

b. 赤痢アメーバにおける取り込み経路

昨年までの解析で、コレステロール (NBD-cholesterol) は赤痢アメーバ内で非常に細かな小胞に組み込まれた後に次第に凝集し、直径 1 μm のエンドソーム様の構造体となって 2 時間後にはリソソームに局在することを示した。この NBD-cholesterol のリソソームまでの輸送は他の可溶性因子 (FITC-dextran) がリソソームに到達するよりも速い。FITC-dextran は 4 時間パルスした後も半分の FITC-positive endosome しかリソソームに到達できないからである。よって、可溶性因子とコレステロールの取り込み経路は赤痢アメーバでは異なっていることが推測された。

他種生物ではエンドサイトーシスの初期過程を調節するのは Rab5 というエンドソームとクラスリン被覆小胞に局在する低分子量 GTPase である。これまで、赤痢アメーバには Rab5 のホモログが 1 つゲノムにコードされているが、その機能は他種生物とは異なることが解明されている (図 3 : Saito-Nakano, 2004)。つまり、EhRab5 は定常状態では小さな小胞に局在するが、食食開始 5 分後に赤血球の食食と共に形成される prephagosomal vacuole (PPV) 上に EhRab7A GTPase とともに局在することが分かっている。その後、食食開始 10 分後には EhRab5 は PPV から遊離し、EhRab7A 陽性 PPV が赤血球を含むファゴソームに融合し、ファゴソーム内の分解に寄与することが解明されている。そして EhRab5 の優性変異型 (GTP 結合型) 発現株では、増殖遅延と食食阻害を示したのにも関わらず、FITC-dextran のエンドサイトーシスには変化が観察されなかった。よって、EhRab5 を介する経路がコレステロールの取込みに関与しているかどうかを解析した。

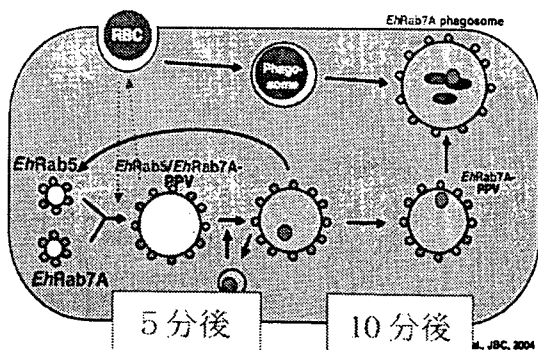


図 3、赤血球の食食に必須な PPV の形成

まず、野生株 HM1 cl6 を用いてヒト赤血球を接触させることにより食食シグナルを誘起し、5 分後と 10 分後に形成される PPV 上にコレステロールが局在するかを観察した。細胞内コレステロールの局在は filipin で染色し、PPV は野生株でも検出可能な抗体である抗 EhRab7A 抗体を用いて染色した (図 4)。その結果、食食開始 5 分後では EhRab7A で染色される PPV にコレステロールの共局在が観察されたが、10 分後では一部の PPV にはコレステロールが局在していなかった。約 30 個の細胞について、コレステロールの共局在を測定した結果、5 分後では $80 \pm 18\%$ の PPV に、10 分後では $39 \pm 6.8\%$ の PPV にコレステロールが局在していた (図 5)。よって、コレステロールは PPV 形成の初期段階のみに PPV 上に局在し、EhRab5 が PPV に局在する時間経過と同一であった。そこで、EhRab5 がコレステロール取り込みの初期に関与している可能性をより明確に示すために、EhRab5 の優性変異発現株を用いて解析した。

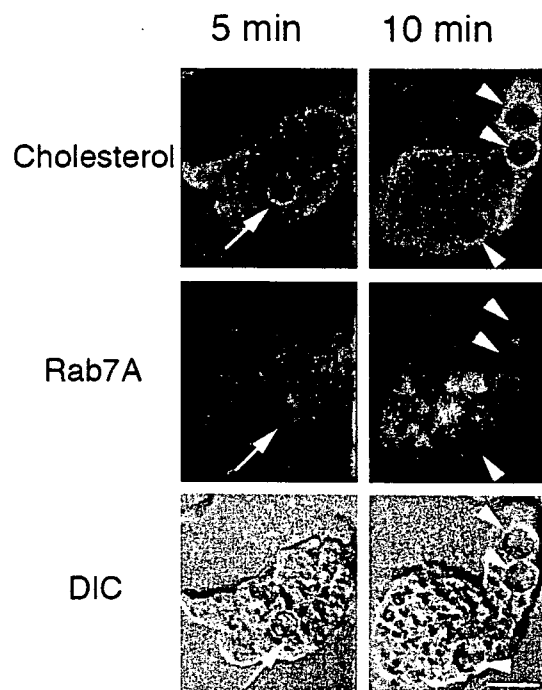


図 4、赤血球の食食時におけるコレステロールと PPV (EhRab7A) の局在。5 分後の PPV (矢印) にはコレステロールが局在するが、10 分後 (矢頭) には局在しない。

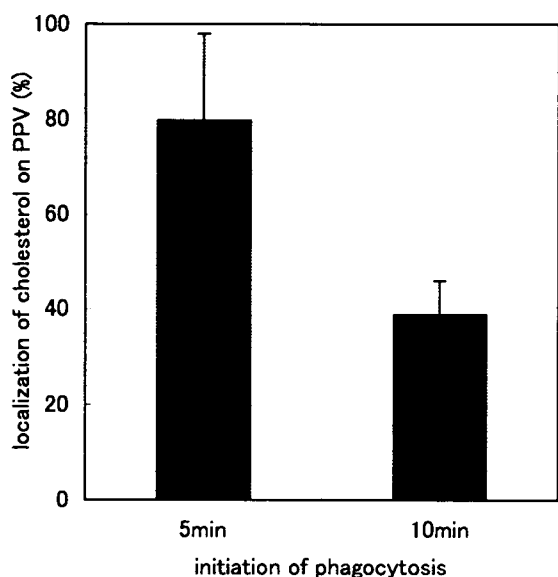


図5、赤血球の貪食時におけるコレステロール (filipin で染色) と PPV (抗 EhRab7A 抗体で染色) の共局在

EhRab5 の優性変異発現株は生育阻害を示すが、FITC-dextran の取り込み速度には変化を示さない。そこで、EhRab5 の優性変異発現株を用いて NBD-cholesterol の取り込み速度を測定した (図6)。その結果、EhRab5 変異発現株の NBD-cholesterol の取り込み速度はコントロール株の 50% であった。よって、赤痢アメーバのコレステロールの取り込みには EhRab5 を介する経路が関与していることが分かった。

