

課題番号 : 28指001
研究課題名 : 革新的技術を応用したB型肝炎に対する新規創薬研究
主任研究者名 : 溝上 雅史
分担研究者名 : なし

キーワード : B型肝炎ウイルス、ゲノム編集、核酸アナログ製剤、創薬、逆転写酵素
研究成果 :

HBV-POL 創薬

「POL 活性化の分子機構の解析」

HBV-POL の変異体を作成することで、逆転写活性の機序の解析を進めた。また、HBV 遺伝子型ごとに POL 発現系を構築し、比較解析が出来るようにクローンを作成した。HBV-POL と宿主因子の網羅的解析を行うために、POL と結合している蛋白を回収するための条件検討を進めた。

「ハイスループットスクリーニング (HTS) の確立と薬剤評価」

POL 蛋白を用いた HTS 系の構築を進めた。現行では、比色法で行っているため、これでも HTS は可能であるが、より簡易に高速処理するために、発光系での評価系を検討した。逆転写に利用される基質に対して、比色法同様に反応を誘導する系を構築した。ただし、この反応系では、POL が持つ 4 つの酵素反応の逆転写機能の評価にとどまるため、4 つの機能を同時もしくは、個別に評価できる系を考案している。

「結晶構造解析」

In house での無細胞蛋白発現系での POL 大量発現を進め、精製 POL 蛋白を取得することで、結晶構造解析を行う準備を進めた。POL 単独での解析をまず行い、続いて、逆転写の RNA 鋳型や HBV 構造蛋白との複合体形成時の構造解析を行う (共同研究者: 東京大学 田之倉優教授)。

「POL 抗体取得と POL の定量検査キット化」

上記の方法で POL 大量発現と精製を繰り返すことで、精製 POL 蛋白の取得を進め、これを抗原とすることで、マウスへの免疫を行い、抗体取得の準備を進めた。抗体作成には、マウスの腸管リンパ節への抗原投与方法を採用することで、短期間に反応性の高い抗体を取得できると考えられる。

ゲノム編集創薬

「ゲノム編集遺伝子の最適化」

投与後に細胞内で最適な量の発現が得られるように、RNA 分子の修飾方法を検討した。細胞内での RNA 分子の安定性を変化させることで、翻訳量を調整できるようにした。3 末端 UTR の長さ、安定化配列の導入などを行い、長期間の蛋白発現を得られるようになった。最適化されたゲノム編集遺伝子の RNA 分子は、ヒト肝細胞置換キメラマウスへの長期投与による安全性と有効性確認を行う。

ヒト肝切除片を用いた ex vivo 培養系で HBV 感染抑制効果を評価した。また、iPS 細胞由来の肝細胞を利用することで、HBV 感染が可能な in vitro モデルを確立した (共同研究者: 東京大学 宮島篤教授)。これにゲノム編集遺伝子を投与することで患者の細胞を使って実際に副作用の発現がないか確認できると考えられた。

「ナノミセルの改良」

ナノミセル DDS の改良を進め、肝臓指向性を向上させる検討を進めた。具体的には、ミセル表面にグルコースなどの分子を修飾することで、指向性の変化を検討しているが、肝細胞特異的に発言するアシアロ糖蛋白も候補分子として検討を進めた。出来てきた DDS 分子は、各種マウスモデル (野生型マウス、ヒト肝細胞置換キメラマウス等) で薬剤輸送状況をライブイメージングで確認する。

「臨床試験に向けた検査系の確立」

ゲノム編集創薬が標的とする肝細胞核内の状況を体外から知ることは困難であるため、血中の HBV マーカーで代用を検討する。細胞株で DNA 損傷応答を誘導し、培地中に分泌される分子で有用なものを探索した。今後は、これらの分子を動物やヒト血液でどの程度検出可能か評価する。

Subject No. : 28shi001

Title : Drug discovery for hepatitis B virus infection by the innovative and knowledge-based technology

Researchers : Masashi Mizokami

Key word : Hepatitis B virus, Genome editing technology, Nucleotide analogue, Drug discovery, Reverse transcriptase

Abstract :

HBV polymerase research

1. Molecular basis of HBV-POL activity

Several mutation clones of HBV-POL were constructed to assess the activity site of reverse transcription, DNA polymerization, priming, RNaseH activity. HBV-POL clones derived from all HBV genotypes were obtained from the full-genome construction. To obtain host factors interacting with HBV-POL, the assay flow of the sample collection were established from protein expression to the collection of protein complex.

2. Development of HTS for drug discovery

We have improved the in house assay of reverse transcription using colorimeter method. New assay was based on chemiluminescent method in order to get easy preparation and rapid reaction. Because HBV-POL has 4 function of reverse transcriptase, priming, DNA polymerase, and RNaseH, the assay systems to evaluate each function are going to be developed.

