

201307023A

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究
（官民共同研究）の推進
総括・分担研究報告書

公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成26(2014)年3月

平成26年4月

各 位

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
事 務 局

創薬基盤推進研究事業
「政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究(官民共同研究)の推進」
研究報告書ご送付の件

拝啓 時下益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

平成25年度厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)を受けて実施いたしました下記報告書が完成しましたので送付申し上げます。

今後ともよろしくお願い申し上げます。

敬具

記

- | | |
|------------------------------|----|
| 1. 平成25年度創薬基盤推進研究事業 研究報告書 | 1部 |
| 2. 平成23～25年度創薬基盤推進研究事業 総合報告書 | 1部 |

以上

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
〒101-0032 東京都千代田区岩本町2-11-1 ハーブ神田ビル 4F
TEL 03-5823-0361 FAX 03-5823-0363
岡崎 治

平成25年度

政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究
(官民共同研究) の推進

総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告

政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究（官民共同研究）の推進

ー総括研究報告ー 高柳 輝夫 …… 1

II. 分担研究報告

課題番号

A分野 医療上未充足の疾患領域における医薬品開発に関する研究（希少疾病治療薬、エイズ医薬品等
開発研究を含む）

KHA1101	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	野崎 智義 ……	11
KHA1201	プロテインノックダウン法を基盤とする創薬研究	内藤 幹彦 ……	17
KHA1202	先天性中枢神経脱髄病の治療薬開発に向けた研究	山内 淳司 ……	24
KHA1203	HDL上昇と機能増進を核とした動脈硬化予防治療薬開発のための 基礎的研究	最上 知子 ……	31
KHA1204	GMP準拠国産ウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実 施とその支援体制の構築	小野寺雅史 ……	36
KHE1105	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	高田 修治 ……	40

B分野 医薬品開発のための評価科学に関する研究

KHB1205	バイオ医薬品の合理的品質管理技術の開発と標準化	川崎 ナナ ……	45
KHB1206	製剤特性評価及び製造工程管理に基づく機能性製剤等の総合品質 管理戦略確立に関する先端的評価科学研究	奥田 晴宏 ……	55
KHB1207	育薬を指向した天然物医薬品の標準化と品質評価に関する研究	合田 幸広 ……	65
KHB1208	ヒトにおける安全性確保のための、非臨床・臨床開発における評価・ 予測系の開発	黒瀬 光一 ……	75
KHB1209	安全性評価手法の新機軸:統合型毒性試験	山田 雅巳 ……	85
KHB1210	ヒトiPS細胞由来機能細胞を利用した新規薬効評価系の構築	川端 健二 ……	91
KHB1211	フェレットに対する免疫原性を基盤とした細胞培養インフルエンザワ クチン株選定法確立	浅沼 秀樹 ……	95
KHB1212	化粧品原材料及び添加物の開発のための評価科学に関する研究	亀山 浩 ……	109

C分野 政策的に対応を要する疾患等の予防診断・治療法等の開発に関する研究

KHC1103	血管内皮機能改善に基づく糖尿病性腎症治療薬の開発	望月 直樹 ……	126
KHC1104	多価ボツリヌス毒素イソドワクチンの有効性及び安全性の検討	山本 明彦 ……	130
KHC1213	高効率にC型肝炎ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発とその 解析	脇田 隆宇 ……	137
KHC1214	メタボロミクスを活用した統合失調症と気分障害のバイオマーカー 開発	功刀 浩 ……	145
KHC1215	フラビウイルス粒子様ワクチンの開発	長谷川秀樹 ……	152

KHC1216	細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性、安全性の評価と生産性向上に関する総合的研究	倉根 一郎	……	158
KHC1217	遺伝子組換えBCGを用いた新規結核ワクチンの開発	保富 康宏	……	164
KHC1218	血球凝集素抗原(HA)の立体構造予測に基づく型特異的および型共通抗インフルエンザウイルス抗体の作成と迅速診断法の確立	横田 恭子	……	170
KHC1219	miRNAを標的とした関節炎治療の開発	浅原 弘嗣	……	174
D分野 医薬品等開発のための先端技術・方法の開発（ヒト組織・細胞の利用等）				
KHD1220	多能性幹細胞を医薬応用へ活かす生体親和性次世代スケーラブル培養システムの確立	阿久津英憲	……	178
KHD1221	臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注を可能とするための基盤整備と第I相臨床試験	藤原 成悦	……	181
KHD1222	創薬支援に有用なヒト肝in vitro/in silico代謝・輸送予測モデルの提案と薬物動態評価における実証	石田 誠一	……	188
KHD1223	腫瘍等ヒト疾患組織の長期継代維持・保存・データベース化による医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築	野村 大成	……	197
KHD1224	心不全に対する再生医療と人工心臓による統合治療戦略	梅澤 明弘	……	207
KHD1225	再生医療技術を駆使した、生活習慣病(虚血性疾患、肥満、糖尿病、高脂血症)の新規病態モデルの開発と創薬研究	佐伯久美子	……	210
KHD1226	小児の網脈絡膜の微細構造の把握に関する研究	東 範行	……	218
創薬技術・戦略に関する調査研究		井口 富夫	……	222
政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究		山下 剛一、加藤 正夫	……	232

政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究 (官民共同研究) の推進

— 総括研究報告 —

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
高柳 輝夫

研究要旨 本研究事業は、厚生労働科学研究費補助金と民間企業からの研究委託費を元に、官民共同研究課題を募集して創薬に関連する研究を推進する。平成 25 年度は、研究期間が 2 及び 3 年間の研究課題の最終年度にあたり、研究成果の結実に向けて官民共同研究をより一層推進した。また、調査研究やセミナー等による情報提供を通じて、企業ニーズと研究シーズのマッチング環境を整えた。

A. 研究目的

本研究事業は、長寿社会における保健・医療・福祉に関する政策的課題解決に向け、国立試験研究機関等と民間企業との官民共同研究を柱に、医療等に係わる現場のニーズに対応する独創的な医薬品・医療機器等の研究開発及びそれに資する技術開発を実施し、先導的な研究成果の獲得を目指す。

B. 研究方法

本研究事業は、委託費を拠出する医薬関連企業と受託研究を実施する厚生労働省所管の国立試験研究機関等を必須とし、大学等の参加も認める官民共同型の研究を基本形態として実施する。

平成 25 年度は、24 年度に引き続いて以下の 4 研究分野について官民共同研究を実施した。

1. 医療上未充足の疾患領域における医薬品開発に関する研究（希少疾病治療薬、エイズ医薬品等開発研究を含む）
2. 医薬品開発のための評価科学に関する研究
3. 政策的に対応を要する疾患等の予防診断・治療法等の開発に関する研究
4. 医薬品等開発のための先端的技術・方法の開発（ヒト組織・細胞の利用等）

本年度は、研究期間が 2 及び 3 年の官民共同研究の最終年度にあたることから、外部委員で構成

される評価委員会により事後評価を実施した。

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団（HS 財団）が実施する「政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究」では、医療ニーズ調査及び将来動向調査を実施し、情報提供としてセミナー、ワークショップ、調査報告書発表会、国立試験研究機関等の研究を企業研究者に紹介する基礎研究講習会を実施した。また、研究課題「創薬技術・戦略に関する調査研究」では、欧米各国における先端技術の医療・医薬品に関する規制動向に焦点を当てた調査を実施した。

C. 研究結果

平成 25 年度の官民共同研究は 30 課題であり、医薬関連企業 76 社、国立試験研究機関 8 機関、大学 34 校、団体・試験研究法人等 14 機関が参加して共同研究を実施した。また、HS 財団が主体で行う調査研究 2 課題を実施した。これら研究課題の研究概要及び研究成果は、添付書類に纏めた。

官民共同研究の主な成果としては、がん、エイズなど医療上未充足の疾患及び小児難治性疾患、中枢神経系疾患等希少疾病の治療薬開発に向け新規ターゲットの探索やスクリーニングによりヒット化合物を得ることに成功した。医薬品開発のための評価科学への取り組みとして、バイオ医薬品、機能性製剤、天然物医薬品、化粧品原材料、

ワクチン等に関する管理戦略等のための試験系を確立し、標準化に向けて政策提言を行った。また、ヒトにおける各種薬効・毒性評価系を確立し、創薬推進に繋がる成果を上げた。政策的に対応を要する疾患として、糖尿病性腎症、C型肝炎、結核、関節炎等を取り上げ、創薬ターゲットに関する基盤研究や治療薬開発に取り組んだ。また、政策的に重要なワクチンに関する評価・開発やインフルエンザウイルスを認識する抗体作成に成功するとともに、精神疾患に関する新たなバイオマーカーを探索した。医薬品等開発のための先端的技术・方法の開発として、iPS、ES、胎盤、骨髄、臍帯血由来細胞を用いた再生医療に係る研究を展開し、培養技術の進展、動物実験による検証、疾患モデルの構築を行うことが出来た。また、創薬に有用な薬物動態モデルの構築、腫瘍細胞を生着・継代できるシステムの構築、小児眼底の微細構造観察システムの構築を行った。以上の研究成果から9件の特許を出願、1件について出願準備中である。

HS財団が実施した研究課題「政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究」では、精神疾患に関する医療ニーズ調査を、また、慢性腎臓病の将来動向調査とその詳細分析を実施し、報告書として取り纏めた。セミナーとして、ウイルス感染症及び自己免疫疾患を、また、ワークショップとしてナノテクノロジーをテーマに取り上げ、情報提供を行った。さらに、国立循環器病研究センターの研究活動を医薬関連企業の研究者に紹介した。「創薬技術・戦略に関する調査研究」では、核酸医薬をキーワードに欧米のベンチャー企業を含む医薬関連企業、研究・医療機関、ライフサイエンス関連行政機関等を訪問し、創薬技術・戦略に関する最新情報を入手した。