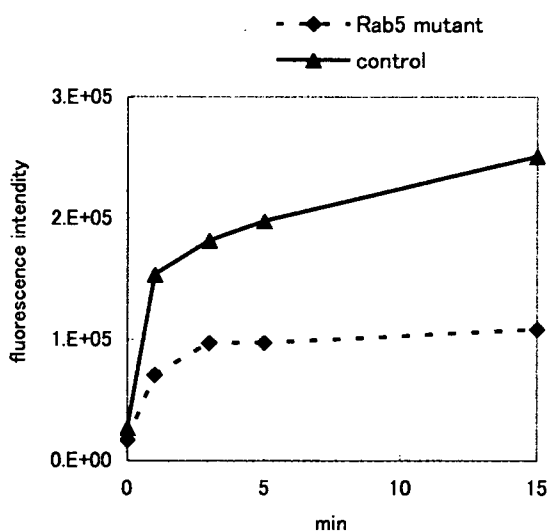


図6、FITC-dextran のエンドサイトーシス

D. 考察

最終年度ではこれまでの研究結果をふまえ、宿主の障害におけるコレステロールの役割と、アメーバ内への取り込みにおける経路についてさらに発展的な解析を行った。前年度に病原因子の CP の活性化にはコレステロールが関与しているのを示したのを始め、今年度は赤痢アメーバの貪食活性は宿主細胞のコレステロール量と強い相関があることが分かった。このことは、赤痢アメーバが腸管から組織侵入を開始した後、門脈を介して肝臓に膿瘍を形成することを良く説明している。おそらく、肝臓よりもコレステロール量が高い細胞、組織が周囲に存在しないため、アメーバは専ら組織内では肝臓に寄生するものと考えられる。それは、赤痢アメーバの生育に必要な脂質成分の取り込むためである。脂質成分の取り込みは貪食の他に、可溶性脂質の取り込み (エンドサイトーシス経路) によっても担われている。その経路は EhRab5 が関与する経路であることが最終年度の解析で明らかになった。ヒトではコレステロールは外界から LDL と結合した形で、LDL リセプターを介して細胞膜から Rab5 を介するエンドサイトーシスによって取り込む他に、可溶性因子の FITC-dextran も Rab5 依存的に取り込むことが報告されている。よって、赤痢アメーバが両者の経路を使い分けているという現象は特異である。また、これまで赤痢アメーバの EhRab5 優性変異発現株は貪食に必要な PPV 形成に障害を示し、最終的に貪食能が低下することが示されていた。それだけでなく、定常状態でも生育速度の低下を示し、貪食に依存しない状態下で何故生育阻害を示すのか不明であったが、本研究によってコレステロールの取り込み能が半分に低下していることが原因であることが示された。哺乳類細胞や出芽酵母には Rab5 のアイソタイプが 3 種存在し、その機能は重複していることが報告されている。一方で、赤痢アメーバには Rab5 は 1 種しか存在せず (Saito-Nakano, Exp Parasitol 2005)、よって EhRab5 に調節される貪食とコレステロールの取り込み経路が赤痢アメーバの薬剤ターゲットとして有用であると考えられる。

E. 結論

赤痢アメーバの宿主細胞に対する障害活性は、宿主細胞のコレステロール量と高い相関があった。赤痢アメーバは組織侵入をした後に肝膿瘍を形成するのは、肝細胞の細胞内コレステロールが高いことが原因であると考えられる。また、赤痢アメーバは生育に必須なコレステロールを食食と、エンドサイトーシスによって取り込むが、そのどちらにも EhRab5 GTPase が関与していた。よって、EhRab5 とその調節経路をさらに解析することが、病原性の理解と新規抗アメーバ薬剤開発のための基盤を提供するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito-Nakano, Y., Mitra, B.N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isotypes, *EhRab7A* and *EhRab7B*, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 9:1796-1808.
2. Mitra, B.N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 9:2112-2125.
3. Clark, C.G., Hofer, M., Alsmark, U.C.M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I.,

Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P.G., Noel, C.J., Hirt, R.P., Embley, T.M., Samuelson, J., Gilchrist, C.A., Mann, B.J., Singh, U., Ackers, J.P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. Clark, C.G., (ed.) ***Advanced parasitology***. Review, 65:51-190.

2. 学会発表

1. Saito-Nakano, Y. and Nozaki, T. (2007) Role of cholesterol for pathogenesis in protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 2007年5月28-30日, 福岡
2. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2007) 赤痢アメーバの病原機構におけるリソソーム形成とメンブレントラフィック 第6回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2007年10月27-28日, 松山

G. 知的所有権の出願・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

微生物変換によるリファンピシン類の新規リード化合物の創出と創薬への応用

所 属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 星野 泰隆

研究要旨

Rifampicin は多くの結核患者の人命を救ってきたが、ヒトの薬物代謝関連酵素である P450 を誘導するため、HIV/AIDS と結核の複合感染症において抗 HIV 薬の作用を低下させてしまう。したがって、rifampicin 類を微生物変換させ抗 HIV 薬と併用可能な新規候補化合物の創出を目指す。

A. 研究目的

今日においても結核は全世界で非常に患者数の多い疾病であり、年間で約 200 万人もの人々の命が失われている。また、現在では既存の抗結核薬が効かなくなった多剤耐性結核菌や HIV/TB の複合感染が非常に大きな問題となっており、WHO を中心として数多くの政策が取られている。このような状況の中で、日本における結核に対する治療薬は、INH や RFP などの 5 種類しか存在しない。また 1965 年の RFP の開発以降、新薬の投入はなされていない。したがって、結核に対する新薬の期待は全世界で高まっている。

その上近年問題が激化した HIV/TB に関しては、結核患者の 50% 程度が HIV に感染しているという結果 (米国 CDC 調べ) が出ている。日本でも、結核患者数は 10 万人当たり 22.2 人 (2005 年) であり、1999 年当時 (34.6 人) と比較すると若干改善方向にあるといえる。しかし、これとは反対に、HIV/AIDS の新規患者数は、2005 年に年間 1000 人以上となり、今後も増加傾向にあるといえる。したがって、HIV/AIDS と結核の複合感染症が今後増加することは必至である。この HIV/TB の複合感染症の問題点としては、唯一殺菌的に作用する RFP が抗 HIV 薬と相互作用することにより併用しにくい薬剤であることである。原因として RFP がヒトの薬物代謝関連酵素 P450 (CYP3A4 等) を強力に誘導し、抗 HIV 薬であるプロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬の血中濃度を著しく低下させ効果を減弱させてしまう点である。したがって、我々は、多剤耐性結核菌に有効あるいは、薬物代謝に係わる P450 (CYP3A4) の強い誘導を引き起こさない化合物の取得を目的として、

新規抗結核薬の研究を目指す。

我々は、今までに報告のない RFP の修飾酵素を見出し、新規な部位への酸素の付加が行われていることが判明している。抗微生物活性に関しては、修飾後であっても活性を有しているためこの化合物をリード物質とした化合物ライブラリーを作成し、候補薬剤の探索研究を行う。

このように HIV/TB の複合感染症に対して使用できるということに着目し、この状況に使用可能な化合物の候補を創出することによって、現段階では治療に困難が付きまとう HIV/TB 感染症に対して、貢献することができる。また、日本においても HIV 感染者は近年増加傾向にあり、今後問題がより明確化するであろう HIV/AIDS 感染者における感染症 (結核などを中心とした) に対して、予防および治療の分野において還元できるものである。

B. 研究方法

(1) rifampicin (RFP) の monooxygenase による変換産物取得

Nocardia farcinica のゲノム解析の結果から、*Rhodococcus equi* において RFP 耐性に関与していると報告されている monooxygenase と相同性を有している遺伝子を見出した。はじめに monooxygenase 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、大腸菌内で monooxygenase タンパク質を発現できるように構築した。微生物変換の方法としては、resting cell を用いた変換方法を利用した。まず大腸菌内で monooxygenase タンパク質発現させる。次にリン酸緩衝液中にて

monooxygenase タンパク質を発現した大腸菌の resting cell を用いて、RFP の変換反応を行った。

(2) RFP 変換産物の精製

Resting cell 変換反応後の変換反応液を各種クロマトグラフィーを用いて精製した。

(3) 構造解析

質量分析および、一次元、二次元の NMR を用いて構造解析を行った。

(4) RFP 変換産物の抗微生物活性

得られた RFP 変換産物の抗微生物活性を以下の非検菌を用いて測定した。グラム陽性菌として *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Nocardia farcinica*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, グラム陰性菌として *Escherichia coli*, を用いた。

(5) rifamycinSV 変換産物

RFP 変換反応と同様に、*Nocardia* の monooxygenase 遺伝子をクローニングした大腸菌の resting cell を用いた微生物変換反応を行った。