3. Crystal structure analysis

Large scale expression of HBV-POL protein was prepared using in house cell-free protein expression system. These proteins were purified by affinity chromatography. To get an enough volume of the protein, the repeated preparation on the protein expression and purification was determined in this year. Our first step to reveal the crystal structure is the purified HBV-POL. However, the stable storage of HBV-POL was very difficult in the purified condition.

4. Development of antibody against HBV-POL and the diagnosis kit

To get high affinity antibody against HBV-POL, the purified protein obtained from in house cell-free system were inoculated into mouse iliac nodes. The immunization is able to induce rapid immunological reaction to produce the specific antibody. When the specific antibodies of HBV-POL are obtained, the diagnosis kit to detect POL in human serum is developed using the antibody.

Gene-editing technology for drug discovery

1. Modification of gene-editing drug

Based on the products we have previously developed, RNA molecule of gene-editing gene was modified to control the duration of the translation.

2. Improvement of DDS molecule

A specific molecule targeting hepatocyte is added into the DDS molecule. This modification improved the specificity of our DDS.

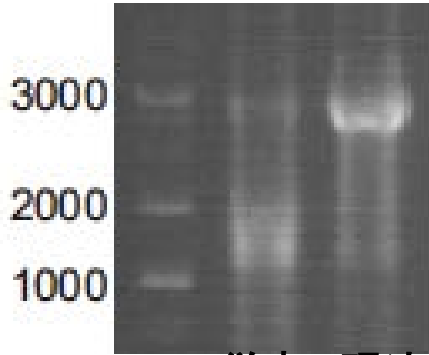
3. Development of biomarker for DNA double strand break

A biomarker to find the DNA double strand break was screened using cell culture system. These candidate molecule will be confirmed in wild or chimeric mouse.

Researchers には、分担研究者を記載する。

HBV polymerase発現系と酵素活性の評価

転写の改善
(RNA泳動)



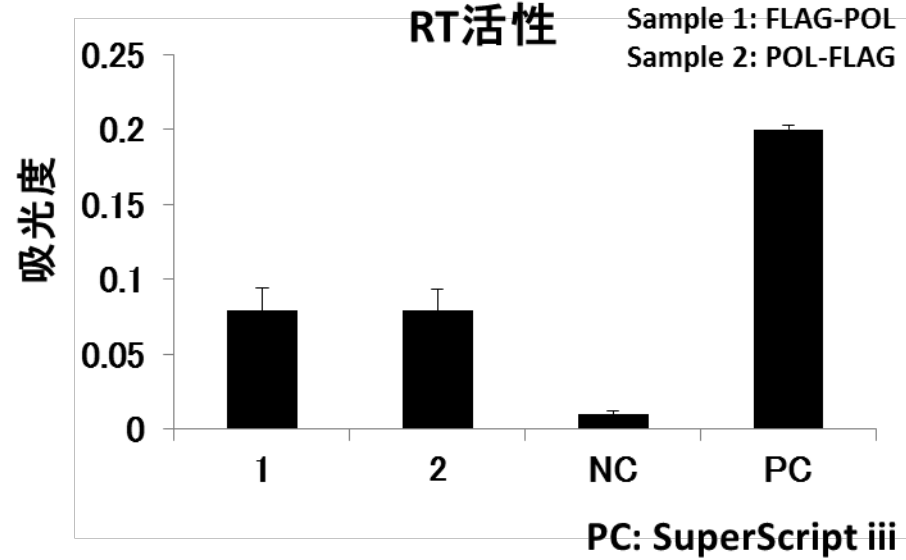
従来 現法

翻訳の改善
(抗FLAG抗体)

