

- prevention of transporter degradation. *J Biol Chem* 2010; 285: 16369-16377
4. 最上(西巻)知子 HDL 産生トランスポーター ABCA1 の肝での二重転写制御機構 生化学 82: 852-856 (2010)
 5. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Yokoyama S. Roles of ATP-Binding Cassette Transporter A7 in Cholesterol Homeostasis and Host Defense System. *J Atheroscler. Thromb* (2011) 18: 274-281.
 6. Nonomura K, Arai Y, Mitani H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Insulin Down-Regulates Specific Activity Of ATP-Binding Cassette Transporter A1 For High Density Lipoprotein Biogenesis Through Its Specific Phosphorylation. *Atherosclerosis* (2011) 216: 334-341.
 7. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML., Yokoyama S. HMG-CoA reductase inhibitors enhance phagocytosis by upregulating ATP-binding cassette transporter A7. *Atherosclerosis* (2011) 217: 407-414.
 8. Yokoyama S, Arakawa R, Wu C, Iwamoto N, Lu R, Tsujita M, Abe-Dohmae S. Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* (2012) 1821: 547-551.
 9. Jayaraman S, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Cavigiolio G. Impact of self-association on structure and function of apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* (2011) 286: 35610-35623.
 10. Ito J, Nagayasu Y, Kheirollah A, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. ApoA-I enhances generation of HDL-like lipoproteins through Interaction between ABCA1 and phospholipase C γ in rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* (2011) 1811: 1062-1069.
 11. Iwamoto N, Lu R, Tanaka N, Abe-dohmae S, Yokoyama S. Calmodulin Interacts with ATP Binding Cassette Transporter A1 to Protect from Calpain-Mediated Degradation and Upregulates High Density Lipoprotein Generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2010) 30: 1446-1452.
 12. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML, Yokoyama S. Helical Apo- lipoproteins of High-Density Lipoprotein Enhance Phagocytosis by Stabilizing ATP-Binding Cassette Transporter A7. *J. Lipid Res.* (2010) 51: 2591-2599.
 13. Akita N, Tsujita M, Yokota T, Gonzalez FJ, Ohte N, Kimura G, Yokoyama S. High Density Lipoprotein Turnover is Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Mice. *J. Atheroscler. Thrombosis.* (2010) 17: 1149- -1159
 14. Obama T, Nagaoka S, Akagi K, Kato R, Horiuchi N, Horai Y, Aiuchi T, Arata S, Yamaguchi T, Watanabe M, Itabe H.: Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: Suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway. *PLoS ONE* (2011) 8: e22917.
 15. Nagahama Y, Obama T, Usui M, Kanazawa Y, Iwamoto S, Suzuki K, Miyazaki A, Yamaguchi T, Yamamoto M, Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011) 413: 566-571.
 16. Itabe H, Obama T, Kato R.: The dynamics of oxidized LDL during atherogenesis. *J. Lipids*, ID418313: 1-9.
 17. Takahashi K, Sasabe N, Ohshima K, Kitazato K, Kato R, Masuda Y, Tsurumaki M, Obama T, Okudaira S, Aoki J, Arai H, Yamaguchi T, and Itabe H.: Glucagon regulates intracellular distribution of adipose differentiation-related protein during triacylglycerol accumulation in the liver. *J. Lipid Res.* 2010, 51: 2571-2580.
 18. Iguchi Y, Yamaguchi M, Sato H, Kihira K, Nishimaki-Mogami T, Une M. Bile alcohols function as the ligands of membrane-type bile acid-activated G protein-coupled receptor *J Lipid Res.* 2010; 51:1432-1441
 19. Iguchi Y, Nishimaki-Mogami T, Yamaguchi M, Teraoka F, Kaneko T, Une M. Effects of chemical modification of ursodeoxycholic acid on TGR5 activation. *Biol Pharm Bull.* 2011;34:1-7
- G. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許出願
ヒト ABCA1 遺伝子の転写を調整する作用を有する物質のスクリーニング方法 最上知子、大岡伸通、奥平桂一郎 H22.7.14 出願 (特願 2010-159674)
 2. 実用新案登録 なし

新規ステロール制御の代謝改善による次世代の 動脈硬化予防治療薬の開発に関する基礎的研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
研究者 最上知子

低 HDL 血症は冠動脈疾患の危険を大きく増大するが、HDL を直接上昇する薬は未だ無い。本研究では①HDL 産生トランスポーターABCA1 の転写・タンパクレベルでの新規調節、②HDL と炎症、③HDL を低下する高トリグリセリド血症・高血糖に着目し、ステロール/胆汁酸による制御を明らかにし、「HDL 上昇」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。本年度は、①ヒト肝特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 のコレステロール応答性転写制御を担うプロモーター・エンハンサー領域を同定し、in vivo での肝型 ABCA1 発現制御をラットで解析するとともに、ABCA1 発現を促進する食品成分の探索を行った。またインスリンによる ABCA1 機能低下の機構を明らかにした。②細胞食作用のコレステロール-ABCA7 を介する制御を in vivo で明らかにした。③エネルギー消費受容体 GPCR/TGR-5 を選択的に活性化する胆汁酸類似構造のトリテルペノイドを探索するとともに、胆汁酸コール酸による2型糖尿病マウスでのトリグリセリド低下機序を消化管ホルモンと肝脂肪酸合成に着目して解析した。

研究分担者

- (1) 田辺三菱製薬(株)薬理研究所
塩谷正治、島田浩志、長崎正明
- (2) 興和(株)東京創薬研究所
山崎裕之、浅沼章宗、田辺宗平
- (3) サントリーホールディングス株式会社 諏訪芳秀
- (4) 名古屋市立大学大学院医学研究科
横山信治、堂前純子
- (5) 広島国際大学薬学部 宇根瑞穂
- (6) 昭和大学薬学部 板部洋之

A. 研究目的

冠動脈疾患の1/3ではLDLコレステロールは正常であり、HDLの低下が独立した重大なリスクと認識されている。低HDL血症は日本人の10~20%に認められ、HDLが10mg/dL上昇すれば20-30%のリスク低下が期待されるが、HDLを直接上昇する薬は実用化されていない。本研究では、HDLの形成と機能に着目し、①HDLの大部分を生産する肝の膜トランスポーターABCA1のヒトでの遺伝子転写調節と翻訳後修飾の解明、②炎症性アミロイド蛋白 serum amyloid A (SAA)を含むHDLや関連分子ABCA7の慢性炎症疾患との関わり、③HDLを低下しそのリスクを増幅する高トリグリセリド(TG)血症・高血糖について、ステロー

ル・胆汁酸代謝物による制御を明らかにし、「HDL」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。

[I] 申請者らは、HDLを最も多く産生する肝臓のABCA1(血中の8割を産生)について、肝型プロモーターによる肝独自の発現調節メカニズムをラットにおいて発見した。本研究では引き続きヒトでの解析を進め、ヒト肝特異的なABCA1バリエントL3を見いだし、量的・機能的にHDL産生に大きな役割を持つことをsiRNAノックダウンにより示した。今年度は①その転写制御システムを明らかにするとともに、②ラットモデルでの肝型発現の評価、③ABCA1発現を促進する食品成分の探索、④インスリンによるABCA1機能の制御解明を行う。

[II] 動脈硬化症の発症進展には、血管壁内膜と中膜局所における細胞内脂質沈着、細胞増殖、食作用などの多様な細胞の反応の集積が重要な役割を果たす。HDL産生に伴う細胞コレステロールの変化が炎症反応や細胞の食作用の制御に関わることが明らかになっている。本年度は、炎症性タンパクSAA産生とアミロイドーシスのABCA1による制御、コレステロールによるABCA7を介する食作用の制御について解析する。

[III] HDLは末梢組織からコレステロールを肝に運び、胆汁酸への転換と体外排出を促す。高トリグリセリド血症や高血糖ではHDLが低下するが、胆汁酸や

胆汁酸吸着剤は抗肥満・抗糖尿病作用を示す。①糖尿病モデルマウスでの胆汁酸によるトリグリセリド低下作用を腸管ペプチドと肝の脂肪酸合成系に着目して検証し、②胆汁酸刺激でエネルギー消費を促進する GPCR/TGR5 の高選択的リガンドを探索する。また③コレステロール蓄積と利用の制御を脂肪滴に着目して明らかにする。

本研究により、「ステロールによる制御」の視点から各病態の制御が明らかにされれば、HDL改善を起点にメタボリックシンドロームの重複リスクを低減する治療薬の実現性が高まると期待される。

B. 研究方法

B-1 HDL 産生の促進

①ヒト肝に特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 の転写開始点上流、ならびに哺乳動物間で高度に保存されたイントロン中の領域をルシフェラーゼリポーターベクターに組み込み、ステロールによる発現制御に関わるプロモーター・エンハンサー領域を探索した。②肝型 ABCA1 発現制御を *in vivo* で評価するラットモデルを構築した。③食品成分から RXR/LXR 作動性の ABCA1・ABCG1 発現促進因子をマクロファージ系細胞および齧歯類肝で探索した。④インスリンによる HDL 新生抑制機構を ABCA1 のリン酸化による機能制御に着目して解明した。

B-2 HDL と炎症

炎症性タンパク SAA は ABCA1 により SAA-HDL として血中に放出される。SAA による AA アミロイド蓄積について、ABCA1 の役割を KO マウスを用いて解析した。細胞食作用のコレステロールによる制御について、ABCA7 の役割を KO マウスを用いて解析した。

B-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御

①2型糖尿病モデル KKAy マウスに高脂肪食とコール酸を投与し、血中腸管ホルモンレベルと肝脂肪酸組成への影響を解析した。②胆汁酸の合成・排出を制御する FXR とエネルギー消費を刺激する G 蛋白共役受容体 (GPCR)/TGR5 について、選択性発揮に必要な 4 環性・5 環性トリテルペノイドの構造要因を検討した。③コレステロールの蓄積と利用の制御を、ステロイド産生細胞の脂肪滴に着目して LH ホルモン刺激による変化を解析した。

(倫理面への配慮) 当研究においては、ヒト組織由来の材料は全て連結不可能匿名化された市販品を

使用し、倫理上の問題はないと考える。動物の取り扱いには「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」等、各研究機関の指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づき実験を行った。