倫理面への配慮

本研究では、RFP の変換産物を取得するために *N. farcinica* 由来の monooxygenase を大腸菌に導入し実験をおこなっている。したがって“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”に該当するため、“国立感染症研究所 組換え DNA 実験実施規則”に従い、遺伝子組換え実験申請を行い、然るべき拡散防止措置を行使し、研究を行った。また、研究を進める上で各実験施設の責任者の管理、監督の下に実験を行った。必要に応じて安全主任者の助言や指導を受けた。

C. 研究結果

(1) RFP の変換産物

N. farcinica 由来の monooxygenase を導入した大腸菌を用いた resting cell 反応により RFP を変換させた。次に変換反応液を Diaion HP-20 のカラムクロマトグラフィーに供し、メタノールにて溶出した。溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶媒、クロロホルム:メタノール = 1:0, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0:1) に供し精製を行った。RFP 変換産物は 10:1~5:1 の画分に溶出され、この画分を回収した。次に、薄層クロマトグラフィー (展開溶媒、クロロホルム:

メタノール:水=65:15:5 の下層を使用) を用いて、掻き取り分取を行った。掻き取ったものを Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィー (溶媒:メタノール) にて精製を行った。

最終的に約 100mg の RFP 変換産物を得た。

得られた RFP 変換産物は、RFP よりも極性が増大し、RFP はクロロホルムに可溶であるが、難溶解性に変化していた。また、RFP は水に難溶解性であるが、変換産物では可溶化していた。色に関しては、RFP はオレンジ色を呈しているが、RFP 変換産物では、赤紫色を呈していた。

(2) RFP 変換産物の抗微生物活性に関して

RFP 変換産物の MIC を測定したところ、RFP と比較して、抗菌活性の低下がみられた。*Nocardia* 属菌およびグラム陰性菌である *E. coli* において、RFP では抗菌活性を弱いながら示していたが、RFP 変換産物では 64 μ g/ml 以上となり、活性が低下していることがわかる。その他のグラム陽性菌では、RFP ももとの MIC 値が高い値であるが、変換産物では、活性が 1/1000 程度になっているが、活性は残存している。

(3) RFP 変換産物の構造

RFP の変換産物に関しては、質量分析より分子量が 838 であることが判明した。また、高分解能質量分析より m/z 839.40838 ($[M+H]^+$) であり、 $C_{43}H_{58}N_4O_{13}$ であることが推定された。したがって、RFP (MW823) から分子量 16 増加した化合物であることが判明した。

UV スペクトラムにおいては、RFP では UV478 付近に吸収に認められるが、RFP 変換産物では UV478 付近に大きな吸収が認められなかった。

1H -NMR の解析においては、RFP の変換産物と RFP と比較すると、34 位のメチル基水素および 1' 位の水素のケミカルシフトが異なっていた。34 位メチル基の水素原子では、RFP で -0.27ppm であるのに対し、RFP 変換産物では 0.69ppm の値をとり低磁場側にシフトしていた。非常に顕著な差である。また、1' 位の水素においても低磁場側にシフトしていることが観測された。

^{13}C -NMR での解析では、1~10 位までのナフタレン骨格部分の炭素原子のシグナルがほとんど観測されなかった。積算時間および解析試料量を増やすことにより、若干であるがナフタレン骨格部分のシグナルを得られることができた。この結果、ナフタレン骨格部分の炭素に関しては帰属することができた。ここで、RFP と RFP 変換産物の比較によって、ピペラジン骨格部位で変化が見られた。1' 位の炭素において RFP では 137ppm であ

るのに対し RFP 変換産物では 155.0 ppm の値をとり低磁場シフトが観測された。また、 ^{15}N -NMR の測定により、NH (アミド)、3' 位および 6' 位の窒素原子が観測された。しかし 2' 位の窒素原子のシグナルは検出されなかった。

^1H 、 ^{13}C および ^{15}N -NMR スペクトルにおける各シグナルを帰属するために二次元の NMR スペクトル (HMQC, HMBC 等) の測定により、RFP 変換産物の解析も行った。これらの結果および RFP の結果をもとに、各シグナルを帰属することができた。したがって、ピペラジン骨格の 2' 位の窒素原子に OH が導入された化合物であることが推定された。

(4) rifamycinSV の変換産物

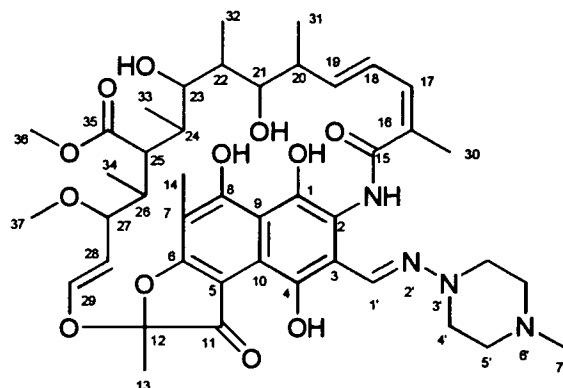
RFP の変換反応と同様に、rifamycinSV の変換反応を試みた。大腸菌を用いた resting cell 反応による変換後、Diaion HP-20 のカラムクロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーおよび Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィーを用いて、精製を行った。得られた rifamycinSV 変換産物を用いて、質量分析を行った結果、rifamycinSV と比較して分子量が 16 増加しており、RFP 変換産物と同様の結果となった。したがって、本化合物は酸素原子が導入された化合物であると推測された。

得られた rifamycinSV 変換産物は、rifamycinSV よりも極性が增大していた。RifamycinSV はクロロホルムに可溶であるが、変換産物では、難溶解性に変化していた。また、水対しては、難溶解性から可溶性へと変化していた。色に関しては、変換産物は、オレンジ色を呈していた。

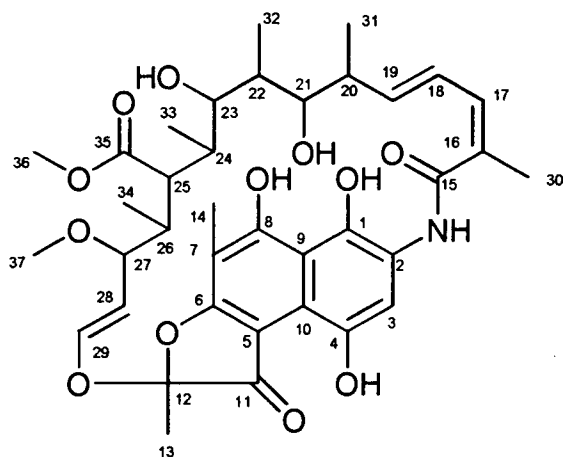
表 1 RFP 変換産物の抗微生物活性

	RFP	RFP 変換産物
<i>M.luteus</i>	0.0035	4
<i>S.aureus</i>	0.0015	4
<i>B.sub</i>	0.03	16
<i>E.coli</i>	16	>256
<i>N.farcinica</i>	4	>256
<i>N.asteroides</i>	0.125	64
<i>N.asteroides</i>	8	>256

μg/ml



(1) RFP (rifampicin) (MW 822)



(2) rifamycinSV (MW 698)

図 1 rifampicin および rifamycinSV の化学構造

D. 考察

抗結核薬としての RFP において、HIV/TB 複合感染症の問題点としては、唯一殺菌的に作用する RFP がヒトの薬物代謝関連酵素 (P450) を強力に誘導し、抗 HIV 薬であるのプロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬の血中濃度を著しく低下させ効果を失わせてしまう点である。したがって、本研究では多剤耐性結核菌に有効あるいは、薬物代謝に係わる P450 (CYP3A4) の強い誘導を引き起こさない化合物の取得を目的としている。

