ M の順に希釈し 280 nm の紫外吸光度で評価した。

IFNAR2-ECD と RO の結合試験

化学量論 IFNAR2-ECD を 30 μ M RO, 5 mM HEPES (pH7.4), 0.15 M NaCl, 0.005 % (w/v) DDM, 5 % (v/v) DMSO で平衡化した SR12 に供し、IFNAR2-ECD を含む画分を 4 $^{\circ}$ C で 4 日間保持した。次いで RO を含まない前述の溶液で平衡化した SR12 に供し、IFNAR2-ECD/RO 複合体を含む画分の紫外吸光プロファイル測定した。係数 C を乗じた 10 μ M RO の紫外吸光プロファイル複合体の紫外吸光プロファイルから引き、タンパク質特有のプロファイルになる C を求め、溶液中の RO の濃度を求めた。タンパク質に期待される紫外吸光プロファイルは、278 nm に吸収極大がある、 ABS_{260nm}/ABS_{280nm} が 0.5~0.6、300nm より長波長で吸収が無い事である。

IFNAR2-ECD の構造に対する RO の影響

IFNAR2-ECD を $\pm 30 \mu$ M RO, 5 mM HEPES (pH7.4), 0.15 M NaCl, 0.005 % (w/v) DDM, 5 % (v/v) DMSO で平衡化した PD-10 に供し、1 日 4 $^{\circ}$ C で静置した。各々、同じ溶液で平衡化した SR12 で IFNAR2-ECD の保持体積を求めた。30 μ M RO を含む実験は 4 日 4 $^{\circ}$ C で静置した実験も行った。

結合位置の推定 PD10 によって溶媒交換し 30 μ M RO, 16.9 μ M IFNAR2-ECD, 5 mM HEPES (pH7.4), 0.15 M NaCl, 0.01 % (w/v) DDM, 5 % (v/v) DMSO を準備した。溶液を二分割し片方に 11.4 μ M となるよう IFN α を添加し、一晩 4 $^{\circ}$ C で静置した。次いで、5 mM HEPES (pH7.4), 0.15 M NaCl, 0.01 % (w/v) DDM で平衡化した SR12 で IFNAR2-ECD を含む画分を集め、紫外吸光プロファイル測定した ($ABS_{(IFNAR2-ECD/RO)}$ と $ABS_{(IFNAR2-ECD/RO/IFN\alpha)}$)。 $R = \frac{\sum (|ABS_{(IFNAR2-ECD/RO)} - C \times ABS_{(10\mu M RO)} - ABS_{(IFNAR2-ECD/RO/IFN\alpha)}|)}{\sum ABS_{(IFNAR2-ECD/RO/IFN\alpha)}}$ を計

算し、R を最小にする最適な C を求め、溶液中の RO の濃度を計算する。ここで、 $ABS_{(10\mu M RO)}$ は、10 μ M RO 水溶液の紫外吸光プロファイル、 Σ で和を取る範囲は測定波長全体である。

(倫理面への配慮)

本研究は、公知のアミノ酸配列を持つ組換えタンパク質をバクテリアによって生産して実施するため、倫理面への配慮を必要としない。

C. 研究結果

IFNAR2-ECD の大量発現と精製 現在の生産精製プロトコルで 4 L の培養スケールから平均 1.5 mg の IFNAR2-ECD を精製でき、物理化学測定が可能となった。

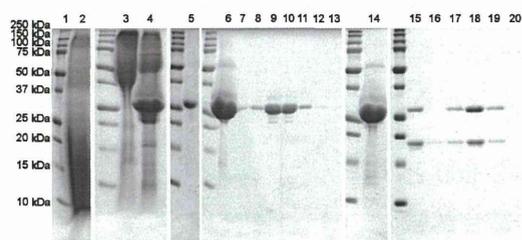


図 1 IFNAR2-ECD の非還元 SDS ページ(composit) レーン 1: 分子量マーカー、2: 培養上清、3: Probond 溶出、4: Endo-Hf 処理後、5: Resource S 溶出、6: Resource Q 溶出、7~13: Superdex200 溶出フラクション、14: レーン 9,10 を濃縮後 4 日目、15: IFN α との混合液、16: His-trap unbound、17-20: 溶出フラクション。

