

- regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30(2):299-310,2010.
4. Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol* 17(4) :271-275,2010.
 5. Takayama N, ...Otsu M, et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 207(13) :2817-2830,2010.
 6. Hayashi Y, ...Otsu M, et al. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5(11): e14099,2010.
 7. Ogawa S, ...Otsu M, et al. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle* 9(6): 1051-1056,2010.
 8. Ogawa S, ...Otsu M, et al. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res* 16(15):3825,2010.
 9. Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T: Time-lapse imaging reveals symmetric division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS ONE* 6: e25303, 2011.
 10. Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T: Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using antibody/ c-Mpl chimera. *Cytokine* 55: 402-408, 2011.
 11. Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: Enforced ROR(γ) expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29: 86-93, 2011.
 12. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, S Hidehiko: Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing a constitutive activation of the αIIbβ3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117: 5479-5484, 2011.
 13. Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Sorafenib Against Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells. *J Gastroenterol* 46: 779-789, 2011.
 14. Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M: Osteomyelitis due to triethoprim/ sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection* 39: 171-173, 2011
 15. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Otsu M, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*. 2012;119(8):e45-56.
 16. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Otsu M et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
 17. Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Otsu M et al. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*. 2011;13(5):262-268.

2. 学会発表
1. 小野寺雅史 遺伝子治療における我が国と欧米の違い 第1回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム(特別講演), 東京, 2011.1.26
 2. Otsu, M., et al. Update of Stem Cell Gene Therapy Clinical Trial for ADA-Deficiency in Japan The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2010, Washington DC.
 3. Otsu, M., et al. Update on a Japanese clinical trial of Stem Cell Gene Therapy for ADA-Deficiency. The 17th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2010, Milan.
 4. Suzuki, S., Otsu, M., Nakauchi, H. Irradiated bone marrow environment impairs hematopoietic stem cells by exposure to tumor necrosis factor. The 52nd ASH Annual Meeting, 2010, Orland.
 5. Otsu, M., et al. Stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficiency: a report of six-year outcomes in 2 treated patients. The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
 6. Okabe, M., Otsu, M., et al. Characterization of iPS cells generated from murine hematopoietic cells. The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan.
 7. Lai, CY., Otsu, M. et al. Role of CXCR4 Signaling in Hematopoietic Stem Cell Repopulation. The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
 8. 村山静子, 田村英一郎, 河合利尚, 井田博幸. 非感染性腸炎を合併した慢性肉芽腫症の検討. 第42回小児感染症学会. 2010
 9. 明城和子, 藤本慎一郎, 河合利尚. 慢性腸炎からマクロファージ活性化症候群を合併した慢性肉芽腫症の1例. 第42回小児感染症学会. 2010.
- 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

治療遺伝子発現用レトロウイルスベクターを用いた 遺伝子導入細胞による難治性疾患の治療実施のため の支援体制の構築

所 属 国立成育医療研究センター研究所
研究者 小野寺 雅史

研究要旨 難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施に向け、1) 大量ヒト造血細胞を用いた Dry Run の実施、2) 当研究センターにおける細胞調製室の整備と遺伝子治療臨床研究の実施体制の強化、3) 患者染色体への治療ベクター挿入部同定法の確立、4) 次期の遺伝子治療臨床研究に向けた Working Cell Bank (WBC)の作製、5) ヒト由来 iPS 細胞を用いた慢性肉芽腫症の病態解析等を行い、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療臨床研究の実施に向けた準備を進めている。なお、本遺伝子治療臨床研究は平成 24 年 3 月 28 日に行われた厚生科学審議会科学技術部会にて了承された。

研究分担者

- (1) 峰野 純一 (タカラバイオ株式会社)
- (2) 大津 真 (東京大学医科学研究所)
- (3) 河合 利尚 (国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

現在、欧米を中心に原発性免疫不全症等、小児難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療が広く行われ、造血幹細胞移植の適応とならない患者に対して根治療法と呼べるほどの治療成績を上げている。一方、我が国の現状を鑑みたとき、ウイルスベクターの開発など遺伝子治療の基礎的研究に関しては優れた技術を有するものの、これら技術を臨床の場で応用する橋渡し機関が欠如しているため、遺伝子治療臨床研究の実施が遅々として進まず、欧米のそれに比して大きな遅れをとっている。そこで、本研究では小児難治性疾患に対する我が国独自の遺伝子治療臨床研究を推進するため、実際に原発性免疫不全症の中で最も頻度の高い慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を行い、その中で必要となる GMP 準拠ウイルス上清の製造、遺伝子治療臨床研究に即したヒト造血幹細胞への遺伝子導入法（標準作業手順書、Standard Operating Procedure: SOP の作成）の確立、安全性評価法の開発ならびに遺伝子治療実施に際し必要となる環境整備を整えることで我が国の遺伝子治療を包括的に支援する体制を構築していく。

B. 研究方法

1. 慢性肉芽腫への造血幹細胞遺伝子治療の実施

現在、国立成育医療研究センターでは米国国立衛生研究所 (NIH) との共同研究で、X 連鎖慢性肉芽腫症 (X-linked granulomatous disease: X-CGD)

に対する造血幹細胞遺伝子治療臨床研究を計画している。CGD は好中球等の食細胞の異常で、患者食細胞は NADPH oxidase を構成するタンパク質の欠損により活性酸素を産生することが出来ず、食食にて細胞内に取り入れた病原体（細菌、真菌）を殺菌することができない。このため、感染が長期化し、炎症が慢性化することで肺や肝臓等の臓器に肉芽腫を形成する疾患である。CGD の根治療法は HLA が一致した造血幹細胞移植であるが、移植ドナーの不足や移植時の潜在性感染症により移植関連合併症が重篤化し、移植医療が必ずしも CGD に対する最適な治療法と言えないこともある。このため、欧米では以前より X-CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療が行われ、一定の治療効果を上げている。

2. 遺伝子治療の実施体制に対する準備

・標準作業手順 (SOP) の作成

患者体重を 20kg と想定し、体重あたり 5×10^6 個 (総細胞数 1×10^8 個) の細胞にレトロウイルスベクターを用いて外来遺伝子を導入する実験を行った。使用した細胞はヒト T 細胞株 Jurkat 細胞であり、使用したレトロウイルスは緑色蛍光色素タンパク質 (EGFP) を発現する DNspEGFP である。 5.0×10^7 個の Jurkat 細胞を RPMI/ 10% FCS 500ml に浮遊し、CO₂ 透過性バッグ (640cm² CultiLife Eva, Takara KB640) にて 2 日間培養した。その後、細胞を遠心にて回収し、100ml 細胞培養液と 100ml ウイルス上清を混ぜた 200ml の培地にて細胞を懸濁し、4 枚の CultiLife™ Spin に分注して、2000rpm、2 時間の遠心操作を行うことで EGFP

遺伝子を導入した。遠心後に細胞を回収し、再び、細胞培養液に $1\sim 2 \times 10^5/\text{ml}$ になるように浮遊し、24 時間培養した。次の日にも同様の遺伝子操作を行い、最終的に遺伝子導入後 72 時間目に細胞を回収して細胞の状態、遺伝子導入効率を解析した。

・細胞調製室の設置

国立成育医療研究センター研究所 5 階に遺伝子治療臨床研究で使用される細胞調製室 (CPC) を設置した。CPC は前室を有し、内部の空気清浄度はクラス 10,000 である。また、実際の患者細胞を扱うために class IIa のセーフティキャビネットを CPC 内に設置し、その他、遠心機、CO₂ インキュベーター、冷凍・冷蔵庫等を準備した。

3. 治療用ベクターの網羅的染色体挿入部位の同定法の確立

治療用ベクターの染色体挿入部位の網羅的な同定に関する信頼性の高い解析系を確立するため、実際に北海道大学医学部附属病院にてデアミナーゼ (ADA) 欠損症に対する遺伝子治療を受けた患者検体 (末梢血、骨髄血) を用いて、解析を行った。

・DNA ライブラリー作製

検体からゲノム DNA を抽出・精製、断片化装置にて断片化、カラム精製を行い、低分子除去を行った後、アダプターライゲーション、1stPCR、2ndPCR を行った。

・網羅的シーケンシング解析

作製した DNA ライブラリーをキャプチャービーズ上に結合させ、エマルジョン PCR により個々のキャプチャービーズごとに増幅を行い、キャプチャービーズを回収した。得られたキャプチャービーズをカウント後、PicoTiterPlate に添加し Genome Sequencer FLX System を用いてシーケンスを行った。