また、平成25年度は当該研究事業が最終年度となること、また双方向コミュニケーション実施の観点から、全32課題について研究成果発表会を開催し、研究者のみならず広く国民に研究成果を公開した。

D. 考察

本研究事業では、保健・医療・福祉分野への公益性に寄与する国立試験研究機関等と社会へ医薬品や医療機器等を提供する医薬関連企業の研究者が共通の問題意識を持って共同研究を実施することにより、これまで有効な治療薬が見出されていない疾患に対して画期的な治療方法等を提供することが期待されている。また、進歩が著しい分析技術を応用した新たな医療・診療技術、あるいは再生医療など新たな医療の形態への対応については、評価科学等も含めた官民共同研究が必須であり、有用な新規医療技術の開発に繋がるものと期待される。

本年度は、希少疾病等アンメットメディカルニーズの高い疾患に対する医薬品創製研究6課題、評価科学に関する研究8課題、政策的に対応すべき疾患の予防・診断・治療に関する研究9課題、先端的技术に関する研究7課題の計30課題を実施した。本年度は官民共同研究の最終年度になることから、各課題の目標達成に向けて研究を推進した。

希少疾病等医療上未充足の疾患に係る研究では、創薬シーズ探索の基礎研究やリード化合物の獲得など、今後の開発推進に繋がる基盤作りが出来た。評価科学研究では、官民共同研究の特色を生かし、医薬品等の品質管理のための評価手法を開発し、日局法に反映させるなど評価方法の標準化を行った。新興・再興感染症等に対しては、治療戦略、ワクチン開発等を達成した。先端的技术として、iPS細胞等を用いた再生医療研究、新たな有効性・安全性評価系の確立、疾患バイオマーカーの確立等を行った。これらの成果はいずれも、官民共同研究の特徴点を生かして得られたものであり、本研究事業の役割を果たすことが出来た。

HS財団が実施した研究課題「政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究」では、医療上未充足の疾患として難病の多い精神疾患について医療ニーズ調査を、また、透析患者数増加の原因である慢性腎臓病について将来動向調査を行った。さらにアンメットメディカルニーズの高い疾

患について、創薬の現状と課題等に焦点をあてセミナーを開催し、情報提供した。「創薬技術・戦略に関する調査研究」では、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・技術の進展と先端医療技術開発の現状等を調査、分析した。HS財団のこれらの活動は、官民共同研究推進及びマッチング環境の整備の一環として実施したものである。

また、本年度は当該研究事業が最終年度であり、広く国民に研究成果を公表する観点から研究成果発表会を開催し、また、研究成果の確認のため事後評価を実施した。

E. 結論

本年度実施した官民共同研究は、4研究分野で30課題であり、本年度で研究期間が2あるいは3年の最終年度にあたることから、それぞれの研究課題について研究目的を達成すべく精力的に取り組んだ。研究成果は、特許出願したほか、論文投稿、学会発表等により公表した。さらに、本年度が官民共同研究の最終年度となることから、研究成果発表会を開催し全研究課題の研究成果を確認した。

また、HS財団が実施した研究課題「創薬技術・戦略に関する調査研究」と「政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究」については、各種調査研究を実施し、報告書を作成するとともに政策提言を関係各所に提示した。さらに、セミナー、ワークショップ等を開催し、情報提供を行った。

F. 健康危険情報

インフルエンザワクチンの株選定過程で、リファランス株と類似の抗原性と判断された株でも、その株に対する抗血清では必ずしもリファランス株と同等の評価ができないことが明確になった。(課題番号：KHB1211)

G. 研究発表

1. 平成25年度(2013年度)国内基盤技術調査

報告書「神経疾患に関する医療ニーズ調査」
(公財)ヒューマンサイエンス振興財団、平成26年3月14日 149ページ

2. 平成25年度(2013年度)将来動向調査報告書「慢性腎臓病(CKD)の将来動向Ⅱ【分析編】」(公財)ヒューマンサイエンス振興財団、平成26年3月18日 91ページ

3. 平成25年度(2013年度)国外調査報告書「創薬基盤強化の新機軸を探る－核酸医薬の新展開・産学連携の最新動向を中心に」(公財)ヒューマンサイエンス振興財団、平成26年3月14日 98ページ

添付書類(研究概要及び研究成果)

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
KHA1101	野崎 智義 他	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	現行のHIV/AIDSに対する標準療法である多剤併用療法には様々な薬剤耐性変異ウイルスの出現等の多くの克服すべき課題が存在する。HIV/AIDSに伴う日和見感染症、特に原虫感染症の多くには有効な治療法が存在しないか、限定的であり、新規治療法を開発し準備することは極めて重要である。本研究ではHIV/AIDSに伴う原虫性日和見感染症であるトキソプラズマ・クリプトスポリジウム・赤痢アメーバ症の新規治療薬創成を目指し、創薬標的経路・酵素の発見、生理機能の解明、阻害剤の探索を通じて抗原虫薬創薬の基盤を創生する。
			トキソプラズマ症・クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症に対する創薬に関し、微生物培養抽出液ライブラリー等のスクリーニング、化合物の同定・構造決定、創薬標的代謝酵素・経路の同定・生理意義の解明などの成果を挙げ、エイズ日和見原虫症に有効な新規薬剤の獲得に関して有意義な貢献を果たした。
KHA1201	内藤 幹彦 他	プロテインノックダウン法を基盤とする創薬研究	がん、神経変性疾患、炎症性疾患など医療上未充足の疾患領域において、疾患原因のタンパク質を特異的に分解する新たな作用機序を持った新規医薬品の開発に資する研究を行う。そのために国立研究所所属の研究責任者が開発したプロテインノックダウン法と、民間企業が有する医薬品開発のリソースを利用して、アカデミアの専門知識と協力を得ながら、官民共同研究で活性化化合物の合成と評価を進める。
			SNIPER(ER)がヒト乳癌細胞のエストロゲン受容体を分解して速やかに細胞死を誘導する分子機構を解析し、ERはユビキチン-プロテアソーム系を介したエストロゲン受容体の分解後に乳がん細胞でROS産生を惹起しネクロシスを誘導する事を明らかにした。また、新規構造を持つエストロゲン受容体分解誘導剤の開発にも成功した。他のタンパク質を標的としたSNIPERの開発についても、新規結合リガンド探索などで成果を挙げることができた。他のタンパク質を標的としたSNIPERの開発についても、新規結合リガンド探索などで成果を挙げることができた。
KHA1202	山内 淳司 他	先天性中枢神経脱髄病の治療薬開発に向けた研究	「中枢神経脱髄Pelizaeus-Merzbacher病」(PMD)は20～30万人に1人が病因を有する先天性の稀少疾病である。しかし、発症機構に関して不明な点が多く、特異的治療薬は現存しない。本研究では、これまでの研究成果をもとにして、官民共同研究で、はじめて達成できる前臨床試験を目指したPMD創薬研究を推進する。
			独自に開発したインビトロ髄鞘変性システムを用いて、2及び3型ニューレグリン受容体、MAPK1/2、TACEと推定される蛋白質分解酵素等を標的候補分子として同定した。これらの標的分子の内、3型ニューレグリン受容体、MAPK1/2は、インビトロの結果ばかりではなく、マウスの髄鞘組織的にも神経運動機能的にも治療標的分子である可能性が示唆された。今後、これらがPMD創薬標的として適しているかどうか、活性ポケットの構造解析などのバイオインフォマティクスを活用したり、これらを標的とした他の疾病の第二相試験で効果がないと判定された化合物のPMD薬としての有効性を検証する。
KHA1203	最上 知子 他	HDL上昇と機能増進を核とした動脈硬化予防治療薬開発のための基礎的研究	低HDL血症は日本人の10-20%に認められ、LDLが正常値でも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ない。①HDL産生に最重要の「肝のABCA1」について、ヒト肝での特異的発現を発見したバリエーションの機能と発現制御、②炎症性アミロイドSAAを含むHDLの形成とアミロイド沈着、③脂質蓄積が動脈硬化病変をもたらす機序を解明し、④制御化合物を探索することにより、HDLの質と量を高める新薬創製に官民連携により貢献する。
			本年度の成果は以下の通り。①肝でのAMP 活性化プロテインキナーゼによるABCA1発現への影響と機序を解明し、肝ABCA1発現を促進する食品成分を探索、胆汁酸基本骨格の新規LXRアゴニストの顕著なABCA1発現の機序を解明した。また肝ABCA1発現促進化合物のin vivoでのHDL上昇効果の機序を検証した。②動脈硬化症発症前の病変好発部位での抗酸化タンパク発現低下を解析した。
KHA1204	小野寺 雅史 他	GMP準拠国産ウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究の実施とその支援体制の構築	近年、欧米では造血幹細胞遺伝子治療が小児難治性疾患に対する有効な治療法をして確立しているが、日本ではこれら治療に関する優れた技術を有するものの、その技術を臨床の場で応用する体制が整っていないため、欧米のそれと比して大きな遅れとなっている。本研究では、実際に遺伝子治療臨床研究を実施することで、そこで必要となる安全性、有効性評価系を確立し、我が国の遺伝子治療実施体制のプラットフォームを整備する。
			①CGD 遺伝子治療臨床研究実施に対する体制(電子カルテへの導入やSOP作成)を整備した。②新規ベクターとしてのレンチウイルスベクターの作製とその精製法を検討した。③CGD患者では炎症性サイトカインが健常人と比較して高値であることを明らかにした。④患者好中球が遺伝子導入により正常に機能するためには一定のgp91phox発現が必要であり、それに適したベクターの選択が必要であることが判明した。