今回我々は、*Nocardia* のゲノム中より見出した RFP の monooxygenase を利用し、抗結核薬である

RFP の微生物変換によって RFP 変換産物を取得した。本化合物の抗微生物活性は、RFP と比較して、グラム陽性菌において 1/1000 程度に低下していることが判明したが、抗菌活性が残存していることから、リード化合物として有効であると考えられる。現時点では CYP3A4 の誘導活性のデータを得ていないが、今後検討する予定である。

構造解析に関しては、ピペラジン骨格の 2' 位に酸素原子が導入された化合物であると考えられるが、現在までにピペラジン骨格に酸素原子が導入された化合物の報告は RFP-6'-N-oxide (合成過程での副産物) がある。この化合物の文献上の結果と本研究において解析した結果では、RFP との比較と同様に、34 位のメチルプロトンの低磁場シフトは観察されていないこと、7' 位のメチルプロトンのケミカルシフトが異なることおよび 6' 位の窒素のケミカルシフトに差があることなど、その他の物理化学性状から、この化合物とは異なることが判明した。

Rifamycin 系化合物において、S-form と SV-form をとることが知られている。1) UV スペクトルが異なる。2) sample の色が SV-form ではオレンジだが S-form では紫色を呈することが知られている。3) 34 位のメチルプロトンのケミカルシフトが SV-form ではマイナス領域、S-form はプラス領域低磁場シフトをとることが知られている。4) NH 水素のケミカルシフトは、S-form と SV-form では異なり、S-form では高磁場側にシフトしているという事例がある。

したがって、これらの結果より RFP 変換産物は、S-form と類似する点を有するが、分子量は SV-form と同じであると推定される。したがって、本化合物は、4 位に carbonyl 構造を有していることが考えられた。したがって、RFP 変換産物は、RFP の 4 位が carbonyl で 2' 位の窒素へ酸素が付加している化合物であることが示唆された。

本年度は、RFP 変換産物の解析をおこなってきたが、今後構造情報を用いて親和性および溶解性などの情報をもとにリード化合物となりえるものを合成していく。また、本研究の重要な目標である P450 の誘導活性に関しても、酸素付加された化合物の活性および既存の rifamycin 類およびその他の rifampicin 系化合物と比較を今後比較検討する予定である。これにより、本研究の目的である抗 HIV 薬と併用可能な薬剤の新規リード化合物の取得を目指す。

また本酵素は、rifamycinSV (ピペラジン骨格を有していない) でも変換反応が起こることから、本酵素の直接的な反応部位ではないことが考えられる。したがって、3 位および 4 位の位置が異

なっている RFP 誘導体 (rifabutin, rifapentin, rifaximin) においても monooxygenase による反応が進み、新しい変換産物が得られることが推測される。また、本酵素の作用機序に関しても、RFP だけではなくその他の RFP 誘導体の変換産物の解析により、判明する可能性がある。

E. 結論

N. farcinica の monooxygenase による RFP 変換産物を大腸菌の Resting Cell 反応によって得た。この RFP 変換産物は、RFP と比較して抗菌活性は約 1000 倍程度低下していることが判明した。また、質量分析の結果からは、酸素原子が一つ RFP に入った化合物であることが判明した。また、構造解析からは、ピペラジン骨格の 2' 位の窒素に酸素原子が取り込まれ、ナフタレン骨格の 4 位が carbonyl 構造に変化していることが判明した。このことから、RFP 変換産物は今までに報告のある RFP の類縁化合物とは、どれとも一致しなく新規化合物であることが判明した。今後本化合物および Rifamycin の変換化合物等を利用して、薬剤代謝酵素である p450 を誘導しない新規リード化合物の取得を目指す。

F. 研究発表

1 論文発表

Hoshino Y, Watanabe K, Iida S, Suzuki S, Kudo T, Kogure T, Yazawa K, Ishikawa J, Kroppenstedt RM, Mikami Y.

Nocardia terpenica sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis.

Int J Syst Evol Microbiol. 2007 Jul;57(Pt 7):1456-60.

2 学会発表

(1) Ishikawa, J., Chiba, K., Hoshino, Y., Ishino, K., Kogure, T., Mikami, Y.
Development of a genetic analysis system for *Nocardia* species.

International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Newcastle upon Tyne, U. K.
2007 年 8 月 26-30 日

(2) Hoshino, Y., Chiba, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Mikami, Y., Ishikawa, J.
Identification of the salicylate synthase gene of *Nocardia farcinica* and its role in the biosynthesis of nocobactin.

International Symposium on the Biology of

Actinomycetes, Newcastle upon Tyne, U. K.

2007年8月26-30日

(3) 五ノ井 透, 星野泰隆, 矢沢勝清, 石川 淳,
三上 襄

病原性放線菌 *Nocardia* 属 64 種が産生するシデロ
フォアの多様性の解析

第 22 回日本放線菌学会大会 (広島) 2007 年 5 月

(4) 千葉和宏, 星野泰隆, 石野敬子, 石川淳
病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるシデ
ロフォア nocobactin の生合成遺伝子の同定

第 81 回日本細菌学会総会 (京都) 2008 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

該当なし

2 実用新案登録

該当なし

次世代の防疫用殺虫剤（医薬品）開発のための新規標的分子探索に関する研究

所属 国立感染症研究所 昆虫医科学部
研究者 葛西 真治

研究要旨 次世代の防疫用殺虫剤の作用点探索の為、殺虫剤抵抗性に連関する酵素の同定を試みた。イエカ属の permethrin 抵抗性系統で過剰発現する 2 つの P450 遺伝子の発現パターンと殺虫剤感受性との間で相関が認められ、抵抗性への関与が強く示唆された。

A. 研究目的

1999年に米国ニューヨーク州に端を発したウエストナイル脳炎はその感染が瞬く間に全米へと拡大し、2003年度には264名の犠牲者を含む9862名の患者を出した。このことはグローバル化が進んだ現代においてはもはや、先進国においても本ウイルス上陸対象の例外とはならないことを示した。ウイルス感染から人々を守るためには、媒介者である蚊の防除が不可欠となる。蚊の防除手段としては米国CDCも指摘しているように発生源対策と並行して、(やむをえず)殺虫剤の力にも頼らざるを得ないのが現実である。ところが、本申請者が中心となって最近実施した、全国69地域を対象とした調査では、媒介蚊であるアカイエカの一部集団が登録薬剤の多くに抵抗性を発達させ、有効な薬剤がすでに限られてきている現状が明らかになった。また、農薬その他の化学物質に対する世間の関心はますます高くなり、より人畜毒性が低く、安全な昆虫制御剤の開発が望まれている。このような現状に対処する為には、昆虫生理機能の中で未だ解明されていない領域を重点的に研究し、昆虫特異的な殺虫剤作用点を新たに見いだすことで、選択毒性の高い安全な新薬を創製することが急務といえる。

シトクロム P450 酸化酵素 (P450) やグルタチオン S 転移酵素 (GST) は代謝酵素群であり、昆虫におけるその役割はホルモンやフェロモンの生合成・代謝の他、殺虫剤や植物毒素の解毒など多岐にわたる。その一方で、これらの酵素の個々の機能の多くは分かっていない。本申請者が期間内に達成しようとするのは、アカイエカの P450 (100 種程度あると考えられている) や GST (30 種程度) の個々の機能を、マイクロアレイ法を用いてその発現パタ

ーンから解明することで、生体維持にとって重要な位置づけにある分子種もしくはその遺伝子発現調節のキーとなる転写因子を新規殺虫剤の標的分子として発掘することである。この成果はまた、比較的マイナーであるが登録薬がない (または一つしかない) ため一部の特別老人養護施設などで深刻な問題となっている疥癬症やシラミ症といった疾病の治療薬開発に、またマラリアやフィラリア症対策として国際的にも貢献できるものと期待される。