・情報解析

得られたリード配列をトリムした後、BLAST を用いて UCSC のヒトゲノム参照配列 (hg19) に対してマッピング (E-Value $\leq 1e-30$) を行い、alignment length / query end が 95% 以上の値を持つアラインメントを抽出、マッピング位置が 1 塩基以上重なるものをクラスタリング、検出したクラスター領域から 10k bp 以内の近傍遺伝子情報を得た。

4. 臨床用ウイルスベクターの製造

今回の慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療は、NIH の HL. Malech 博士より臨床用ウイルス上清 MFGSgp91 を用いて行われるが、そのウイルス量には限りがあるため、Malech 博士らが BioReliance 社に依頼して作製した Master Cell Bank (MCB) より 15 vial の細胞株を輸入し、タ

カラバイオ社に依頼して Working Cell Bank (WCB) の作製を開始した。この WCB をもとに臨床用ウイルス上清の製造を開始していく。

5. ヒト由来 iPS 細胞を用いた慢性肉芽腫症の病態解析

gp91phox 欠損患者の CD34 陽性細胞よりセンダイウイルスベクターを用いた山中因子の導入により iPS 細胞を樹立した。機能的な好中球への分化は既報の好中球分化誘導系と、当研究室で開発した嚢状物 (iPS-sac) 形成法とを組み合わせて行った。得られた好中球について形態的評価、機能解析を行い、末梢血好中球と iPS 細胞由来好中球 (iPS-NEU) の比較、健常人と患者由来の iPS-NEU の比較を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究に向けた研究においては、「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 16 年 2 月 19 日) に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成 14 年 3 月 27 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正) に基づいて行った。実施計画書作成に必要な前臨床研究の一部では、臍帯血等の造血幹細胞を利用しているが、それら一連の研究は施設内の倫理委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。また、挿入部位同定に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行い、得られたデータの管理に関しては、連結可能匿名化にて、個人情報保護法を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 慢性肉芽腫への造血幹細胞遺伝子治療の実施

国立成育医療研究センターにおいて X-CGD に対する造血幹細胞遺伝子治療を実施するため、同実施計画書ならびに患者説明書・同意書を作成し、当センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会に平成 22 年 1 月 22 日に提出した。その後、平成 23 年 5 月 31 日、同年 12 月 20 日に審査委員会が開催され、慎重な審議の末、最終的に平成 23 年 2 月 24 日付で承認された。その後、審議は厚生労働省科学審議会 (遺伝子治療臨床研究作業委員会等) に移り、その審議会が平成 24 年 1 月 13 日開催された。そこで審議をもって、平成 24 年 3 月 28 日に開催された厚生科学審議会科学技術部会にて了承された。最終的には大臣の承認をもって遺伝子治療臨床研究は開始される。

2. 遺伝子治療の実施体制に対する準備

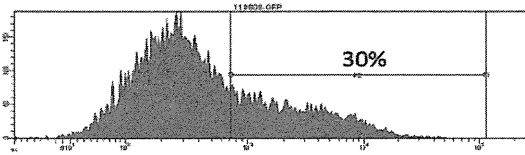
- ・ 標準作業手順書 (SOP) の作成

得られた細胞数は以下の通りである。

Day 0 5.0x10⁷ 個、Day 2 8.5x10⁷ 個

Day 3 1.0x10⁸ 個、Day 5 1.2x10⁸ 個

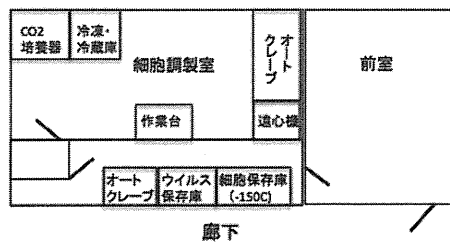
また、細胞の viability はいずれも 90% を越え、大量培養による細胞の障害は少ないと考えられた。また、最終的に遺伝子導入効率は 30% 程度であり、この値は small scale で得られる値と同等であった。



以上のことから、1.0x10⁸ 個程度のヒト血液細胞にその viability を保ったまま、効率良く遺伝子を導入することができた。ここで行われた操作を SOP として文書化し、次に行われるヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入で使用し、最終的な SOP として使用する。

- ・ 細胞調製室の設置

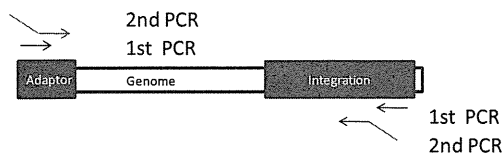
下記に CPC の見取り図を示す。



大量ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入はこの CPC を用いて行われる予定である。

3. 治療用ベクターの網羅的染色体挿入部位の同定法の確立

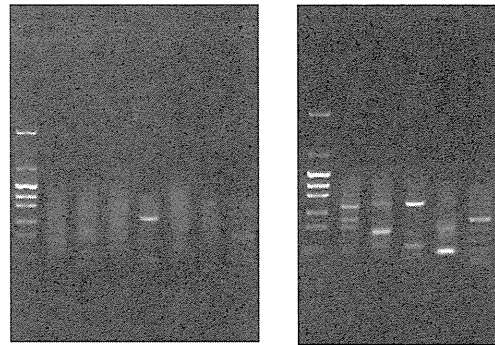
治療用ベクターの染色体ゲノム挿入部位と、DNA ライブラリー作製時のカセット、PCR プライマーの関係は以下の通り。



検体 1 (患者 1 末梢血)、検体 2 (患者 1 骨髄血)、

検体 3 (患者 2 末梢血)、検体 4 (患者 2 骨髄血) の各検体から、1stPCR と 2ndPCR におけるプライマー配列の異なるライブラリー 4 種類を作製し、この中から検体 1~3 に関してはライブラリー 4 を、検体 4 に関してはライブラリー 3-2 とライブラリー 4-2 を用いて網羅的シーケンシング解析を行った。ライブラリーの電気泳動写真を下に示す。

M1 S1 S2 S3 - S5 S6 M2 M1 4L3-2 4L4-2
- - M2



M1 : MW marker (PHY)

M2 : 100 bp Ladder

S1 : 検体-1 ライブラリー-4

S2 : 検体-2 ライブラリー-4

S3 : 検体-3 ライブラリー-4

S5 : ポジティブコントロール

S6 : ネガティブコントロール

4L3-2 検体-4 ライブラリー-3-2

4L4-2 : 検体-4 ライブラリー-4-2

各シーケンスデータをクラスタリングし、各クラスタリングのリード数の上位 10 位、もしくは 1.0% 以上のリード数が得られたものを抽出した。各ライブラリーで抽出したから、ゲノム上の位置、近傍遺伝子名 (gene symbol)、近傍遺伝子との距離、リード数の % を以下に示す。また、LAM-PCR でも検出された挿入部位を示す。

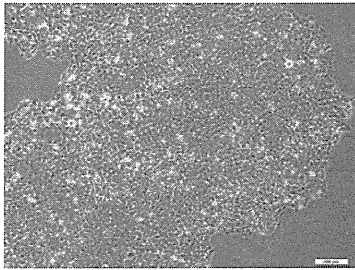
4. 臨床用ウイルスベクターの製造

臨床用ウイルス上清 MFGSgp91 産生細胞 MCB (293-SPA-MFGSgp 91-155 MCB, LN: 2037-0022) 3 バイアルを用いて、ワーキングセルバンク (WCB) 作製のための検討を行った。各バイアルの融解時における総細胞数と細胞生存率は以下の通りであった。

vial	総細胞数	細胞生存率
#90	2.53×10 ⁶ cells	45.1%
#108	4.05×10 ⁶ cells	52.4%
#42	3.65×10 ⁶ cells	51.0%

BioReliance 社の GMP Production Final Report

「cGMP Production of a Retrovirus Vector from Constitutively Producing Cells」によると、MCBを融解した際の細胞濃度と細胞生存率はそれぞれ $5.12 \times 10^5/\text{ml}$ 、95%であったが、それと比較して細胞生存率が非常に低かった。14日培養した代表的な写真を下に掲載する。引き続き培養検討を行い、WCB製造条件を確立する。