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
KHE1105	高田 修治 他	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	創薬事業においては産学官が共同して、疾患に関連する遺伝子をノンバイアスかつ機能的に同定、解析していく必要がある。欧米では、すでに多くの成功例が報告されているが、日本において実績を上げてきたのは我々のグループを除いて非常に少ない。本研究で提案するシステム医学研究戦略は、疾患の病態の解明とより効果的と考えられる創薬ターゲットの絞り込みが同時に並行して進めることができ、あらゆる疾患研究に応用可能である。 全長cDNAライブラリーを使用したハイスループット遺伝子導入スクリーニングを用いて、IL-6の3' UTRに作用し、その発現制御に関わる因子を探索した。このシステムにより、短時間で効率よく、網羅性の高いスクリーニングが行えた。スクリーニングにより得られた候補因子の一つを詳細に検討した結果、この候補遺伝子がIL-6の発現を安定に維持することにより、炎症性疾患の病態の形成や病状の悪化性、慢性化に関わることを示唆する結果を得た。本研究により炎症性疾患の有力な新規創薬ターゲットを同定した。
KHB1205	川崎 ナナ 他	バイオ医薬品の合理的品質管理技術の開発と標準化	厚生労働省は医薬品産業支援と革新的医薬品開発推進の方針を示し、バイオ医薬品開発に関連して、QbDを取り入れた原薬の開発と製造、非臨床安全性評価、ヒト初回投与試験安全性確保に関するガイドラインを発出した。本研究では、それらの政策や指針の具現化に資する研究として、ライフサイクル全般に運用できるバイオ医薬品の品質管理手法、新規基材評価方法、ウイルス安全性試験法、免疫原性評価法の開発と標準化を行う。 バイオ医薬品のQbD 実現に向け、(1)分子変化体評価のためのPAT 手法の開発、酸性オリゴ糖及びグリコフォーム分析の標準化、並びに競合法ELISAによる結合活性試験法の標準化を行った。(2)カイコ由来抗体の品質確保には、糖鎖構造の管理が重要であることを明らかにした。さらに、バンク化によるTgカイコ系統維持手法の改良を行った。(3)マウスパルボウイルスを用いた新規蛍光標識ウイルス粒子を開発し、ウイルス感染性評価に利用可能であることを実証した。(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化を行った。
KHB1206	奥田 晴宏 他	製剤特性評価及び製造工程管理に基づく機能性製剤等の総合品質管理戦略確立に関する先端的評価科学研究	医薬品のライフサイクルを通して品質を確保するためには、開発段階から最新の科学に基づき目標製品品質プロファイルを設定し、医薬品の重要品質特性と製造工程を適切に評価し、品質管理戦略を確立することが求められている。本研究では、機能性製剤の目標製品品質プロファイルを明かし、重要品質特性とその特性に影響を与える製造工程を評価する手法を産官学共同研究を通じて究明し、医薬品の品質保証に資することを目的とする。 QbDアプローチによる医薬品製剤開発の実現に不可欠な製剤特性を解析するための適切な評価法が定まっていない(1) ナノDDS製剤、(2) 機能性製剤、(3) 超難溶性薬物製剤等について製剤特性評価法の開発を行い、また、(4) これらの製剤の製造工程をリアルタイム、超高速に管理する製造工程管理手法を検討した。
KHB1207	合田 幸広 他	育薬を指向した天然物医薬品の標準化と品質評価に関する研究	天然物医薬品は、合成品と違い、規格化・標準化が困難で、再現性の良い医療を行い、医薬品として新効能等を取得する為の品質規格条件が明確ではない。本研究では、産官学の研究者が共同で、既承認の天然物医薬品(単味生薬、漢方処方、西洋ハーブ)を中心に、特に育薬の観点から、新規効能効果取得を目指し、分析化学的、分子生物学的、生物学的試験法等を組み合わせた天然物医薬品の標準化と品質評価手法を確立する。 遺伝子情報に基づく天南星の掌葉半夏に対する純度試験法を確立し、より高いレベルのコンタミネーション防止策としてより厳密なPCR 産物の物理的封じ込めが重要であることが判明した。また竜胆と秦艽、党参等の結果は、今後の公的規格化に反映される。さらに、局方手引きの効能効果の読替え案についてまとめ、「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)を作成した。西洋ハーブ関係ではチェストベリー乾燥エキスが承認された。漢方処方関係では、漢方処方の新規効能効果を踏まえた試験法について検討し、アルカロイド除去麻黄エキスを利用した漢方処方に育薬の可能性が高いことが明らかとなった。
KHB1208	黒瀬 光一 他	ヒトにおける安全性確保のための、非臨床・臨床開発における評価・予測系の開発	医薬品の安全性を開発早期に確保することを目標に、参加企業のニーズを含む医薬品開発上の必要性を踏まえ、1) 非臨床開発においては、iPSを含むヒト細胞系を用いた代謝動態・副作用評価系の開発を、2) 臨床開発においては安全性バイオマーカーの探索・同定と迅速なマーカー検出系の開発を行う。医薬品の開発過程における安全性の予測・評価系の開発は、予防・予測型の安全対策を推進している厚生労働行政の方針とも合致する。 副作用リスクの予測と安全性評価に関して以下成果を得た。(1) 医薬品のインビトロアレルゲン性予測系の開発、(2) ヒトiPS細胞を用いた小腸上皮細胞の分化およびその評価、(3) 安全性バイオマーカーの探索・同定と診断法の開発(腎薬物トランスポーターに関連バイオマーカー、GST-KOマウスを用いたメタボロミクス解析、遺伝子多型とタイピング系の開発、安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発)。

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
KHB1209	山田 雅巳 他	安全性評価手法の新機軸：統合型毒性試験	トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験について、2011年OECDガイドライン公開に伴う遺伝毒性試験および一般毒性試験への組み込みの重要性を視野に入れ、統合型試験法策定時の科学的根拠となる基礎データを取得する。Pig-a試験法は、民間を中心に改良法の国内・国際バリデーション研究を進め、標準化を目指す。In vitro試験法のキット化、及び遺伝毒性メカニズムに基づく代替法の開発等に取り組む。 トランスジェニック動物を用いる遺伝毒性試験と一般毒性試験は統合するという結果を得た。Pig-a 試験法は他の遺伝毒性試験結果とよい相関を示し、有用性が認められた。in vitro 試験法である蛍光細胞を用いる小核試験、全ゲノムの塩基配列を調べる手法等から、より多くの情報が得られることが示された。
KHB1210	川端 健二 他	ヒトiPS細胞由来機能細胞を利用した新規薬効評価系の構築	iPS 細胞を創薬へと応用するには、分化誘導技術の開発と分化した細胞を安定的に培養する技術の両者が重要である。そこで本研究では、アレルギーと糖尿病という新薬開発が期待されている現代病に着目し、これらの疾患に重要な役割を担っているマスト細胞と膵島β細胞をヒト iPS 細胞から効率良く分化誘導する技術を開発し、また官民共同研究により分化した細胞を安定的に培養できる技術を開発する。 ①C3H10T1/2細胞との共培養法あるいはEB形成法により得られたヒトiPS細胞由来血液前駆細胞をメチルセルロース中の培養で、マスト細胞様細胞が得られた。② Wnt5aを作用させることで、マウスiPS細胞由来マスト細胞の成熟化が促進された。③低分子化合物ILV、PMAを用いることで膵β 様細胞への分化が促進された。また、CM-mFLCを用いて培養することによっても、膵β 様細胞への分化が促進された。しかしながら、ヒト膵β 細胞よりも機能面で依然として劣っているため、今後も継続してグルコース応答性の高い膵β 細胞の作出するための技術開発が必須であると考ええる。
KHB1211	浅沼 秀樹 他	フェレットに対する免疫原性を基盤とした細胞培養インフルエンザワクチン株選定法確立	細胞培養インフルエンザワクチンの株選定基準確立を目指し、本研究では遺伝子背景の異なる野外分離株をフェレットに感染させ免疫誘導能を検討し、ワクチンとして用いた場合の有効性を検討する。また民間企業の有する正確かつ高い抗体の作製技術を取り入れ、フェレット免疫分子に対する抗体を作製・応用する。ワクチンの安全性や有効性を明確にすることは厚生労働行政の重要な役割であり、本研究はそのことに大きく貢献できる。 臨床分離株を感染させたフェレット抗血清を用いて分離株の抗原性解析を行った結果、リファランス株での評価とは異なる結果が得られた。リファランス株はワクチンを決定する上で重要な情報となるが、分離株の抗血清を用いた抗原性解析の情報を加味することで、より精度の高いワクチン候補株の選定ができることが示された。その一方、ワクチン種株の選定方法が如何に難しいかということも同時に示されることとなった。引き続き、不活化抗原の免疫実験による応答性の違いやフェレット分子のさらなる探索およびモノクローナル抗体の作製を進める予定である。
KHB1212	穐山 浩 他	香粧品原材料及び添加物の開発のための評価科学に関する研究	香粧品原材料及び添加物は薬事法規制下にあるが、近年、予測不可能な複合経路暴露によるアレルギー疾患等の健康危害の報告が急増している。本研究はこれらの健康危害を未然に防ぐために、産官学共同により、バイオアッセイ等による安全性評価手法と機器分析による品質管理手法の開発が必定である。生化学及び分析化学の両面からの研究アプローチによる総合的な評価手法を検討し、得られた成果・情報を基に、規格基準案を策定する。 ①生理的条件下でBSAとカルミン酸が結合した。②香粧品原材料中の各種金属の分析手法の確立を行った。③香粧品原材料や添加物中に含まれる食物アレルギー物質を免疫化学的手法により検出・定量する手法を構築した。④最近香粧品に添加されることが多い動物性の多糖、ヒアルロン酸について、調査した。⑤品質管理手法の一法として、天然由来の有機化合物、香粧品原料、食品添加物製品のqNMRスペクトルデータを取得した(500品目以上、約700製品)。⑥THP-1を樹状細胞様に分化誘導した細胞を用いてin vitroの抗原感作性の評価系を確立した。⑦ヒト末梢血CD4+T細胞のサイトカイン応答に与える香粧品原材料等の影響を解析した。
KHC1103	望月 直樹 他	血管内皮機能改善に基づく糖尿病性腎症治療薬の開発	本研究では、糖尿病性腎症に対する新規医薬品開発を目指す。近年、糖尿病患者の増加に伴い、合併症の1つである糖尿病性腎症は著しく増加し、年間約 1.3 兆円の医療費を要する血液透析の原因疾患の第一位となっている。医療経済的にもその治療は急務と考え、本疾患の予後改善と患者の生活の質の向上を目指した糖尿病性腎症治療薬としてのasymmetric dimethylarginine (ADMA) 低下薬を開発する。 DDAH 活性を評価する新規評価系を立ち上げ、約15万化合物のスクリーニングを行った。その結果、DDAH1 活性化能を有する可能性のある4化合物(TOA-01～04)を見出した。摘出血管を用いた検討の結果、化合物TOA-03はADMAによる血管弛緩障害に対する改善作用を有する可能性が見出された。生体内においてADMA は腎機能障害に関与する可能性があることから、DDAH1 を制御することが腎症の新たな治療戦略になり得ると考えられる。