IFNAR2-ECD の 6 個のシステイン残基は、部分的にジスルフィド結合を形成している (図 1 レーン 9, 10)。この不均一性は、既知の結晶構造と符合している (PDB ID: 3S9D)。精製後も時間依存的に分子間でジスルフィド結合が形成される (図 1 レーン 9, 10, 14)。C 末に His タグを持つ IFNAR2-ECD は His タグを持たない IFN α と結合し、His-Trap カラムから共溶出する点は、IFNAR2-ECD が IFN α 結合活性を保持していることを示す (図 1 レーン 17-19)。

RO の溶解度試験 5 % (v/v) の DMSO を含む常温の水に対する RO の溶解度は約 30 μ M であった (図 2)。

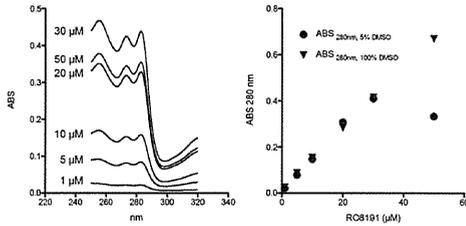


図 2 RO の溶解度試験 (左) 5%(v/v)DMSO 水溶液の RO の可視吸収。(右)100% DMSO 中と 5%(v/v) DMSO 中の RO の 280 nm での吸光度の濃度依存性。

化学量論 RO の紫外吸収プロファイルに乗じる C の値が 0.2 の時、補正後の紫外吸収プロファイルが典型的なタンパク質の吸収プロファイルとなった。これは、溶液の RO 濃度は 2 μMであることを示す。IFNAR2-ECD 濃度は 2.3 μM である。RO の結合部位が IFNAR2-ECD 当たり 1 箇所であると仮定すると、30 μM RO でおよそ 90% の IFNAR2-ECD が複合体であると考えられる。

IFNAR2-ECD と RO の結合試験
RO は IFNAR2 の会合を促進し、IFN α 様の生物活性を示すと提案されている。

RO の有無にかかわらず SR12 の保持体積は 12.7 ml で、IFNAR2-ECD の大きな構造変化は観察されなかった。

IFNAR2-ECD と RO を長期間共存させると結合量が増加する可能性が示唆された。RO は 280 nm を挟んだ両側に紫外吸収ピークを持ち、また 260 nm より短波長側にも吸収が見られる (図 2)。SR12 で非結合 RO を除いた IFNAR2-ECD の紫外吸収プロファイルは、共存時間が 4 日の場合、280 nm を挟んでピークがあり、かつ 260 nm より短波長側にも一定の吸収が見られた (図 4)。共存時間が 1 日の場合は、280 nm より少し短波長側に吸収極大があり、そこから短波長側では単調に吸収が

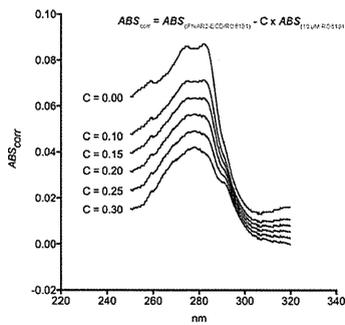


図 3 紫外吸収プロファイル解析

減少した。

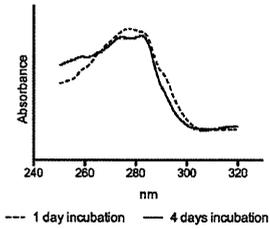


図 4 SR12 カラムからの IFNAR2-ECD を含む溶出画分の紫外吸収プロファイル。

結合位置の推定 IFN α と RO の IFNAR2-ECD に対する K_D はそれぞれ 30 nM、480 nM と報告されている。C が 0.2 の時 R が最も小さくなった。IFN α 存在下では SR12 から IFNAR2-ECD と共溶出する RO が 2 μM 分少なくなることを示した (図 5)。IFN α と RO の結合部位は近傍にある可能性が示唆された。