#108のday15における顕微鏡写真

5. ヒト由来iPS細胞を用いた慢性肉芽腫症の病態解析

健常人および患者の細胞からのiPS細胞を樹立したが、健常人と患者検体の間に樹立効率等には明らかな差を認めなかった。末梢血成熟好中球とは表面マーカーの発現等に差を認めるものの、フローサイトメトリーを用いた活性酸素(ROS)産生の評価では、既報よりも優れたROS産生が再現されていることが示された。さらに、成熟好中球の特性としてのneutrophil extracellular trap(NET)形成がiPS-NEUにおいても再現された。患者由来iPS-NEUでは、ROS産生、NET形成ともに欠如しており、病態モデルが確立された。

D. 考察

本研究の目的は、我が国独自の遺伝子治療の実施を支援していく体制を構築することにあるが、その具体例として実際に慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を行い、その中で起こりうる問題点や課題を解決することで、実施に必要なインフラを整備することである。なお、当該遺伝子治療臨床研究は平成23年2月24日に当センターのIRBにて承認され、その後、国の審査として平成24年3月28日に開催された厚生科学審議会科学技術部会にて了承された。

今年度は主に遺伝子治療臨床研究の際に使用する安全性と高い遺伝子導入効率を担保する遺伝子導入法の樹立とその工程を文章化したSOPの作成、実際に遺伝子導入細胞を調製する細胞調製室(Cell Processing Room: CPR)の整備を行った。また、治療ベクターの挿入部位を同定するLAM-PCRや今後も継続して遺伝子治療臨床研究

を進めていくための臨床用ウイルスベクターの製造(Working Cell Bankの作製)を試みた。さらには患者由来iPS細胞を樹立し、慢性肉芽腫症の病態解析を試みた。

さて、慢性肉芽腫症であるが、本疾患は食細胞の機能異常が原因で、乳児期より重篤な感染症に罹患し、根治療法としてはHLAが一致した造血幹細胞移植しかなく疾患である。また、重度感染症の罹患により必ずしも安全な移植医療が行えず、治療の選択に苦慮する疾患でもある。この点から鑑みて、本研究によって慢性肉芽腫症に対する安全で有効な治療法が確立できれば、患者・家族のQOLが格段に上昇すると思われる。確かに、遺伝子治療は最近では欧米を中心に広く行われているが、その数は十分ではなく、いまだ実験的医療の範疇を超えない。よって、ここで行われる遺伝子治療の臨床結果は将来の遺伝子治療の発展において大いに役立ち、また、学術的観点からも貴重な情報を提供するものとして国際学会等の発表にも十分に資する。同時に、造血幹細胞遺伝子治療により重度感染症が回避できることから医療費の観点からも意義がある。

今後は、現在進めている慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を継続して実施していくが、その際には今回作製したWCBをより製造した臨床用ウイルスを用いて行って行きたいと考えている。

E. 結論

- 1) ヒト大量造血細胞を用いたDry Runを複数回施行し、この結果をもとにSOPを作成した。
- 2) 遺伝子治療臨床研究で使用される細胞調製室の準備、遺伝子治療専属スタッフへの指導及び病院関係者との連携を深めた。
- 3) pyrosequencingの原理を応用した高速ソークエンシングによる遺伝子導入部位の網羅的解析法は、以前より行われていたLAM-PCR法で得られた結果を再現し、さらにはより頻度の低いバンドも増幅できることが示唆された。
- 4) 臨床用ウイルス製造のためのWCB作製の準備を開始した
- 5) gp91^{phox}遺伝子は造血幹細胞の増殖に正の影響を与えていないことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T: Time-lapse imaging reveals symmetric division of GFAP-expressing progenitors for expansion of

- postnatal dentate granule neurons. *PLoS ONE* 6: e25303, 2011.
2. Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T: Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using antibody/ c-Mpl chimera. *Cytokine* 55: 402-408, 2011.
 3. Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: Enforced ROR(γ)t expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29: 86-93, 2011.
 4. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, S Hidehiko: Heterozygous *ITGA2B* R995W mutation inducing a constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117: 5479-5484, 2011.
 5. Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity of Sorafenib Against Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells. *J Gastroenterol* 46: 779-789, 2011.
 6. Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M: Osteomyelitis due to triethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection* 39: 171-173, 2011
 7. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Otsu M, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood*. 2012;119(8):e45-56.
 8. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Otsu M et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
 9. Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Otsu M et al. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*. 2011;13(5):262-268.
 10. Kawahara M, Chen J, Sogo T, et al. Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine*. 2011;55(3):402-408.
2. 学会発表
1. 河合利尚、村山静子、新井勝大、小崎里華、奥山虎之、小野寺雅史. 慢性肉芽腫症における非感染性炎症疾患の検討. 第114回小児科学会学術集会, 東京, 2011.
 2. 村山静子、明城和子、竹澤祐介、石黒精、河合利尚、大石勉、井田博幸. マクロファージ活性化症候群を発症した慢性肉芽腫症の3例. 第114回小児科学会学術集会. 2011
 3. T Kawai. Gene Therapy for a Patient with Chronic Granulomatous Disease. 第17回遺伝子治療学会, 福岡, 2011.
 4. 田村英一郎、村山静子、伊藤玲子、河合利尚、井田博幸. X連鎖慢性肉芽腫症における腸内細菌叢の検討. 第43回小児感染症学会, 岡山, 2011.
 5. Evidence for the Involvement of CXCR4 Signaling in *in vivo* Self-Renewal of Transplanted Hematopoietic Stem Cells CHEN-YI LAI, Sachie Suzuki, Motohito Okabe, Satoshi Yamazaki, Makoto Otsu, Hiromitsu Nakauchi The 53rd ASH Annual Meeting, 2011, San Diego.
 6. Patient Autologous iPSCs in the Modelling and Treatment of Chronic Granulomatous Disease. Lin Huan-Ting, Makoto Otsu, Taizo Wada, Akihiro Yachie, Naoya Takayama, Hiroshi Endo, Hiromitsu Nakauchi The 19th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2011, Brighton.
 7. Lessons from Japanese Clinical Trial of Stem Cell Gene Therapy for ADA-Deficiency. Makoto Otsu The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2011, Fukuoka, Japan.

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

効果的な酵素補充療法を可能にするライソゾーム病の 新たな診療体制の確立

所 属 国立成育医療研究センター
臨床検査部
研究者 奥山 虎之

研究要旨

ムコ多糖症 II 型の中枢神経病変に有効性を示す低分子ケミカルシャペロンを 21 化合物を同定した。361 名を対象にポンペ病新生児マス・スクリーニングパイロット研究を行った。ムコ多糖症モデルマウスにおいて骨の肥厚化を示す所見を得た。

研究分担者

鳥取大学生命機能研究支援センター難波栄二
日本ケミカルリサーチ株式会社研究本部
森本秀人

年間数千万円におよぶ高額医療の妥当性が問われ始めている。

A. 研究目的

酵素補充療法が可能なライソゾーム病であるムコ多糖症 II 型とポンペ病を対象として、

- (1) 中枢神経病変に対する治療法の開発
- (2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立
- (3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化、の 3 点を目的に研究を進める。

現在、6 疾患（ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリー病、ムコ多糖症 I 型, II 型, VI 型）に対する酵素補充療法が可能であり、相当数の患者が酵素補充療法の恩恵に与っているが、臨床経験の蓄積は以下の新たな問題を浮き彫りにしている。

- ① 高分子である酵素は、血液脳関門を通過できないことから、精神発達遅滞や退行に対するの治療効果が期待できない。
- ② ムコ多糖症の骨病変やポンペ病の心筋障害等には、病変が進行する前から酵素補充療法を開始しないと効果がない。
- ③ 疾患の認知度が高まるにつれてライソゾーム病と診断される患者は着実に増えているため、

B. 研究方法

(1) 中枢神経病変に対する治療法の開発
IDS 基質競合阻害活性による化合物のスクリーニングを行った。化合物の検索には FDA 認可薬ライブラリー (640 化合物) と ICCB (Institute of Chemistry and Cell Biology) 化合物ライブラリー (476 化合物) を用いた。IDS 基質競合阻害活性測定は 4-MU-sulfate を基質として使い、96 ウェルプレート上で IDS と化合物を混和後、37°C、60 分間反応後、4-MU 蛍光測定を行った。スクリーニングは 2 回行い、共に 50%以上の阻害活性を示した化合物を抽出した。また、濃度依存的阻害活性測定は、段階的に希釈した化合物を用い、同様の方法で阻害活性測定を行った。