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
KHC1104	山本 明彦 他	多価ボツリヌストキソイドワクチンの有効性及び安全性の検討	ボツリヌス中毒症はわが国では稀な疾患であるが、近年大量破壊兵器としてのボツリヌス毒素が注目されている。しかし実際にテロが発生した際に生物兵器の処理にあたる要員の防疫に必要な厚生の準備は皆無である。毒素性感染症の予防にはトキソイドワクチン接種が最も有効であることは疑いない。本研究は2007年に厚生労働研究班の製造したボツリヌストキソイドワクチンの有効性・安全性を実証し、当ワクチンの国内開発・生産の可能性を検証する。 多価ボツリヌストキソイドの今年度4回目接種を終えたで被験者36名に発症防御レベル(0.2 IU/mL 以上)の毒素中和抗体が産生され、副反応の発症率も低かった。本トキソイドは一般及び安全性試験の結果から製造後7年で品質に経時的な変化はほとんど認められなかった。
KHC1213	脇田 隆宇 他	高効率にC型肝炎ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発とその解析	C型肝炎ウイルス(HCV)の新規感染は激減したが、医療関係者や感染者の家族などのハイリスクグループに対する有効なワクチンはない。免疫グロブリンは受動免疫による感染予防の有効な手段である。これまでの研究により、HCVに対するヒト型感染中和抗体の開発に成功している。本研究では感染中和活性のより高いヒト型感染中和抗体を樹立して、免疫グロブリンによるHCV感染防御を目指す。 ①抗体ファージライブラリーから単離したHCV中和抗体は強い感染中和活性を示した。②E2リコンビナント抗原を免疫したウサギからモノクローナル抗体を取得し、感染中和活性を有する抗体があった。③HCV中和抗体に対する耐性ウイルスを取得した。耐性変異を同定した。④TPV3剤併用療法中CH-C患者でB細胞活性化と抗ウイルス状態を解析した。TPV併用3剤療法中のB細胞内は治療開始早期から強い抗ウイルス状態にあることが示唆された。⑤蛍光タグ付加HCVを用いて細胞吸着分子を探索した。侵入阻害剤としての可能性を有する低分子化合物を同定した。
KHC1214	功刀 浩 他	メタボロミクスを活用した統合失調症と気分障害のバイオマーカー開発	平成23年7月より精神疾患は5大疾病の1つに位置づけられた。しかし、うつ病や統合失調症において臨床や健診で実用化されている客観的なバイオマーカーはない。われわれは、メタボロミクスによるバイオマーカー実用化を行っている民間企業と共同し、エタノールアミンリン酸のうつ病バイオマーカーとしての有用性について検証するとともに、豊富なバイオリソース(血液・脳脊髄液)を活用して、新規のマーカーを開発する。 統合失調症、うつ病の血液、死後脳、脳脊髄液のメタボライトの解析から、統合失調症のバイオマーカーとして、ジペプチド分子A、糖鎖修飾分子Bなどが有用であること見出した。うつ病では、脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子Cや細胞保護作用のある分子S、ジペプチドである分子H、血漿中のトリプトファンがバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。昨年度までに統合失調症のマーカーとして再現性のある所見が得られたベタインは、DNAのメチル化を制御している可能性が示唆された。
KHC1215	長谷川 秀樹 他	フラビウイルス粒子様ワクチンの開発	WHO要請のフラビウイルスワクチン開発において、温暖化により猛威をふるうデングウイルス、HS官民共同研究で顕著な成果を得た日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスに関し、感染性ウイルスを用いない新技術によるワクチン開発を官民共同研究を通じて行う。即ち、①ウイルスゲノムを持たず、形態上ウイルスと同等のウイルス様粒子(VLP;Virus-Like Particle)を、②細胞培養系で持続産生させ、③精製VLP抗原を安価な第2世代ワクチンに開発する。④他のワクチン不在ウイルスでも本技術によるワクチン開発を応用する。 (1)発現・分泌されるキメラDENV prM-E抗原の性状をE/E、prM/E、prM/prMサンドイッチELISA及び蔗糖密度勾配遠心法も加え解析した。その結果、①DENVのEはprMと相互に連携して沈降速度の異なる2種の複合抗原を形成でき、②EとMの相互作用で形成される複合抗原は沈降速度が遅く、③DENVの主要中和ドメインをWNVのprM-Eをベースに発現すると沈降速度の遅いキメラ複合抗原が形成されること等を新たに見出した。また、(2)DENV/WNVキメラprM-E発現抗原の精製法を詳細に検討し、Cellufine Sulfateアフィニティーカラム法が有効な濃縮・精製法であることを示した。
KHC1216	倉根 一郎 他	細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性、安全性の評価と生産性向上に関する総合的研究	細胞培養弱毒生痘そうワクチン(LC16m8)は危機管理対策として国家備蓄されている。非特定の国民への緊急及び予防的使用を想定し、臨床疫学研究や各種動物感染モデルを通じて安全性、有効性を検証する。また、同ワクチンの特性を解析する。さらに品質試験方法の精度向上、製造施設の稼働効率の向上を通じた安定生産体制の維持・向上に関する調査研究を実施する。 弱毒生痘そうワクチン株作製過程で得られたウイルス株の全塩基配列を決定し、その製造過程を明らかにした。霊長類を含む動物モデルでの細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8の有効性と安全性に関する研究、実際にヒトで使用された場合の有効性と安全性に関する研究、同ワクチン製剤の生産性の向上に関する研究、等がなされた。本ワクチンが製造されてからの保管期間とワクチン力価、含湿度試験等の成績を約11年間継続して実施し、品質に著明な変化がないことが確認された。これらの研究成果は、我が国におけるバイオテロリズム対策に科学的基盤を提供するとともに、痘そうワクチンの安定的生産体制の維持と生産性向上を達成することに貢献する。

