

清中のウイルスゲノム量が有意に低下することから、JMJD5 は HBx タンパク質と相互作用して HBV 複製に関与することが示唆された。また、HBx は主に細胞質に局在しているが、JMJD5 は核に局在する。HBx 発現細胞では、JMJD5 は核から細胞質に局在を変えることが示された。

#### D. 考察

JMJD5 はヒストン脱メチル化に関与するタンパク質であり、JMJD5 が標的とする分子が HBV 複製に関与していることが考えられる。HBx はそれ自身に DNA 結合能はないが、様々な遺伝子発現を制御していることが報告されていることから、JMJD5 が HBx による遺伝子発現制御に関与していることが示唆できる。

#### E. 結論

HBx と相互作用する新規分子として JMJD5 を同定した。JMJD5 は HBV の複製に関与していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kelly GL, Grabow S, Glaser SP, Fitzsimmons L, Aubrey BJ, Okamoto T, Valente LJ, Robati M, Tai L, Fairlie WD, Lee EF, Lindstrom MS, Wiman KG, Huang DCS, Bouillet P, Rowe M, Rickinson AB, Herold MJ and Strasser A. Targetting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53, *Genes Dev* 28(1):58-70 (2014)
2. Okamoto T, Coultas L, Metcalf D, van Delft M, Glasser SP, Takiguchi M, Strasser A, Bouillet P, Adams JM, Hunag DCS. Enhanced Mcl1 stability can blunt stress-induced apoptosis, cause male sterility and promote tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(1): 58-70 (2014)
3. Brumatti G, Salmanidis M, Kok CH, Bilardi RA, Sandow JJ, Silke N, Mason K, Visser J, Jabbour AM, Glaser SP, Okamoto T, Bouillet P, D'Andrea RJ, Ekert PG. HoxA9 regulated Bcl-2 expression mediates survival of myeloid progenitors and the severity of HoxA9-dependent leukemia. *Oncotarget*. 4(11) 1933-47 (2013)

4. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, Okamoto T, Dobson RC, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity*. 39: 443-453 (2013)
5. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. Ifit1 inhibits JEV replication through binding to 5' capped 2' -O unmethylated RNA. *J Virol*. 87(18): 9997-10003 (2013)
6. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis*. Jan 17;4:e465 (2013)
7. Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity. *ACS Chem Biol*. 8(2): 297-302 (2013)

#### 2. 学会発表

1. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
2. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
3. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
4. 山本聡美、福原崇介、塩川 舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、B 型肝炎ウイルスの増殖に関与する宿主因子の解析、

- 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日, 2013
5. 川岸崇裕、金井祐太、岡本 徹、松浦善治、小林剛, 哺乳類オルソレオウイルスの腫瘍細胞溶解能の検討と遺伝子操作系の確立, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日, 2013
  6. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2013
  7. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2013
  8. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2013
  9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 32nd American Society for Virology, Annual Meeting, USA, JULY 20<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>.
  10. Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Akinori Ninomiya, Takasuke Fukuhara, Toru Okamoto, Takayuki Abe, and Yoshiharu Matsuura, Innate immune response induced by baculovirus suppresses transgene expression, 32nd American Society for Virology, Annual Meeting, USA, JULY 20<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>.
- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他

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(平成 25 年度)

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者:榎本 信幸 山梨大学医学部第一内科 教授

分担研究課題: Deep sequence を用いた PreS 変異と HBV 肝病態進展の検討

研究要旨: B型慢性肝疾患におけるpreS領域の欠失あるいは変異は、肝病態の進行や肝発癌と関連することがダイレクトシーケンスによる解析にて報告されているが、病態形成における意義は十分に明らかとなっていない。H25年度は、H24年度に引き続き、本邦のB型慢性肝疾患におけるpreS領域の欠失・変異、HBs抗原量と肝病態との関連を明らかにすることを目的として、deep sequenceを用いた検討をH24年度の24人から72人と解析症例を増加させ、より詳細に解析を行った。

その結果、特にPreS2の欠失が肝病態の進展と有意に関連すること、すなわち無症候性キャリア(AsC)から慢性肝炎(CH)、肝硬変(LC)と病態が進展するにつれて、PreS2欠失B型肝炎ウイルス(HBV)の混在比率が増加し、一方でPreS2変異・欠失の混在率が高いほどHBsAg量は低くなること示された。これらのことから肝病態が進行するほどPreS領域の変異・欠失が生じ、肝病態進展例ではむしろHBsAg低値となることが明らかとなった。

研究協力者:前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

A. 研究目的

近年 B 型慢性肝疾患における病態と関連する因子として、HBs抗原定量値の重要性が注目されている。すなわち中国を中心としたアジア諸国からの報告にて、高 HBs抗原症例では、HBV-DNA 量とは独立に肝発癌リスクが高いことが報告されている。B 型慢性肝疾患は病態と年齢に大きな関連があることが知られているが、これらの国における肝疾患の年齢層は若く、比較的高齢者の多い日本において HBs抗原量と肝疾患に同様の関連が認められるのか明らかとなっていない。

一方、HBV における preS 領域の欠失あるいは変異は、肝病態の進行や肝発癌と関連

することがダイレクトシーケンスを用いた検討等にて以前より報告されているが、病態形成における詳細な意義は明らかとなっていない。

H25 年度は H24 年度に引き続き、本邦の B 型慢性肝疾患における preS 領域の欠失・変異、HBs抗原量と肝病態との関連を明らかにすることを目的として、deep sequence を用いた検討を H24 年度の 24 人から 72 人と解析症例を増加させてより詳細に検討した。

B. 研究方法

B 型肝炎のウイルス量が 4 未満で肝炎の活動性が臨床的に認められないキャリア群

(AsC)18例、慢性肝炎群(CH)25例、肝硬変群(LC)29例における血清から PreS<sup>+</sup>S<sup>-</sup>領域をパイロシークエンサーをもちいて deep sequence を行い、HBs 抗原量の値と含めて、臨床的関連性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

Deep sequence を用いた検討にて 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。

### D. 考察

Deep sequence を用いた検討によって、特に preS2 領域の欠失は B 型肝炎の進行と関連することが示された。PreS2 領域の変異・欠失症例で HBsAg は低く、preS 領域変異・欠失によって、HBs 抗原の産生が低下することが明らかとなった。PreS 領域の変異・欠失症例では、HBsAg 低値でも肝病態は進行しており、HBsAg 量は HBV ccc DNA のサロゲートマーカーにならない可能性が考えられた。

### E. 結論

次世代シークエンサーを用いた deep sequence による HBV の quasispecies 解析

を行うことにより、肝病態の進展に PreS2 の変異・欠失が関連することが明らかとなった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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.