(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立と新生児スクリーニングへの応用
2011 年 1 月から 2011 年 5 月まで国立成育医療研究センターで、在胎週数 35 週以上かつ出生体重 2000 g 以上で出生した新生児の中で、保護者から本検査の同意を得られた新生児を対象とした。現行の先天性代謝異常症マス・スクリーニングのために新生児からろ紙採血をする際、本検査用のろ紙微量血液検体も採取し、1) GAA 活性値(基準値

に対する%)、2) 阻害% (阻害物質の存在下、非存在下での活性値の比)、3) Ph 活性比 (酵素反応条件による活性値の比) を蛍光合成基質を用いて測定した。GAA 活性値が正常新生児基準値の 30% 以下の場合を一次スクリーニング陽性と判断し、二次スクリーニングとして pseudodeficiency の鑑別のために GAA 遺伝子の 1726G>A (G576S) の遺伝子多型解析を行った。遺伝子の多型解析で pseudodeficiency が否定された場合および pseudodeficiency と診断された場合でも GAA 活性値が基準値の 8% 以下であった症例については、リンパ球の GAA 活性測定と GAA 遺伝子の全領域の遺伝子検査を行った。

(3) ムコ多糖症骨病変の病態解明

37~39 週齢の IDS KO マウス及び IDS KO マウスと同腹仔の野生マウス各 3 匹を用い、下記に示す解析を行った。

①軟 X 線写真撮影：軟 X 線撮影装置 (TRS-1005: SOFRON 社) を用い軟 X 線写真を撮影した (条件: 電圧 28 kV、電流 2.5 mA、撮影時間 90 秒)。

②病理組織学的検査：大腿骨を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、EDTA で脱灰後、定法に従いパラフィン包埋した。3 μ m の厚さで薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製した。作製した HE 染色標本について病理組織学的検査を実施した。

③骨形態計測：脛骨を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、GMA 樹脂に包埋した。3 μ m の厚さで薄切後、トルイジンブルー染色標本作製した。作製したトルイジンブルー染色標本について、骨形態計測システム (OsteoMeasure: Osteometrics 社) を用い、骨形態計測を行った。計測範囲は、成長板軟骨から 0.2 mm の領域を除外した位置を基準とし、基準から遠位方向に 1.125 mm までの二次海綿骨領域とした。

C. 研究結果

(1) 中枢神経病変に対する治療法の開発

FDA 認可薬ライブラリーと ICCB 化合物ライブラリーの計 1,116 化合物の IDS 阻害活性スクリーニングを行い、FDA 化合物 7 個、ICCB 化合物 13 個の計 21 化合物を同定した。また、これらの化合物はいずれも濃度依存的な IDS 酵素阻害活性を示した。IDS cDNA 発現ベクターを一過性に導入した培養 COS7 細胞では、顕微鏡下で小胞体に局在する発現 IDS を検出した。また、ウェスタンブロット法により、約 76 kDa の IDS 蛋白質の発現を検出した。さらに、このライセートから抗 IDS 抗体を用い免疫沈降を行い、免疫沈降産物中の IDS も検出した。

(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立と新生児スクリーニングへの応用

対象者となったのは 361 名であり、そのうち 15 名が一次スクリーニング陽性と診断された。これらの陽性例の 1726G>A (G576S) の GAA 遺伝子多型解析を行った結果、14 例は pseudodeficiency に矛盾しないホモ接合体であった (対象者の 3.9%)。1 例はヘテロ接合体であったため、リンパ球での GAA 活性測定、GAA 遺伝子検査を行ったところ、GAA 活性値は基準値の 15% で、GAA 遺伝子変異は認められなかった。スクリーニング陽性群の解析結果の平均値は、1) GAA 活性値 $20.1 \pm 3.6\%$ 、2) 阻害% $57.9 \pm 8.9\%$ 、3) pH 活性比 26.4 ± 6.3 であった。スクリーニング陰性群では、1) GAA 活性 $103.5 \pm 39.5\%$ 、2) 阻害% $35.7 \pm 6.4\%$ 、3) pH 活性比 5.4 ± 2.5 であった。GAA 活性値が 8% 以下、阻害% 60% 以上、pH 活性比 30 倍以上を呈するポンペ病の症例はなかった。

(3) ムコ多糖症骨病変の病態解明

①軟 X 線写真：野生型マウス群と比較して IDS KO マウス群において、頭蓋骨、上肢、下肢及び肋骨等で骨の肥厚化が認められた。

②病理組織学的検査：野生型マウス群と比較して、IDS KO マウス群において皮質骨部分が肥厚化して

いた。また、空胞化した骨小腔が多数認められ、骨細胞の密度も野生型マウス群と比較して増加していた。

③骨形態計測：単位骨量（%）、骨梁幅（ μm ）、骨梁数（/mm）及び骨梁間隙（ μm ）は野生型マウス群でそれぞれ、 10.2 ± 2.3 、 41.5 ± 5.0 、 2.45 ± 0.28 及び 370.6 ± 49.8 であった。一方、IDS KO マウス群ではそれぞれ、 17.1 ± 1.8 、 45.2 ± 1.8 、 3.79 ± 0.34 及び 220.3 ± 25.4 であった。野生型マウス群と比較して、IDS KO マウス群で、単位骨量及び骨梁数の有意な増加、骨梁間隙の有意な減少が認められた。骨梁幅については、野生型マウス群とIDS KO マウス群で差は認められなかった。

D. 考察

昨年度はインシリコスクリーニングにより、ヒトIDS酵素蛋白質に結合が予測される9個のFDA候補化合物を同定した。しかし、いずれの化合物も試験管内IDS酵素阻害活性を認めなかった。そこで、本年度は試験管内酵素阻害活性測定によりIDS阻害活性を示す化合物のスクリーニングを行った。得られた21化合物はいずれも分子量300-800の低分子化合物であった。予備的に2化合物について調べた結果、IDSに対する試験管内酵素安定化作用を認めた。また、いずれの化合物もベータガラクトシダーゼ、ヘキソサミニダーゼに対する阻害活性は認めなかった。他のスルファターゼに対する阻害活性についてはこれから検討する予定である。

化合物が細胞内でシャペロン活性を示すには、化合物が細胞膜と小胞体膜を通過し、小胞体内で変異酵素化合物と結合することが必要と考えられる。よって、これまでのGM1-ガングリオシドシスとゴーシェ病に対する我々のシャペロン化合物開発過程でも、試験管内酵素阻害活性を有する化合物がシャペロン活性を示さない場合もあった。また、細胞毒性の高い化合物は将来的な治

療薬としての開発には適さない。来年度は患者皮膚線維芽細胞または変異ヒトIDS発現細胞系を用いたシャペロン活性の測定を行うことで、シャペロン化合物としての効果の検討を行う。また、今回の試験管内スクリーニングの結果をもとに再度インシリコスクリーニングを行うことで、新たな候補化合物の同定を行う。

今回のパイロット研究では、一次スクリーニングで陽性と判定された15例のうち14例がpseudodeficiencyであった。本研究におけるpseudodeficiencyの頻度は3.9%であり、既知の報告と同じ頻度であった。また1例は、GAA遺伝子の多型解析によりpseudodeficiencyが否定されたため、二次スクリーニングであるリンパ球GAA活性測定、GAA遺伝子検査を行ったが、異常は認められなかったため、正常と判断した。乳児型ポンペ病患者が疑われる症例は認めなかった。この結果、本ポンペ病新生児スクリーニングの特異度は95.8%であった。今後、検査対象例の結果を蓄積し、本検査のカットオフ基準値が適正であるかどうかについて、レトロスペクティブに検討していく必要があると考える。

無血清培養にて製造した遺伝子組換えヒトIDSを、ムコ多糖症II型のモデルマウスであるIDS KOマウスへ0.5 mg/kg、1.0 mg/kg及び2.0 mg/kgの用量で週1回24週間反復尾静脈内投与したところ、全ての用量において、尿中及び組織中GAG濃度の顕著な減少効果が認められた。

E. 結論

試験管内酵素阻害活性スクリーニングを行い、ヒトIDSに対し基質競合阻害活性を示す21化合物を同定した。今後、培養細胞を用いたシャペロン試験によりケミカルシャペロン化合物の同定を行う。

361名が対象となった今回のパイロットスタディでは一次スクリーニング陽性例は15例であり、14例はpseudodeficiencyであった。1例は擬陽

性であったが、乳児型ポンペ病患者が疑われる症例はなかった。検査の特異度は95.8%であった。

ムコ多糖症 II 型のモデル動物の骨異常に関する評価を実施した結果、軟 X 線写真及び病理組織学的検査で骨の肥厚化が認められ、骨形態計測の結果では、骨梁の増加が認められた。骨異常を指標とした酵素補充療法の有効性評価においても有用なモデルであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Hum Mutat, 32, 843-852, 2011
- 2) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J Neurochem, 118, 399-406, 2011
- 3) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts. J Biol Chem, 286, 35283-35290, 2011
- 4) Sakakibara Y, Hachiya T, Uchida M, Nagamine N, Sugawara Y, Yokota M, Nakamura M, Pendorf K, Komori T, Sato K. COPICAT: a software system for predicting interactions between proteins and chemical compounds. Bioinformatics, 28, 745-746, 2012

5) Oda E, Tanaka T, Migita O, Kosuga M, Fukushi M, Okumiya T, Osawa M, Okuyama T: Newborn screening for Pompe disease in Japan. Mol Genet Metab. 104:560-565, 2011.