C. 研究成果

C-1 HDL 産生の促進

1) ABCA1 のヒト肝での転写制御機構 [最上]

昨年度の研究で、ヒト肝に特異的な ABCA1 mRNA バリエント L3 を同定し、ノックダウンにより量的・機能的な重要性を示すとともに、コレステロール低下で発現が上昇する「肝型」の発現応答を示すことを明らかにした。本年度はその転写制御の解析を進め、エクソン L3 転写開始点上流(-428~+480)に弱いプロモーター活性を見いだした。さらに、イントロン 3 の哺乳動物で高度に保存された領域(+3103~+3378)がエンハンサーとして機能し、ステロール低下で活性化することを発見した。この領域が L3 プロモーターの遠位エンハンサーとしてステロール低下による転写活性化を担うと考えられる。またラットの肝型 ABCA1 は SREBP2 により転写が促進されるが、ヒト肝型 L3 および L2b の発現には SREBP2 の関与は部分的であることを siRNA ノックダウンにより明らかにした。

2) 肝 ABCA1 発現検証 *in vivo* モデル [田辺ほか]

昨年度の研究で、ピタバスタチンは肝型 ABCA1 プロモーターの活性化と ABCA1 タンパク安定化の二つの作用で発現を促進する機序をラット肝由来細胞で明らかにした。今年度は *in vivo* での検討を行い、ピタバスタチン投与によりラット血中 HDL が上昇すること、肝では末梢型 ABCA1 発現が低下するものの SREBP2 活性化により肝型の発現が促進することを示し、*in vitro* での機序を支持する結果を得た。

3) 末梢型 ABCA1 の転写による制御 [諏訪]

末梢細胞の ABCA1 は細胞内のコレステロールを HDL として放出する役割を持ち、コレステロールにより活性化される核内受容体 LXR/RXR による転写促進を受ける。食品酒類に由来する LXR/RXR 作動因子 (ABCA1 および ABCG1 mRNA 発現促進因子) をマクロファージ系細胞 (RAW264 および THP-1) を用いて探索し、アペリジンおよびホルダチン (大麦由来のビール成分)、および キサントフモール類 (ホップ由来) を 2 次評価へ向けて選出した。

4) ABCA1 の機能制御 [横山ほか]

インスリン抵抗性/高インスリン血症は動脈硬化性疾患の危険因子であり、低 HDL 血症を伴う頻度が高い。インスリンによる HDL 産生への影響を調べ、インスリンが 2 つのメカニズムにより apoA-I 依存性 HDL 新生を抑制することを明らかにした。1 つは PI3 キナーゼ活性化が ABCA1 タンパク質分解を促進するため、もう 1 つは ABCA1 がインスリンレセプターによるリン酸化を受け、タンパク質量の変化なしに HDL 放出速度低下を生じるためであった。さらに、ABCA1 上の Y1206 を後者の機序に関与する特異的なリン酸化部位と同定し、これの変異によるインスリンの効果消失も証明した。ラットインスリン抵抗性モデルでも、高インスリン血症は血糖値や体重の影響なしに ABCA1 の比活性を抑制し、HDL の生合成を低下させる事が確認された (Nonomura et al., *Atherosclerosis*. 2011)。

C-2 HDL と炎症 [横山ほか]

1) SAA-HDL 形成とアミロイドーシス

急性期反応物質の一つである serum amyloid A (SAA) は、慢性炎症時に沈着する AA アミロイドの前駆体であるが、動脈硬化性疾患の発症/進展への関与も推測されている。肝で産生される SAA は ABCA1 により HDL 粒子に組み込まれ血中に放出される。ABCA1 KO マウスでは LPS 投与時にも血中 SAA 濃度上昇が無い。本マウスで、SAA-HDL 形成がアミロイドーシス発症にどのように関与するかを調べた。アミロイドーシス誘発処理に伴う肝臓 SAA の産生誘導は WT マウスと KO マウスとで差がなかったが、KO マウスの血漿 SAA 濃度は WT の 1/10 程度であり、HDL ではなく VLDL/LDL に分布していた。脾臓への AA アミロイド沈着は WT マウスと KO マウスのいずれにも認められたが、頻度ならびに沈着量は KO マウスで低かった。

2) ABCA7 による食作用制御とステロール代謝

ABCA1 関連分子 ABCA7 は、細胞ステロールレベルの変動により SREBP2 を介した ABCA1 とは逆方向の発現制御を受ける。SREBP2 活性化をもたらすスタチンが ABCA7 と食作用へ与える効果を調べた。マクロファージの ABCA7 発現と食作用活性はともにスタチンにより増強されるが、食作用の対象物をポリスチレンビーズのみならず大腸菌、黄色ブドウ球菌、アポトーシス細胞等に拡げても同様の結果を得た。マウス個体へのスタチン投与により、腹腔マクロファージの ABCA7 タンパク質発現と in vivo での食作用活性はと

もに上昇した。一方、ABCA7 ノックアウトマウスではスタチン投与による食作用活性化はなかった。(Tanaka et al., *J Atheroscler. Thromb.* 2011; Tanaka et al., *Atherosclerosis* 2011)

C-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御

1) 胆汁酸による糖・脂質代謝調節 [塩谷ほか]

胆汁酸は核内転写因子の FXR や細胞表面の GPCR である TGR5 を介して血糖やエネルギー代謝の改善作用を示すことが報告されている。昨年度の研究で、2 型糖尿病モデルの KKAy マウスにコール酸を混餌投与すると、血中トリグリセリド、遊離脂肪酸値が顕著に低下した。その機序を明らかにするために、血中消化管ホルモンを測定したが、GLP-1 濃度に増加傾向を認めたが有意な差ではなく、血中 CCK, PYY に対してはほとんど影響を与えなかった。肝臓におけるトリグリセリドや脂肪酸の合成系への何らかの影響が考えられることから、肝臓中の脂肪酸組成を LC/MS で測定したところ、コール酸投与は脂肪酸側鎖延長指数(C18/C16)とデサチュレーション指数(C18:1+C16:1/C18+C16)をともに、高脂肪食群に対して有意に増加させていた。

2) 胆汁酸を基本骨格とする TGR5 リガンドの探索と創製 [宇根]

エネルギー消費を促進する GPCR/TGR5 は胆汁酸により活性化される。TGR5 高選択的リガンドの創製を目的に、胆汁酸に構造の類似する植物ステロール及びトリテルペノイドの TGR5 及び胆汁酸をリガンドとする核内受容体 FXR に対する影響を検討した。Maslinic acid, Hederagenin, Echinocystic acid に比較的高い TGR5 活性化能が認められたが、内因性リガンドの一つであるリコール酸に匹敵する活性を有する化合物を見出すことはできなかった。また、本研究で検討したトリテルペノイドは FXR アゴニスト活性を示さなかった。さらに、植物ステロールの一つであるググルステロンが FXR アンタゴニストであることが報告されているため、これら化合物が FXR アンタゴニスト活性を有するか検討を行った。本検討において、18 種の化合物が FXR アンタゴニスト活性を示した。その内訳は、corosolic acid や maslinic acid などの 5 環性トリテルペノイド 6 種と 25-O-Ac-dihydroxycucurbitacin F や Betulaforienediolone をはじめ、全ての 4 環性トリテルペノイドであった。これらのうち、ルシフェラーゼアッセイによってググルステロンと同程度の IC50 を示した化合物 7 種の FXR 支配

下遺伝子への影響について検討した。Maslinic acid 及び 25-O-Ac-dihydroxycucurbitacin F はケノデオキシコール酸によって増加した BSEP、及び SHP の発現を減少させた。

3) コレステロール貯蔵と利用の制御機構 [板部]

コレステロール蓄積が動脈硬化病変をもたらす機序解明の一環として、コレステロールの貯蔵と利用の代謝制御のモデルとなる脂肪滴に着目し、ステロイドホルモン産生細胞(マウス Leydig 細胞株 MLTC-1)での性状解析を行った。MLTC-1 細胞の脂肪滴画分構成タンパク質には、肝やマクロファージとは異なり、39kDa、28kDa 付近に強いバンドが認められた。LC-MS/MS 解析によりそれぞれ 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase / $\delta 5 \rightarrow 4$ -isomerase type1 (3 β -HSD)、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 11 (17 β -HSD)と同定された。Perilipin 1、Perilipin 2 など、よく知られている脂肪滴タンパク質に加え、ステロイド代謝に関わる酵素が多数見出された。3 β -HSD、17 β -HSD は、脂肪滴画分と膜画分に存在することが確かめられた。MLTC-1 細胞は、黄体形成ホルモン LH で刺激すると、cAMP を介して細胞が活性化し、主にプレグネノロンを産生する。LH 刺激により、3 β -HSD、17 β -HSD は ER 画分への分布がやや増加し、Perilipin2 は一部脂肪滴画分に移行した。LH で刺激した MLTC-1 細胞をレーザー共焦点顕微鏡で観察したところ、脂肪滴が断片化し、小型化した脂肪滴は細胞質全体に分散した。未刺激の細胞では、Perilipin1 がリング状になっている脂肪滴は小胞体とは独立したところに存在したが、LH 刺激により calnexin と Perilipin1 が共局在し、少なくとも脂肪滴の一部は小胞体と相互作用していることが示唆された。

D. 考察

D-1 HDL 産生の促進

1) ABCA1 の転写制御機構 [最上・田辺ほか・諏訪]

肝は HDL 産生に中心的な位置にあり、アポ A-I と HDL 前駆体を形成し、末梢組織からコレステロールを搬出するために供給する役割が示唆されている。肝の ABCA1 は血中 HDL の8割を産生する最重要の役割を持つ。主任研究者は肝独自の二重転写制御システムをラットで発見しており、昨年度はヒト独自の肝型 ABCA1 mRNA バリエント L3 型を見いだした。L3 型はヒト肝の総 ABCA1 mRNA の約 1/4、ヒト肝由来 JHH-5 細胞では約 1/2 を占める重要なバリエントであり、機能的 ABCA1 をコードしていることを siRNA ノッ