2. 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.

3. 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.

$\alpha$ -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C.

Hepatology. 2013 Oct;58(4):1253-62.

4. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.

IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) and IFN- $\alpha$  synergistically inhibit HCV replication.

J Viral Hepat. 2013 Apr;20(4):281-9.

5. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N.

Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.

J Med Virol. 2013 Mar;85(3):449-58.

6. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.

Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.

Hepatol Res. 2013 Aug;43(8):865-75.

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。

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（平成 25 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

研究協力者：外山政明，濱崎隆之，岡本実佳（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

分担研究課題：カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発

研究要旨：現在，臨床で使用されている B 型肝炎ウイルス（HBV）の治療薬は，インターフェロンを除くと，それらは全て逆転写酵素として働く HBV の DNA ポリメラーゼを阻害する核酸アナログである。昨年度の本研究において，新しい作用機序を持つ抗 HBV 薬の開発を目的として，HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を確立した。また，それを用いて薬剤ライブラリーの *in silico* スクリーニングを行い，ドッキングスコアの高い薬剤を選択した。本年度はその中の薬剤およびその誘導体について，*in vitro* における抗 HBV 効果を調べたところ，選択的に HBV の産生を抑制する化合物をいくつか同定することに成功した。

#### A. 研究目的

昨年度の本研究報告書でも述べたように，B 型肝炎ウイルス（HBV）による慢性肝炎の治療薬として，現在臨床で使用可能なものは，インターフェロンを除くと，全てが核酸アナログである。これらの薬剤は逆転写機能を有する HBV の DNA ポリメラーゼを標的としており，それ以外の分子を標的とした抗 HBV 薬の開発が遅れている。抗 HBV 核酸アナログの実用化は，慢性 B 型肝炎の治療成績に大幅な改善をもたらしたが，他の抗ウイルス薬と同様に，これらの薬剤に対する耐性ウイルスの出現や，薬剤の中断による肝炎の再燃・増悪も報告されている。

そこで本研究では，HIV 感染症治療における多剤併用療法の成功例にならう，核酸アナログ以外の新規抗 HBV 薬の開発を目的とした研究を行う。HBV の場合は HIV と比較して，薬剤の標的となるウイルス由来の蛋白分子も少なく，ウイルスの感染複製機構の解明も遅れているが，昨年度の本研究により，カプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系（docking study）を

確立できたことから，これを用いて薬剤の *in silico* スクリーニングを行うことで，効率的な薬剤の同定を試みる。スクリーニングによって選出された薬剤は，既に確立されている HBV 感染培養細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を用いて，抗 HBV 効果を確認する。この操作により，選択的な抗 HBV 効果を有するリード化合物が得られたら，その周辺化合物や誘導体について，抗 HBV 効果を検討することで薬剤の最適化を行うとともに，作用機序（分子標的）を明らかにする。最終的には，動物を用いた毒性試験や薬物動態試験を行い，これらの結果を総合することで，当該薬剤の臨床開発の可能性を決定する。

本研究の目的が達成されれば，我が国に 110-140 万人と推定される HBV 持続感染者に対し，既存の抗 HBV 薬とは異なる作用機序を有する新規薬剤を提供することにより，新しい B 型肝炎治療への展望を開くことが可能となる。すなわち，既存の核酸アナログと本研究により開発が期待される新規薬剤を併用することで，高価で副作用の強いインターフェロンが不要になるだけ

でなく、薬剤耐性ウイルスの出現による肝炎の再燃を防ぎ、感染者に対して長期にわたる安定的な治療を提供することができる。その結果、肝硬変や肝がんの発症率や死亡率を減少させることで、感染者の将来に対する不安を軽減するとともに、国民の福祉の向上と医療費の削減をもたらすことができると思われる。

## B. 研究方法

1. 薬剤の *in silico* スクリーニング：詳細は昨年度の本研究報告書に記載した。再度、簡潔に述べると、*in silico* アッセイ系の構築には、統合計算化学システム Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) を用いた。HBV カプシド蛋白複合体の結晶構造に水素原子を付加し、構造の最適化を行うことで、カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスにおけるポケットサイトを同定した。このサイトを標的とし、薬剤の *in silico* スクリーニングアッセイを行い、ドッキングスコアを計算した。次に、ドッキングスコアとドッキングポーズが良い化合物を選別し、*in vitro* アッセイ系を用いて抗 HBV 活性を評価した。

2. 抗 HBV アッセイ：*In silico* スクリーニングにより選出された薬剤は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 に HBV DNA を導入した HepG2.2.15 細胞のクローン株 HepG2.2.15.7 を用いて、抗 HBV 効果について検討した。具体的には、 $1 \times 10^4$  個/well の細胞を、コラーゲンがコートされたマイクロプレートに播種し、種々の濃度の薬剤とともに 37°C にて培養した。培養 3 日後に、同じ濃度の薬剤を含む新鮮な培養液と交換し、さらに 3 日間培養した。その後、細胞はテトラゾリウムを用いた色素法にて、生細胞数を定量した。一方、培養上清は lysis buffer にてウイルス粒子を融解した後、real-time PCR 法を用いて、ウイルス DNA の定量を行った。Real-time PCR に用いた TaqMan プライマー/プローブの塩基配列は、昨年度の本報告書に記載した。

(倫理面への配慮)

本研究では、個人が特定出来るようなヒトのサンプルは用いていない。

## C. 研究結果

1. カプシド蛋白間のインターフェイスを標的とする *in silico* スクリーニング：昨年度の本研究において、図 1 に示すように、薬剤がはまり込むポケットサイトを同定することに成功した。今年度は昨年度の結果を受けて、このポケットサイトに対し、各種薬剤ライブラリーのデータベースを用いて、引き続き *in silico* スクリーニングを実施した。その結果、新たにドッキングスコアの良い 24 種類の化合物を選び出し、それらの薬剤を実際に入手し、*in vitro* 抗 HBV アッセイを行った。

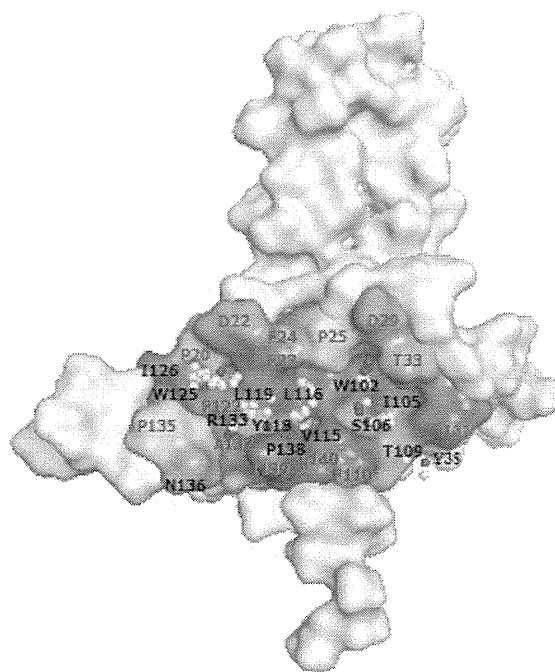


図 1. カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスと *in silico* スクリーニングの標的サイト。標的サイトを赤球と白球で示しており、それぞれの球は、親水性と疎水性の性質を示す。また、カプシドのインターフェイスに関わるアミノ酸も示されており、この標的サイトに含まれるアミノ酸を赤文字で示す。