6) Furujo M, Kubo T, Kosuga M, Okuyama T: Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI. Mol Genet Metab. 104:597-602, 2011

7) Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FW, Reuser AJ, Okumiya T: Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. Mol Genet Metab. 103:12-17, 2011.

2. 学会発表

- 1) Nanba E. Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8
- 2) Takai T, Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening. Tokyo, 2011.8
- 3) 高井知子、檜垣克美、鈴木義之、難波栄二: ヒト変異 β -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物. 第84回日本生化学会大会、京都、2011.9
- 4) 三浦弘子、檜垣克美、山内裕子、高井知子、難

波栄二：ライソゾーム病神経変性とミトコンドリア異常. 第84回 日本生化学会大会、京都、2011.9

5) 檜垣克美, 高村歩美, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二：GM1 ガングリオシドシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 第16回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2010. 9

6) Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Chemical chaperone therapy for β -galactosidase deficiency. 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011,10

7) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二：ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第53回 日本先天代謝異常学会総会, 千葉, 2011.11

8) Yi Y, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二：ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第53回 日本先天代謝異常学会総会, 千葉, 2011.11

9) Motomichi Kosuga, Eri Oda, Toju Tanaka, Kazuhiro Kida, Torayuki Okuyama. The Feasibility of Newborn Screening for Pompe Disease in Japanese Population. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research Hosted with the pediatric Academic Societies' Annual meeting. Denver, USA. April 30, 2011.

10) 小須賀基通、木田和宏、藤 直子、小田絵里、奥山虎之. 乳児型ポンペ病新生児スクリーニングのパイロットスタディ. 第53回日本先天代謝異常学会・第10回アジア先天代謝異常症シンポジウム、千葉、2011.11.26.

11) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、小田絵里、奥山虎之.. 国立成育医療研究センターにおける新生児型ポンペ病マススクリーニングパイロットスタディの結果報告. 第38回 日本マス・スク

リーニング学会、福井、2011.10.29.

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。
3. その他
該当なし。

エイズ日和見原虫症に対する新規薬剤標的の探索と生理機能の解明

所 属 国立感染症研究所・寄生動物部
研究者 野崎 智義

研究要旨 本研究では、エイズに伴う原虫感染症であるトキソプラズマ症・クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症の創薬に不可欠である新規創薬標的の探索をその代謝経路の同定と機能解明を目的としている。初年度はいずれの分野に関してもほぼ予定通りの成果を挙げた。特に、トキソプラズマ関連原虫における植物ホルモンの存在の証明、植物ホルモンのインビボでのトキソプラズマ増殖阻害効果の確認、赤痢アメーバ組換え酵素を用いた微生物培養液の阻害剤の探索、赤痢アメーバの標的代謝経路の選択的抑圧株の作成など、有益な成果を得た。また、次年度以降研究展開に必要な準備的な検討を完了した。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所・寄生動物部 永宗喜三郎
- (2) 北里大学・大学院感染制御科学府 塩見和朗
- (3) 弘前大学・農学生命科学部 坂元君年
- (4) 日本生物科学研究所 川原史也

A. 研究目的

HIV/AIDSにしばしば随伴するクリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症などの原虫症は日和見感染症として重要である。これらの原虫感染症には、限定的な治療法しか存在しないか、有効な治療法が存在しない。また原虫感染症における薬剤耐性の出現はマラリア・リーシュマニア等の例に限らず、共通した問題である。本研究では、これら原虫症に対する治療・予防薬の創成を目指し、原虫に選択的に存在する代謝経路を標的とした新規阻害剤の探索、標的代謝経路の生理機能の解明を行い、リード化合物の誘導体化、候補化合物の選定、並びに、得られた化合物の安全性試験を行うことを目的とする。本研究班は、天然物化学、有機化学、生化学、寄生虫学、創薬・ワクチンを専門とする異分野の統合を図った研究グループである。本研究の成果により臨床応用への道が開かれれば、エイズによる致死率を減少させるのに重要な貢献をすることが期待される。現在の薬剤耐性エイズウイルスの出現に鑑み、代替えの治療法をあらかじめ準備することは対エイズ対策上極めて重要であると考えられる。

トキソプラズマ症創薬に関しては、アピコンプレクサ門原虫に選択的に存在する植物様ホルモン合成経路を阻害する薬剤をスクリーニングし、インビトロ・インビボ試験の後、抗トキソプラズマ薬を選定する。同時に、植物様ホルモンとその合成経路のトキソプラズマ感染・病原機構における役割を解明する。赤痢アメーバ症創薬に関しては、原虫選択的に存在するシステイン合成経路を標的とした阻害剤の探索、誘導体化、リード化合物の決定を行う。クリプトスポリジウム症創薬に関しては、呼吸鎖の末端酸化酵素AOXの阻害剤と協調して働く、呼吸鎖の別の作用点であるND2

を標的とした生理機能・構造解明と阻害剤探索の研究を行い、高い治療効果を示す治療法を創成することを目指す。これら原虫感染症には、有効な治療法の欠如、既存の薬剤の毒性、耐性原虫株の出現などの問題が存在する。現行のエイズ多剤併用療法への薬剤耐性出現に鑑み、日和見原虫症に有効な新規薬剤を準備しておくことは極めて重要である。

B. 研究方法

1. トキソプラズマ創薬研究

トキソプラズマの *in vitro* での増殖は、RH 株に大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した 2F 株を用いてその β -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより行った。マウスへの感染実験には BALB/c マウスを用いた。BALB/c にトキソプラズマの PTG 株を腹腔内投与し、チジアズロンを 12 日間にわたり毎日腹腔内投与した。チジアズロンの効果は、マウスの生存率を 20 日間観察しその生存率により評価した。

アイメリア原虫は *Eimeria tenella* Nt-P110 株を用い、SPF 鶏 (L-M 系、日生研) を用いて継代した。糞便中に排泄されるアイメリア原虫のオーシストを、飽和食塩液を用いた比重勾配浮遊法にて分離した。オーシスト破碎は 0.5mm ガラスビーズとの共振とうにより、脱囊は 0.25% トリプシン、0.5% タウロデオキシコール酸ナトリウム添加により行った。

植物ホルモンおよび抗植物ホルモン阻害剤は上記した脱囊処理液に最終濃度 0.1% で添加して効果を判定した。40°C、1 時間の加温処理後、顕微鏡を用いて脱囊した虫体数を測定した。脱囊虫体数が 20% 以上増加した薬剤を促進効果がある薬剤と判定し、脱囊虫体数が 20% 以上の減少を示した薬剤を抑制効果がある薬剤と判定した。

2. クリプトスポリジウム創薬研究

C. *parvum* 由来 NADH-ユビキノ還元酵素 ND2 の組換えタンパク発現のため、ゲノム DNA

を鋳型に PCR により ND2 遺伝子を増幅した。pET151 を用いて発現用プラスミドの構築を行った。更に、*C. parvum*, *C. hominis* 由来リンゴ酸-キノン酸化還元酵素 MQO 遺伝子のクローニングを行った。

NADH-ユビキノ還元酵素は大腸菌においてプロトンポンプを行う ND1 およびプロトンポンプ能を持たない ND2 の 2 種類が存在し、*C. parvum* の ND2 を発現した際に膜を用いる活性測定を妨害することが予想されたため、ND1、ND2 それぞれを欠損した大腸菌および二重欠損大腸菌を入手し、それぞれの培養上の性質を検討した。