クダウンにより示した。L3 型は L2b とともにコレステロール低下により発現が上昇する「肝型」の発現応答を示す。本年度は、L3 型のプロモーター領域、ならびにイントロン 3 中の種を超えて保存されている領域よりエンハンサー領域を同定し、この二つの領域が共同してコレステロール応答を担うことを明らかにした。ラット・マウスの肝型はコレステロール低下に応じて SREBP2 が活性化し転写を促進するが、ヒト肝型 mRNA の発現や L3 プロモーター・エンハンサー活性には SREBP2 のノックダウンの影響は部分的であった。したがって、コレステロール応答の機序解明にはさらなる検討が必要とされる。L3 型プロモーター・エンハンサー配列を利用したアッセイを行えば、強力でヒトに有効な HDL 上昇薬創製に大きく貢献することが期待される。

また本年度は Statin の in vivo での HDL 上昇をコレステラミンとの併用により検証するラットモデルを構築した。ピタバスタチンは HDL 上昇作用を示し、昨年度 in vitro で明らかにした機序「SREBP2 の活性化により ABCA1 発現を増加する」を支持する結果が得られた。本モデルでの解析は、臨床における Statin の HDL 上昇作用機序の解明に有用と考えられる

また主に日常飲食品に含まれる成分について、LXR-RXR 作動による ABCA1 および ABCG1 活性化を介した血漿 HDL 上昇因子を探索した。マクロファージやげっ歯類肝の ABCA1 や ABCG1 への影響は総じて緩和であったが、こうした成分は飲食品を通して日常的に摂取され、それらの類縁体を含めた摂取量は少なくはないものと見られる。

末梢組織と肝の ABCA1 はそれぞれ、細胞コレステロールを HDL として放出、コレステロール引き抜き能の高い HDL 前駆体 (pre β HDL) を形成する異なる役割を持つことが提唱されている。末梢型・肝型それぞれの ABCA1 発現を増強する方法が確立できれば、血管壁でのコレステロール蓄積を防ぎ、動脈硬化を抑制する効率の良い治療創製に貢献することが期待される。

2) ABCA1 の機能の制御 [横山ほか]

本年度の研究により、インスリンが ABCA1 の機能を低下させることにより HDL 新生を抑制する機序が明らかになった。これは、インスリン抵抗性/高インスリン血症の病態で低 HDL 血症の生じるメカニズムと考えられる。

D-2 HDL と炎症 [横山ほか]

本研究により、AA アミロイド沈着は SAA-HDL 産生や血中 SAA 濃度の上昇がなくても生じるが、ABCA1 を介した SAA-HDL 形成は SAA の血中濃度維持に必須であり、これがアミロイド沈着量を決定する重要な因子となっていることが示された。一方 ABCA7 は in vitro でも in vivo でも細胞の食作用を正に制御し、スタチン投与は ABCA7 発現増加を通じてこれを増強することが示された。

D-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御 1) 胆汁酸による糖・脂質代謝調節 [塩谷ほか]

HDL を低下しそのリスクを増幅する高トリグリセリド血症・高血糖について、胆汁酸による制御を検討した。胆汁酸は小腸の TGR5 を介して血中グルコース濃度の低下に関わる消化管ホルモン GLP-1 の分泌を促進し、また消化に関わる CCK の分泌を抑制することが報告されている。今回、コール酸投与により GLP-1 の増加傾向が認められたが、CCK や節食抑制ホルモン PYY は影響されなかった。混餌投与で随時の採血を行ったため、明確な作用が見られなかったことも考えられるが、コール酸の血中 TG や脂肪酸の低下作用に対しては、消化管ホルモン以外の作用である可能性が考えられた。胆汁酸は FXR の活性化により脂肪酸や TG の合成系遺伝子の発現抑制作用を示すことが報告されている。また、近年脂肪酸の側鎖延長を行う ELOVL6 や脂肪酸に二重結合を導入する SCD-1 が、脂質や血糖に影響を及ぼすことが報告されている。そこで今回は、コール酸投与が肝臓で、脂肪酸側鎖延長や二重結合といった脂肪酸組成変化に与える影響を検討した。コール酸は側鎖延長指数、二重結合指数(デサチュレーション指数)の両パラメーターを高脂肪食コントロール群に比べ増加させていることが示された。今回の結果は、肝臓全体から抽出した脂肪酸の測定結果であり、直接これらの酵素反応に影響を与えているかどうかは、この結果のみからは不明であるが、コール酸は、脂肪酸の合成や、側鎖の延長や二重結合の導入に作用して、血中のパラメーター改善に繋がることを示唆された。

2) 胆汁酸を基本骨格とする TGR5 リガンドの探索と創製 [宇根]

TGR5 は抗糖尿病性ホルモン分泌を促進し、FXR は脂肪酸合成を抑制する。いずれに対してもリガンド活性を有する 5 環性トリテルペノイド、及び FXR アンタゴニスト活性を示す 4 環性トリテルペノイドを見いだした。しかし、トリテルペノイドの構造と FXR に対するリ

ガンド活性に相関性は確認されなかった。FXR のリガンド結合ドメイン(LBD)は 6 α -ethyl-CDCA との X 線結晶構造解析で示されている。FXR アンタゴニストのググルステロンのモデリング研究から他の LBD の存在が示唆されており、これらトリテルペノイドは他の LBD へ結合することによりアンタゴニスト活性を示したことも考えられる。

3) コレステロール貯蔵と利用の制御機構 [板部]

細胞内脂肪滴は種々の細胞に普遍的に存在するオルガネラである。コレステロール蓄積と利用の制御機構を解析するために、ステロイドホルモン産生細胞である MLTC-1 の脂肪滴をモデルに解析を行った。MLTC-1 の脂肪滴にはステロイド産生酵素群が存在しており、LH 刺激により、3 β -HSD、17 β -HSD は ER 画分への分布が増加し、脂肪滴が小型化して細胞質全体に広がり、脂肪滴は小胞体と相互作用していた。LH 刺激を受けた細胞では A キナーゼにより Perilipin1 のリン酸化が起こり、小型化した脂肪滴が小胞体の近傍に分散した。コレステリルエステルの加水分解で生じたコレステロールを速やかに輸送し代謝しているのではないかと考えられる。

E. 結論

1. 抗動脈硬化性リポタンパク HDL の大部分を生産する肝 ABCA1 について、肝特異的 L3 型 mRNA バリアントのコレステロール応答を担うプロモーター・エンハンサー領域を同定した。
2. Statin による HDL 増加作用と機序を検証するモデル動物を構築した。
2. ABCA1 (末梢型)・ABCG1 を誘導する食品成分を探索し、2次評価へ向けて3種の候補成分を選出した。
3. インスリンの新しい作用として、ABCA1 の分解促進と HDL 新生能の比活性低下が示された。
4. 血中 SAA 濃度の持続高値を可能にする ABCA1 による SAA-HDL 形成は、アミロイド沈着量を決定する重要な因子であることが示された。細胞のステロール変化に伴い、ABCA7 を介した食作用活性が変わることが in vitro と in vivo の両方で明らかとなった。
5. 胆汁酸コール酸は 2 型糖尿病モデル KKAy マウスで強力に血中 TG を低下する。コール酸投与は消化管ホルモンの GLP-1, PYY, CCK には影響せず、肝臓脂肪酸組成が変化することから、脂肪酸合成系への作用が考えられた。

6. エネルギー消費受容体 TGR5、ならびに FXR に対しリガンド活性を持つ 5 環性・4 環性トリテルペノイドを見いだした。

7. コレステロールの蓄積と利用の制御をステロイド産生細胞の脂肪滴をモデルに解析し、LH 刺激により Perilipin1 のリン酸化を経て脂肪滴の小型化と小胞体近傍への分散が起こることを観察した。

F. 健康危険情報
該当無し

G. 研究発表
論文発表

1. Maejima T, Sugano T, Yamazaki H, Yoshinaka Y, Doi T, Tanabe S, Nishimaki-Mogami T. Pitavastatin Increases ABCA1 Expression by Dual Mechanisms: SREBP2-Driven Transcriptional Activation and PPAR α -Dependent Protein Stabilization but Without Activating LXR in Rat Hepatoma McARH7777 Cells. *J Pharmacol Sci.* (2011) 116: 107-115
2. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Yokoyama S. Roles of ATP-Binding Cassette Transporter A7 in Cholesterol Homeostasis and Host Defense System. *J Atheroscler. Thromb* (2011) 18: 274-281.
3. Iwamoto N & Yokoyama S. Protein kinase D regulates the adiponectin gene expression through phosphorylation of AP-2; a common pathway to the ABCA1 gene regulation. *Atherosclerosis* (2011) 216: 90-96.
4. Nonomura K, Arai Y, Mitani H, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Insulin Down-Regulates Specific Activity Of ATP-Binding Cassette Transporter A1 For High Density Lipoprotein Biogenesis Through Its Specific Phosphorylation. *Atherosclerosis* (2011) 216: 334-341.
5. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML., Yokoyama S. HMG-CoA reductase inhibitors enhance phagocytosis by upregulating ATP-binding cassette transporter A7. *Atherosclerosis* (2011) 217: 407-414.
6. Yokoyama S, Arakawa R, Wu C, Iwamoto N, Lu R, Tsujita M, Abe-Dohmae S. Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* (2012) 1821: 547-551.
7. Jayaraman S, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Cavigiolio G. Impact of self-association on structure and function of apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* (2011) 286: 35610-35623.
8. Ito J, Nagayasu Y, Kheirollah A, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. ApoA-I enhances generation of HDL-like lipoproteins through Interaction between ABCA1 and phospholipase C γ in rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* (2011) 1811: 1062-1069.
9. Shibata T, Shimozu Y, Wakita C, Shibata N, Kobayashi M, Machida S, Kato R, Itabe H, Zhu X, Sayre LM, Uchida K.: Lipid peroxidation modification of protein generates N ϵ -(4-oxononanoyl)lysine as a pro-inflammatory ligand. *J. Biol. Chem.* (2011) 286: 19943-19957
10. Obama T, Nagaoka S, Akagi K, Kato R, Horiuchi N, Horai Y, Aiuchi T, Arata S, Yamaguchi T, Watanabe M, Itabe H.: Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: Suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway. *PLoS ONE* (2011) 8: e22917.
11. Nagahama Y, Obama T, Usui M, Kanazawa Y, Iwamoto S, Suzuki K, Miyazaki A, Yamaguchi T, Yamamoto M, Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011) 413: 566-571.
12. Itabe H, Obama T, Kato R.: The dynamics of oxidized LDL during atherogenesis. *J. Lipids*, ID418313: 1-9.