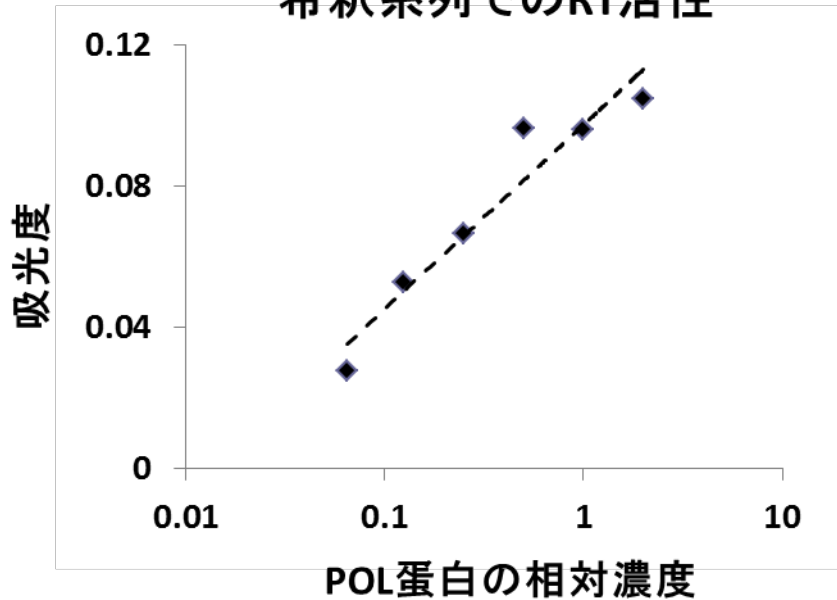


従来 現法

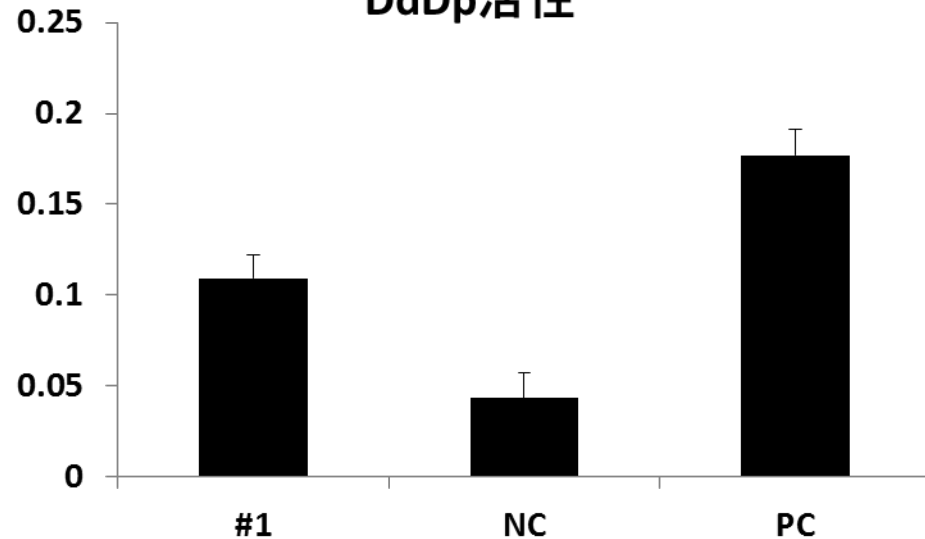
RT活性



希釈系列でのRT活性



DdDp活性

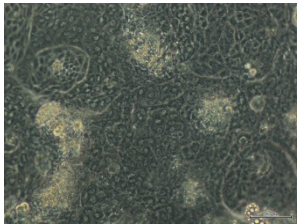


iPS細胞由来肝細胞のHBV感染モデル

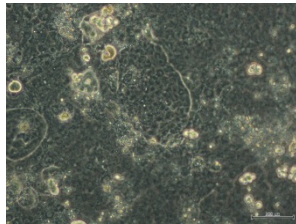
コラーゲンゲル板高密度培養

	DMSO	JAKi	TBKi
分化培地	1	2	3
維持培地	4	5	6

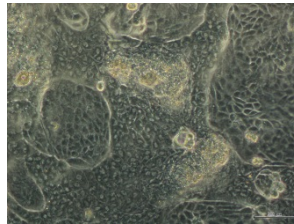
1



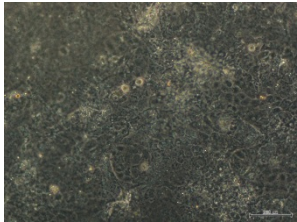
2



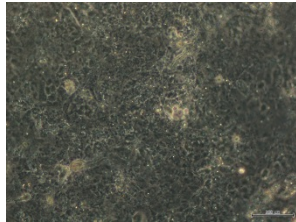
3



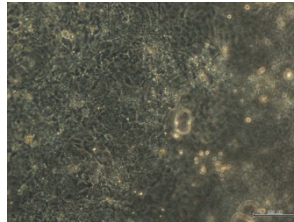
4



5

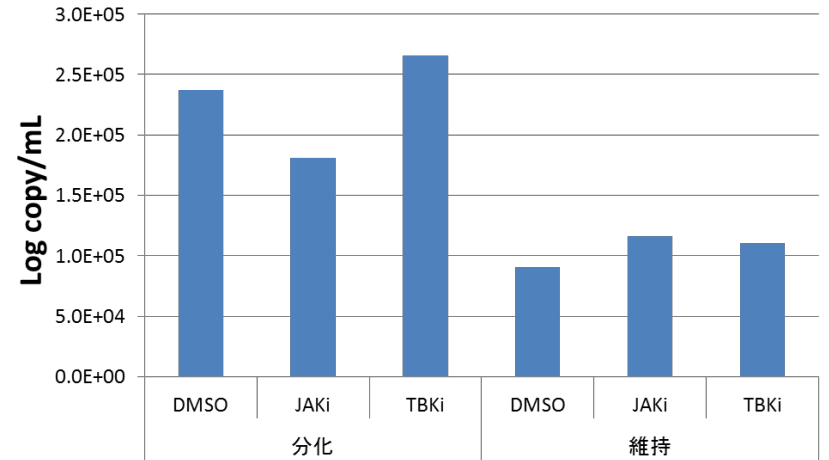


6

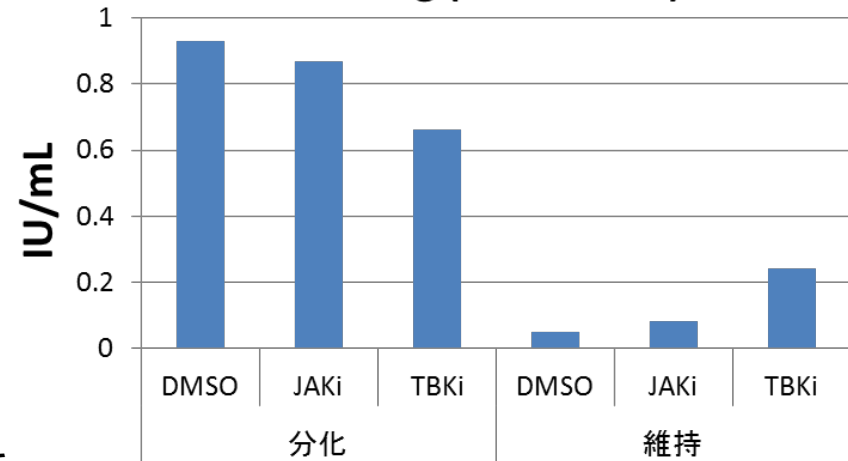


iPS細胞由来の肝細胞を誘導し、HBV感染を実施した。
培地の違いや培養条件の違いで感染性に違いを認めた。

HBVDNA定量



Culture supernatant HBsAg (ARCHITECT)



研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 28指001

研究課題名： 革新的技術を応用したB型肝炎に対する新規創薬研究

主任研究者名： 溝上雅史

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis.	□ N shi da N Chashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsuhashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M.	Sci. Rep.	28814	2016
The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly.	Dansako H, Ueda Y, Okumura N, Satoh S, Sugiyama M, Mizokami M. , Ikeda M, Kato N.	FEBS J.	283(1):144-56.	2016
Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B.	Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Mita E, Okamoto T, Matsuura Y, Okuno A, Takikawa O, Mizokami M. , Kanto T.	Hepatology	63(1):83-94.	2016

研究発表及び特許取得報告について