3. 赤痢アメーバ創薬研究

システイン・S-メチルシステインの生合成経路の遺伝子の発現を抑制した赤痢アメーバ発現抑制株を作成した。システイン合成酵素(CS)1, CS3, セリンアセチル転移酵素(SAT)1, SAT2, SAT3 遺伝子配列はゲノムデータベース(AmoebaDB)から獲得し、タンパク質コード領域の N 末端に相当する 420bp を増幅後、psAP-Gunma に挿入した。赤痢アメーバ株 G3 株を BI-S-33 培地を用いて培養し、Lipofectamine により、形質転換を行った。G418 濃度を徐々に上げ、6 µg/ml の G418 の存在下で野性型が薬剤非存在下で増殖するのと同等な薬剤耐性を示した時点で、選択を完了した。

微生物代謝産物ライブラリーのスクリーニングに必要な含硫アミノ酸代謝組換え酵素(SAT1~3, CS1~3)の調製は既存の方法に従い、His タグ付の各酵素を発現・精製した。96 穴プレートでの酵素アッセイ系は、キュベットを用いた野崎らの方法を改変した。代謝物ライブラリーは北里大学北里生命科学研究所保有の微生物代謝産物ライブラリーに登録されている 316 化合物を用い、終濃度 0.1 mg/mL として CS1~3 および SAT1~3 に対する阻害活性を測定した。阻害活性を示した化合物の IC50 値を求めた。更に、北里大学北里生命科学研究所微生物資源センターおよび微生物機能研究室より供給された糸状菌および放線菌の培養液をそれぞれ 1 ウェルあたり 5 µL または 10 µL 用いて、CS1 および SAT1 に対する阻害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

病原微生物取り扱いに関する細則には十分に配慮した。マウス感染実験に関しては機関内の動物実験委員会の承認を得て、内規を遵守して行った。更に、動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律について」(環境省)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省)、「厚生労働省の所轄する実験機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(厚生労働省)、「農林水産省の所轄する実験機関における動物実験等の実施に関する基

本指針」(農林水産省)、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)などを厳正に遵守した。

C. 研究結果

1. 天然・合成植物ホルモンのトキソプラズマ増殖に対する評価

天然サイトカイニンとしてトランス-ゼアチン、合成サイトカイニンとしてチジアズロン、天然オーキシニンとして、インドール酢酸、合成オーキシニンとしてナフタレン酢酸および 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid を、またジャスモン酸およびサリチル酸のトキソプラズマ増殖への影響を検証した。サイトカイニン以外のホルモンはトキソプラズマの増殖に影響しなかった。

天然サイトカイニンであるトランス-ゼアチンは *in vitro* での原虫の増殖を正に上昇させ、合成サイトカイニンであるチジアズロンは抑制した。トランス-ゼアチンが原虫増殖を 2 倍上昇させる濃度は約 2 µM で、チジアズロンが 50%抑制させる濃度は約 50 µM であった。次に *in vitro* 効果を示したチジアズロンの抗トキソプラズマ効果を *in vivo* マウスモデルを用いて検証した。チジアズロンの抗原虫効果は 1.1 µg/kg/day 以上の濃度で有意に確認された。

2. トキソプラズマ・クリプトスポリジウムに関連するアピコンプレクサ門原虫における植物ホルモンの証明と阻害剤効果の検討

アイメリア原虫 *Eimeria tenella* から MS 解析により 41 種類の植物ホルモン及び中間体の検出を試みた。サイトカイニン類であるイソペンチニルアデニンリボシド (iPR)、イソペンチニルアデニン (iP)、トランス-ゼアチンリボシド (tZR) およびトランス-ゼアチン (tZ) は、加温および脱囊処理により、その含有量が大きく減少した。一方で、加温および脱囊処理後には、iP および tZ の代謝物(非活性型)と考えられる iP7G、tZ7G および tZ9G の増加が確認された。

サリチル酸 (SA) およびオーキシニン類であるインドール-3-酢酸 (IAA) は、加温処理だけでは特に大きな変動が認められなかったが、脱囊処理により顕著に増加する傾向が認められた。IAA の代謝物とされるインドール-3-アスパラギン酸 (IAA_{sp}) も脱囊処理後に増加する傾向を認めた。一方、インドール-3-アラニン (IAA_{la}) は、いずれのサンプルからも検出されなかった。SA、IAA および IAA_{sp} とともに、他の植物ホルモンと比較して虫体あたりの含有量が極めて高い値を示すことが特徴であった。以上、一部のジベレリン類のみが検出された。ジベレリン A4 (GA4) は加温処理により大きく減少し、条件により変動した。脱囊処理後には検出限界以下のレベルにまで減少した。一方で、ジベレリン A12 (GA12) は加温および脱囊処理により大きく増加する傾向を示した。

MS 解析で検出対象とした 41 種類のうち、12 種類 (アブシジン酸、ジャスモン酸、ジベレリ

ン A8、ジベレリン A20 およびジベレリン A53 など) については、いずれかのサンプルから検出されたものの、加温処理や脱囊処理によって特に大きな変動は認められなかった。また、18種類(シス-ゼアチン、ジハイドロゼアチンおよびこれら両者の前駆体と代謝物、ジベレリン A1、ジベレリン A3 ならびにジベレリン A7 など) については、いずれのサンプルからも検出されなかった。

植物ホルモンおよび抗植物ホルモン阻害剤のアイメリアのオーシスト脱囊への効果を天然オーキシンである IAA および合成オーキシンであるナフタレン酢酸(NAA)で調べたところ、ともに脱囊を顕著に促進する効果を示した。一方で、NAAと同じ合成オーキシンである2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)で処理した場合、脱囊が顕著に抑制された。オーキシン合成阻害剤であるアミノエトキシアミノグリシン(AVG)およびオーキシン輸送阻害剤とされる2,3,5-トリヨード安息香酸(TIBA)の処理では、ともに脱囊が顕著に抑制された。サリチル酸合成阻害剤であるアミノオキシ酢酸(AOA)およびAOAへミ塩酸塩の処理では、ともに脱囊が完全に抑制された。一方で、アブシジン酸およびジベレリン A3 の処理は、脱囊には全く影響を及ぼさなかった。

3. クリプトスポリジウムの創薬研究

C. parvum 由来 NADH-ユビキノン還元酵素 ND2 のタンパク質コード領域は予想配列通りに増幅され、発現用プラスミドは構築された。*C. parvum*, *C. hominis* 由来リンゴ酸-キノン酸化還元酵素 MQO に関しては、PCR の過程で *C. hominis* ゲノムデータベース情報の不備が発覚したため、ゲノム Walking や、より上流に設計したプライマーの利用で、*C. parvum* MQO の配列を確認し、登録配列との完全一致を確認した。発現用断片の増幅に関してはより広範囲の配列を増幅後、Nested PCR により達成された。*C. hominis* MQO においてもデータベースで欠けていた部分の配列が決定された。

NADH-ユビキノン還元酵素である ND1、ND2 のそれぞれ一つ、または二つを欠損した大腸菌を培養したところ、単一欠損株はいずれも通常通り培養出来たが、二重欠損株については試みたすべての培地で生育が安定せず、コントロールプラスミドでの形質転換効率も悪かったため発現用の大腸菌としては適切でないことが明らかとなった。

4. 赤痢アメーバシステイン・S-メチルシステイン合成経路の発現抑制体の作成

本経路の生理機能の解析のため、SAT 及び CS の遺伝子の発現抑制株を作成した。SAT、CS はシステイン並びに S-メチルシステインの合成経路においてキーとなる 2 反応を触媒する。赤痢アメーバのゲノム中には 3 種類の SAT 及び CS のアイソザイムが存在し、そのアミノ酸レベルで