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
KHC1217	保富 康宏 他	遺伝子組換えBCGを用いた新規結核ワクチンの開発	世界三大感染症の一つである結核は、わが国でも毎年2万人以上の患者が発生しており、保健医療分野の重要課題である。唯一のワクチンであるBCGは、小児結核には効果があるが成人の肺結核に対する明らかな予防効果は認められないことから、新規ワクチン開発が急務である。本研究では、このBCGにサイトカイン産生を負に制御しているSOCs蛋白質のアンタゴニストを発現させ、免疫原性を増強することにより、成人にも有効な新規結核ワクチンの開発を目指す。 ①サイトカイン抑制シグナル(SOCs)分子の拮抗分子を発現する組み換えBCG(rBCG-SOCs1DN)を作製した。② rBCG-SOCSDN免疫マウスは結核抗原特異的サイトカインにおいて親株以上の産生が認められた。③ rBCG-SOCSDNは自然免疫のみのマウス(RAG1KO)においても排除されることが確認された。④免疫マウスに結核菌強毒株を接種したところ、rBCG-SOCSDNのワクチン効果は親株以上に長期間持続した。
KHC1218	横田 恭子 他	血球凝集素抗原(HA)の立体構造予測に基づく型特異的および型共通抗インフルエンザウイルス抗体の作成と迅速診断法の確立	東洋紡の多孔性フィルター固相法と化学発光法による高感度検出系に抗H5HA抗体を応用したH5/AB検出キットを感染者検体で評価した結果、AB型診断は既存品より優れていたもののH5HA検出に関しては感度が不十分であった。本研究では、HA立体構造予測に基づいてインフルエンザウイルスを検出する型特異的・型共通抗体を作製し、より感度と特異性の高い検出キットを開発して臨床現場で実用性の高いインフルエンザ簡易迅速診断法確立を目指す。 POCCubeのH5/Aインフルエンザ診断キットに用いた抗H5 HA抗体のエピトープ認識部位の解析により、本キットは広くアジアに流行するH5N1インフルエンザウイルス迅速診断キットとして有用であることが明らかとなった。H5 HA分子上の新規エピトープペプチド配列に立体構造保持フレームを付与すると、ウイルス粒子立体構造を認識する抗体の産生増強効果を認め、更に、T細胞エピトープを付加することにより、ペプチドの免疫原性を飛躍的に高めることが出来た。この様な独自にin silicoデザインされたペプチドに対する抗体の一部は、適当な界面活性剤利用によりPOCCube用のキットとしても構築可能であったことから、我々の手法の将来性が期待される。
KHC1219	浅原 弘嗣 他	miRNAを標的とした関節炎治療の開発	慢性関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)等、関節炎の病態に関与すると考えられるmiRNAについて詳細な機能解析を行い、miRNAを中心とした関節炎の病態に関わる分子ネットワークを解明する。これらの解析を製薬企業、大学機関の協力のもと官民共同研究で行うことにより、miRNAを標的とする関節炎の治療法および新たな診断法の開発を目指す。 関節リウマチおよび変形性関節症の発症に重要であると考えられているTh17細胞および軟骨細胞の分化や機能にかかわる新規のmiRNAを複数同定した。さらにこれらmiRNAの標的遺伝子を分子生物学的手法やバイオインフォマティクス的手法により明らかにし、新規miRNAが抗炎症miRNAであることを見出した。さらに、人工ヌクレアーゼTALENを用いた迅速かつ簡便なノックアウトマウスの作製方法を構築し、これらmiRNAおよびホスト遺伝子のノックアウトマウスの作製に成功した。
KHD1220	阿久津 英憲 他	多能性幹細胞を医薬応用へ活かす生体親和性次世代スケーラブル培養システムの確立	本研究は、次世代医療や医薬開発研究を担うヒトiPS細胞等の多能性幹細胞の細胞性質劣化を阻止したまま大量培養可能な次世代スケーラビリティの構築を、生体親和性・マイクロファブリケーション技術を取り入れ統合的に行う。多能性幹細胞を活かす研究を展開し科学的エビデンスを構築することで、現法の体外培養系が付随する問題点を改善し、新規的多能性幹細胞を指針に組入れ運用を評価するための重要な知見を提供する。 マイクロファブリケーション技術により細胞の足場を造形でき、細胞外マトリックスを選択することで異種成分を使用しない培地でも幹細胞の未分化性が維持できることが示された。安定したscaffoldsは多能性幹細胞研究を行う上で必要不可欠であり、未分化維持が安定的に行える技術が整備できた。パターンニングがあらゆる形状が可能であり、足場を制御することで空間への増殖性も間接的に制御できることが示唆され、今後分化誘導を行う上で有効になる成果が得られた。ヒト多能性幹細胞特異的発現をするmiR302群においてその標的分子を明らかにし、未分化→分化変動における機能でWntシグナル伝達系が働くことを明らかにした。
KHD1221	藤原 成悦 他	臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注を可能とするための基盤整備と第I相臨床試験	本研究では、臍帯血移植後の生着不全と感染症に対し、従来は不可能であったドナーリンパ球輸注(DLI)を可能とするために、臍帯血由来活性化T細胞を用いるDLIの臨床第I相試験を行う。また、関連企業と共同して安全管理法の確立など基盤整備を行うとともに、臍帯血由来制御性T細胞によるGVHD治療の基礎研究を行う。急速に普及しつつある臍帯血移植を安全かつ有効に行うための基盤整備は、厚生労働行政の重要課題である。 リンパ球の無血清培養は、新鮮臍帯血からは可能であったが、凍結臍帯血からは困難であった。第I相臨床試験は無血清培養法が確立された後行うべきと考えられる。培養リンパ球の安全性確保のための迅速ウイルス検査法の改良が進んだ。臍帯血からGVHDに治療に用いるためのiTregを調製するためのプロトコールが確立された。マルチカラーフローサイトメリーによる簡便な制御性T細胞検出プロトコールが作成された。末梢血からウイルス特異的T細胞を調製するプロトコールが作成された。

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
KHD1222	石田 誠一 他	創薬支援に有用なヒト肝 in vitro/in silico代謝・輸 送予測モデルの提案と 薬物動態評価における 実証	レギュラトリサイエンスを担う国立衛研が、ヒト肝in vitro/in silico代謝・輸送予測モデルの提案と薬物動態評価の実証を目的とし、世界をリードする大学研究者と創薬に携わる企業と連携し、評価法の標準化、実用化を視野に研究を推進する。創薬で希求されるヒト肝臓の輸送・代謝・毒性を予測できるin vitro実験法が確立される。日本薬学会でのシンポジウム開催などによる情報発信を通して、創薬プロセス短縮による製薬産業の競争力向上や国民の健康維持に役立つよう社会的にも貢献をしていく。
			新規医薬品候補化合物の薬物動態学的な特徴を創薬の早い段階から捉えるために、ヒトCYP分子種による代謝プロファイルやヒトCYP分子種に対する阻害プロファイルのin silico予測法と薬物トランスポーターの相互作用の予測法の開発・整備を行った。薬物間相互作用のin vivo臨床データを解析することにより(Top-downアプローチ)、in vitroからヒトの予測(Bottom-upアプローチ)の精度を高める必要性が示唆されており、それを支援するためのマイクロプロセスによる三次元培養と肝非実質細胞との共培養の検討を行った。
KHD1223	野村 大成 他	腫瘍等ヒト疾患組織の長期継代維持・保存・データベース化による医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築	Super-SCID (severe combined immunodeficient) マウスを用い、ヒト腫瘍等疾患組織および正常組織の長期継代維持と保存を各組織、腫瘍および病理分類型で行い、創薬研究分野の企業および大学研究者等の参画によりニーズに合致した有効性、安全性評価のための総括的ヒト組織維持システムを官民共同で世界に先駆けて構築することにより、国民の保健・医療・福祉の向上に役立てる。
			ヒト組織移植に最適なSuper-SCIDマウスを用い、ヒト患者由来がん組織等疾患組織120例および正常組織23例の移植を行い、38症例の臨床がん組織の再生可能な形での凍結保存に成功した。移植腫瘍が自然遠隔転移することをマイクロサテライトを用いて確認すると共に、微生物モニタリングも実施し安全性を確認した。これら患者由来の疾患組織に関する、臨床所見、病理所見に加えて、遺伝子変異・発現の変化の調査を開始し、新薬開発における有用性を産学官で検証した。これにより、創薬ニーズに合致した有効性、安全性評価システムの基盤を構築することにより、国民の保健・医療・福祉の向上に役立てる。
KHD1224	梅澤 明弘 他	心不全に対する再生医療と人工心臓による統合治療戦略	先天性心疾患を有する患児の予後は向上したが、術後および合併症による心不全に対する治療法の少なさは著しく、その治療法の開発には薬剤・人工臓器とともに再生医療を集学的に投入することが必要である。本研究では、特に胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来するCD29 ^{high} CD34 ^{low} c-kit ⁺ CD140a ⁺ 細胞に着目し細胞生物学的観点から基盤研究を推進することにより科学的な礎を築き、厚生労働省「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に基づくモデルを提示する。
			本研究では再生医療を薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することが必要であると考え、特に胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来するCD29 ^{high} CD34 ^{low} c-kit ⁺ CD140a ⁺ 細胞に注目し、以下の前臨床研究を推進した。①CD29 ^{high} CD34 ^{low} c-kit ⁺ CD140a ⁺ 細胞のバリデーション、②心筋形成因子を用いた細胞治療戦略、③CD29 ^{high} CD34 ^{low} c-kit ⁺ CD140a ⁺ 細胞に有効なヒト血清分離技術の開発、④小動物による有効性・安全性の検討、⑤ 大動物による前臨床研究、⑥施設バリデーション項目の検討。
KHD1225	佐伯 久美子 他	再生医療技術を駆使した、生活習慣病(虚血性疾患、肥満、糖尿病、高脂血症)の新規病態モデルの開発と創薬研究	本研究は各種のヒト細胞を用いて、厚生労働行政が力点をおく生活習慣病(肥満・糖尿病・高脂血症・動脈狭窄症)の新規疾患モデルを開発するとともに、生理活性物質の単離、化合物ライブラリーのスクリーニング、モノクローナル抗体作製の技術を駆使して創薬研究を展開する。材料として申請者の独自の技術に基づくヒトES/iPS細胞由来分化細胞を用いることに特長があり、従来の研究の壁を乗り越えた新しい創薬研究が推進される。
			本年度は、世界で初めて、ヒトES/iPS細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導する手法を開発した。本手法は、動物由来成分を可能な限り排除した無フィーダー無血清で、分化誘導の効率も高く、安定に大量培養を行うことも可能であった。また、本褐色脂肪細胞は、脂質代謝、糖代謝に対する強力な改善能を有していた。さらに、褐色脂肪細胞特異的細胞表面マーカーの探索も開始した。一方、様々のヒト血管内皮細胞の平滑筋細胞の増殖に対する効果を接触培養と非接触培養の系を駆使して検討し、ヒト初代培養血管内皮細胞、ヒトES細胞由来血管内皮細胞、ヒトiPS細胞由来血管内皮細胞、など、血管内皮細胞の種類によって異なる特徴を明らかにした。
KHD1226	東 範行 他	小児の網脈絡膜の微細構造の把握に関する研究	小児失明・重篤な視覚障害の原因の過半数は眼底疾患で、多数の種類があるにもかかわらず、大部分の原因や病態が明らかでない。近年、画像技術の発達により、無侵襲な生体観察法が開発された。本研究では、この分野で最新鋭技術をもつ企業と共同で、眼底疾患の構造を詳細に把握し、原因や病態の解明、進行防止、治療開発に資する知見を得ることを目的とする。これにより、小児の重症視覚障害で、視力向上と社会参加を可能とし、少子時代の医療・福祉に大きく寄与することができ、厚生労働行政に大きく貢献する。
			広画角眼底撮影と長波長干渉断層計を用いて、小児の眼底検査を行った。おのおのの検査法で新たな解析機能を加えることによって、従来は描出できなかった病像を明らかにすることができた。硝子体や視神経など、従来は観察困難であった組織の病変を把握することができ、網膜電図のような機能検査と組み合わせることによって、病態の解明が大きく進むことが期待される。