2. 抗 HBV 効果: *In silico* スクリーニングにて選別された 24 種類の薬剤を入手し, それらの HepG2.2.15.7 細胞における抗

HBV 効果について調べた。選抜された薬剤の化学構造とそれらの抗 HBV 効果を図 2 に示す。

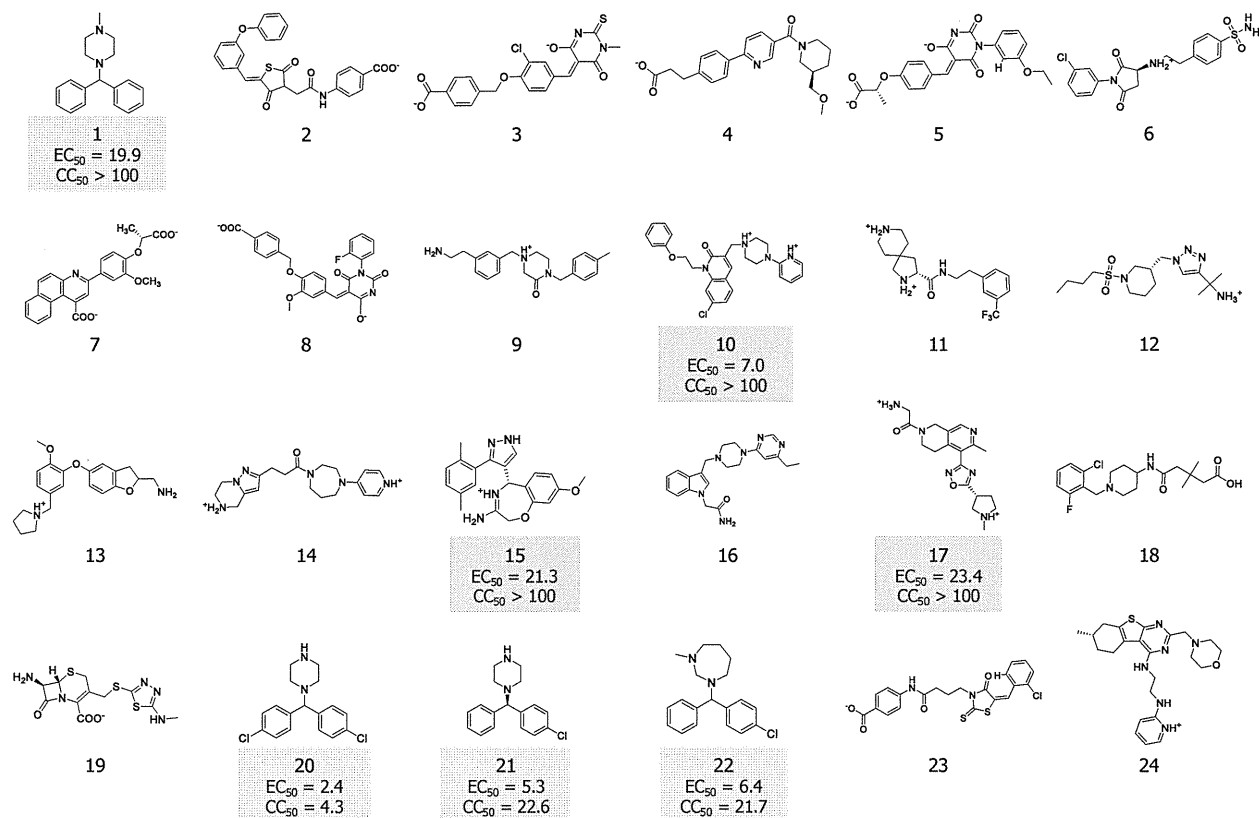


図 2. *In silico* スクリーニングによって選別された薬剤の化学構造とそれらの抗 HBV 効果.

薬剤の抗 HBV 効果は, HepG2.2.15.7 細胞における, 培養上清中の HBV の DNA を real-time PCR 法にて定量することで評価した。また, 薬剤の細胞毒性は生細胞数をテトラゾリウム法にて定量することで評価した。 $EC_{50}$ : 50% Effective concentration based on the reduction of viral DNA in culture supernatants.  $CC_{50}$ : 50% Cytotoxic concentration based on the reduction of viable cell number. 数値が記載されていない薬剤は, 抗 HBV 効果が認められなかったもの。

結果的に 24 薬剤のうち, 7 薬剤に抗 HBV 効果を認めた。そのうち, 4 薬剤は化学構造が類似していた (緑色)。しかしながら, 薬剤 1 を除き, 20, 21, および 22 は細胞毒性も比較的強く, HBV に対する選択性が得られなかった。一方, 薬剤 10, 15, 17 (青色) については, 細胞毒性がほとんど認められなかったが, 10 を除いて, わずかな抗 HBV 効果しか示さなかった。以上の事から, 薬剤 10 がリード化合物の第一候補である

と考えられた。

3. 新規核酸誘導体: 本研究の目的である「カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬」の研究を進める一方で, 我々は新規核酸誘導体に強い抗 HBV 効果を同定することにも成功した。それらの化学構造と抗 HBV 効果を図 3 に示す。何れも adenosine 誘導体であるが, 一方は臭素を (Nuc 1), もう一方はヨウ素を (Nuc 2) 分子内に有している。また, 糖に相当する部分は不飽和炭素