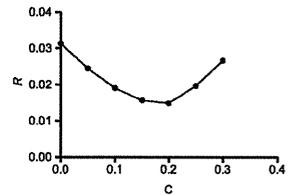


図 5 IFNAR-2 と RO8191 の結合に対する IFN α の影響。

D. 考察

30 μM RO で概ね 9 割の IFNAR2-ECD が複合体化することが確認された。RO は、IFNAR2-ECD の会合を促進したり、大きなコンホメーション変化を引き起こしたりしない一方で、IFN α によって複合体形成が妨げられる。これらの点から RO と IFN α の結合位置は極めて近傍にあると言える。

日単位の共存がゲルろ過で分離しない強度の複合体形成に寄与する可能性を示す結果が得られた (図 4)。この結果は、Biacore を使った実験では 1 分ほどで結合量が飽和する報告と異なる。これらの結果は、複数の複合体形成様式がある可能性を示唆する。RO が生物活性を発揮する仕組みとして、RO 依存的 IFNAR2 の会合が提案されている。しかし、今回の実験では、RO 依存的な IFNAR2-ECD の会合は観察されなかった。膜貫通ドメインと細胞内ドメインを持つ IFNAR2 全長が、RO 依存的会合に必要である可能性もある。しかし、RO による会合を指示する実験的結果は報告され

ていない。IFNAR2の欠損でR08191の効果が減弱することからIFNAR2が情報伝達で重要な役割を担っているのは間違いないが、IFNAR2が提供する分子システム全体を対象として研究する事が、R0が生物活性を示す仕組みを知る上で肝要であると考えられる。

IFNAR2-ECD/R0複合体の結晶化には、より高い水溶性を持つ類似分子を使う必要がある。溶液中ではほぼ100%複合体となっていることが複合体結晶となる前提条件である。R0のIFNAR2-ECDに対する親和性はBiacoreの結果で480 nMと報告されている。 $K_D = k_{off}/k_{on} = [E][I]/[EI] = 0.48 \mu\text{M}$ 、ここで、ほぼ100%複合体になっている状態を $[EI]/[E] = 100$ とすると、 $[I] = 48 \mu\text{M}$ となる。この値は30 μM R0共存でおよそ9割のIFNAR2-ECDが複合体となった結果と符合する。しかし、5% (v/v) DMSO水溶液に対するR0の溶解度は50 μM 未満であることから、複合体結晶を得るための十分な濃度を保つことが難しいと考えられる。IFN α 様の生物活性を持つ低分子化合物が働く仕組みの構造基盤を解明するためには、水溶性の高い低分子化合物を対象に研究を進めることが望ましいといえる。

E. 結論

R08191依存的なIFNAR2-ECDの構造変化について物理化学実験をするに足る質と量で、活性のあるIFNAR2-ECDを生産精製できる様になった。

IFN α とR08191はIFNAR2-ECD上で結合位置が競合すると考えられ、R0の占有率は、30 μM で90%と見積もられた。

IFNAR2-ECDの多量体化を含む大きな構造変化

は30 μM 以下の濃度のR08191では観察されず、IFNAR2の会合でシグナルが伝達されるという仮説を指示するデータは得られていない。シグナル伝達機構はより広い分子システムを対象として探求する必要がある。

R08191の水溶性は、IFNAR2-ECDと溶液中ではほぼ100%複合体を形成するに必ずしも十分ではない。複合体の結晶化には、溶液中ではほぼ100%の複合体形成が必要条件である。IFNAR2単独でIFN様シグナルを伝達するIFNAR2の構造基盤を解明する観点からは、R08191より水溶性の高い化合物がより望ましい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況（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。

2. 臨床標的に関する研究

抗HBV薬創薬の2次・3次スクリーニング用の新規HBV感染増殖細胞系・ *in vivo*感染増殖系の構築

研究分担者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 教授

研究協力者

池田 均（東京大学医学部 准教授）

坪田昭人（東京慈恵会医科大学 臨床医学研究所 副所長・教授）

鈴木哲朗（浜松医科大学 教授）

清水弘樹（産業技術総合研究所 主任研究員）

【研究要旨】

2次・3次スクリーニングのための核酸アナログ耐性HBV産生細胞株、新規NTCP発現細胞株、ヒト肝細胞置換TK-NOGマウスの作製を進めた。

A. 研究目的

抗HBV薬創薬過程で、一次スクリーニングでピックアップされた化合物およびその最適化合物を2次・3次スクリーニングするための、新規HBV感染増殖細胞系と*in vivo*感染増殖系を構築する（図1）。