課題番号	研究者名	研究課題名	研究概要
			研究成果
財団分担	井口 富夫	創薬技術・戦略に関する調査研究	本年度の創薬技術・戦略に関する調査研究は、「創薬基盤強化の新機軸を探る-核酸医薬の新展開・産学連携の最新動向を中心に-」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、分析する。
			本年度の調査研究は、米国、フランス、オランダ、スペイン、英国の製薬企業、研究機関等を訪問し、1)核酸医薬の進展、2)各国のライフサイエンスに関する産学連携の最新動向、3)大手・中堅製薬企業の経営戦略及び研究開発戦略、の3点に絞って情報収集した。各訪問先から得られた情報をまとめ調査報告書に、1)核酸医薬の現状と課題、2)産学連携をもとにした創薬研究の進展、3)製薬企業における前競争的連携の進展、として総括し、政策提言を行った。
財団分担	山下 剛一	政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究	本年度の政策的に創薬に取り組むべき疾患等の調査研究では、「医療ニーズ」、「将来動向」の調査、および「セミナー」での情報提供を通じて、政策的に創薬に取り組むべき疾患を明らかにし、また、創薬の可能性と課題等について情報収集し、かつ提供するものである。具体的には、①「神経疾患」に関する医療ニーズ調査、②「慢性腎臓病(CKD)の将来動向Ⅱ」の分析、③アンメットメディカルニーズの高い疾患について、創薬の現状と課題を明らかとすべく、セミナーを開催する。
			政策的に創薬に取り組むべき疾患等に関して、調査研究を行い、かつ情報提供した。難病の多い神経疾患について、医療ニーズ調査を行った。また、透析患者数増加の原因である慢性腎臓病について、将来動向調査を行った。さらにアンメットメディカルニーズの高いウイルス感染症疾患、自己免疫疾患について、創薬の現状と課題等についてセミナーを開催し、情報提供した。

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

国立感染症研究所・寄生動物部
野崎 智義

研究要旨 本研究はエイズに伴う重要な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・赤痢アメーバ症の新規創薬に不可欠である新規創薬標的の探索、その代謝経路の同定と機能解明、阻害剤スクリーニングによるリード化合物の獲得を目的としている。3年度は、赤痢アメーバ創薬に関しては、標的であるシステイン・S-メチルシステインの生合成経路のセリンアセチル転移酵素・システイン合成酵素に対する阻害活性の微生物培養抽出液からの探索を継続し、多くの有望化合物を獲得し、一部構造を決定した。更に、これらの酵素の阻害剤のうち数剤が赤痢アメーバのインビトロでの増殖を阻害することを明らかにした。トキソプラズマおよびコクシジウム関連原虫における植物ホルモン、阻害剤の増殖抑制効果の評価を継続した。クリプトスポリジウム症に対する創薬では、標的となる NADH-ユビキノ還元酵素の大腸菌での短縮組換え酵素の生産・活性確認に成功した。以上、最終年度においていずれの分野に関しても成果を挙げた。

研究組織

- | | |
|--------------------|-------|
| (1)国立感染症研究所・寄生動物部 | 野崎智義 |
| (2)北里大学・大学院感染制御科学府 | 塩見和朗 |
| (3)国立感染症研究所・寄生動物部 | 永宗喜三郎 |
| (4)日本生物科学研究所 | 川原史也 |
| (5)弘前大学・農学生命科学部 | 坂元君年 |

A. 研究目的

クリプトスポリジア症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症などの原虫症はHIV/AIDSに随伴する日和見感染症として重要である。これらの原虫感染症の治療・予防法は、極めて限定的であり、HIV感染において十分な治療効果をもつ治療法が存在しないか、治療法が存在しても、治療薬が少ない、薬剤耐性が存在する等の問題が存在する。マラリア・リーシュマニア等の例に限らず、原虫の薬剤耐性株の出現は、原虫感染症に共通した問題であり、持続的にモニターし続けるべき重要な課題である。更に、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。

本研究は、HIV/AIDSに伴うクリプトスポリジア症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症などの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短、中期的目的としている。具体的な創薬実現をめざし、本研究班では微生物の抽出液から抗生物質を単離する天然物化学・有機化学の専門家、寄生虫生化学を専門とする寄生虫学者、創薬・ワクチンを専門とする企業の研究者という異分野の結集により総合的な創薬研究を展開している。

トキソプラズマ症創薬に関しては、コクシジウム綱原虫に選択的に存在する植物ホルモン生

成・代謝経路を阻害する薬剤を既存の薬物群の中から探索し、インビトロ・インビボ試験により最適化合物を選択し、抗トキソプラズマリード化合物を決定しようとしている。赤痢アメーバ症創薬に関しては、システイン・S-メチルシステイン生合成経路の主要酵素システイン合成酵素(CS)とセリンアセチル転移酵素(SAT)を標的として、糸状菌・放線菌の培養液上清から阻害剤のスクリーニングし、構造を決定し、リード化合物を獲得することを目指している。同時に、標的酵素・代謝経路の生理機能を明らかにし、代謝の俯瞰的解析により、代謝全体における役割を解明する。クリプトスポリジウム症創薬に関しては、特徴的な呼吸鎖の重要な作用点であるNADH-ユビキノ還元酵素(ND2)を標的としたスクリーニング・創薬を行うことを目標としている。最終年度もHIV/AIDS随伴原虫症の創薬に関して、年次計画に基づき研究を実施した。

B. 研究方法

1. トキソプラズマ等コクシジア創薬研究

プロピコナゾールおよびビテルタノールはシグマ社から購入した。宿主細胞内で活発に増殖を行うステージであるタキゾイト期に特異的に発現する遺伝子である SAG1 プロモーターの下流に DsRed を、ブラディゾイト期に特異的に発現する遺伝子である BAG1 の下流に GFP を組み込んで、両ステージで異なった蛍光を発するよう設計されたトキソプラズマ株、PLK/DUALを用いて薬剤の原虫に対する効果判定を行った。タキゾイトからブラディゾイトへの分化誘導は通常培養培地から RPMI1640 培地 (1 % FBS, 50 mM HEPES, 0.1 % Gentamicin をそれぞれ添加, pH 8.1) に培地を交換し、通常大気中 37°C において 7 日間培養することによって行った。宿主細胞 (Human Foreskin Fibroblast, HFF) に対す

る毒性は Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて細胞の致死活性を測定することにより行った。

2. コクシジアモデルを用いた創薬

モデル原虫として鶏アイメリア原虫 *Eimeria tenella* のオーシスト期の虫体を使用した。オーシストの継代およびオーシストを用いた感染実験には、3~5 週齢の実験用白色レグホン SPF 鶏 L-M 系 (日生研株式会社) を供試した。感染・経代実験、オーシスト収集、孢子形成、鶏投与法等は分担報告書に詳述した。

薬剤の評価には 1 群あたり 5~10 羽の鶏を使用した。薬剤は剤形に合わせて飲水中に 1,000ppm (0.1%) の濃度で混合して投与した。薬剤投与後 2 日以降に鶏アイメリア原虫のオーシストを 1 羽あたり 1×10⁵ 個を鶏に経口投与して感染させた。オーシスト投与後 7 日目に試験を終了した。薬剤は投与開始から試験終了時まで連日投与した。

3. 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 またはリンゴ酸-キノン酸化還元酵素 MQO 遺伝子を導入した方向性 TOPO ベクター pET151 を発現用大腸菌 BL21 STAR(DE3)に導入し、IPTG 誘導によるタンパク質発現の検討、活性測定法の検討を行った。ND2 は予想されるオルガネラ移行配列部位を除いた短縮型を発現させ、膜からの可溶化、およびアフィニティー樹脂による精製を試みた。MQO は大腸菌にコードンを最適化した人工遺伝子を合成し、発現ベクターを構築した。

4. 赤痢アメーバ創薬研究

標的とする含硫アミノ酸代謝酵素 SAT および CS はそれぞれ 3 種類のアイソタイプ (SAT1~3, CS1~3) があり、それら計 6 種の酵素をコードする遺伝子を導入した組み換え大腸菌 (野崎グループより分与) を用いて常法により His タグ付の各酵素を発現させた。得られた酵素の精製、タンパク定量も常法により行った。96 穴プレートでのアッセイ系は、キュベットを用いた野崎らの方法 (Mol. Biochem. Parasitol. 163, 39, 2009) を改変することにより構築した。CS・SAT 活性測定は分担報告書に詳述した。

北里大学北里生命科学研究so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 10 μ L 用いて、CS1、CS3 および SAT1、SAT3 に対する阻害活性を測定した。SAT を阻害する微生物培養液の一次スクリーニングでは、SAT の活性を 50%以上阻害し、かつカップリング反応に用いている CS1 を阻害しないもの (CS1 阻害率 25%以下) を選択した。CS を阻害する微生物培養液の一次スクリーニングでは CS の活性を 70%以上阻害するものを選択した。