学会発表

研究会 2010年5月 東京

1. 最上(西巻)知子: HDL 産生トランスポーター ABCA1 のヒト肝での二重転写制御機構: シンポジウム"HDL 分子研究の発展とその臨床応用" 第84回日本生化学会大会(2011.9)(京都)
 2. 最上(西巻)知子: HDL 産生トランスポーター ABCA1 のコレステロールによる肝型転写制御 - 第12回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (2011.6)
 3. Kuniko Okumura-Noji, Toshihiko Usami, Giorgio Cavigiolio, Rong Huang, W Sean Davidson, Shinji Yokoyama, Maki Tsujita. Characterization of ion-exchange column fractionated human and mouse apoA-I subfractions. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011 Scientific Sessions, April 9, 2011 (Chicago)
 4. Shinji Yokoyama. Cellular Factors to Regulate Cholesterol Content in HDL. HDL Workshop for AHA-ATVB Meeting. April 30, 2011 (Chicago)
 5. Shinji Yokoyama. Targeting ABCA1 for Raising HDL. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 16, 2012 (Fukuoka)
 6. Shinji Yokoyama. Post Translational Regulation of ABCA1 Activity. International Symposium on Atherosclerosis (ISA) 2012. March 27, 2012 (Sydney)
 7. 山口智広: 脂肪滴局在タンパク質 RELIPIN ファミリーによる脂質代謝制御 日本薬学会第131年会 2011年3月 静岡
 8. Hiroyuki Itabe, Kumiko Ohshima, Rina Kato, Keiko Kitazato, Katsuhiko Takahashi, Takashi Obama, Tomohiro Yamaguchi: Glucagon regulates intracellular redistribution of ADRP between ER and lipid droplets in the liver. Keystone Symposium "Lipid Biology and Lipotoxicity" 2011, May, Killarney, Ireland
 9. 加藤里奈: 低侵襲的な酸化 LDL 測定: 歯肉溝侵出液の利用 第3回コレステロールダイナミクス研究会 2010年5月 東京
 10. 板部洋之: 心血管系疾患の発症・進展と酸化 LDL 第12回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2011年6月 富山
- H. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許出願 なし
 2. 実用新案登録 なし

システムアプローチの構築による創薬ターゲットの 同定と医療への応用

所属 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
システム発生・再生医学研究部
研究者 高田 修治

研究要旨

変形性関節症の病態に関わる *IL-6* の mRNA の安定化に関わる因子を網羅的に探索し、新規の標的遺伝子候補を見出した。また、OA の病態に関わる miRNA である miR-140 の発現制御に関わる領域を同定した。

研究分担者

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 システム発生・再生医学研究部 浅原弘嗣
- (2) 慶應義塾大学医学部 分子生物学 塩見春彦
- (3) 日本臓器製薬株式会社生物活性科学研究所薬理研究部 内木充
- (4) 参天製薬株式会社リウマチ研究開発センター 青野浩之

A.研究目的

世界的に高齢化社会を迎えることから、今後さらに老年者が増加する中で、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA)、リウマチ疾患 (Rheumatoid arthritis: RA) の発生率は増加が継続と推定される。OA や RA による関節の破壊は、患者に局所の苦痛に加え運動に制限が加わるため、はかりしれない苦痛を与える。近年、OA や RA に対する新規治療法や診断法の発見には注力され、革新的かつ効力の高い治療薬の開発が待たれている。生物学的製剤の登場はこれらの疾患治療にパラダイムシフトをもたらし、道を拓いたが、副作用の問題等、未だ解決すべき点が多い。移植、再生を含む根本的治療の開発が待たれているが、骨・軟骨の発生、分化を制御する分子メカニズムなど依然解決されていない部分が数多く残されている。

関節炎治療市場は 2010 年には 210 億ドルの規模になると予測され、新薬の開発は、製薬企業にとっては医療への高い貢献だけでなく、またとない市場機会が与えられていると言える。しかし、創薬において、従来の手法では、すでにほとんどの探索 (スクリーニング) が終わっており、新規の創薬ターゲットを見出すには、これまでにない新規のスクリーニング法により探索する必要が

ある。

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、システム発生・再生医学研究部が運用しているハイスループット遺伝子導入スクリーニングは、疾患遺伝子の発現に関与する因子を、網羅的かつ効率的に探索することができるシステムの一つであり、既存の方法ではできない新しい側面での創薬ターゲットを高効率で見出すことのできるシステムである。集積されたデータの解析・利用により、創薬をはじめ、あらゆる分野で極めて重要なデータが得られることが期待できる。また、このアッセイ系は、遺伝子導入する cDNA の代わりに、低分子化合物を用いたスクリーニングにも利用でき、より創薬に向けた研究開発、さらには、新しいポストゲノムの複合的機能的遺伝子スクリーニングとして、他の疾患治療研究のモデルとなることが期待される。

そこで、幹細胞制御因子や炎症性インターロイキンなどの標的遺伝子の発現を制御しているほぼ全ての遺伝子について、網羅的なポストゲノムアプローチを相乗的、相補的に複合させた疾患遺伝子スクリーニングを行い、同定することを目的とする。

B.研究方法

(1) *IL-6* の mRNA 安定化に関わる因子のスクリーニング

Mammalian Gene Collection (MGC) より入手した約 6 千種類のヒト遺伝子の全長 cDNA が哺乳類細胞で発現するようなベクターに入っているプラスミドのライブラリ (MGC ライブラリ) と、*IL-6* の mRNA 安定化に関わる AU-rich element (ARE) を含む 3' 非翻訳領域 (UTR: Untranslated region) の

下流にレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。

i) ハイスループット遺伝子導入アッセイ、アッセイ・プレートの作製

MGC ライブラリはそれぞれのプラスミドが大腸菌に導入された状態で、96 ウェルプレート上で -80°C の超低温冷凍庫で保存している。その一部を別の 96 ウェルプレート上の液体培地に移し、培養・増殖させた後、遠心してペレット状にし、96 ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップでプラスミドを精製した。それぞれのプラスミド濃度をプレート・リーダーで測定後、濃度調整装置により 50ng/well となるように希釈し、自動分注機を用いて 384 ウェルプレートにライブラリを高密度に配置したアッセイ・プレートを作製した。作製したアッセイ・プレートは密閉後、 -20°C で凍結保存し、使用日に室温で融解した後に使用した。

ii) ハイスループット遺伝子導入アッセイ

作製したアッセイ・プレートにレポーター・プラスミド、遺伝子導入試薬及び細胞を自動分注機で加えることで遺伝子導入（リバース・トランスフェクション）し、一定時間培養した後、Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した（図 1）。384 ウェルプレート 1 枚では全てのプラスミドの遺伝子導入は物理的に不可能であり、多数の 384 ウェルプレートを使用することになった。このことにより、アッセイ条件が各プレートで若干異なることになり、プレート間でバックグラウンドの数値が変動する可能性が考えられた。そのため、それぞれの 384 ウェルプレートに MGC ライブラリのプラスミドを配置させていないウェルを用意し、そのウェルをコントロールとすることにより、各プレートで数値を補正する作業を加えて、より確実に正確なデータ解析を行った。

(2) OA 関連 miRNA、miR-140 の発現制御領域の探索

軟骨特異的に発現し、OA の病態に関わる miRNA である miR-140 について、発現制御領域を探索した。

i) トランスジェニックマウス解析

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒト由来細胞および実験動

物を用いた研究が予定されている。ヒトクローン胚、ヒト ES 細胞などは使用せず、患者サンプルのヒト遺伝子解析は行わない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究はこれを行わない。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査し、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。また、国立成育医療センターの動物実験委員会の承認を得ている。遺伝子組み換え実験については、当センターの規約に則り、申請者は「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、平成 16 年 2 月 19 日より施行）を遵守して行うことを誓約し、許可を得ている。

今後も必要な場面では、独立行政法人国立成育医療研究センターにおいて機関の外部委員を含めた倫理審査委員会により生命倫理、安全管理を厳重に審査し、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。また、マウス等の動物実験は国立成育医療センターの動物実験委員会の承認を得て遂行する。

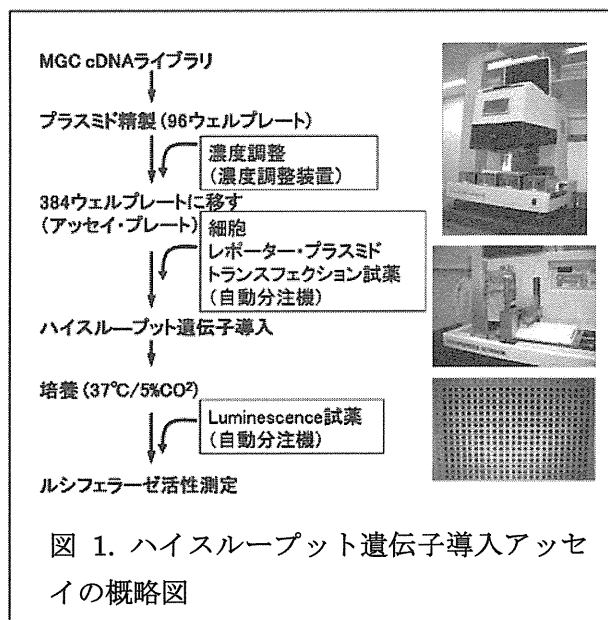


図 1. ハイスループット遺伝子導入アッセイの概略図

C. 研究結果

(1) *IL-6* の mRNA 安定化に関わる因子のスクリーニング

MGC ライブラリ由来の約 6 千種類の遺伝子の発現プラスミドを 384 ウェルプレートに高密度に配置したアッセイ・プレートをを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、3'非翻訳領域 (UTR) に Adenylate/Uridylate (AU) -rich element(ARE)と呼ばれる転写後、mRNA の安定化