環構造であり、2' および3' の位置に水酸基を有する、リボース型であった。

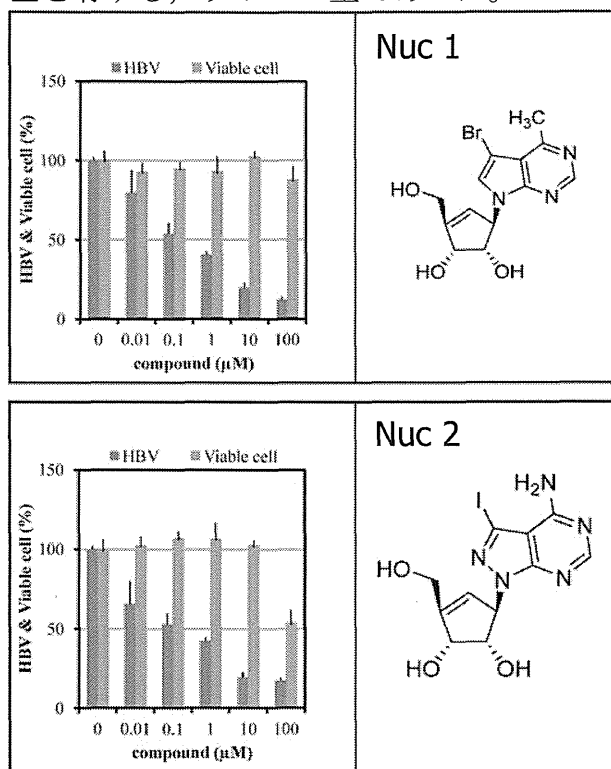
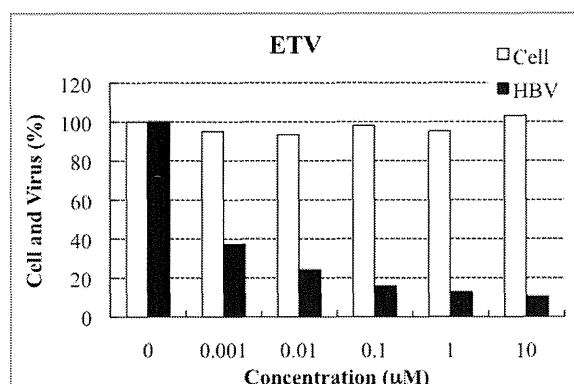
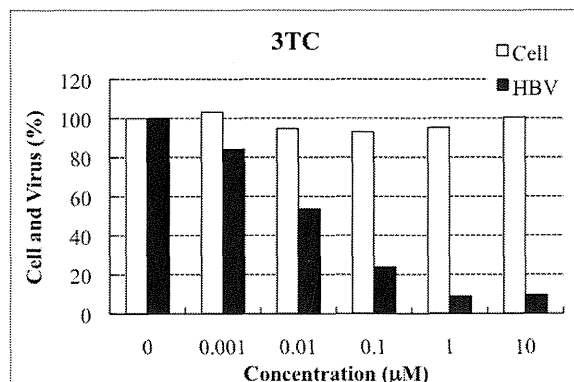


図 3. 抗 HBV 活性を有する新規核酸誘導体の化学構造と抗 HBV 活性. 薬剤の抗 HBV 効果および細胞毒性の評価法は図 2 の説明のとおり. Nuc 1 の EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> 値は, それぞれ 0.36 および > 100 μM であった. また, Nuc 2 の EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> 値は, それぞれ 0.53 および ≥ 100 μM であった.

4. マイコプラズマの汚染が抗 HBV アッセイに与える影響: 研究を進める途中において, *in vitro* 抗 HBV アッセイに用いている HepG2.2.15.7 細胞が, マイコプラズマに汚染されていることが分かった. そこで, 専用の試薬を用いて, マイコプラズマを除去し, 除去後はマイコプラズマ・フリーの同細胞を用いて, 抗 HBV アッセイを継続することにした. ところが, マイコプラズマ・フリーの細胞を用いて, ラミブジン (3TC) およびエンテカビル (ETV) の抗 HBV 効果を検討したところ, 図 4 に示すように, マイコプラズマで汚染された細胞では強い抗 HBV 効果を示したにも関わ

らず, マイコプラズマ・フリーの細胞では高濃度においても上清中の十分なウイルス DNA の減少が認められなかった.

A



B

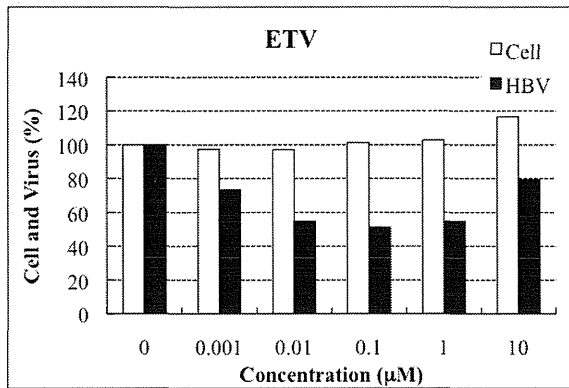
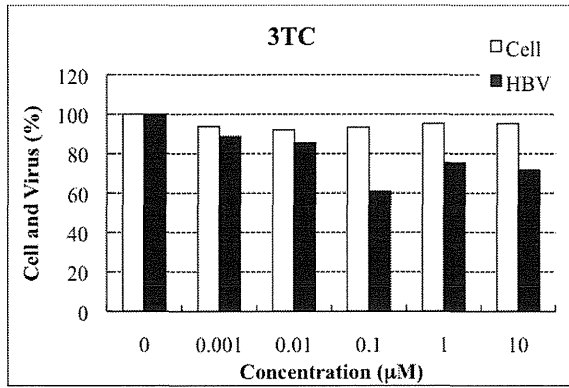


図4. ラミブジン (3TC) およびエンテカビル (ETV) の抗 HBV 効果. HepG2.2.15.7 細胞に種々の濃度の薬剤を作用させ、「研究方法」で述べた方法により、薬剤の抗 HBV 効果を評価した。A: マイコプラズマに汚染された細胞を用いた場合、B: マイコプラズマ・フリーの細胞を用いた場合。

そこで、マイコプラズマ・フリーの細胞を用いても、薬剤の抗 HBV 効果を同定できるようなアッセイ条件を検討したところ、アッセイ期間を6日から9日に延長することで、この問題が回避できることが分かった (図5)。従って、今後はこの条件で、薬剤の試験を進めて行く予定である。