B. 研究方法

実験材料：

実験にはピレスロイド剤抵抗性ネッタイエカ (JPal-per 系) を用いた。JPal-per 系統はサウジアラビアで採集されたコロニーを permethrin により 20 世代室内淘汰されて確立された系統で、4 齢幼虫は permethrin に 2500 倍の抵抗性を示す。

リアルタイム定量 PCR：

JPal-per 系統の卵、幼虫、蛹、成虫より Isogen (Nippongene) を用いて全 RNA を抽出後 TURBO DNA-free (Ambion) を用いて混入 DNA を除去した。ReverTraAce (Toyobo) を用いて定法により cDNA を合成し、リアルタイム PCR 解析を行った。内部マーカーとして RPS3 遺伝子を用いた。定量用の標準曲線を得るために、あらかじめ CqRPS3F3/CqRPS3R2 (RPS3)、P14F6/P14R8 (CYP4H34)、P32F15/P32R5 (CYP9M10) プライマーを用いて各遺伝子産物を増幅、精製した。標準曲線は標準 DNA の 1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μmol を鋳型として PCR を行うことで得た。リアルタイム PCR は、iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) によ

り iQSYBR Green Supermix (Bio-Rad) と以下のプライマーセットを用いて行った：
CqRPS3F7/CqRPS3R10 (RPS3)、P14F21/P14R22 (CYP4H34)、P32F23/P32R24 (CYP9M10)、PCR の反応は 95°C 3 分変性後 95°C 15 秒、60°C 30 秒のサイクルを 50 回行い、PCR 反応終了後に 50°C から 95°C までの融解曲線を 0.5°C 刻みで得た。結果は、RPS3 の値により標準化した。

シトクロム P450 全長のクローニングと培養細胞系の発現：

昨年までの研究により、ピレスロイド系殺虫剤の permethrin に抵抗性を発達させたネッタイイエカ JPal-per 系統で過剰発現する P450 が 3 種 (CYP4H34、CYP9M10、CYP6Z10) 見いだされた。これらの遺伝子の permethrin 代謝能を確認するため、全長をクローニングし、キイロショウジョウバエ由来培養細胞 S2 でタンパクを発現させ、基質特異性を調べることにした。まずは 3 種 P450 の cDNA 全長を pDONR221 ベクター (Invitrogen) に BP Clonase II (Invitrogen) を用いて相同組換えにより挿入した。その後、S2 細胞で発現させるために pMT-DEST48 ベクター (Invitrogen) へ LR Clonase II (Invitrogen) を用いて挿入した。P450 遺伝子を挿入した pMT-DEST48 は FuGENE HD Transfection Reagent (Roche Applied Science) を用いて S2 細胞へトランスフェクションしたのち、抗生物質ブラストサイジン (100 ppm) を添加したシュナイダー培地で継続的に培養することで核内ゲノムへの組換えを促した。ブラストサイジン選抜細胞を硫酸銅処理 (0.5 mM) し、挿入遺伝子の転写を誘導した。それぞれの培養細胞より Isogen (Nippongene) を用いて全 RNA を抽出後、ReverTraAce を用いて cDNA を合成し、リアルタイム定量 PCR で用いたプライマーセットを用いて PCR を行い、電気泳動を行うことで mRNA の発現誘導を確認した。PCR の条件は、95°C 2 分変性後、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル行った後、72°C で 5 分間伸長反応を行った。PCR 産物は 3% NuSieve GTG アガロースゲルで電気泳動した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った実験については、ヒトまたは動物を用いた実験等を含んでいないため、倫理面への問題は無い。

C. 研究結果

CYP9M10、CYP4H34 の遺伝子発現：

昨年までの研究で、CYP9M10 と CYP4H34 は JPal-per 系統でそれぞれ 365 倍、17.8 倍過剰発現していることが分かっている。これらの遺伝子が、各発育ステージでどのような発現パターンを示すのか調べるために、卵、幼虫、蛹、成虫から cDNA を調製し、リアルタイム PCR による定量を行った (図 2)。いずれの遺伝子も、卵から 1 齢、2 齢、3 齢幼虫とステージが進むごとに発現量が大きくなり、4 齢幼虫で最も強く発現していた。蛹期以降、遺伝子発現がほぼ完全に抑制され、ほとんど発現が認められなかった。4 齢幼虫期には CYP9M10 と CYP4H34 はともに内部標準マーカー RPS3 遺伝子とほぼ同程度の分子数が発現しており、絶対量としてもかなり多く発現していたことが伺える。

培養細胞での 3 種 P450 の発現：

期待されたように 3 種の P450 遺伝子全長が pMT-DEST48 ベクターに挿入された。これを S2 細胞にトランスフェクトし、ブラストサイジンにより誘導することで、核内ゲノムへの組み換えが実現した。それは、硫酸銅による遺伝子発現誘発により、各 P450 遺伝子の誘導が認められたことにより確認された (図 3)。また、硫酸銅による誘導を受けていない細胞中では挿入遺伝子がほとんど発現していないことも確認された (図 3)。

D. 考察

ネッタイイエカ P450 の遺伝子発現と殺虫剤感受性の相関：

これまでに行った試験により、JPal-per 系統は終齢である 4 齢幼虫では感受性の小笠原系統と比べ 2500 倍の抵抗性を発達させていることが分かっている。一方で、成虫期には 19 倍の抵抗性しか示さないことも分かっている。さらに JPal-per 系統についてピレスロイド剤の作用点ナトリウムチャンネルの構造解析を行ったところ、1035 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換された、いわゆる kdr 型の抵抗性機構を有していることが分かっている。一般に kdr 型の抵抗性因子を保有した昆虫は 10~20 倍程度の抵抗性を獲得することが知られている。つまり、JPal-per 系統の成虫期においては、おそらく kdr 因子のみが抵抗性機構として機能しており、解毒酵素活性の増大による感受性の低下は機能していないものと推察される。そして、そのことは CYP9M10 や CYP4H34 が成虫期でほとんど発

現していないことと矛盾しない。さらに、JPal-per 系統の permethrin に対する LC_{50} 値は 4 齢幼虫でおおよそ 10 ppm であるが、1 齢幼虫では 0.1~0.4 ppm の間にあることを予備的試験により確認している。つまり、4 齢幼虫は 1 齢幼虫と比べ permethrin に対する感受性が 25~100 倍低いことを意味する。このことも、CYP9M10 や CYP4H34 が permethrin 抵抗性に関与していることを強く示唆する。今年度中に完了することはできなかったが、CYP9M10、CYP4H34、そして CYP6Z10 は S2 細胞の核内に組み込ませることに成功し、硫酸銅処理により安定的に発現できることを確認することができた。今後、この組み換えタンパクを用いて in vitro 系の permethrin 代謝試験を行うことでこれら P450 分子種の機能がより詳細に解明されるとともに、これらをターゲットとした新たな昆虫制御剤創製への足がかりとなることが大いに期待される (図 4)。

E. 結論

Permethrin 抵抗性ネッタイエカで過剰発現する CYP9M10 と CYP4H34 の各発育ステージにおける発現パターンと permethrin 感受性のパターンが同調していることが明らかになり、これ

ら 2 つの分子種が抵抗性に関与している可能性が高いと考えられた。

このような殺虫剤抵抗性に関与するタンパクもしくはその制御機構に関連する分子は昆虫特異的な殺虫剤作用点として、選択毒性の高い安全な新薬の創製に重要な示唆を与えるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