微生物培養液からの阻害物質の精製
スクリーニングで阻害活性を見出した微生物培養液の生産菌 (糸状菌または放線菌) を種培養し、それを各々の化合物生産に適した培地に植菌し生産培養を行った。得られた微生物培養液に EtOH を添加して菌体からも代謝産物を抽出

した後、菌体を遠心分離して除いた。EtOH 抽出液を濃縮後、各種カラムクロマトグラフィーで酵素阻害活性を指標に精製を進め、活性化化合物を単離した。精製法・過程の詳細は分担研究報告書に記載した。

阻害剤の赤痢アメーバインビトロ培養での増殖に対する効果は赤痢アメーバ株 HM-1:IMSS cl6 株を 96 穴プレートを用いた嫌気培養で評価した。1 穴あたり 10,000 の栄養型を植え、48 時間後に細胞数を計測した。詳細は既述の方法に従った (Sato et al., Int. J. Antimicrob. Agents., 35, 56-61, 2010)。増殖活性は WST-1 によるアッセイにて評価した。培養液は 1%の DMSO を含んだ。培養液中にシステインを含有したもの (cys+) とシステインを除いたもの (cys-) を用いた。

(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」(日本学会会議)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

ビテルタノール・プロピコナゾールの効果を検討した結果、ビテルタノールにおいては宿主細胞、ブラディゾイトおよび、タキゾイトとタキゾイトからブラディゾイトへの分化途中の原虫 (プレブラディゾイト) に対する LD50 がそれぞれ 54.5 μ M、32.7 μ M、19.7 μ M であり、プロピコナゾールはそれぞれ 172.8 μ M、47.4 μ M、33.9 μ M であった。また、哺乳細胞毒性の低かったプロピコナゾールの抗ブラディゾイト活性、抗タキゾイト活性、および移行途中の原虫に対する効果を経時的に観察したところ、分化ステージによる顕著な差は認められなかった。

今回見出したプロピコナゾールおよびビテルタノールは、有意にタキゾイト及びブラディゾイトの両ステージの虫体のいずれをも殺滅した。またプロピコナゾールは、哺乳動物細胞と原虫間での選択毒性が 4 倍 (対ブラディゾイト) ~5 倍 (対プレブラディゾイト) とビテルタノールよりも優れていた。殺原虫効果の経時的な観察において、ブラディゾイトとタキゾイトに対する殺原虫作用が類似していたことからプロピコナゾールは両ステージに共通して存在する代謝系を阻害している可能性が示唆された。現在ブ

ロピコナゾールにおける *in vivo* での効果や作用機序の詳細な解析および両薬剤の類縁体を用いた解析を行っている。

2. アピコンプレクサ門原虫に対する抗植物ホルモン薬剤効果の検討

カラギナン、 ι -カラギナンおよびデキストラン硫酸 (Mw500,000) の評価試験の成績は以下の通りである。鶏の増体率の成績では、非投薬感染対照群と比較した時に、カラギナン、 ι -カラギナンおよびデキストラン硫酸 (Mw500,000) の投与群の鶏の増体率は同等か上回る傾向を示した。特にデキストラン硫酸 (Mw500,000) 投与群では、有意差は認められなかったものの、非感染対照群と比べて 5%以上の増体改善効果が確認された。糞便中に排出された新生オーシストの数は、非投薬感染対照群の成績を 100 とした時、カラギナン投与群では 292、 ι -カラギナン投与群では 1,638 およびデキストラン硫酸 (Mw500,000) 投与群では 285 と、全ての投与群において非投薬感染対照群の成績を顕著に上回った。

λ -カラギナン、デキストラン硫酸 (Mw5,000) およびデキストラン硫酸 (Mw9,000-20,000) の鶏の増体率の成績では、非投薬感染対照群と比較した時に、 λ -カラギナン、デキストラン硫酸 (Mw5,000) およびデキストラン硫酸 (Mw9,000-20,000) の投与群の鶏の増体率は同等か上回る傾向を示した。特にデキストラン硫酸 (Mw5,000) およびデキストラン硫酸 (Mw9,000-20,000) 投与群では、有意差は認められなかったものの、非感染対照群と比べて 7%以上の増体改善効果が確認された。糞便中に排出された新生オーシストの数は、非投薬感染対照群の成績を 100 とした時、 λ -カラギナン投与群では 131 およびデキストラン硫酸 (Mw9,000-20,000) 投与群では 224 と、非投薬感染対照群の成績を顕著に上回った。

3. クリプトスポリジウムの創薬研究

昨年度までに検討した *C. parvum* の ND2 の大腸菌における発現条件の範囲をさらに広げた。大腸菌の培養温度、IPTG の濃度、IPTG の添加時期それぞれについて、18-37°C、0-300 mM、大腸菌の OD=0.3-1.0 の範囲で条件検討を行い、培地も LB、2xYT、合成培地等を比較した。培養条件によってはこれまで精製を試みていた SDS-PAGE で発現が強く確認できる主要なタンパク質バンドより少し分子量の大きい位置に別のタンパク質バンドが強く確認された。一方で、ND2 のパン酵母におけるホモログ、NDi1 との配列比較から、NDi1 で報告されているミトコンドリア移行シグナルに相当する部位、31 アミノ酸を除いた ND2-Short1 を作製し、大腸菌で発現したところ、主要な二つのバンドが IPTG により誘導された。全長 ND2 と ND2-Short1 の SDS-PAGE を比較すると、二つの主要バンドのうち、分子量の大きいバンドのサイズが異なっているが、分子量の小さいバンドは

同じサイズであった。このことから分子量の大きいバンドが目的のタンパク質であることが分かった。改めて、全長 ND2 発現株から ND2 の精製のために膜の可溶化を行ったところ、Triton-X-100 やドデシルマルトシドなどの界面活性剤では ND2 はほとんど可溶性画分には現れず、不溶性画分に留まった。この結果は ND2-Short1 でも同じであった。更に、NDi1 の結晶構造を参考に、構造安定化に必須では無いと予想される N 末端アミノ酸を除いた。ND2-Short1 から 16 アミノ酸を除いた ND2-Short2 を作製し、大腸菌で発現させた。ND2-Short1 の場合と同様に分子量の大きいバンドの分子量が更に小さくなった。このタンパク質は 0.5% Triton-X-100 により、容易に膜から可溶化されたため、次の精製に進んだ。Ni-NTA アフィニティーカラムにより目的のタンパク質は精製出来たものの、精製分画には明確な活性は認められなかった。しかしながら、膜を使った活性測定では全長 ND2、ND2-Short1、ND2-Short2 いずれもほぼ同程度の活性を示し、N 末の短縮による失活は見られなかった。阻害剤探索に利用可能な大腸菌として内在性 ND2 の欠損株を利用するために、DE3 株でなくても T7 プロモーター依存の遺伝子発現が可能であるベクター、pTrcHis の利用を計画した。既存の ND2 欠損大腸菌の利用を計画し、ここに導入、発現が可能な pTrcHis-CpND2 を構築した。また、MQO はクリプトスポリジウム由来の塩基配列では大腸菌での発現が全く見られなかったことから大腸菌にコドンをも最適化した人工遺伝子を合成し、発現ベクターに組み込んだ。

4. 赤痢アメーバのシステイン・S-メチルシステイン生合成経路に関与する SAT, CS の阻害剤、微生物抽出液の原虫阻害効果の評価

北里大学の構造既知の化合物ライブラリーから CS の阻害剤として選択された Kerriamycin B, Kerriamycin C, Aggreticin, Xanthofulvin, Tetracycline phosphate complex, Fluorescamine, Diacetylkinamycin C, Setomimycin, Nanomycin, Patulin, Deoxyfrenolicin, Staurosporine の増殖阻害活性を 0.1-100 microgram/ml で評価した。多くの化合物で cys+, cys-いずれでも赤痢アメーバ増殖阻害活性を示した。特に Staurosporine は 0.1 μ g/ml で著明な増殖阻害活性を示した。最も優れた CS1 の阻害剤であった (IC50=1.7 μ M) Xanthofulvin は 100microgram/ml の濃度でも有意な増殖阻害活性を示さなかった。一方、Diacetylkinamycin C, Nanomycin, Patulin, Deoxyfrenolicin は cys+ と cys- で明瞭な増殖阻害曲線の違いが見られ、CS を標的としていることが示唆された。

更に、微生物培養液抽出液から同定された CS, SAT 阻害剤の原虫増殖阻害活性の評価を行った。CS 或いは SAT に阻害活性を示す 245 の糸状菌と 113 の放線菌の培養液抽出液の赤痢アメーバ栄養型増殖阻害活性を評価した。糸状菌抽出液 36-240 のうち 164 と 240 以外はすべて SAT3 に

特異的な阻害抽出液であった。164 と 240 は CS3 特異的阻害抽出液であった。

36 と 197 はもっとも高い原虫増殖阻害活性を示し、>500 倍希釈で極めた高い殺滅作用を示した。一方、147, 162, 164 では cys+, cys-で明瞭な増殖阻害曲線の違いを示し、システイン合成経路を標的としていると認められた。

放線菌抽出液 24, 32 は CS3 の、6, 34, 36, 41 は SAT3 の阻害剤であった。34, 36, 41 はもっとも高い原虫増殖阻害活性を示し、>200-1000 倍希釈で極めた高い殺滅作用を示した。特に 41 は cys+, cys-で明瞭な増殖阻害曲線の違いを示し、システイン合成経路を標的としていると考えられた。