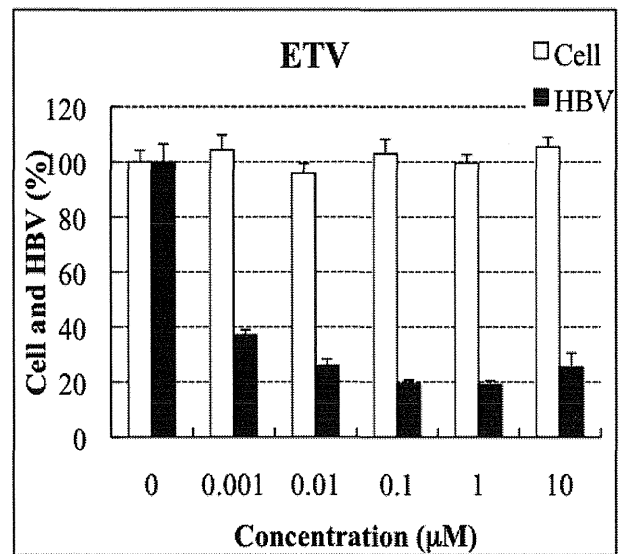
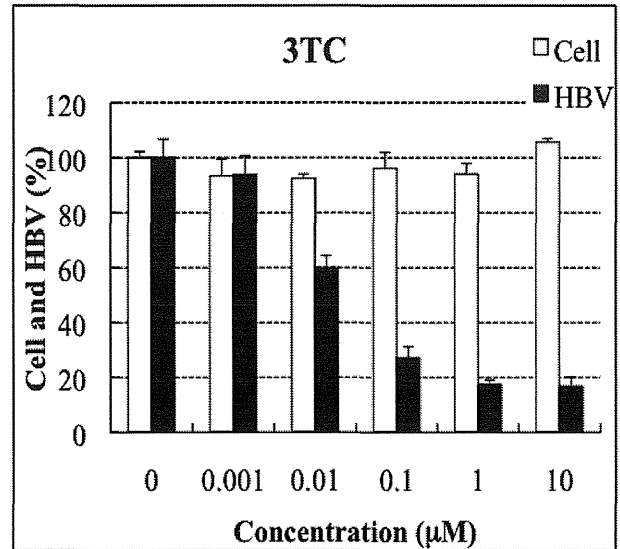


図5. マイコプラズマ・フリーの細胞を用いて9日間で抗 HBV アッセイを実施した結果。

#### D. 考 察

HBV のコアは感染細胞の細胞質において、カプシド蛋白、ウイルスプレゲノム RNA、ウイルス DNA ポリメラーゼ、そしていくつかの宿主細胞由来の蛋白によってアセンブリーされる。コアはプレゲノム RNA からウイルス DNA の合成や細胞内輸送に必須であることから、コアを形成する際のカプシド-カプシド蛋白間の相互作用 (インターフェイス) は、抗ウイルス薬の標的になる可能性がある。我々はこれまで

の本研究において、コンピューターを用いて、カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスを解析し、それと相互作用する薬剤を選び出す目的で、薬剤ライブラリーの *in silico* スクリーニングを実施した。これにより、実際に *in vitro* 抗 HBV アッセイを実施すべき薬剤を 24 種類に絞り込み、その中実際に抗 HBV 効果を調べた。

今回、同定された薬剤は、昨年度に報告したリード化合物と化学構造が異なることから、新しいリード化合物になる可能性を有している。特に薬剤 **10** は細胞毒性もほとんどないことから、今後はこの誘導体について、抗 HBV 効果を検討することで、化合物の最適化を図る予定である。また、昨年度に同定したリード化合物も、現在、その誘導体について抗 HBV 効果を検討中であり、活性が高い薬剤が同定できた時には、これらの薬剤がコアの形成を阻害することで、抗 HBV 効果を発揮しているかどうかを明らかにする予定である。

一方、これとは別に、今年度は 2 種類の新規核酸誘導体に強い抗 HBV 効果を同定することに成功した。これらの薬剤は、糖に相当する部分がリボース型であることから、当初は抗 HCV 効果を狙って合成された。しかし、これらは抗 HCV 効果を示さなかった (data not shown)。現在、これらの薬剤については、特許を出願するとともに、誘導体を合成展開中であり、さらに高い活性を有するものが得られた場合には、3TC や ETV に耐性を示す HBV に対する抗ウイルス効果を検証することで、開発の可能性を探る予定である。

最後に、マイコプラズマによる細胞の汚染が、それを用いた *in vitro* 抗 HBV アッセイの結果に大きな影響を与えることを明らかにした。この理由は明らかではないが、一般的に核酸系抗ウイルス薬の場合には、1) マイコプラズマによる核酸誘導体のリン酸化に対する影響、2) マイコプラズマの増殖が細胞内の核酸プールに与える影響、3) マイコプラズマによる核酸トランスポーターに与える影響などが想定されている。

しかしながら、今回の問題はアッセイ期間をこれまでの 6 日間から 9 日間に延長することで、回避できることが明らかになったことで、上記 1~3 以外の原因も否定出来ない。また、HBV の場合は HIV のように、非核酸系の良い阻害薬が存在しないため、今回のような現象が核酸誘導体にもみ起こるのか、あるいは全ての阻害薬に対しても起こるのかは、全く不明である。何れにせよ、今後は全ての薬剤について、9 日間のアッセイを行う必要があるだろう。

## E. 結 論

HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を用いて、薬剤ライブラリーのスクリーニングを行い、選び出した 25 種類について、*in vitro* 抗 HBV アッセイを行ったところ、リード化合物となるような新規薬剤を同定することに成功した。また、これとは別に、強い抗 HBV 効果を有する新規核酸誘導体を同定することに成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Painsil E, Cheng Y-C. From the chemistry of epoxy-sugar nucleosides to the discovery of anti-HIV agent 4'-ethynylstavudine - Festinavir. *Curr. Pharm. Des.* **19**: 1880-1897 (2013).
2. Uto T, Toyama M, Nishi Y, Akagi T, Shima F, Akashi M, Baba M. Uptake of biodegradable poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles and antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Results Immunol.* **3**: 1-9 (2013).
3. Nakamura M, Matsumoto Y, Toyama M, Baba M, Hashimoto Y. Organosilicon compounds as adult T-cell leukemia cell proliferation inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **61**: 237-241 (2013).

4. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by *in silico* screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 1323-1331 (2013).
  5. Okamoto M, Chono H, Kawano Y, Saito N, Tsuda H, Inoue K, Kato I, Mineno J, Baba M. Sustained inhibition of HIV-1 replication by conditional expression of the *E. coli*-derived endoribonuclease MazF in CD4<sup>+</sup> T cells. *Hum. Gene. Ther. Methods* **24**: 94-103 (2013).
  6. Shimo T, Taketsugu Y, Goto T, Toyama M, Yoshimura K, Baba M. A facile synthesis of (5-hydroxy-4-oxo-4*H*-pyran-2-yl) methyl carboxylates and their antiviral activity against hepatitis C virus. *Heterocycles* **87**: 1349-1358 (2013).
  7. Sakakibara N, Hamasaki T, Baba M, Demizu Y, Kurihara M, Irie K, Iwai M, Asada E, Kato Y, Maruyama T. Synthesis and evaluation of novel 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil analogs as potential anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* **21**: 5900-5906 (2013).
  8. Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Doi A, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Kawamura YI, Otsubo T, Dohi T, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagida M, Oka S, Okamura T, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1. *Retrovirology* **10**: 83, (2013).
  9. Shima F, Uto T, Akagi T, Baba M, Akashi M. Size effect of amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles on cellular uptake and maturation of dendritic cells *in vivo*. *Acta Biomaterialia* **9**: 8894-8901 (2013).
  10. Kasula M, Tuniki B, Toyama M, Thiyagarajan A, Bal C, Baba M, Sharon A. Conformational mimetic approach for synthesis of new carbocyclic nucleosides as anti-HCV lead. *ChemMedChem* **8**: 1673-1680 (2013).
  11. Raina S, Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A reporter based single step assay for evaluation of inhibitors targeting HIV-1 Rev-RRE interaction. *Indian J. Virol.* **25**: 101-106 (2014).
  12. Konreddy AK, Toyama M, Ito W, Bal C, Baba M, Sharon A. Synthesis and anti-HCV activity of 4-hydroxyamino  $\alpha$ -pyranone carboxamide analogs. *ACS Med. Chem. Lett.* in press.
  13. 馬場昌範. 抗ウイルス薬の歴史と分類、特集「抗ウイルス療法の現状と今後の展望」. *臨床と微生物***40**: 3-7 (2013).
  14. 濱崎隆之, 馬場昌範. 抗ウイルス薬. 医薬ジャーナル増刊号「新薬展望2013」**49**: 102-108 (2013).
2. 学会発表 (招待講演・シンポジウム)
    - 1, Baba M. My antiviral research in Fukushima, Leuven and Kagoshima. “Gertrude Elion Award Lecture” *26th International Conference on Antiviral Research*, May 12, 2013, San Francisco, USA.
    2. Baba M. Discovery and development of novel antiretrovirals: from compound screening to clinical trials. *14th Kumamoto AIDS Seminar*, October 30, 2013, Kumamoto, Japan.
    3. 馬場昌範. 生分解性ナノ粒子を用いた抗腫瘍ワクチンの開発研究. 平成 25 年度日本皮膚科学会西武支部企画研修講習会, 2013 年 11 月 8 日, 鹿児島.
    4. Baba M. Investigations of novel antiretrovirals: from discovery of compounds to their clinical trials. *International Symposium on Prevention and Control of Viral Diseases*, December 12, 2013, Daejeon, South Korea.
- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許出願・取得
    1. 新規ピラノンカルボキサミド誘導体及

びその抗 C 型肝炎ウイルス薬としての用途。発明者：馬場昌範, Ashoke Sharon, Chandralata Bal, Ananda Kumar Konreddy. 出願人：鹿児島大学, Birla Institute of Technology (India). 出願番号：特願 2013-148716. 出願日：2013 年 7 月 17 日。

2. 抗 B 型肝炎ウイルス薬。発明者：馬場昌範, 濱崎隆之, Ashoke Sharon, Chandralata Bal, Anandarajan Thiyagarajan,

Mohan Kasula. 出願人：鹿児島大学。出願番号：特願 2013-254236, 特願 2013-254238. 出願日：2013 年 12 月 9 日。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：Akbar Sheikhmohammadfazole

研究協力者：

分担研究課題：**Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection**

研究要旨：

Studies have shown that containment of HBV replication can be achieved by commercially-available antiviral drugs in patients with chronic hepatitis B (CHB), however, maintenance of therapeutic efficacy and blocking of HBV-related complications is hard to materialized and maintained in CHB patients by these drugs. After working for 20 years to develop an alternate therapeutic regimen for CHB patients, last year we presented that in addition to directly acting antiviral drugs, HBV antigen-specific therapeutic vaccines may be endowed with antiviral and liver protecting effects in HBV transgenic mice (HBV TM), a model of chronic HBV carrier state. Also, preliminary data about safety and efficacy of a HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine in patients with CHB was documented. However, it was not still clear if this approach can induce sustained suppression of HBV replication. Also, the cellular and molecular mechanisms underlying these were not addressed. As the phase III clinical trial with HBsAg/HBcAg vaccine in CHB patients has entered in off-treatment follow period, both transient responders and sustained responders are now available for elucidation of mechanisms underlying this. As some of these cellular mechanisms cannot be evaluated in CHB patients due to ethical and technical concerns,, those were evaluated in HBV TM. After analyzing the outcome of these data, more effective regimens for controlling HBV replication, containment of HBV-induced liver damages, and blocking HBV-related complications in CHB patients would be developed.

**A. 研究目的**

The final target of this study is to develop new, novel and evidence-based therapeutic regimens for sustained control of HBV replication and containment of liver damages in subjects with chronic HBV infection. The primary aim of this study is to dissect the nature of immunity in responders and non-responders of HBV-related therapeutic vaccines. Ultimately, the study will be expanded to other available agents used for treating CHB patients.

**B. 研究方法**

The study was conducted in both animal model of chronic HBV infection and also in patients with CHB. HBV TM expressing HBV DNA, hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B antigen (HBeAg) were used as

animal model of chronic HBV infection. Patients with CHB with HBsAg in sera for more than 6 months, elevated alanine aminotransferase (ALT), and evidences of increased hepatic fibrosis compatible with chronic liver damages (confirmed by fibroscan) were enrolled in this study.

1. HBV TM were injected HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine intraperitoneally for 8 times at an interval of 2 weeks.
2. Patients with CHB were immunized with vaccines containing HBsAg/HBcAg (100 microgram of each antigen) 5 times by nasal route and 5 times by both nasal and subcutaneous routes (interval of 2 weeks).
3. Kinetics of HBV DNA, HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, and ALT were evaluated in the sera.

4. In vitro studies were accomplished with immunocytes of both HBV TM and CHB patients. Production of cytokines, proliferation of T lymphocyte, and frequencies of cytotoxic T lymphocytes (CTL) were assessed, whenever possible.
5. At EOT, transient responder HBV TM exhibited HBsAg and HBcAg-specific cytokine production, T cell proliferation and CTL in the liver. However, the magnitudes of HBV antigen-specific reduced significantly in transient responders treatment free follow up period. On the contrary, sustained responders retained antigen-specific immunity 24 weeks after EOT during treatment-free follow up period.

#### (倫理面への配慮)

All mice used in this study received human care and permissions were obtained from respective institutional review board to conduct the study. Informed written consent was obtained from patients with CHB. Also, permission was obtained from ethical committee of the hospital before human study. In case of collaborative studies, all sorts of permissions were obtained by the Principal Investigators of the concerned institutions.