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

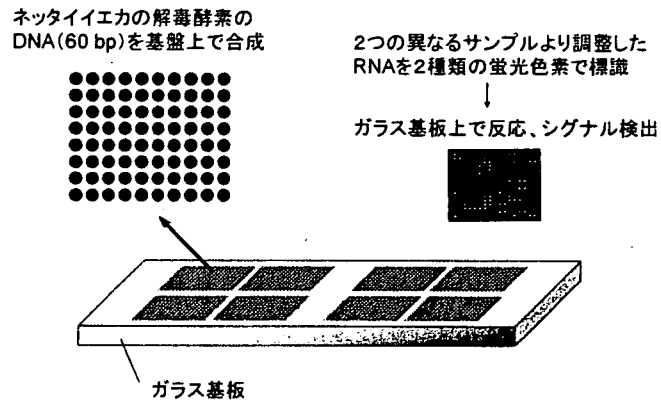


図1 マイクロアレイ法による全 P450 遺伝子発現の網羅的解析

表1 リアルタイム定量PCR に用いられたプライマー

Primer name	Sequence
RPS3F3	ACCCGTACCGAGATCATCATC
RPS3R2	CACGGCAGCATAATCTTGACC
RPS3F7	AGCGTGCCAAGTCGATGAAG
RPS3R10	ACGTA CT CGTTGCACGGATCTC
P14F6	TTTACGATGCTGTTGTTTGCGATTC
P14R8	CTGCACCCTAATCGGAATCC
P14F21	CCGTT CAGCGTGGGATCG
P14R22	GCAGCACCAGGTCCATCTTG
P32F15	GTTGGTGCCTACTGCGATCT
P32R5	AAACGCACTCCGGTTGATGTTG
P32F23	GCAAAGAGAAGAGCACAAACATTG
P32R24	CTCCGTTGAGGACTGAAGATG

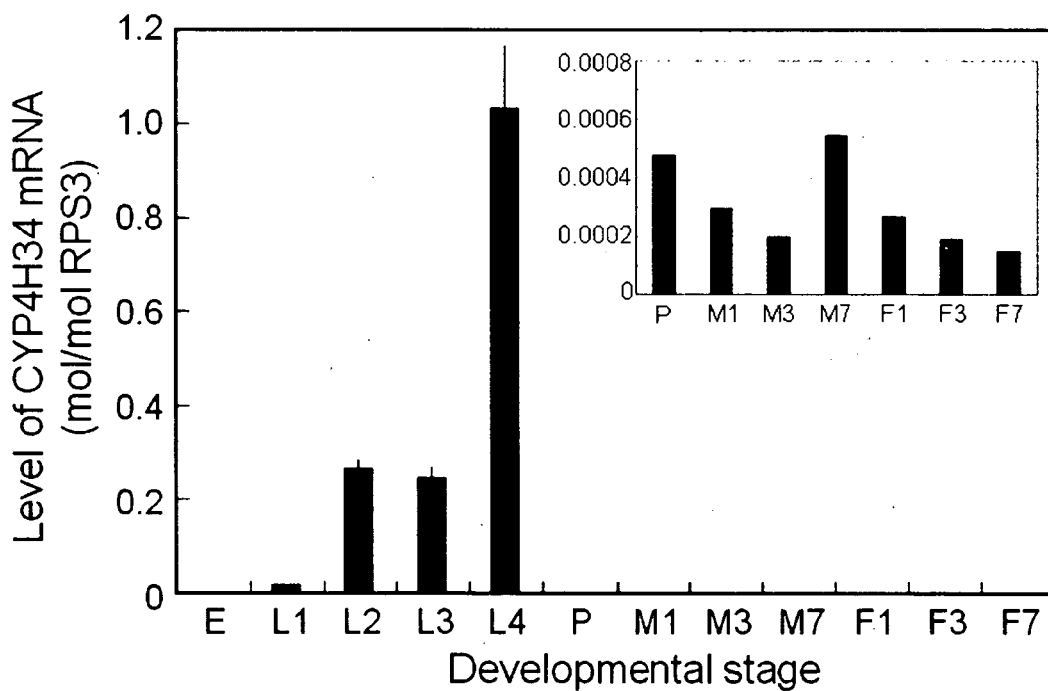
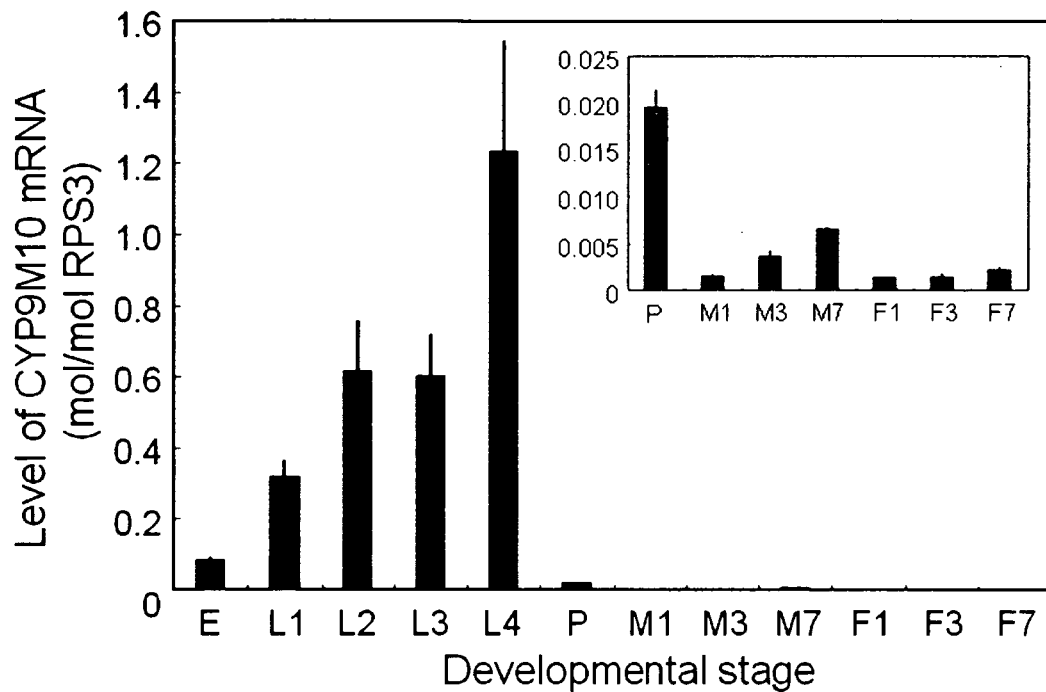


図2 ネットアイエカ JPal-per 系統の各発達ステージにおける CYP9M10 (上図) と CYP4H34 (下図) の相対的発現量。E (卵)、L1 (1 齢幼虫)、L2 (2 齢幼虫)、L3 (3 齢幼虫)、L4 (4 齢幼虫)、P (蛹)、M1 (成虫オス 1 日齢)、M3 (成虫オス 3 日齢)、M7 (成虫オス 7 日齢)、F1 (成虫メス 1 日齢)、F3 (成虫メス 3 日齢)、F7 (成虫メス 7 日齢)。

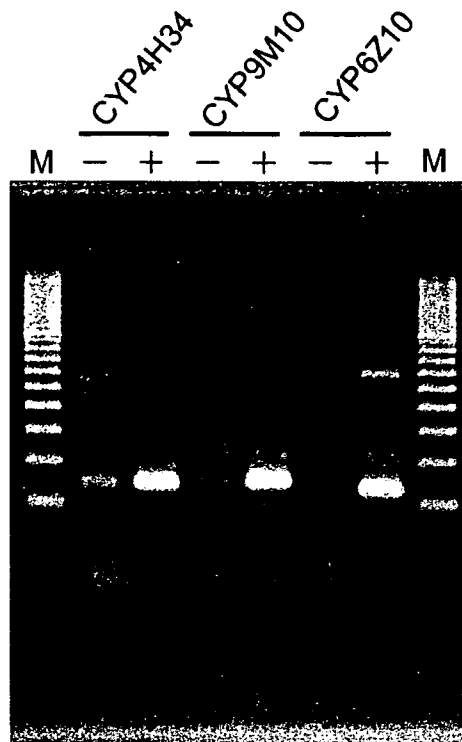


図3 硫酸銅による CYP4H34、CYP9M10、CYP6Z10 遺伝子発現の誘導
 (-) : 誘導なし、(+) : 誘導あり、M : 100 bp DNA マーカー