の相互同一性はそれぞれ 48-73%、83-99%であった。組換えタンパク質を用いた過去の酵素学的解析から、これら 3 種の SAT アイソザイムは同様の基質親和性と反応速度をもつ一方で、システインによる阻害の感受性に明瞭な差があることが示されている。システインに対する K_i は SAT3>SAT2>SAT1 の順に高い(Hussain Mol Biochem Parasitol 2006)。一方、CS1/2 と CS3 の両者の明瞭な相違は見られない。従ってこれらの個別の gene silence 株を作成し、その表現型を観察することは、SAT、CS アイソザイムの機能的棲み分けを理解する上で重要である。Gene silence 法による発現抑制を RT-PCR で確認したところ、SAT1 又は SAT2 の gene silence により、両者が同時に抑制された。一方、SAT3 の gene silence 株では SAT3 遺伝子のみが発現抑制された。一方、CS 遺伝子抑制株で CS1,3 両方のタンパク質発現をイムノプロットで確認すると、いずれの発現抑制体でも CS1,3 が同時に抑制されていた。CS 酵素活性のアッセイの結果もタンパク質発現の結果を補完していた。この結果は SAT1-2、CS1-3 の遺伝子距離の近さにより、区別なくアイソタイプ遺伝子が抑制されたと考えられた。

5. 赤痢アメーバ SAT、CS の阻害剤探索

微生物代謝産物ライブラリー中の 316 化合物中から CS、SAT 阻害化合物を探索した。10 化合物が CS1~3 を 50%以上阻害した。いずれも各アイソタイプに対する選択性はみられなかった。CS を強く阻害する化合物はその構造中にナフトキノン骨格を含んでいた。CS1 に対する IC50 値を測定したところ、抗菌活性、抗がん活性が報告されている kerriamycin B が IC50=6 μM と最も強い阻害活性を示した。

一方 SAT1~3 を 50%以上阻害するものは 316 化合物中 ascofuranone のみであった。ascofuranone も 3 種類のアイソタイプ全てに対し阻害活性を示した。SAT1 に対する IC50 値を求めたところ 120 μM であった。

次に、微生物培養液のスクリーニングを行った。スクリーニングにおける通貨基準は以下のように設定した。一次スクリーニング: SAT1 の活性を 50%以上阻害するものを選択する。二次スクリーニング: CS1 を阻害しないもの(CS1 阻害率 25%以下)を選択する。三次スクリーニング: システインを検出するための酸ニンヒドリン反応を阻害して、偽活性を示すサンプルを除く。CS 阻害剤スクリーニングの基準は以下の通り。一次スクリーニング: CS1 の活性を 50%以上阻害するものを選択する。二次スクリーニング: 酸ニンヒドリン反応を阻害するサンプルを除く。

微生物培養液 720 サンプル中、SAT を選択的に阻害するサンプルはわずか 1 サンプルのみであった。一方 CS を阻害するサンプルは 50 を超えた。この傾向は微生物代謝産物ライブラリー化合物をスクリーニングした結果と一致した。

10 $\mu\text{L}/\text{well}$ の微生物培養液を用いたスクリーニングでは CS を阻害するサンプルが全体の 7%と多数であったため、微生物培養液量を半量 (5 μL) として、さらにスクリーニングを行った。その結果、CS を 50%以上阻害するサンプルは全スクリーニングサンプルの 1.3%まで減少した。さらに通過基準を 70%以上阻害するものにまで引き上げた結果、二次通過基準を通過したサンプルは 0.8% (25 サンプル) まで減少した。

D. 考察

本研究は HIV/AIDS に付随する原虫症の治療薬の開発に不可欠な新規標的の探索と解析を目指している。初年度、当初の計画に従いほぼ予定通りの成果を収めた。トキソプラズマ創薬研究においては、永宗らがこれまで解析してきた植物ホルモンおよびその代謝経路を創薬標的としている。初年度トキソプラズマ増殖阻害効果を確認した化合物のうち、特に、肥料として安価に合成されているサイトカイニンであるチジアズロンはシードとして非常に有望である。チジアズロンがなぜ天然サイトカイニンであるトランス-ゼアチンと正反対の効果を示すかについては、これらの薬剤の作用機序の解明と並行して次年度以降の重要な検討項目である。

更に、トキソプラズマ・クリプトスポリジウムと同様にアピコプラスト門原虫に属するアイメリアを用いて、本年度、様々な植物ホルモンの存在の属ならびに条件特異性を検討した。その結果、アイメリアにおいて、脱囊の機序と植物ホルモンが深く関与していることが明らかとなった。この成績は、同じアピコンプレクサ門に属するトキソプラズマ原虫やクリプトスポリジウム原虫の脱囊時にも同様の機序が存在することを示唆し、脱囊がこれら原虫の新たな創薬標的になり得ることを示唆した。実際に、サリチル酸やオーキシンの阻害剤は原虫の脱囊を顕著に抑制することから、これらの薬剤は今後、トキソプラズマ原虫やクリプトスポリジウム原虫に対する治療薬の新たなリード化合物になることが期待される。川原らは当初より安全性試験を担当する予定になっており、次年度以降、別グループからも ND2/MQO、CS/SAT 阻害剤などの新規リード化合物が発見されるに従い、抗トキソプラズマ薬リードと併せて安全性試験を実施する予定である。

坂元らによるクリプトスポリジウム創薬研究はやや遅れているが、化学療法の標的となる ND2、MQO の阻害剤探索のために組換えタンパク質の発現を行う目的でそれぞれのクローニングを終了し、発現の準備が整った。更に、人の感染において重要な *C. hominis* の MQO および周辺の配列を決定し、今後 *C. parvum* の MQO をモデルとして利用することが妥当だと判断するなど不可欠な知見を蓄積している。

赤痢アメーバ創薬に関して、塩見らは順調にスクリーニングを展開している。微生物代謝産物ライブラリー中から見出された CS を阻害する化合物は主としてナフトキノン骨格を持っていた。過去

にナフトレン化合物が植物の CS を阻害するとの報告があり、構造の類似性から今回見出した化合物は赤痢アメーバの CS のみならず植物などの CS も阻害する可能性が示唆された。一方、SAT を阻害する化合物は ascofuranone ただ一つであったが、SAT 阻害機序は全く不明であり次年度以降解析が必要である。また、微生物培養液をスクリーニングした結果、ライブラリー化合物のスクリーニング結果と同じく、CS を阻害するサンプルは多数見出されるが、SAT を阻害するサンプルは少ない傾向にあることが判明し、同時に、スクリーニングの通過基準設定を至適化することが出来、次年度以降の追加スクリーニングの準備が完了した。次年度は有望なヒットサンプルの培養液を精製して活性物質を単離するとともに、さらにスクリーニングを継続していく予定である。

野崎らの赤痢アメーバのシステイン・S-メチルシステインの生合成経路の生理的役割の解明も予定通りに展開している。本経路は選択的・合理的な創薬標的であるが、一方で解決すべき重要な疑問が残されていた。その一つである酵素アイソタイプの redundancy の問題を解決すべく、初年度は、本経路の 2 段階を触媒するそれぞれのアイソタイプ遺伝子を独立して抑圧する株の確立を試みた。その結果、SAT1-3 の 1/2 と 2 を独立して抑制することが可能となった。一方 CS1-3 はそのヌクレオチドレベルでの相同性の高さから、すべての遺伝子は gene silencing 法により同時に抑圧され、本方法は相同性の高い遺伝子の選択的抑圧に適さないことが示された。準備的な結果によれば、SAT3 抑制体及び CS1-3 抑制体はシステイン非存在下で増殖阻害を示し、もしこの増殖阻害が培養液中のシステインの存在に依存的であれば、本経路のシステイン合成としての役割が示されたことになる。これらの形質転換体を用いた次年度の表現型観察、メタボローム解析を含めた代謝解析の準備が完了した。更に、次年度は分担研究者塩見らの研究から得られる有望な CS、SAT 阻害物質の薬理作用に関して、アメーバにおける具体的作用点の確認を行うことも不可欠な研究項目である。

E. 結論

トキソプラズマ・クリプトスポリジウム・赤痢アメーバの創薬研究のいずれの分野に関しても初年度ほぼ予定通りの成果を挙げた。特に、トキソプラズマ関連原虫における植物ホルモンの存在の証明、植物ホルモンのインビボでのトキソプラズマ増殖阻害効果の確認、赤痢アメーバ組換え酵素を用いた微生物培養液の阻害剤の探索、赤痢アメーバの標的代謝経路の選択的抑圧株の作成など、有益な成果を得ることができた。更に、次年度以降研究項目に必要な準備的な検討を終えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mishra, V., Ali, V., Nozaki, T., and Bhakuni V.
Biophysical characterization of *Entamoeba*