#### C. 研究結果

The primary assessment of therapeutic effect of HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine in HBV TM and CHB patients was made at end of treatment (EOT) (Transient response). A second evaluation of therapeutic outcome was done 24 weeks after EOT (sustained response). *Therapeutic effect at EOT and 24-weeks of follow up*

1. At EOT, 80% of HBV TM became negative for HBsAg and 60% developed antibody to HBsAg (anti-HBs). HBV TM that remained both negative for HBsAg and also developed anti-HBs in the sera were considered as transient responders to therapy.
2. Twenty-four weeks after EOT, 60% HBV TM remained negative for HBsAg and 50% retained anti-HBs. Fifty percent HBV TM those remained negative for HBsAg and also continued to express anti-HBs were considered as sustained responders.
3. At EOT, 56% CHB patients showed undetectable HBV DNA and ALT within upper limit of normal (ULN) (transient responder)
4. Twenty-four weeks after EOT, 45% showed undetectable HBV DNA and ALT within ULN (sustained responders)

#### D. 考察

In this study, the immunological responses at EOT and 24-weeks after EOT were evaluated in 5 representatives HBV TM. Also, the nature of immunity in transient responders and sustained responders were evaluated in 5 patients of each group. Although preliminary, this study provides insights about relation between therapeutic effect of vaccine therapy and sustainability of antigen-specific immunity in these subjects. However, other factors related to sustained immunity are yet to be explored in randomize clinical trial.

#### E. 結論

The dose of vaccines, duration of therapy, nature of therapy, repeated vaccinations and other unknown factors may be related to waning of antigen-specific immunity in vaccinated subjects along with time. Defining proper therapeutic regimen on the basis of retrieved data and further study would be required.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Akbar SM, Al-Mahtab M, Uddin MH, Khan MSI. Scope and limitation of HBsAg-, HBcAg-, and HBsAg/HBcAg-based combined therapeutic vaccines in chronic HBV

infection: Evidences from laboratory benches and patient's bedsides. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 12:363-9, 2013

Akbar SM, Al-Mahtab M, Khan SI. Non-antigen-specific and antigen-specific immune therapies for chronic hepatitis B: Evidences from laboratory benches and patient's bedsides. *Expert Opin Biol Ther* 13: 1063-74, 2013

Al-Mahtab M, Akbar SM, Aguilar JC, Uddin H, Khan MS, Rahman S. Therapeutic potential of a combined hepatitis B surface antigen and core antigen vaccine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2013; 7:981-989

Stefanska B, Bouzeimat A, Huang J, Sudermant M, Hallett M, Han Z-G, AL-Mahtab M, Akbar SM, Khan WA, Raqib R, Szyfi M. Discovery and validation of DNA hypomethylation biomarkers for liver cancer using HRM-specific probes. *PlosOne* 8:e68439, 2013

## 2. 学会発表

**3<sup>rd</sup> Meeting of the USJCMSP Hepatitis Panel. A Symposium on Curative Therapies for Chronic HBV Infection. Singapore, March 12<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> 2013.**

Akbar SM. Therapeutic vaccine for HBV

**2013 Taiwan Association for the Study of the Liver (TASL)-Japan Hepatitis B Workshop, Tokyo, Japan April 13-14 2013**

Akbar SM. Therapeutic potential of inducible immunity in HBV infection: antigen non-specific versus antigen-specific immune therapy

**1<sup>st</sup> South Asian Association for the Study of Liver (SAASL), Dhaka, Bangladesh, May 18-19**

Akbar SM. Immune therapy for

hepatocellular carcinoma.

**Asia-Pacific Asociación for the Study of the Liver. Singapore June 6-10, 2013.**

Akbar et al. Wide-spread immunogenecity and adjuvant properties of hepatitis B core antigen (HBcAg) and their utility during immune therapy against chronic hepatitis B

Akbar et al. Mechanisms underlying limited therapeutic efficacy of combination therapy containing antiviral drug and hepatitis B virus vaccine in chronic hepatitis B

**第 2 4 回 The Meeting of Liver and Immunology 平成 2 5 年 9 月 7 日 京都**

Akbar et al. Safety and efficacy of HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine vs pegylated interferon in a phase III clinical trial with 151 chronic hepatitis B patients in Bangladesh.

**XIII Euroasian Congress of Surgeons and Gastroenterologist. Baku, Azerbaijan, September 12-15.**

Akbar et al. Discrepancies between immunoassay and sequencing exposed inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan

**64<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for the Study of the Liver, Washington DC, November 1-5, 2013**

Akbar et al. A phase III clinical trial with a therapeutic vaccine containing both HBsAg and HBcAg administered via both mucosal and parenteral routes in patients with chronic hepatitis B.

Akbar et al. Nature of a pathogenic and protective immunity in chronic hepatitis B virus infection.

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





労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。動物実験に関しては「動物の保護および管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）および「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和55年総理府公示第6号）の法律および基準の他、「大学等における実験動物について」（文部科学省国際学術局長通知、文学情第141号）の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮する。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し、承認を得た後に実施する。遺伝子組み換え実験においては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（平成15年法律第97号）を遵守して実施する。

### C. 研究結果

平成25年度は各遺伝子型HBVプラスミドの構築を行い、細胞株樹立に向け進行中である。パイロット試験として樹立した遺伝子型Dの細胞株を用いてSILAC法によるプロテオーム解析を行った。3828蛋白を比較定量的に同定し、約111蛋白がHBV蛋白発現時に有意に増減していた。ミトコンドリア関連蛋白の増加と小胞体関連蛋白の減少が、明らかな傾向として示された。

### D. 考察

今回行ったプロテオーム解析のパイロット試験の結果より、HBV蛋白が細胞内で発現する事により細胞周期、細胞分化の遷延化が引き起こされ持続感染化、癌化へと誘導される可能性が示唆された。今後は細胞株樹立後遺伝子型毎にプロテオーム解析を行い、臨床的特徴と比較検討を行う予定である。

### E. 結論

HBV細胞モデルを構築し、HBV蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析することにより、HBVにより修飾を受ける細胞性因子の同定、異なる遺伝子型HBVにおける複製増殖機構、病原性発現機構を分子レベルで解明し、新たな抗ウイルス薬開発の基盤形成を目指す。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Morikawa K, Gouttenoire J, Hernandez C, Dao Thi VL, Tran HT, Lange CM, Dill MT, Heim MH, Donzé O, Penin F, Quadroni M, Moradpour D.

Quantitative proteomics identifies the membrane-associated peroxidase GPx8 as a cellular substrate of the hepatitis C virus NS3-4A protease.

Hepatology. 2013 Aug 8. doi: 10.1002/hep.26671. [Epub ahead of print]

Lange CM, Miki D, Ochi H, Nischalke HD, Bojunga J, Bibert S, Morikawa K, Gouttenoire J, Cerny A, Dufour JF, Gorgievski-Hrisoho M, Heim MH, Malinverni R, Müllhaupt B, Negro F, Semela D, Kutalik Z, Müller T, Spengler U, Berg T, Chayama K, Moradpour D, Bochud PY; Hiroshima Liver Study Group; Swiss Hepatitis C Cohort Study Group. Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development.