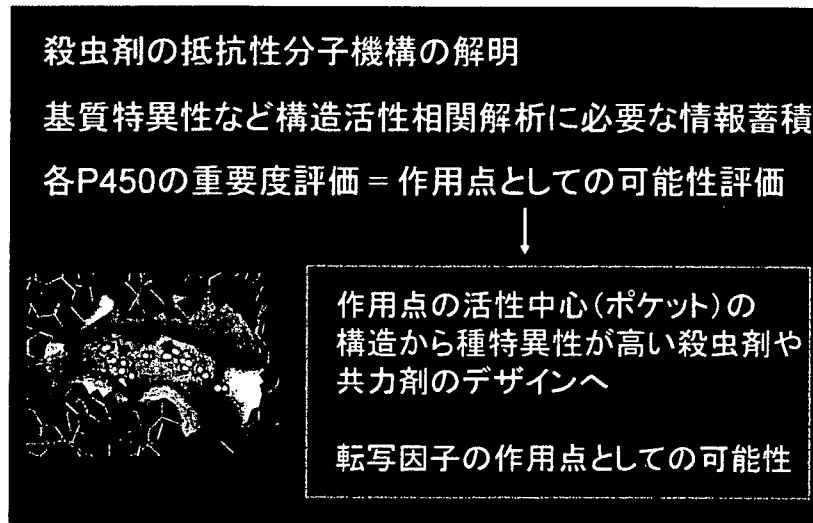


図4 マイクロアレイ法による P450 の研究が可能にすること

制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジング グスタディーの基礎的および応用的研究

所属 京都大学大学院医学研究科

薬剤疫学分野

研究者 川上 浩司

研究期間 平成 17 年 4 月-平成 20 年 3 月

研究要旨

制癌分子標的療法開発をモデルに、我が国の臨床試験認可制度と欧米の制度の差異を比較検討し、国内の先端医学の基礎研究から創薬・市場化への開発過程の環境と方法論を検討する。

A. 研究目的

我が国の基礎研究は世界でもトップレベルにあることは周知であるが、基礎研究の成果を臨床応用し社会に還元する体制は十分に整ってはいない。トランスレーショナル研究の最終目標は、研究成果を製薬・生物製剤として市場に送り出すことであり、そのための開発には研究者のみならず臨床試験を施行する医師、そして行政側による的確な開発の指導とデータ管理が不可欠である。アメリカ合衆国においては、患者に新しい製薬または生物製剤を投与する場合、すべて連邦政府食品医薬品庁（FDA；Food and Drug Administration）に IND（Investigational New Drug）申請を行い、審査と認可を受けて後始めて臨床試験が施行される。すなわち、FDA は IND 申請者（sponsor）と二人三脚で開発を進行し、また、すべてのアメリカ国内の臨床試験のデータベースは FDA によって作成、管理されてい

る。このデータベースにより、アメリカ国内のトランスレーショナル研究の水準も保たれている。一方、日本の薬事法上の治験は医薬品医療機器総合機構によって審査をうけるが、臨床試験の全例管理をしていないため体系的なデータベースの整備はなされておらず、また、製薬や生物製剤の開発の速度にも限界が指摘されている。

本研究では、癌細胞表面上に発現する新しい Th2 サイトカイン（Interleukin-25）の受容体をターゲットとした制癌分子標的療法をモデル開発し、その開発過程で我が国の医薬品医療機器総合機構における臨床治験認可業務とアメリカ FDA における IND 制度の差異を比較検討し、現在急務とされる遺伝子治療、分子治療、細胞治療などの先端医療開発の整備になにが必要であるかを研究する。本研究から得られた知見は、我が国の創薬力、厚生労働行政における国策としてのトランスレー

ショナル研究のありかたと IND 制度導入の是非について多くの情報、モデルを提供することが期待され、日本国民の健康・医療の向上のみならず、将来の国益を見据えた先端医療の臨床開発研究の推進にも寄与することを目指す。

B. 研究方法

IL-25 と PE (ヒト正常細胞への結合部分を除去した緑膿菌外毒素をコードした DNA) を DNA リコンビナントによって結合させることにより、IL-25 受容体を標的とした新しい抗癌剤 (IL25-PE) を作成した。IL25-PE は人工合成蛋白として大腸菌の系で発現・大量培養し、FPLC にて精製した。蛋白の identity をウェスタンブロット法にて確認した。

同製剤をモデルとして、日本においてトランスレーショナル研究、製剤の市場化を推進する際に何が必要か、システムの問題点はなにかについても合わせて検討をすすめた。日本における臨床試験の審査システムの現状および要求される CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)、薬物動態・毒性試験、臨床プロトコルについてをアメリカ FDA、欧州における基準と比較検討しつつ各種規制も調査した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学における組換え DNA 実験計画書、動物実験計画書をそれぞれの専門委員会に提出、承認をうけた上で実施された。

C. 研究結果

新規サイトカインである IL-25 に関しては、現在までにヒト DNA ライブラリーから PCR 法により DNA を単離し DNA 発現 (pCIneo) および蛋白発現 (pET24a) ベクターに導入しシークエンスを確認し、IL-25 と PE (ヒト正常細胞への結合部分を除去した緑膿菌外毒素) をコードした DNA を結合させた人工蛋白として大腸菌の系で大量培養し、目的蛋白を inclusion body 封入体にて発現させ、FPLC による精製に成功した。蛋白の分子量を SDS-PAGE 法にて確認後、in vitro での各種腫瘍細胞に対する細胞殺傷効果を ^3H -leucine uptake assay にて確認した。しかしながら、IL25-PE 蛋白は、IL-25 受容体が発現していると推定されているいずれの乳癌細胞株に対しても殺細胞効果を示すことはなかった。以上の結果より、IL25-PE 自体は、医薬品としての使用は困難であることがわかった。

次に、日本においてトランスレーショナル研究、シーズの応用化を推進する際に何が必要かを把握するために、規制について米国、日本、欧州の現状を調査した。

(i) 米国の状況

アメリカ合衆国においては、人体被験者に未承認の生物製剤を投与する際、必ず Food and Drug Administration (FDA) による審査と承認が必要となる。Clinical Trial (日本における未承認薬の臨床研究や治験などといった区別はなく、Clinical Trial と総称される) を施行したい企業・研究機関や大学などの施設 (総称して sponsor という) は、例外・区別なく定まった様式にのっとり IND (Investigational New Drug applications) の申請を準備し、regulatory authority である

FDA の当該機関に提出することが義務付けられている。すなわち、米国における未承認薬の clinical trials は IND 制度による全例管理となっている。FDA は regulatory authority として、Public Health Service (PHS) Act、Food, Drug and Cosmetic (FD&C) act といった法律を行使する機関であり、その法の解釈として、より具体的な規制である Code of Federal Regulations (CFR) (うち第 21 項が IND 制度や認可についての項目) が運用されている。

(ii) 日本の状況

現在、日本の医薬品認可行政では、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の生物系審査部において遺伝子・細胞医薬、再生医療（組織）、血液製剤などが審査を行っているが、薬事法の範疇外にある（事業性が低く対象が限られている）場合には治験ではなく臨床研究として臨床試験を施行することになる。しかしながら、生物製剤など先端医療に関わる剤形の場合は薬事法の範疇の内外の境界が不明瞭な部分もあり、申請者の中でも混乱が大きいことがわかった。