- histolytica* phosphoserine aminotransferase (EhPSAT): role of cofactor and domains in stability and subunit assembly. *Eur Biophys J.* 40, 599-610, 2011.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics* 12, 275, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2045-2052, 2011.
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1263, 2011.
- Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-Infected Japanese Men: Clinical Features and Response to Therapy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1318, 2011.
- Khan, S. M., Debnath, C., Pramanik, A. K., Xiao, L., Nozaki, T., and Ganguly, S. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet. Parasitol.* 178, 342-345, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., and Nozaki, T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(2):375-386, 2012.
- Mishra, V., Kumar, ., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y. J., Bhakuni, V. Role of conserved active site tryptophan-101 in functional activity and stability of phosphoserine aminotransferase from an enteric human parasite. *Amino Acids* 2011 in press.
- Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y. J., and Bhakuni, V. Glu-108 is essential for subunit assembly and dimer stability of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181(2):117-24, 2012.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and β -hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens* 8(2): e1002539. doi:10.1371/journal.ppat.1002539, 2012.
- Yamamoto, M., Ma, J.S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Megumi, Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Favre, D., and Takeda, K. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 2011, 208, 1533-46
- Nakatani, F., Morita, Y.S., Ashida, H., Nagamune, K., Maeda, Y., and Kinoshita, T. Identification of a second catalytically active trans-sialidase in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2011, 415, 421-5
- Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite *Plasmodium falciparum* cells swell and rupture to death." *PLoS ONE*, in press
- 永宗喜三郎 トキシプラズマが産生する植物ホルモン 感染症・炎症・免疫 2010, 40: 181-183
- 早川昌志、西村文秀、加藤将、末友靖隆、松山幸彦、金澤篤志、一宮睦雄、桑田晃、山田和正、永宗喜三郎、福士路花、海老根一生、吉見英明 「藻類の仲間たち」 原生動物園 2011, 2: 25-41
- 泉山信司、八木田健司、永宗喜三郎 生水と原虫症 (生水のリスク) 公衆衛生 2012, 76: 50-53
- 永宗喜三郎 アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモン様物質とその作用 日生研たより 印刷中
- Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y.-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, K., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K., and Ômura, S. (2011) Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. *Tetrahedron* 67, 6582-6586.
- Ohashi-Suzuki, M., Yabu, Y., Ohshima, S., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Kita, K., Ohta, N. and Suzuki, T. Differential kinetic activities of glycerol kinase among African Trypanosome species: phylogenetic and therapeutic implications. (2011) *J. Vet. Med. Sci.* 73(5), 615-621
- Oda, Y., Yui, R., Sakamoto, K., Kita, K. and Matsuura, ET. Age-related changes in the activities of respiratory chain complexes and mitochondrial morphology in *Drosophila*. (2011) *Mitochondrion* 12, 345-351
2. 学会発表 (国際学会及び重要な国内発表のみ)
- Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The Second Cross-Straits and Asia Pacific International Conference on Parasites, August 31-September 2, 2011, Tainan, Taiwan. (Invited lecture)
- Nozaki, T. A novel import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle from

- the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. International Union of Microbiological Societies. September 8-10, 2011, Sapporo, Japan. (Symposist and Convenor)
- Nozaki, T. Function and transport of the highly divergent mitochondrion-related organelle from the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. The 1st Asian Conference of Prosistology, October 3-6, 2011, Jeju, Korea (Plenary Lecture)
- Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., and Furukawa, A. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The 1st Asian Conference of Prosistology, October 3-6, 2011, Jeju, Korea (Workshop).
- Nozaki, T. Protozoan metabolism and drug development: discovery and targeting a novel pathway in the enteric parasite. Singapore-Japan Joint Forum on Emerging Concepts in Microbiology. November 15-16, 2011, Singapore.
- Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting, December 1-2, 2011, Bangkok, Thailand.
- Nozaki, T. Divergent evolution of mitochondrion-related organelles under anaerobic conditions: Function and transport of mitosomes in *Entamoeba histolytica*. The 33rd Japanese Society of Molecular Biology, December 13-16, 2011, Yokohama.
- Nozaki, T. Evolutionary divergence of function and import of the mitochondria. JST Vinnova Japan-Sweden Joint Workshop, Multidisciplinary BIO, January 25, 2012, Tokyo.
- Nozaki, T. Metabolism and metabolomics in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 2-3, 2012, Delhi, India. (Invited lecture)
- Nozaki, T. Metabolism, drug resistance, vesicular trafficking, virulence, and mitochondria evolution in *Entamoeba histolytica*. EMBO Global Lecture Course and Symposium on 'Amoebasis: Exploring the Biology and the Pathogenesis of *Entamoeba*' March 4-7, 2012, Khajuraho, India. (Plenary Lecture)
- Fkshi, M., Aonuma, H., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. Analyze of the mechanism of action of primaquine on *Toxoplasma gondii*. 11th International Congress on Toxoplasmosis, Ottawa, Canada, June 2011
- Andrabi, S.B.A., Tahara, M., Aonuma, H., Toyama, T., Tanabe, K., Nozak-i, T., and Nagamune, K. Plant hormone cytokinins: Elucidating their role in *Toxoplasma gondii*." 11th International Congress on Toxoplasmosis, Ottawa, Canada, June 2011
- Nagamune, K. and Andrabi, S.B.A. Plant hormone cytokinins: Elucidating the role in *Toxoplasma gondii*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo
- Fkshi, M., Aonuma, H., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. Analyzing of the mechanism of action of primaquine on *Toxoplasma gondii*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo
- 増田 祐衣、森 美穂子、野崎智義、筒井 歩、砂塚敏明、増間碌郎、高橋洋子、大村 智、塩見和朗 微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ原虫特異的含硫アミノ酸代謝酵素阻害物質の探索 日本農芸化学会 2012 年度大会 京都 March 22-26, 2012
- 川原史也、鶏コクシジウム症対策の課題、第 25 回日本動物原虫病学会、2011 年 4 月
- 川原史也、魚谷勇介、鈴木敬之、上塚浩司、布谷鉄夫、SPF レイヤー鶏を用いた鶏壊死性腸炎実験モデルの構築、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月
- 川原史也、*Eimeria brunetti* による鶏コクシジウム症の予防法の確立、シンポジウム家畜衛生等技術のこれから～民間の力を生かして、2011 年 12 月
- 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

HIV のインテグラーゼとプロテアーゼの多量体化の ダイナミクス解明とそれらの阻害剤の開発

所属 熊本大学大学院生命科学研究部・血液内科学分野

研究者 満屋 裕明

研究要旨：HIVプロテアーゼ(PR)の酵素活性獲得には2量体形成が必須であり、2量体形成は新規の抗HIV剤開発の標的となる。本研究では2量体化過程の阻止の分子レベルでの解析を進め、タンパクの多分子間相互作用をHIV PRとレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系（fluorescence resonance energy transfer/FRET法）により検討することで、HIV PR2量体形成阻害効果を有する複数の新規化合物をデザイン・合成・同定、臨床応用へと進めつつある。PR同様、HIV増殖に必須の酵素であるHIV インテグラーゼ(IN)の阻害剤が近年臨床導入されたが、INとDNA或はIN阻害剤複合体結晶は得られておらず詳細な結合態様は不明である。INは多量体化して活性を発揮するとされるが、そのダイナミクスも同様に現時点では不明である。本研究ではINとPRの多量体化ダイナミクスを明らかにし新規阻害剤開発へ進める。

外国側研究者

(1) Purdue University Arun K. Ghosh

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）感染によって起こる重度の免疫不全によってもたらされる後天性免疫不全症候群（AIDS）に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤（RTIs）とプロテアーゼ阻害剤（PIs）、また最近ではインテグラーゼ阻害剤などを組み合わせた多剤併用療法（HAART）の導入に負うところが大きい。しかし、HIV-1がRTIsとPIsの両剤に対して耐性を獲得し、またその多くが交差耐性であるため治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生HIV-1株と多剤耐性株の双方に

強力な活性を発揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている。本研究では、HIV-1が耐性を発現しにくく、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規PIsの開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。また、HIVのインテグラーゼ（IN）は、逆転写酵素に媒介されてウイルスRNAから生成された二重鎖プロウイルスDNAを標的細胞のDNAに組み込む役割を果たす、HIVの増殖に必須の酵素である。INは、その多量体化に関連するとされるN端HH-CC zinc fingerドメイン、INの酵素活性ドメイン、C端ドメインの3ドメインから構成されている。酵素活性中心ドメインとC端ドメインはウイルスと細胞のDNAに結合する事が示されているが、INとDNAの複合体の結晶解