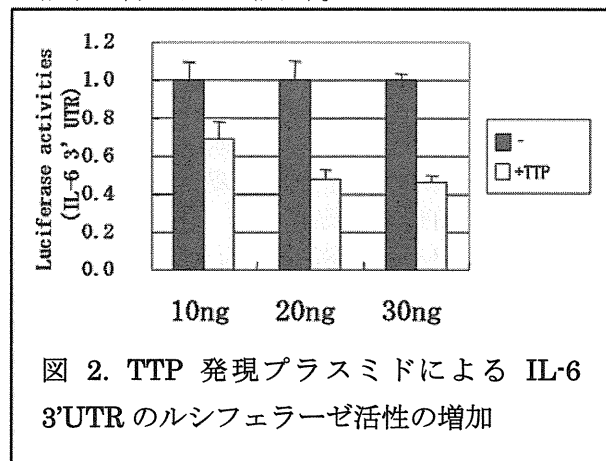
に重要な領域をもつ IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現制御に関わる因子をゲノムワイドに探索した。

このスクリーニングにはすでに発表されている IL-6 の mRNA の安定化に関わる ARE を含む IL-6 の 3'UTR (Neininger A., et al., J Biol Chem. 2002) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドを作製して、使用することにした。

まず、この IL-6 3'UTR レポーター・プラスミドとこのレポーター活性を低下させることが明らかとなっているトリステトラプロリン

(tristetraprolin: TTP) (Zhao W., et al., J Interferon Cytokine Res. 2011) の発現プラスミドを用いて 384 穴プレートで、細胞数、各プラスミド量、遺伝子導入試薬の濃度、インキュベーション時間などのアッセイ条件を検討した。

細胞は遺伝子導入効率がよい 293T 細胞を用いることにした。この細胞で条件検討を行ったところ、細胞数が 5000、IL-6 3'UTR レポーター・プラスミドが 30ng、遺伝子導入試薬である FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) は 0.2 μ l で遺伝子導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定したとき、TTP の発現プラスミドの有無で 0.4 倍のルシフェラーゼ活性の低下が見られ、数値も良好な結果が得られた (図 2)。



これらの条件検討より、本研究においては 5000 個の 293T 細胞を用いて遺伝子導入試薬 FuGENE® HD Transfection Reagent は 0.2 μ l、レポーター・プラスミドは 30ng、MGC ライブラリのプラスミド 50ng を加えて 48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定することにした (図 3)。

上記の条件で、MGC ライブラリを 384 穴プレートへ配列させたアッセイ・プレートに各種プラスミドと遺伝子導入試薬を混ぜたものを自動分

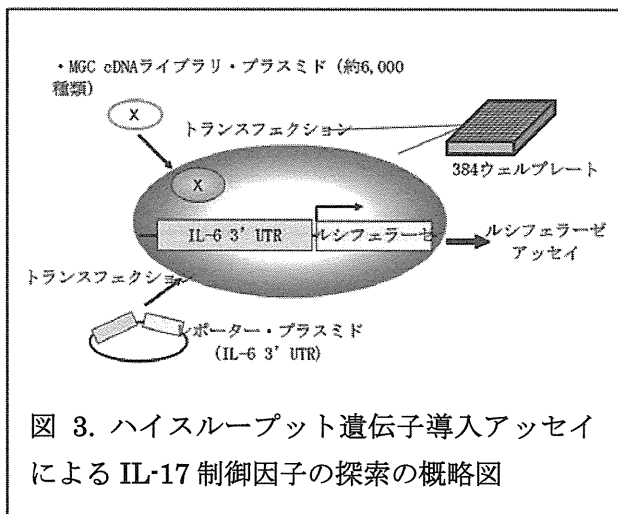


図 3. ハイスループット遺伝子導入アッセイによる IL-17 制御因子の探索の概略図

注機で分注し、さらに 293T 細胞を分注してハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。このスクリーニングは 2 度繰り返しの実験を行い、解析データとした。解析の結果、ルシフェラーゼ活性を 0.7 倍以上低下させた因子を制御因子候補として同定した。

(2) OA 関連 miRNA、miR-140 の発現制御領域の探索

軟骨特異的に発現し、OA 患者の関節軟骨で発現が減少することが報告されている miRNA である miR-140 (Miyaki S., et al., Arthritis Rheum. 2009; Miyaki S., et al., Genes Dev. 2010) の発現制御領域を同定するため、*in vitro* および、*in vivo* の解析を行った。

まず、miR-140 の primary transcript の上流 3kb の DNA 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドを作製し、軟骨の分化に重要な転写因子である Sox9 によりルシフェラーゼ活性が増加するか調べたところ、プラスミドの容量依存的にルシフェラーゼ活性が増加することが観察された。

このレポーター・プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子を LacZ に変更したレポーター・プラスミドを作製し、トランスジェニックマウスを作製し、X-gal 染色により LacZ の発現組織を調べたところ、胎生期 12.5 および 15.5 日のマウスで軟骨組織特異的に LacZ が発現していることが確認された (図 4)。

次に、Sox9 と協調して軟骨分化に関わることが報告されている L-Sox5 と Sox6 が miR-140 の発現制御に関わるかどうかについて、ルシフェラーゼ・アッセイにより調べたところ、L-Sox5/Sox6 の共発現によりルシフェラーゼ活性が顕著に増強された (図 5)。また、どの領域がこれら Sox による発現制御に重要か、3~0.3k のいくつかの領域のレポーター・プラスミドを作製して検討した

ところ、1~0.8kb の領域で顕著にルシフェラーゼ活性が減少し、0.7~0.6kb の領域でほとんど活性がなくなった (図 5)。この 0.7kb についても同様にトランスジェニックマウスで解析を行ったところ、3kb と同様に軟骨特異的な LacZ の発現が観察できた。

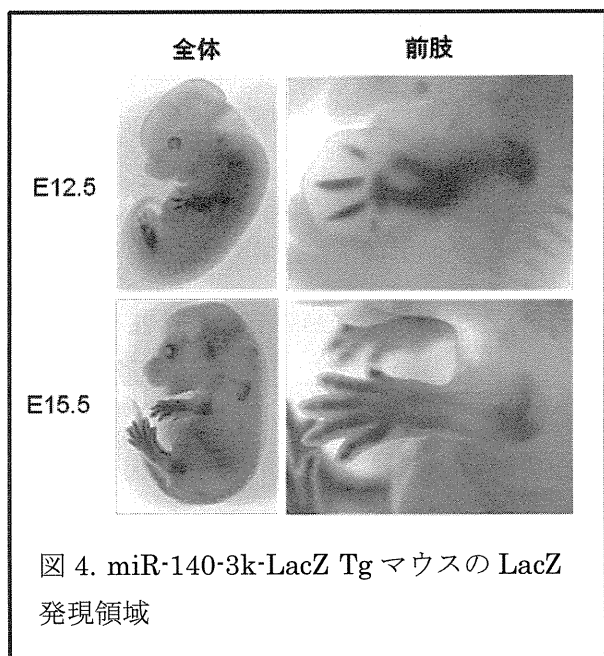


図 4. miR-140-3k-LacZ Tg マウスの LacZ 発現領域

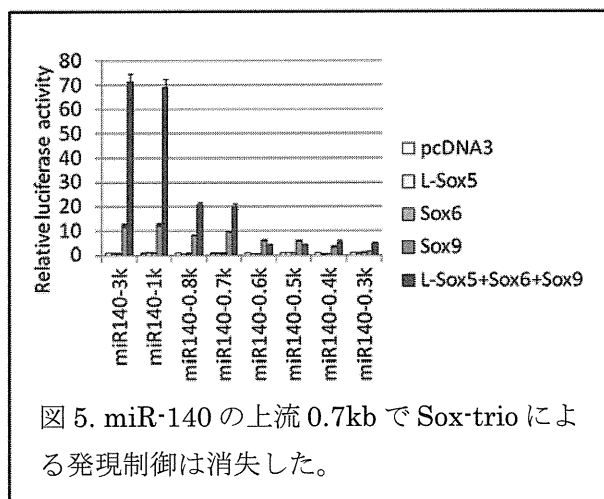


図 5. miR-140 の上流 0.7kb で Sox-trio による発現制御は消失した。

さらに、0.7~0.6kb の中で Sox9 の結合配列を見出し、この配列と同様のオリゴプローブおよび Sox9 結合モチーフに変異を加えたプローブを作製して、EMSA、0.7~0.6kb の領域を繋いだレポーター・プラスミドと同様に Sox9 の結合領域に変異を加えたレポーター・プラスミドを作製してルシフェラーゼ・アッセイを行い、詳細な Sox9 の結合領域を同定した。E12.5 のマウスの四肢をサンプルとしてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、Sox5、Sox6、Sox9 がこの領域に *in vivo* で結

合していることを確認した。

D. 考察

(1) IL-6 の mRNA 安定化に関わる因子のスクリーニング

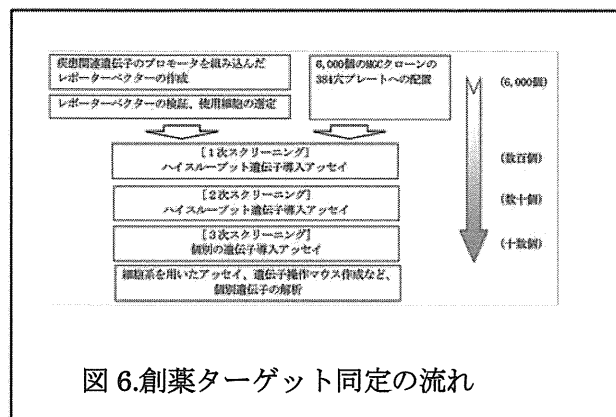
これまで、遺伝子発現は転写因子等による転写調節を中心に解析されてきているが、近年、転写後に発現が調節されることの重要性が明らかになってきている。転写後調節とは転写後の mRNA の安定化、スプライシングの制御、翻訳の調節等、遺伝子が遺伝子産物 (タンパク質) の形成に至るまでに受ける調節のことであり、これらの制御により、実際に機能するタンパク質の合成量が調整されている。