図1

B. 研究方法

①核酸アナログ耐性HBV産生細胞株の樹立
一次スクリーニングに用いたのは、Hep2・2・15 (genotype D ウイルス産生)を用いた。このため、2012年度は、genotype AHBV産生株 HuhHBVAe株を樹立した（鈴木）。2013年度は、名越班で7施設から収集した患者血清から選択した5検体の、HBVゲノム配列を決定した。その中から、核酸アナログ耐性変異を見出したため、変異ウイルス持続複製細胞株の樹立を進めた（鈴木・清水）。

②NTCP自然発現株細胞の選択

HBV感染研究に通常用いられるHepaRG細胞は、NTCP高発現細胞である。HepaRG以外にNTCPが自然発現する細胞株がないか、DNAマイクロアレーとリアルタイムPCRで検討した（松浦、池田）。

③TK-NOGマウスを用いたHBV感染・増殖系
通常HBVの感染増殖系動物モデルとして、ヒト肝細胞で肝臓を置換したPXBマウスが用いられているが、自研究施設でのハンドリングができない。このため、ヒト化肝臓をもつTK-NOGマウスの効率の良い作製法を検討した（坪田）
(倫理面への配慮)

臨床サンプル収集は、東京慈恵会医科大学、埼玉医科大学、岩手医科大学、東京大学、岐阜大学、山口大学の倫理委員会の許諾のもと、患者さんの人権・個人情報に配慮し、文章による同意の上に行った。

動物実験は、東京慈恵会医科大学・動物実験委員会、遺伝子組換え安全対策委員会、病原体等安全管理委員会の審査と許諾の元で行った。

C. 研究結果

①核酸アナログ耐性HBV産生細胞株の樹立

ヒト肝臓キメラ免疫不全マウスを使った新規肝炎ウイルス感染動物実験系の確立

研究協力者 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 教授 坪田昭人

研究要旨

NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(Alb-Plau)11-4/ShiJic マウスを用いたヒト肝臓キメラ免疫不全マウスにより HBV 持続感染の成立が確認できた。さらに確実にヒト肝細胞置換率を改善する必要はあるが、動物モデルに関連する費用が従来の約 10 分の 1 に抑制され、今後の網羅的遺伝子解析・プロテオーム解析も含めた HBV の感染成立機序解明と新薬開発に貢献でき得る有用な手段と考えられた。

A.研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続保有者 (キャリア) は世界に約 3 億人と概算されている。本邦では B 型肝炎母子感染防止事業・ワクチン開発により新生児の新規感染は著減したが、新たに再興感染として問題化している。また医学の急速な進歩にともない HBV の常識が覆され、HBV の真の病態解明と根本的な治療の新規創薬が急務である。その過程において、新規薬剤の効果、薬物動態・力学、毒性の試験には動物での基礎データが必要である。HBV の培養系は未だに確立されておらず、ヒト HBV が感染可能なチンパンジーは禁止されている。ヒト臨床治験の前段階としての動物実験は必須であり、他に代替手段がない。それらを解決するうえで肝炎ウイルス感染モデル動物は重要であり、ヒト肝細胞を移植したキメラ免疫不全マウスが有力なモデルの一つとして注目されている。現在使用可能な免疫不全マウスは使用できる施設が限定され、非常に高価かつ不安定である。実験動物中央研究所 (神奈川・川崎) では、2002 年に従来の SCID マウスより更に免疫不全な状態でヒト由来細胞の生着率のよい NOD-scid IL2Ry^{null} の確立に成功した。さらに urokinase-type plasminogen activator (uPA) をマウス肝臓特異的に発現させる NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(Alb-Plau)11-4/ShiJic マウスを樹立し、高率に移植可能なヒト肝臓キメラマウスを作製することに成功している。本研究では、このヒト肝臓キメ

ラマウスに HBV を感染させることで新規肝炎ウイルス動物実験系を作製するとともに、網羅的遺伝子解析・プロテオーム解析も含めた HBV の感染成立機序解明と新薬開発における前臨床試験に役立てたい。