(iii) 欧州の状況

EU の法令には、欧州委員会 (European Commission) の発議により制定される法令と、専門機関の策定するガイドラインとが存在し、欧州委員会レベルの規制は更に、規則 (Regulation) と指令 (Directive) の 2 段階に分類される。「規則」は加盟国に直接適用されて各国の国内法に優先するのに対し、「指令」の場合、各国はこれに沿って国内法や規則を改正しなければならないが、直接適用されることはない(各国が国内法を整備して始めて実効性を持つ)。

一方、専門機関によるガイドラインの拘束力は、各国の国内法に劣後する。ただし、欧州医薬品審査庁 (European Medical Agency; EMEA) は治験承認の権限を集中的に有しているため、申請者はそのガイドラインに従わざるを得ないという意味で、実質的な拘束力は強い。

臨床試験の実施に際しては、2001 年以降、EC Clinical Trial Directive (臨床試験指令) が制定され、臨床試験の実施において、商業スポンサーか非商業スポンサーか、承認申請目的か否かに関わらず、試験実施前に、倫理審査委員会の審査に加えて規制当局の承認審査が必要となった (2004 年以降実効化)。これにより、米国の IND 制度と同様に、先端医療を目指すトランスレーショナルリサーチと医薬品行政の対応が一体化され、規制当局が研究振興のための支援も行うという新しいレギュラトリーサイエンスの考え方が導入されたことになる。

なお、欧州においては、医薬品の承認申請の許認可は、EMEA が集中的に行っている。EU 加盟国は、自国内での医薬品の価格を定めたり、自国のシステムに採用するものを取捨選択したりする権限は有しているが、これらは全て EMEA の審査を受け、販売承認を受けた医薬品でなければならず、その手続きを踏んでいない医薬品は EU 域内では販売することができない。

以上により、日米欧において、トランスレーショナルリサーチに関係する法制度は大きく異なっていることが理解された。ただし、候補品の規格の設定、安全性の評価、製造、非臨床動物試験などの細かい要求項目には、大きな差はないこともわかった。

D. 考察

IL25-PE 蛋白の作成は、蛋白の発現方法の条件検討も様々な方法で繰り返したが、非常に不安定で、蛋白の合成と凍結保存のサイクルにより発現した蛋白も分解してしまうことがわかり、医薬品化は困難なことがわかった。また、IL25-PE 受容体発現細胞に対してもその殺細胞効果は示されず、IL-25 受容体は分子標記療法のターゲットとしては適当でない可能性が示唆された。

制度面での考察としては、日本においては、臨床試験の審査・管理・支援が一元化されていないことが新規の医薬品、生物製剤を開発するにあたって大きな障壁となっている感がある。我が国におけるトランスレーショナル研究の推進および先端医療の社会への還元に必要なシステム（インフラ整備）としては認可行政の充実が重要であり、規制当局が規制のみならず、研究者や製薬企業とよく対話して研究段階から製造、非臨床試験、臨床試験のプロトコル作成の支援を行うことが肝要であると考察された。そのような新しいレギュラトリーサイエンスの考え方の充実とともに Investigational New Drug (IND) 制度を導入することが必須であると考えられた。

E. 結論

制癌分子標的療法の研究開発をモデルに、我が国の臨床試験認可制度と欧米の制度の差異を比較検討し、国内の先端医学の基礎研究から創薬・市場化への開発過程の環境と方法論を検討した。

F. 研究発表（平成 17 年度－平成 19 年度）

1. 論文発表

Koji Kawakami, Keynote presentation. Special report from the 3rd DIA multitrack workshop in Japan: Scientific review and clinical development of advanced therapeutics and biologics. *Global Outsourcing Review*, 9: 10-15, 2007.

Koji Kawakami and Hiroko Yamane. Clinical research in Japan: ways to alleviate unnecessary regulatory burdens. *RCEIIS-Electronic Journal in Communication, Information and Innovation in Health*, 1: 57-61, 2007.

Koji Kawakami and Raj K. Puri. IL-4/13 and cancer. In: *Cytokines in the Genesis and Treatment of Cancer* Ed. by M.A. Caligiuri and M.T. Lotze, Humana Press, Totowa, NJ, pp135-153, 2007.

Koji Kawakami, Oumi Nakajima, Ryuichi Morishita, and Ryozo Nagai. Targeted anticancer immunotoxins and cytotoxic agents with direct killing moieties. *The Scientific World Journal*, 6:781-790, 2006.

Koji Kawakami. Cancer gene therapy utilizing interleukin-13 receptor $\alpha 2$ chain. *Current Gene Therapy*, 5: 213-223, 2005.

川上 浩司. 医薬品の研究開発と安全性評価の今後. *ファルマシア* (日本薬学会会誌), 43: 1195-1200, 2007.

川上 浩司. 先端医薬の開発に必要な基盤整備と人材養成 (わが国発の臨床研究推進に向けて). *医学のあゆみ*, 220: 860-866, 2007.

川上 浩司. 行政的観点からのインフラ整備 (臨床研究・大規模研究の進め方). *呼吸と循環*, 55: 255-260, 2007.

川上 浩司. 米国遺伝子治療の認可行政の現

状. 再生医療, 5 : 127-129, 2006.

2. 学会発表

川上 浩司. 医薬品審査・認可体制と創薬力.

日本薬学会関西支部新春講演会 講演, 2007

年1月12日, 京都.

川上 浩司. 抗癌免疫トキシン療法の現状

と展望. 第44回日本癌治療学会総会 教育講

演, 2006年10月20日, 東京.

川上 浩司. アメリカ合衆国における先端医

療と再生医療. 厚生労働省・ヒューマンサイ

エンス振興財団 平成18年度先端医学研究等
普及啓発セミナー 講演, 2006年8月3日, 大
阪.

ほか

G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究

所属 京都大学大学院医学研究科

薬剤疫学分野

研究者 川上 浩司

研究要旨

制癌分子標的療法開発をモデルに、我が国の臨床試験認可制度と欧米の制度の差異を比較検討し、国内の先端医学の基礎研究から創薬・市場化への開発過程の環境と方法論を検討する。

A. 研究目的

我が国の基礎研究は世界でもトップレベルにあることは周知であるが、基礎研究の成果を臨床応用し社会に還元する体制は十分に整ってはいない。トランスレーショナル研究の最終目標は、研究成果を製薬・生物製剤として市場に送り出すことであり、そのための開発には研究者のみならず臨床試験を施行する医師、そして行政側による的確な開発の指導とデータ管理が不可欠である。アメリカ合衆国においては、患者に新しい製薬または生物製剤を投与する場合、すべて連邦政府食品医薬品庁（FDA；Food and Drug Administration）に IND（Investigational New Drug）申請を行い、審査と認可を受けて後じめて臨床試験が施行される。すなわち、FDA は IND 申請者（sponsor）と二人三脚で開発を進行し、また、すべてのアメリカ国内の臨床試験のデータベースは FDA によって作成、管理されてい

る。このデータベースにより、アメリカ国内のトランスレーショナル研究の水準も保たれている。一方、日本の薬事法上の治験は医薬品医療機器総合機構によって審査をうけるが、臨床試験の全例管理をしていないため体系的なデータベースの整備はなされておらず、また、製薬や生物製剤の開発の速度にも限界が指摘されている。

本研究では、癌細胞表面上に発現する新しい Th2 サイトカイン（Interleukin-25）の受容体をターゲットとした制癌分子標的療法をモデル開発し、その開発過程で我が国の医薬品医療機器総合機構における臨床治験認可業務とアメリカ FDA における IND 制度の差異を比較検討し、現在急務とされる遺伝子治療、分子治療、細胞治療などの先端医療開発の整備にながが必要であるかを研究する。本研究から得られた知見は、我が国の創薬力、厚生労働行政における国策としてのトランスレーショナル研究のありかたと IND 制度導入の是