ARE は多くの mRNA の 3'UTR に存在し、mRNA の安定化に関わることが報告されている (Chen CY., et al., Trends Biochem Sci. 1995)。この領域に様々な RNA 結合タンパク質が結合することで、mRNA を安定化あるいはその逆に不安定化 (分解) へと導くことになる。炎症反応においては、重要な炎症性サイトカインである TNF- α と IL-6 の 3'UTR に存在する ARE が、それらの mRNA の安定化に関わることが示されており (Neininger A., et al., J Biol Chem. 2002)、IL-6 の ARE に TTP が結合し、mRNA を不安定化することが報告されている (Zhao W., et al., J Interferon Cytokine Res. 2011)。しかしながらこれらのサイトカインの mRNA の安定化・不安定化に関わる因子とその制御メカニズムはそのほとんどが未解明のままである。これらの炎症性サイトカインの発現は変形性関節症やリウマチ疾患を含む様々な炎症性疾患の病態に関わることから、これらの mRNA の安定化・不安定化に関わる新たな因子が解明されれば病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定に極めて有用である。

本研究では IL-6 の ARE を含む 3'UTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドと約 6000 種類の発現プラスミドを使用してハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-6 の mRNA の安定化に関わる因子を探索し、新規の IL-6 の発現制御因子候補を複数見出した。今後、2 次スクリーニング、3 次スクリーニングと更なるルシフェラーゼ・アッセイを行い、再現性を確認し、IL-6 の発現制御因子を同定する。その後、培養細胞を用いた検討により IL-6 の発現に重要であるか等について検討し、変形性関節症の病態に関わるか、またどのように関わるか調べる (図 6)。

これらの解析により未だ不明点の多い変形性

関節症の病態メカニズムを明らかにすることを試みる。また、解析の上で病態に密接に関係することが確認できた因子については創薬ターゲットとし、化合物スクリーニングや、疾患モデルマウスを使用した治療効果を検討することにより、新規治療法や診断法の開発を試みる。



(2) OA 関連 miRNA、miR-140 の発現制御領域の探索

本研究では、軟骨分化に重要な転写因子である Sox9 が軟骨で特異的に発現する miRNA である miR-140 の発現制御に関わるのではないかとという仮説を立て、研究を開始した。いくつかの検討により、miR-140 の primary transcript の上流 3kb の領域に Sox9 反応性の領域が存在し、トランスジェニックマウスによる解析により、この 3kb の領域に軟骨組織特異的な miR-140 の発現制御に関わる領域が存在することを明らかにした。これまで、miR-140 は軟骨細胞特異的に発現し、OA 患者の関節軟骨で発現が減少することが報告されており (Miyaki S., et al., Arthritis Rheum. 2009)、ノックアウトマウスによる詳細な解析により、OA の病態に関わる因子であることが明らかとなっている (Miyaki S., et al., Genes Dev. 2010)。しかしながらその発現制御機構はほとんどのことが不明であった。最近、miR-140 が Sox9 により発現制御されることを示唆する報告がなされたが (Yang J., et al., FEBS lett. 2011)、細胞を用いた *in vitro* での解析結果のみであり、本研究で初めて *in vivo* で miR-140 の軟骨特異的な発現制御領域を明らかにし、さらに L-Sox5 と Sox6 が miR-140 の発現制御に関わることを明らかにした。

本研究で見出した miR-140 の上流 3kb および、その中に含まれる Sox9 の結合領域は、ヒトとマウスで非常に保存されていることが確認できている。このことは、miR-140 の上流 3kb がヒトにおいても miR-140 の軟骨特異的な発現制御に関わ

り、Sox9 による制御も同じ領域であることが示唆される。今後は、ヒトの miR-140 の上流の DNA 配列をクローニングしてレポーター・プラスミドを作製して使用し、ヒトでも Sox9、L-Sox5、Sox6 により発現制御を受けているかについて検討し、本研究課題で使用しているハイスループット遺伝子導入アッセイのシステムを利用して、miR-140 の発現制御に関わる全遺伝子の探索、あるいは化合物ライブラリを使用することにより、miR-140 の発現を制御する化合物を探索することを計画する。miR-140 は OA の病態に関わることが報告されていることから、これらの検討により miR-140 の発現制御機構および、発現を制御する化合物を明らかにし、OA に対する新規創薬ターゲットおよび化合物を同定することを目標とする。

本研究で利用したハイスループット遺伝子導入アッセイは、これまでの既存の手法では困難な創薬ターゲットの選定を効率的かつスピーディーに決定することができる。このシステムは、今後の継続的かつ様々な運営/活用により、多くの疾患メカニズムの解明につながることを期待できると考えられる。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA 遺伝子導入による機能的スクリーニングのシステムを用いて、IL-6 の発現制御に関わる因子をスクリーニングした。自動分注装置などを使用したこのシステムにより、短時間で効率よく、網羅的な情報が得られるスクリーニングが行えた。これらの因子は IL-6 の発現制御を介して変形性関節症 (OA) やリウマチ疾患 (RA) 等の炎症性疾患の病態に関わる可能性がある。これらの候補因子は、更なる解析を行い、炎症性疾患の創薬ターゲットを同定し、新規治療法、診断法の開発を試みる。

また、OA の病態に関わる miRNA である miR-140 の発現制御に関わる領域を同定した。この領域はヒトでも非常に良く保存されており、今後、ハイスループット遺伝子導入アッセイのシステムを利用して、この miR-140 の発現制御に関わる因子あるいは、化合物ライブラリを利用して miR-140 の発現を制御する化合物を探索し、OA の新規創薬ターゲットあるいは化合物を同定する。

F. 健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H.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

創薬技術・戦略に関する調査研究

所 属 財団法人ヒューマンサイエンス
振興財団 研究企画部
研究代表者 井口 富夫

研究要旨 「ヒトゲノム解読 10 年を経た個別化医療の進展と新たな創薬の方向性を探る。」をテーマに、欧米各国の製薬企業、研究機関、及びライフサイエンス関連行政機関等を訪問し、欧米各国における最新の医薬品産業の動向を把握するとともに、創薬に関連する科学・技術の進展と先端的医療技術開発の現状等を調査、分析した。

A. 研究目的

平成 23 年度（2011 年度）の本調査は、「ヒトゲノム解読 10 年を経た個別化医療の進展と新たな創薬の方向性を探る」をテーマに、欧米各国を訪問し、製薬企業、研究・医療機関及び関連行政機関より、最新の情報を入手・分析するものであった。また、その具体的目的は、以下の通りであった。

・ 目的 1：中堅製薬企業の経営・R&D 戦略

昨年度に実施した日本企業と同規模の欧米中堅企業の経営・R&D 戦略に関する調査・分析に対し、賛助会員からの高い評価と、本年度の国外調査における継続実施の要望が得られたことから、本年度は、日本企業と同規模で、グローバルな知名度は高くないものの、自国の医薬品市場で確固たる地位を築いている企業、ユニークな戦略で実績を伸ばしている企業の経営・R&D 戦略を調査することとした。

・ 目的 2：ゲノム科学と個別化医療の進展

ヒトゲノムのドラフトシーケンスが発表されてから 10 年を経た現時点において、欧米各国におけるゲノム科学と個別化医療の進展が如何なる状況であるかを詳細に把握するとともに、それらの今後の展望予測についても重点的に調査することとした。

・ 目的 3：各国のバイオバンクの実態

新たな取組みが進む欧米バイオバンクの実態を創薬技術・戦略への影響の点から、製薬企業の要望も踏まえ調査することとした。

B. 研究方法

①調査参加企業の募集

HS 財団情報委員会の下に、国外調査ワーキンググループ (WG) を組織し、HS 財団の会員企業から訪問調査参加企業を募集した。平

成 23 年度の訪問調査に参加した企業は、第一三共、味の素、武田、バイオインフォビジョン、日立ハイテクノロジーズ、Meiji Seika ファルマ、理研ジェネシスであった。

②訪問先の選定

平成 23 年 2 月に実施した会員を対象とした国外調査のテーマに関するアンケート調査の結果を踏まえ、研究目的に合致する欧米の規制当局、企業、公的研究機関を WG で訪問先として選定した。

中堅製薬企業の経営・R&D 戦略の継続調査では、特に、グローバルな知名度が非常に高いとは言えないものの自国市場で確固たる地位を築いている企業、特定領域・分野でグローバルに実績を伸ばしている企業等を訪問することとした。

バイオバンクの調査については、HS 財団研究資源委員会の要望も踏まえ訪問先を選定した。

C. 研究結果

訪問日および訪問機関・企業

訪問日および訪問機関・企業は下表のとおりであった。

No.	訪問日	訪問機関・企業	訪問都市
01	10月17日(月)	Ontario Genomics Institute (OGI)	Toronto
02	10月17日(月)	The Centre for Applied Genomics (TCAG)	Toronto
03	10月18日(火)	Ontario Institute for Cancer Research (OICR)	Toronto
04	10月18日(火)	Centre for Commercialization of Regenerative Medicine (CCRM)	Toronto

05	10月19日 (水)	GlaxoSmithKline (GSK)	Durham/NC
06	10月20日 (木)	Biogen Idec	Boston/MA
07	10月20日 (木)	Knome	Boston/MA
08	10月21日 (金)	National Institutes of Health (NIH)	Washington D.C.
09	10月24日 (月)	Recordati	Milan
10	10月24日 (月)	MolMed	Milan
11	10月25日 (火)	Invest in Catalonia	Barcelona
12	10月25日 (火)	Barcelona Science Park (PCB)	Barcelona
13	10月25日 (火)	Barcelona Biomedical Research Park (PRBB)	Barcelona
14	10月26日 (水)	Esteve	Barcelona
15	10月26日 (水)	Almirall	Barcelona
16	10月27日 (木)	European Federation of Pharmaceutical Industries and Association (EFPIA)	Brussels
17	10月27日 (木)	UCB	Brussels
18	10月28日 (金)	European Medicines Agency (EMA)	London
19	10月28日 (金)	UK Trade & Investment (UKTI) 及び Department for Business, Innovation and Skills (BIS)	London
20	10月28日 (金)	Wellcome Trust	London

各訪問先で入手した情報

1) Ontario Genomics Institute (OGI)