<p>Geographic Distribution and Characteristics of Genotype A Hepatitis B Virus Infection in Acute and Chronic Hepatitis B Patients in Japan.</p>	<p>Ito K, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, Yatsunami H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Tanaka Y, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Koike K, Mizokami M, and the Japanese AHB and CHB Study Group.</p>	<p>J Gastroenterol Hepatol</p>	<p>31(1):180-9.</p>	<p>2016</p>
<p>Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx.</p>	<p>Kouwaki T, Okamoto T, Ito A, Sugiyama Y, Yamashita K, Suzuki T, Kusakabe S, Hirano J, Fukuhara T, Yamashita A, Saito K, Okuzaki D, Watashi K, Sugiyama M, Yoshio S, Standley DM, Kanto T, Mizokami M, Moriishi K, Matsuura Y.</p>	<p>J Virol.</p>	<p>90(7):3530-42.</p>	<p>2016</p>

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
<p>Variation of PreS-S gene in HBV-associated HCC patients with HLA-DPB1*0201</p>	<p>Masaya Sugiyama, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami</p>	<p>第64回日本ウイルス学会学術集会</p>	<p>札幌</p>	<p>2016年10月</p>
<p>TLR4経路阻害によるB型肝炎ウイルス感染キメラマウスの肝線維化抑制効果の検討</p>	<p>杉山真也、考藤達哉、溝上雅史</p>	<p>第52回日本肝臓学会総会</p>	<p>千葉</p>	<p>2016年5月</p>

研究発表及び特許取得報告について

TLR4 signaling mediates liver fibrosis in chimeric mice with humanized liver persistently infected with HBV	Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami	第52回日本肝臓学会総会	千葉	2016年5月
Toll-like receptor 4 pathway mediate liver fibrosis in chimeric mice with human hepatocytes persistently infected with HBV.	Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami	The international Liver Congress 2016 EASL	Barcelona	2016年4月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
「B型肝炎関連疾患に関与するHLA遺伝子多型」	特願2016-204735	溝上雅史、西田奈央、杉山真也、徳永勝士、澤井裕美	2016年10月18日	日本、PCT

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。