PLoS One. 2013 May 29;8(5):e64053.

Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice.

Gastroenterology. 2013 Aug;145(2):447-55. e1-4.

#### 2. 学会発表

Uchikoshi M, Ito T, Arai J, Shimozuma Y, Miyashita M, Morikawa K, Eguchi J, Nozawa H, Tomoe S, Yoshida H and Imawari M.

The combination therapy with telaprevir, pegylated interferon-alpha-2b and ribavirin causes high serum levels of B cell activation factors and results in abnormal activation of B cells in patients with chronic hepatitis C.

64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, Washington DC, 5 Nov 2013.

Arai J, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Morikawa K, Eguchi J, Nozawa H, Tomoe S, Yoshida H and Imawari M.

Rapid disappearance of HCV from B cells by the combination therapy with telaprevir, pegylated interferon-alpha-2b and ribavirin is associated with high levels of interferon stimulating genes expression in B cells of patients with chronic hepatitis C.

64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, Washington DC, 5 Nov 2013.

宮下みゆき, 伊藤敬義, 打越学, 下間 祐, 荒井潤, 森川賢一, 江口潤一, 吉田 仁, 井廻道夫.

Telaprevir/PegIFN/RBV 3 剤併用療法中の C 型肝炎患者における B 細胞単一クローン増殖及び B 細胞免疫異常の変化

第 17 回日本肝臓学会大会、東京、2013 年 10 月 9 日

荒井 潤, 森川賢一, 飯島堅太郎, 宮下みゆき, 下間 祐, 坂木 理, 野本朋宏, 土肥弘義, 江口潤一, 伊藤敬義, 吉田 仁, 斉藤光次, 国村利明, 九島巳樹.

頻用薬で惹起された薬物性肝障害の二例

第 326 回関東支部例会、東京、2013 年 9 月 14 日

林 栄一, 下間 祐, 江口潤一, 荒井 潤, 大森里紗, 宮下みゆき, 魚住祥二郎, 森川賢一, 伊藤敬義, 吉田 仁

常用量のアセトアミノフェン内服により劇症肝炎をきたした一例

第 326 回関東支部例会、東京、2013 年 9 月 14 日

宮下みゆき, 伊藤敬義, 打越 学, 下間 祐, 荒井潤, 森川賢一, 江口潤一, 吉田 仁, 井廻道夫.

C 型慢性肝炎患者におけるナイーブ B 細胞異常活性化と B 細胞 Clonality 発現及びインターフェロン抵抗性との関連

第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013 年 6 月 7 日

荒井 潤, 伊藤敬義, 宮下みゆき, 打越 学, 下間祐, 森川賢一, 江口潤一, 吉田 仁, 井廻 道夫.

テラプレビル 3 剤併用療法による C 型慢性肝炎患者 B 細胞中 HCV 動態と治療開始早期 ISG 上昇の関連

第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013 年 6 月 7 日

森川賢一

HCV 感染患者内非構造蛋白 3-4A プロテアーゼの MAVS 切断効率の解析

第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013 年 6 月 7 日

江口潤一, 石井成明, 坂木 理, 土肥弘義, 大森里紗, 梶原 敦, 林 栄一, 伊藤敬義, 森川賢一, 吉田 仁, 広石和正, 井廻道夫.

肝細胞癌に対する樹状細胞と抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法の検討

第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013 年 6 月 6 日

大森里紗, 石井成明, 坂木 理, 土肥弘義, 梶原敦, 林 栄一, 森川賢一, 伊藤敬義, 広石和正, 井廻道夫, 江口潤一.

消化器癌に対する IFN- $\alpha$  と抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法の検討

第 99 回日本消化器病学会総会、鹿児島、2013 年 3 月 22 日

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得; 特記事項なし
2. 実用新案登録; 特記事項なし
3. その他; 特記事項なし

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（平成 25 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：豊田哲也

分担研究課題：HBV逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の開発

研究要旨：テノフォビル、エンテカビルより効率の良いHBV逆転写酵素の阻害剤の開発とRNase Hに対する阻害剤の開発のために、ハイスループットスクリーニング系の開発を行い、蛍光色素FAMによる384穴プレートを用いるRNase Hに対する阻害剤のスクリーニング系を開発した。今後は、効率のよりRT-RNase Hドメインの精製法を開発することが課題である。

A. 研究目的

HBVポリメラーゼは逆転写酵素とRNase H活性を持ち、逆転写酵素に対するヌクレオチドアナログが治療薬として用いられている。そして、テノフォビル、エンテカビルが導入され、治療効率は画期的によくなった。しかし、それらは今のところ耐性ウイルスの出現頻度は低いが、今後、耐性の問題が出てくる。また、HIVで培われたように、多剤併用療法が効率的治療のために必要である。そこで、テノフォビル、エンテカビルより効率の良いHBV逆転写酵素の阻害剤の開発と新たにRNase Hに対する阻害剤の開発のために、ハイスループットスクリーニング系の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. HBVポリメラーゼの精製

T7プロモーターの下流にHisタグをつけたHBVポリメラーゼ(pol)、逆転写酵素とRNase H部位(RT-H)、RNase H部位(H)をクローニングし、大腸菌にてHSP90αと共発現し、変性剤を使わずに可溶化し、N-NTA、Mono Q、Superdex200の組み合わせで部分精製した。

2. RNase H活性測定系

蛍光色素FAMを結合したHBVの遺伝子

RNA (RC970-01) 、  
5'(2371)-AGAAGAAGAACUCCCUCGCCU  
CGCAGACGA-3'(2400)とオリゴDNA、  
5'(2394)-GCGAGGCGAGGGAG-3'(2381)を用いてPAGEにてRNase H活性を測定した。また、DNA-RNAキメラヌクレオチド(RC961-1)  
5'-(6-FAM)-rCrCrArCrArUrArGrGrCrUrArUr  
GrUrGrGrArArCTTTTGTTCACATAGCCT  
ATGTGG-(Eclipse)-3'を用いてRNase H活性阻害剤の探索系を開発した。

3. 逆転写酵素活性測定系

ポリA鑄型にFITC-oligo dT15をプライマーとする系とHBV DRとεRNA鑄型とDRに対する相補DNAをプライマーとする系で逆転写酵素活性を測定した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

1. HBVポリメラーゼの精製

N末端にHisタグをつけたpol (His-pol)、RT-H (His-RT-H)、H (H-His)とC末端にHis