- OGIは、ゲノム研究成果の活用を中心に、公的研究機関や企業の支援を通じて、オンタリオ州ライフサイエンス産業の振興を図っている。
- 具体的な取り組みとして、Pre-commercialization Business Development Fund (PBDF)を設立し、スタートアップ企業等が実施する臨床試験のPOC取得を後押ししている。
- 2010年度は、加齢性黄斑変性症の診断薬を開発している ArcticDx、核内ホルモン受容体に対する創薬支援システムを開発している InDanio の2社が、PBDFの支援を受けた。オンタリオ州の研究者や企業との連携があれば、日本企業も支援を受けることができる。
- 研究者間ネットワークの拡充、企業・アカデミア・規制当局間交流の活性化、一般市民の

理解醸成等を積極的に行っており、地域全体でゲノミクスの成果を享受しようとしている。

- 2000～2010年に、オンタリオ州・カナダ政府から約86M加ドルの投資が行われ、約5,000人の雇用と18社の誘致が実現する等、総額約520M加ドルの経済効果があったと試算している。

2) The Centre for Applied Genomics (TCAG)

- TCAGは、The Hospital for Sick Childrenの付属研究機関として、ゲノム研究及びその成果の治療及び診断へ活用を図るトランスレーショナル研究を担っている。
- 特に、小児疾患のゲノム研究に力を入れており、嚢胞性線維症の原因遺伝子の変異を発見した業績がある。
- 最近5年間で1,300のラボとの共同研究を行っており、33カ国、700人の研究者を受け入れて教育・研究を進めている。共同研究先の約90%がカナダ国内であり、同じく約90%がアカデミアとなっている。
- 独自開発した技術で、約240種の疾患関連遺伝子の診断を行っており、病院からの検査依頼も多く、この数年で、受託診断によって予算の半分以上を得るに至っている。
- カナダの前首相はバイオサイエンスに対する理解が深く、戦略的投資を行った結果、近年、アメリカから多数の研究者がカナダに渡り、カナダでのゲノム研究が急速に発展した。

3) Ontario Institute for Cancer Research (OICR)

- OICRは主に、3つの製品化移行プログラム、6つの革新プログラム、6つの技術基盤ユニットからなるがん領域のトランスレーショナル研究組織であり、がん研究成果のビジネス化に焦点を当て、治療や診断等に結び付く研究開発を行っている。
- OICRは、オンタリオ州よる357M加ドルの出資を基盤に2005年12月に設立され、現在、160M加ドルを超える年間予算で事業を運営している。
- 特徴的な事業形態は、①POC促進事業「トライフェイズ」(アカデミア及び製薬企業が有する研究テーマについて24の医療機関で集中的に非臨床試験からPOCまで開発するビジネスモデル)、②アカデミアでの探索研究から非臨床試験までの研究テーマ促進事業「IP Development and Commercialization 基金事業」(3年間で最大1.5M加ドルの支援)等である。

- これらの事業展開により、OICR 設立から 3 年間で、バイオテック企業 8 社が起業、3 プロジェクトで製品上市、3 プロジェクトで治験開始（医療機器）等の実績が得られている。
 - Ontario Tumour Bank (OTB) は OICR の 6 つの技術基盤ユニットのプログラムの 1 つである。OTB は、カナダ最大のがんバイオバンクで、オンタリオ州がん関連病院から多様なヒトがん試料と臨床情報を収集・蓄積しており（累積で 9,200 以上の患者から 99,000 以上のがん試料を集積）、試料は品質管理規則と倫理基準ガイドライン厳守のもとで取り扱われ、州内外の様々ながん研究に供されている。
- 4) Centre for Commercialization of Regenerative Medicine (CCRM)
- CCRM は、カナダにおける再生医療の実用化促進のために、カナダ政府と民間企業が共同出資（政府が 15M、民間企業から 10M の計 25M 加ドル）して 2011 年 4 月に設立された組織であり、新しい企業の創出や知財のライセンスによる収益獲得、グローバルな再生医療技術の開発、技術者がキャリアを積む環境の創生等が目標である。
 - 製品開発を、① Reprogramming、② Cell Manufacturing、③ Biomaterial & tissue mimetics の 3 つに分け、各段階で研究開発を行う。段階毎に開発された試薬、ツール、バイオリクター、バイオマテリアル等は全て成果物となり、再生医療研究ツールとして販売可能な製品になる。
 - 細胞治療は、今後ますます重要になると考えており、カナダでは 5 つが臨床試験中で、近く 3 試験増える予定である（全世界では約 150 試験）。今後は、トロント、オタワ、モントリオール、エドモントンで向こう 3~5 年間に 55 試験が行われる予定（患者数は約 800）。
 - 細胞治療の臨床試験に関する最大の問題の 1 つはコストである（患者あたりの費用は 50.0K-70.0K 加ドルであり、Phase I でも 1M 加ドル必要）。また、GMP 設備や専門家が不足しており、治験実施前の当局との交渉に長時間を要する等、規制面でも様々な課題がある。
- 5) GlaxoSmithKline (GSK)
- ファーマコゲノミクス (PGx) への取組みを継続することは重要であり、これによって開発中断や市場撤退を回避できた事例は少ない (GSK 自身には当該経験はない)。
 - GSK は、Phase II と III 試験では、原則全ての国でゲノム試料を集めるが、Phase I では、科学的妥当性を内部で議論した上で収集するか否かを決定している。
 - 収集したゲノム試料は原則 15 年間保管しており、15 年という期間は、開発期間と市販後に問題が発生した場合の対応期間を考慮したライフサイクルマネジメントの観点から定めた。
 - 試料収集は困難を伴う。規制、プライバシーに関する考え方、文化の違い、知的所有権の取り扱い、倫理観等が各国で異なるため、収集専任チームにてこれに対処している。
 - 試料提供に対するインフォームドコンセント取得率は約 90% であり、探索研究にも利用できる試料の収集成功率は 78% である。4~5 年前は、これが 60% 程度であったが、主に BRICs 等の新興国での試料収集成功率が向上して、現在の水準となった。
 - GSK は、収集したゲノム試料を全て自社内でシーケンスしているのではなく、一部、多数の次世代シーケンサーを有する BGI (Beijing Genomics Institute) にアウトソースしている。
 - 現時点のヒトゲノム解析コストは、5.0K 米ドル/試料以下であるが、2013 年には 1.0K 米ドル以下となるだろう。一方、シーケンス技術の進展に伴い、①得られる膨大なデータの処理・解析、②データ管理・保管、③入手成功率の改善、④得られたデータが全てノウハウに直結していない、等の課題解決も必要である。
 - シーケンス技術の進展とコスト低減により、①パーソナルゲノミクス、②遺伝子診断を加速する革新的技術 (Disruptive Technology)、③PGx 等が一層進展すると予想している。
- 6) Biogen Idec, Inc.
- Biogen Idec は、1978 年創立で (Biogen として)、1980 年にはノーベル賞受賞者 Walter Gilbert が出資し、2003 年に IDEC Pharmaceuticals との合併により現在の社名となった。
 - Biogen Idec は、多発性硬化症治療薬で新たなビジネスモデルを構築し、世界トップ 3 のバイオテック企業となった。従業員は約 4,400 人、主要製品は RITUXAN[®]、AVONEX[®]、TYSABRI[®] 等。
 - 2010 年の売上は 4.7B 米ドルで、R&D 費は売上げの 26%。R&D 従事者は約 1,000 名で、その全てが研究開発拠点 (ケンブリッジ) にいる。

- ・ 主要疾患領域は得意とする CNS、免疫、血友病で、アンメットメディカルニーズの高い標的疾患に対する新たな治療法開発を目的とした R&D を徹底して行っている。
- ・ 多発性硬化症では、タンパク製剤・抗体医薬に加え、既存薬のライフサイクルマネジメント、低分子化合物の新規導入等、あらゆる角度から徹底的に取り組んでいる。
- ・ トランスレーショナル研究、特にバイオマーカーの活用に積極的に取り組んでいる。
- ・ 2011 年にトップマネジメントを刷新し、よりサイエンスを重視して、R&D 成果を最大活用しようとしている。また、欧米大手製薬企業に比べて、POC 取得のために丁寧な R&D を行っており、少数例の治験で Go/no-Go 判断を行っている。

7) Knome, Inc.

- ・ Knome は、2007 年に Harvard 大学 George Church 博士らによって設立され、現在の社員数は約 50 名で、その約 50% がシステムエンジニア、残りの約 50% が生物系研究者とのことである。
- ・ Knome は、富裕層を対象に、全ゲノムシーケンシングとその解釈のサービスを世界で初めて提供し、世界で 3 人目となる公開全ゲノムシーケンシング (匿名アジア人) を、350K 米ドルで行った。
- ・ 現在の主なビジネスは、主にアカデミアや製薬企業の研究者に対する全ゲノムシーケンシングと解析の受託であり、(1) Knome が独自に開発してきた効率的な解析パイプライン、(2) 遺伝子配列と公開データベースの疾患リスクやパスウェイ情報等を専門家が精査しマッピングするソフトウェア群やデータベース、が他社にないコア技術として差別化要因となっている。
- ・ ゲノム配列解読のプラットフォームは、Illumina、Complete Genomics、BGI、Life Technologies に対応しており、プラットフォーム非依存のソフトウェアツールやアプリケーションインターフェースを開発している。
- ・ 現在の主なビジネスパートナーは、Roche、BGI、Illumina、Johns Hopkins 大学等である。

8) National Institutes of Health (NIH)

(1) National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS)

- ・ NCATS は、Scientific Management Review Board (SMRB) の提言を受けて、新薬・新治

療法の開発促進を目的に 2011 年に設置された NIH 内の研究所横断的な組織で、2012 年度の予算は 32B 米ドルである。

- ・ NCATS で実施中のプログラムの内、特に重要な Clinical and Translational Science Awards (CTSA) と Cure Acceleration Network (CAN) の具体的内容は以下の通りである。

① Clinical and Translational Science Awards (CTSA)

CTSA は研究機関による効率的かつ高品質な臨床研究やトランスレーショナル研究を促進するための支援プログラムであり、その実施拠点は、全米 30 州、60 か所の Academic Health Centers である。各 Center の平均予算は、5 年間で年平均 8M 米ドルである。

② Cure Acceleration Network (CAN)

CAN は、研究から臨床試験までのバリアを減らし、治療への道筋を早めるネットワークで、the Affordable Care Act により設置され、2012 年度予算に 20M 米ドルが計上されている。