B.研究方法

NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}

Tg(Alb-Plau)11-4/ShiJic マウス(8 週齢・雄, 実験動物中央研究所)に前処置として ganciclovir の腹腔内投与を行う。血清 ALT 値の測定により有意な肝障害を起こしたマウスに対して、麻酔下で皮膚・腹膜を小切開後、脾臓を露出させ経脾臓的にヒト肝細胞(1.0~2.0×10⁶ cells, 10 μL)を移植する。その後、4 週毎に血清ヒトアルブミン値を測定し、ヒト肝細胞移植後 16 週前後に経尾静脈的に HBV (4.0×10⁶ copies, 20μL)を投与する。感染後は 2 週毎に血清 HBV 量を測定する。感染直前(20 週齢), HBV 増殖期(22~24 週齢), HBV 安定期(28 週齢)の各期における肝臓を網羅的遺伝子・プロテオーム解析の対象とした。

(倫理面への配慮)

以下の学内委員会による厳正な審査を承認されたうえで、十分な配慮により実験は行われている。

- 動物実験委員会承認済み (承認番号 25-017)
- 遺伝子組換え安全対策委員会承認済 (承認番号 25-14)

- 病原体等安全管理委員会承認済み (承認番号 I-25-12)
- 倫理委員会承認済み (承認番号 25-236 7371)

C.研究結果

ヒト肝細胞移植を施行したマウスは 40 匹 (現時点) であり、血清ヒトアルブミン値の上昇を認めたマウスは 14 匹であった。血清ヒトアルブミンは移植後 4~8 週に急激に上昇し、12 週以降に plateau に達していた。その値は 1.9~5.1 mg/mL (中央値 3.2 mg/mL) であった。肝細胞置換率では 24~73% (中央値 63%) であった。死亡したマウス 19 匹の死因は、肝移植術関連 5 匹、肝不全死 11 匹、原因不明 3 匹であった。

血清 HBV 量は、感染後 2~8 週でほぼ plateau に達し、5.7~8.2 log copies/mL (中央値 6.8 log copies/mL) であった。感染直前(20 週齢), HBV 増殖期(22~24 週齢), HBV 安定期(28 週齢)の各期における肝臓は、網羅的遺伝子・プロテオーム解析中である。

D.考察

HBV 持続感染可能なヒト肝臓キメラ免疫不全マウスを確立できた。初期の死因は、ヒト肝細胞移植手技の未熟さや結果的に過剰な前処置による肝不全死が主であった。移植手技に関しては、きめ細かな改良によりほぼ 100%の生存が可能になった。一方、前処置のプロトコールは改良の余地がある。軽度の肝傷害惹起ではヒト肝細胞肝置換率が低く、肝傷害を高度にすると肝不全死に陥りやすい。マウスの個体間差が予想以上に大きく、遺伝子発現の差異と考えられた。今後は生存率と置換率を改善するために、肝傷害の程度に応じた個別化処置プロトコールの確立が必要と考えられた。現在、新規プロトコールで検討中である。

E.結論

HBV 持続感染可能なヒト肝臓キメラ免疫不全マウスを確立できたが、より確実に高い置換率を達成するための改良の余地はある。このモデルを用いれば、動物に関連する費用が約 10 分の 1 に抑えられ、汎用性への普及に貢献でき得ると考えられた。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

7. 論文発表

- 1) Atsukawa M, **Tsubota A**, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Iwakiri K, Nakatsuka K, Kawamoto C, Sakamoto C. Serum 25-hydroxy- vitamin D₃ levels affect treatment outcome in pegylated-interferon/ribavirin combination therapy for compensated cirrhotic patients with HCV genotype 1b and high viral load. *Hepatol Res.* 2014 Jan [Epub ahead of print].
- 2) Atsukawa M, **Tsubota A**, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Narahara Y, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C. Efficacy of alfacalcidol on PEG-IFN/ribavirin combination therapy for elderly patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Hepat Mon.* 2013;13:e14872.
- 3) **Tsubota A**, Furihata T, Matsumoto Y, Chiba K. Sustained and rapid virological responses in