5. 天然化合物ライブラリーからの赤痢アメーバ CS の阻害剤探索、構造活性相関の解明、微生物抽出液からの CS, SAT 阻害剤の探索・構造解析

天然化合物ライブラリーから唯一の SAT 阻害化合物として見出された ascofuranone の類縁化合物を、ascofuranone 生産菌である糸状菌 *Neosartorya* sp. FO-5897 株の培養液から単離し、各 SAT アイソザイムに対する阻害活性を評価した。それぞれ 100 µg/mL の濃度で評価した。Ascochlorin はどの SAT アイソザイムも阻害したが、ascofuranone に比べ、全体に活性が減弱する傾向がみられた。また ascochlorin のデクロロ体である LL-Z 1272ε は SAT3 に対し阻害活性を示さなかった。この結果から芳香族環上のクロル基が SAT3 アイソザイムの阻害に関与していることが示唆された。LL-Z 1272α-epoxide と β はほとんど阻害活性を示さなかった。この 2 種の化合物は脂溶性であるため、溶解性の悪さから、阻害活性を示さなかった可能性がある。培養液中には類縁化合物が他にも含まれているため、それらを単離して構造活性相関を調べる予定である。

次に、微生物培養液のスクリーニングの結果を示す。昨年度に引き続き、SAT1 と SAT3 (相同性 48%) と、CS1 と CS3 (相同性 83%) の各アイソザイム選択的に阻害する微生物培養液サンプルをスクリーニングした。約 5,500 種類の微生物培養液をスクリーニングした結果、今年度も SAT および CS のアイソザイムそれぞれを選択的に阻害する微生物培養液を見出すことができた。昨年と同じ傾向は(1) SAT3 阻害を示す糸状菌サンプルが非常に多かった、(2) SAT、CS とともに、各アイソザイムを選択的に阻害するもののほうが多い、の 2 点であった。また昨年度は糸状菌培養液からより多くの阻害サンプルが見出されたが、今年度は放線菌培養液と糸状菌培養液間で差が見られなかった。さらに今年度は SAT1 と SAT3 の両方を阻害する微生物培養液サンプルが全く見出されなかった。

更に、7 種の糸状菌または放線菌を大量培養し、培養液中に含まれる阻害化合物を各種カラムクロマトグラフィーで精製した。そのうち、*Exophiala* sp. FKI-7032 株、属未同定糸状菌 FKI-7005 株の培養液から CS 阻害化合物を 109

mg 単離し、各種機器分析の結果 exophillic acid (J. Antibiot. 2003, 56, 1018) と同定できた。Exophillic acid の CS1 阻害活性は IC50=19 µM と強くはないものの、CS3 に対する阻害活性は 2,800 µM でも認められず、CS1 選択的な阻害化合物であることがわかった。

更に、属未同定糸状菌 FKI-7005 株が生産する阻害化合物 FKI-7005-1 化合物を 7.0 mg 得た。FKI-7005-1 化合物は FABMS 測定の結果、分子量は 716 と推定され、各種 NMR スペクトルより、放線菌が生産する panosialin に構造が類似していることが示唆された。糸状菌でも、物質生産菌として一般的ではない *Chaetomella* sp. や海洋由来の糸状菌 *Zygosporium* sp. などから panosialin に類似の化合物が単離されており、FKI-7005 株もこれら糸状菌に近い属であると推測された。既報の化合物で分子量が一致するものではなく、新規化合物であると考えている。今後構造を明らかにする予定である。

D. 考察

本研究は、有効な治療薬が存在しない、有効性が低いなどの問題が存在する HIV/AIDS 随伴原虫症の治療薬の開発に不可欠な創薬シーズの発見・標的の証明を目指している。そこで本研究班は、HIV/AIDS 随伴原虫症薬の開発に資する標的代謝経路、酵素のスクリーニングとその生理機能の解析を目的として、異なった研究背景を有する研究者が指し、初年度から 2 年度まで、当初の計画に従いほぼ予定通りの成果を収めてきた。最終年度も特に赤痢アメーバの新規創薬に関しては予想を超えるシーズが多く獲られ、新規創薬が展開している。

塩見らは順調に赤痢アメーバの CS, SAT 阻害剤のスクリーニングを展開し、最終年度にも、既存の構造既知ライブラリーからアスコフラノン・アスコクロリンを SAT 阻害剤として発見するとともに、構造活性相関を一部明らかにした。更に、糸状菌・放線菌の培養液抽出液からも CS3, SAT3 の阻害剤を多く発見し、その一部の構造を明らかとした。特に、exophillic acid、panosialin 関連化合物は今後速やかに赤痢アメーバ細胞に対する効果を検証する必要がある。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に関しては、初-2 年度に逆遺伝学により作出された遺伝子抑圧株を利用した解析により、システイン飢餓下での増殖抑制、酸化ストレス下での必須性が示され、システイン・S-メチルシステイン生合成経路が合理的な創薬標的であることが確認された。

トキソプラズマ創薬研究においては、永宗らは、植物ホルモンやその阻害剤、農薬などのスクリーニングを継続しているが、本年度は急増虫体、緩徐虫体の両ステージに対して有効な 2 種の薬剤 (プロピコナゾールおよびビテルタノール) の詳細な作用ステージを同定した。今後作用機序の解明が優先的な研究項目となる。更にプロピコナゾールにおける動物モデルでの効果、構造類縁体を用いた解析を行う必要がある。

川原らは、発見された原虫薬シードの安全性

の確認を主な目的としているが、これまで実際に安全性を確認するに至った化合物はないため、最終年度はアイメリアをトキソプラズマ・クリプトスポリジウムらの属するアピコプラスト門原虫のモデルとして、カラギナン、 α -カラギナンおよびデキストラン硫酸、 Λ -カラギナン、デキストラン硫酸 (Mw5,000) およびデキストラン硫酸 (Mw9,000-20,000) のトリ感染における、トリ増体率の変化糞便中排出オーシストの定量により、評価し、効果のある化合物を同定した。これらの化合物は鶏の増体率の改善効果とオーシスト数の抑制効果を併せ持つことから、新規薬剤シードとなるかもしれない。

坂元らによるクリプトスポリジウム創薬研究は阻害剤のスクリーニングに供する ND2, MQO の組換えタンパク質の大量調整が難航していたが、最終年度 ND2 の部分欠損変異体 (ND2-Short1、ND2-Short2) の作成と同程度の活性の証明に成功した。一方、MQO に関しては今後更に大腸菌用コードン改変などの工夫によりボトルネックを解決し、今後の阻害剤スクリーニングにつなげる必要がある。

E. 結論

本研究班が目的とする HIV/AIDS に伴う原虫症 (赤痢アメーバ・トキソプラズマ・クリプトスポリジウム) の創薬研究は、特に赤痢アメーバ創薬に関して予定を超える優れた成果を挙げた。薬剤耐性エイズウイルスの出現に鑑み、本研究の成果によ新規抗原虫薬開発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貢献をすることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Soga, T., Suematsu, M., Nozaki, T. Biochemical and functional characterization of novel NADH kinase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 95, 309-319, 2013. (10.1016/j.biochi.2012.09.034)
- Ali, V. and Nozaki, T. Iron sulfur clusters, their biosynthesis and biological functions in protozoan parasites. *Adv. Parasitol.*, 83, 1-92, 2013. (10.1016/B978-0-12-407705-8.00001-X)
- Escueta- De Cadiz, A., Jeelani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One* 8, e74840, 2013. (10.1371/journal.pone.0074840)
- Billar, L., Matthiesen, J., Kuehne, V., Lotter, H., Handal, G., Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Schuermann, M., Roeder, T., Tannich, E., Krause, E., Bruchhaus, I. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics*. 2013 Oct 17. PMID: 24136294. In press
- Makiuchi, T. and Nozaki, T. Highly divergent

mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* 2013. In press

Kawahara, F., Zhang, G., Suzuki, T., Iwata, A., Nagamune, K., and Nunoya, T. Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* in press

永宗喜三郎 「トキソプラズマ症」 IDWR 感染症発生動向調査 感染症週報 2013, 15: 20-25

Kawahara, F., Re-thinking chicken coccidiosis and necrotic enteritis in Japan. *J Jpn Soc Poultr Dis*, 49(S):19-24, 2013

Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, DK., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, EO., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, AL., Harada, S., Kita, K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4580-4585, 2013.

2. 学会発表 (国際学会及び主要国内学会のみ)

- 見市文香, 宮本智文, 原博満, 野崎智義, 吉田裕樹 赤痢アメーバ“マイトソーム”の硫酸活性化経路の生化学的解析 第 86 回日本生化学会大会、日本、横浜 2013 年 9 月 11-13 日
- 見市文香, 宮本智文, 原博満, 野崎智義, 吉田裕樹 赤痢アメーバ“マイトソーム”の硫酸活性化経路の生化学的解析 第 11 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, Oct 2-3, 2013, Nagasaki
- Nozaki, T. Evolution of mitochondrion-related organelles in parasitic protists under anaerobic conditions. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, Oct 28-Nov 1, 2013, Okinawa.
- Nozaki, T. Unique evolution of mitochondrion-related organelles in the enteric protozoon *Entamoeba histolytica*: a potential target for drug development. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim-US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Parasitic Diseases Panel Meeting, Feb 9-12, 2014, Dhaka.
- Nozaki, T. Evolution of mitochondrion-related organelles in parasitic protists under anaerobic conditions. 33rd Yonsei Tropical Medicine Symposium “Recent Progress on Cell Biology of Protozoan Parasites”, Institute of Tropical Medicine, Yonsei University College of Medicine, Feb 20, 2014, Seoul.
- 見市文香, 宮本智文, Ghulam Jeelani, 原博満, 野崎智義, 吉田裕樹 赤痢アメーバマイトソーム硫酸活性化経路の生理的意義の解明