(2) The Cancer Genome Atlas (TCGA)

- ・ NIH 内の研究所横断プロジェクトである TCGA の現状と展望について説明を受けた。
- ・ TCGA プロジェクトは、National Cancer Institute (NCI) と National Human Genome Research Institute (NHGRI) との共同プロジェクトであり、2006 年、3 年間のパイロットプロジェクトとしてスタートし、2009 年からは、規模の大きな正式なプロジェクトとして進められている。
- ・ 大規模ヒトゲノムシーケンス解析を通じて、がんの分子的機序解明を促進することがこのプロジェクトの目的で、2014 年までの 5 年間に、25 のがん種で各 500 症例を集める予定である。「がんについては全てやる」姿勢で、臨床データや病理画像などを含めた様々なタイプのデータを集積するとともに、高品質で大量の試料をもとに統合的に分子的機序解明を図り、広くがん研究者にデータを開放し、がん研究分野の基盤を強化することを狙っている。
- ・ 現時点では、研究成果は 2 つの論文にしかなくはないが、これらは 400 以上のペーパーで引用されている。また、現在までに 500 症例に達したがん種は 4 つ (Breast Ductal、Colorectal、Clear Cell Kidney、Ovarian Serous Cystadenocarcinoma) である。
- ・ 2011 年 11 月 17-18 日に、ワシントン DC で TCGA First Annual Scientific Symposium を行

う。それまでに 4,000 以上のヒトがんの mRNA/miRNA expression、copy number、promoter methylation、mutation analysis datasets を公表する。

(3) NCI's Experimental Therapeutics Program (NExT)

- NExT は、HTS から臨床開発までの医薬品 R&D 全段階で産官学連携を推進する NCI のプログラムであり、2 年前に、今まで複数あった同様のプログラムを 1 つに集約して始まった。
- 早期の探索化合物の開発促進を目的に Chemical Biology Consortium が作られ、PK、PD、毒性試験、GMP スケールアップ、バイオマーカー探索、アッセイ法開発等を行っている。
- NCI は多くの企業と共同研究契約を締結しているため、大学では知的財産の問題で困難である新規化合物の併用療法の治験等も多く実施しており、これが NCI の強みともなっている。
- 製薬企業が保有する化合物で企業戦略に乗らなかった化合物や適用を拾い上げて開発することも NCI からの新薬創製、新適応取得の流れとなっている。

(4) Office of Biorepositories and Biospecimen Research (OBBR)

- OBBR は、NIH に所属する NCI (米国国立がん研究所) が運営する機関であり、患者より収集した試料を有効利用して、がんの早期及び正確な診断、治療法選択、治療効果の早期評価等を実現し、がん治療を向上させることを目的としている。
- OBBR は 2003 年の Biospecimen Research Network 構想をもとに 2006 年に組織化され、2007 年には NCI Best Practices for Biospecimen Resources を公表、更にはがん組織試料の物質・医療情報の標準化促進のため、2009 年にはがんヒトバイオバンク (caHUB) を設置した。
- 主な事業は、①アカデミア・製薬企業によるがん組織試料研究のネットワーク構築 (分子レベルの研究等に関する定例シンポジウム、革新的応用技術開発のためのグラント付き科学プログラムの実施等)、②共同研究の推進 (がん臨床プロテオーム技術評価、TCGA 等) である。
- caHUB は、これらの事業の充実及び研究者への試料提供のために機能している。保有試料は、腫瘍組織、正常組織、血液、血清、血漿、尿、唾液で、免疫法、アフィニティーチップ、

マイクロアレー、イルミナビーズ等で、DNA/RNA、蛋白質、組織形態の検査を実施している。

- 今後の課題は、増加する試料への対応、ユーザーからの様々な試料収集への要望、試料の品質管理・処理条件の標準化、試料処理工程と供給過程の改善等である。

9) Recordati Industria Chimica e Farmaceutica S.p.A.

- Recordati は欧州を基盤とする中堅の製薬企業であり 2010 年の売り上げは 728M ユーロで、従業員は 2,800 名、研究者はおよそ 150 名で、抗体等のバイオリジクスは取り扱っていない。
- ロシア、ウクライナ等の CIS (独立国家共同体) 諸国及びトルコを成長市場と捉え、これらの地域では企業買収等を通じて販売体制を固め、2013 年は 14%以上の売上増を見込んでいる。
- 中堅日本製薬企業とのアライアンスを重視しており、例えば、欧州に開発・販売拠点を有さない日本企業から開発品を導入し、欧州 (イタリア、スペイン等) での開発・販売を手掛けている。
- 研究開発領域は循環器系と泌尿器系に特化し、欧米大手製薬企業が焦点をあてない領域を目指している。またオーファンドラッグの開発を柱の一つとしている。
- 現在、5,000-7,000 の希少疾病が知られているが、オーファンドラッグとして承認された製品は 72 品のみであり、研究開発の余地が大きいことに加え、希少疾病の認知度が上昇しており、希少疾病の治療薬と診断薬は成長分野であると考えている。
- 傘下の Orphan Europe には、オーファンドラッグに関する薬事のスペシャリストが多く、高い開発力を有しており、2007 年からは米国でのオーファンドラッグ開発も手掛けている。

10) MolMed S.p.A.

- MolMed は、1996 年に設立された新規がん治療法を開発するバイオテック企業であり、細胞・遺伝子治療用の細胞やベクターを GMP 生産するとともに、白血病、大腸癌、肝臓癌、中皮腫、肺癌、卵巣癌、エイズに対する治験を実施している。
- MolMed の本社はイタリアミラノの San Raffaele Biomedical Science Park にあり、実施中の試験は、Phase I 6 試験、Phase II 9 試験、Phase III 2 試験で、細胞・遺伝子治療及び血管選択的抗がん剤の technology platform をベ

ースに、TK（骨髄移植に対する新規細胞治療製品）と NGR-hTNF（固形癌に対する血管選択的抗がん剤）の 2 製品の単独及び他抗がん剤との併用試験を実施中である。

- 遺伝子治療では、Telethon Foundation と GSK から 2 つの新たな資金を獲得している。
- GMP 施設は、San Raffaele 病院内に 5 室（QC 用 1 室含めて遺伝子治療用 3 室、細胞治療用 2 室）あり、細胞治療用の培養細胞 GMP 生産管理のキーポイントとして、①プロセスの理解・教育、②エンドポイントの明確化を上げていた。

11) Invest in Catalonia

- カタルーニャ州の面積はスペイン全体の 6.3%、人口は同約 16% の 750 万人で、GDP は同約 20% を占めている。同州の一人当たり GDP は年 27.0K ユーロで、欧州平均を 14% 上回っている。
- 同州では、サービス産業が 71% を占めているが、サービス産業振興のためにも第二次産業の活性化が重要と考えており、特にバイオテクノロジー等の新しい産業の振興に力を注いでいる。
- スペインに進出した日本企業の 71.4% はカタルーニャ州に本拠をおいており、日本からの投資が 50% を超えている企業は 98 社、同じく投資されている企業は 150 社である。
- カタルーニャ州には、スペイン 5 大製薬企業（Almirall、Esteve、Ferrer、Grifols、Uriach）を含む全体の 42% となる 170 社の医薬関連企業があり、その生産高はスペイン全体の 44% である。
- スペインの医薬品市場は、2008 年の統計で 13.9B ユーロであり、ドイツ、フランス、イタリアに次いで欧州第 4 位である。
- Invest in Catalonia は公的組織であり、守秘義務を尊重しつつ、各企業に適したテーラーメイドなサービスを無料で提供している。カタルーニャ州への投資を考えている日本企業にとって、Invest in Catalonia のサービスを活用することは一考の価値があると思われる。

12) Parc Científic Barcelona (PCB) / 英名: Barcelona Science Park

- PCB は、1997 年に Barcelona 大学によって設立され、ライフサイエンス分野のイノベーションを促進することを目的に、ベンチャー起業や共同研究の促進等を中心的業務としている。

- PCB の傘下には、Institute for Research in Biomedicine、Institute for Bioengineering of Catalonia、Molecular Biology Institute of Barcelona の 3 研究機関があり、これら研究機関の中に 70 以上の研究グループがあって、2,200 人が研究、開発、イノベーション等に従事しており、75 の企業との協業・連携が進行中である。
- PCB を運営している 79 名のマネージャーの中で、Barcelona 大学教授を兼任しているは 1 名のみで、他は全てビジネスマンであり、Barcelona 大学の間接的関与はあるものの、大学とは独立した非営利組織として運営されている。
- コンビナトリアルケミストリー、トランスクリプトーム、プロテオミクス、ナノテクノロジー、結晶化テクノロジー、動物実験、安全性、創薬の 8 テクノロジープラットフォームにゲノム解析センターを加えた 9 つの最先端テクノロジーを利用することが可能である。
- 来年には、Esteve の研究機能の全てが PCB 内施設に移転することが決まっており、Almirall の研究機能の一部も PCB に移る予定である。8,000 m² がまだ利用可能であり、日本企業の利用を期待している。なお、施設利用の最短期間は 2 年、最長は 25 年である。

13) Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) / 英名: Barcelona Biomedical Research Park

- PRBB は、カタルーニャ州、バルセロナ市及び Pompeu Fabra 大学により 2006 年 5 月に設立された。6 つの研究センターが総合病院（Hospital del Mar）と地下道で直結しており、建物は海に面したオープンな雰囲気溢れており、研究者間の交流が盛んとのことである。
- PRBB は高品質なバイオメディカル関連の新知見を創出することを使命とし、年間 700 件の論文を投稿している。52 カ国 1,400 名の研究者が約 100 の研究グループで研究に従事しており、年間研究費は約 7B ユーロである。
- 詳しい説明を受けた研究グループ・組織は、以下の 6 つであった。
 - ① Center of Genomic Regulation: 疾病の遺伝学的基礎を理解し QOL の向上を目指す。
 - ② aScidea: 遺伝子配列の読み取りからバイオインフォマティクスまでを手掛ける。
 - ③ Chemotarget S.L: インシリコ薬理学を駆使し創薬支援サービスを手掛けている。
 - ④ Laboratorio de Neurofarmacologia: 神経システムに関連する治療標的の同定、薬物依存