

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

平成23－25年度総合研究報告書

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

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

平成23－25年度総合研究報告書

目 次

I. 総合研究報告

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

ー総合研究報告ー	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 ……	5
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 ……	13
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 ……	16
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 ……	19
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 ……	22
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 ……	27

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 ……	31
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 ……	36
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 ……	41
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 ……	46
KHB1209	安全性評価手法の新機軸:統合型毒性試験	山田 雅巳 ……	52
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 ……	63
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 ……	68
KHB1212	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	穂山 浩 ……	73

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 ……	80
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 ……	85
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 ……	90
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 ……	95
KHC1215	フラビウイルス粒子様ワクチンの開発	長谷川秀樹 ……	100

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	……	103
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	……	112
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	……	117
KHC1219	miRNAを標的とした関節炎治療の開発	浅原 弘嗣	……	120
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	……	125
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	……	128
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	……	132
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	……	146
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	……	151
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	……	155
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	……	160
創薬技術・戦略に関する調査研究		井口 富夫	……	167
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	……	170

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 —総合研究報告—

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

高柳 輝夫

平成23年4月～平成26年3月

研究要旨 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団(HS財団)が実施する創薬基盤推進研究事業は、厚生労働省の研究補助金並びに医薬関連企業から国立試験研究機関等への研究委託費を元に、産官学が一体となって政策創薬分野における基礎及び開発研究の推進を行う、わが国における官民共同型研究を代表する研究事業である。本研究事業では、画期的・独創的な医薬品の創製、先端技術の医療・医薬への応用の実現を目指し、創薬研究等に係る基礎技術向上のための基盤的研究を推進した。

A. 研究目的

本研究事業は、官民共同研究をベースとした研究事業を遂行することにより、保健・医療・福祉関連施策の高度化に資することを目的とし、分子生物学、バイオテクノロジー等の先端科学技術を活用した画期的・独創的な創薬技術の開発、医療現場のニーズに密着した医薬品の開発及び先端的・基盤的な医療技術の開発を目指す。

B. 研究方法

本研究事業は、厚生労働科学研究費補助金と医薬関連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。研究形態は、研究委託費を受ける厚生労働省所管の国立試験研究機関等の研究者と医薬関連企業の研究者が共同で行う官民共同研究とし、必要に応じて大学や研究機関等の研究者も参加する。

平成23年度は、優れた医薬品等の開発に必要なとされる画期的・独創的な共通基盤技術の開発や新規な医療技術の創製を目的に、以下の5研究分野を対象として実施した。

1. 稀少疾病治療薬の開発に関する研究(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ヒト組織・細胞の利用に関する研究

5. 医療上未充足の疾患領域における医薬品創製を目指した研究

平成24及び25年度の研究分野は、希少疾病等医療上未充足あるいは感染症など政策的に対応を要する疾患領域に対する優れた医薬品等の開発推進や新規医療技術の創製に必要な共通基盤技術の開発に繋げるため、以下の4研究分野に絞り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)

研究課題の採択は、外部委員で構成される評価委員会により事前評価を行い、さらに官民共同研究事業に係る重要事項を審議する共同研究委員会で最終評価を行った。研究期間を3年とし、2年目の研究課題については、評価委員会で中間評

価を実施し、継続の可否について共同研究委員会で審議・判断した。また、最終年度の課題は事後評価を実施した。

H S財団が主体となって実施する研究課題「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修講習会を実施した。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を調査・分析した。

C. 研究結果

平成23年度は、官民共同研究が39課題であり、医薬関連企業90社、国立試験研究機関11機関、大学48校、団体・試験研究法人等10機関が参加して共同研究を実施した。平成23年度の終了課題は、研究期間が2年（平成22-23年度）で21及び3年（平成21-23年度）で8であり、計29課題が終了した。

平成24年度は、新たに開始した官民共同研究が26課題、継続が10課題であり、計36課題を実施した。なお、終了課題は6課題であった。平成24年度は、医薬関連企業85社、国立試験研究機関9機関、大学39校、団体・試験研究法人等14機関が参加した。

平成25年度は、官民共同研究が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。

官民共同研究の成果としては、希少疾病・難病・医療上未充足の疾患等企業単独では躊躇する疾患領域の治療薬開発や基礎的検討に産官学共同で取り組み、創薬シーズに係る基礎研究のほか、リード化合物の獲得等今後の開発推進に繋がる基盤づくりを果たした。医薬品開発のための評価科学研究としては、品質管理戦略等のため試験系を確立し、標準化に向けての取り組みを行った。

また、政策的に対応を要する疾患を取り上げ、治療戦略に関する研究を展開し、ヒット化合物の獲得等を果たした。また、政策的に重要なワクチンに関する疫学調査を完遂するとともに新興・再興感染症を標的としたワクチンの開発や安全性評価システムの構築を果たした。医薬品等開発のための先端的技術・方法の開発を目的として、iPS細胞等を用いた再生医療に係る基盤情報の獲得、技術開発、疾患モデル研究を展開した。また、創薬に有用な新たな毒性・薬効・動態評価モデル構築、腫瘍細胞等研究試料の継代システム構築、疾患バイオマーカーの獲得等の成果を得た。以上の研究成果を元に、21件の特許を出願し、また1件について出願準備中である。

H S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、医療ニーズ調査として、2010年度実施の医療ニーズに関するアンケート調査結果の深掘り分析や気分障害・精神疾患に関する調査を、また将来動向調査として、慢性疼痛・慢性腎臓病の将来動向とその詳細分析を実施し、報告書として取り纏めた。また、セミナーでは、神経変性疾患、アルツハイマー病、慢性腎臓病、糖尿病、ウイルス感染症、自己免疫疾患を、また、ワークショップとしてバイオシミラー、がんの個別化医療、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、医薬基盤研究所、国立感染症研究所及び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する基礎研修講習会を開催した。「創薬技術・戦略に関する調査研究」では、以下の3テーマについて、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、情報を収集した。1.「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」、2.「創薬基盤強化の新機軸を探る-オープン・イノベーション、バイオマーカーを中心に-」、3.「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-」。調査結果は、報告書として取り纏めた。

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、研究成果発表会を開催し、全32研究課題の成果を研究者のみならず広く国民に公開・還元した。

D. 考察

HS財団が実施する本研究事業は、厚生労働科学研究費補助金及び民間から国立試験研究機関への研究委託費にて行う本邦における代表的な官民共同研究である。国立試験研究機関が使命とする保健・医療・福祉関連施策の高度化に資する研究開発の展開に際しては、民間企業やアカデミア等との協働が必要とされ、また民間企業にも国立試験研究機関やアカデミア等と共同研究により解決すべき課題がある。本研究事業は、これらの使命や創薬シーズ・医療ニーズを吸い上げ、目的に合致した課題を設定し研究推進を行うことにより役割を果たしてきた。

平成23年度から本研究事業（政策創薬総合研究）が一般公募型となり、HS財団は官民共同研究の運営およびマッチングのための調査研究・セミナーの推進に向けた研究事業を新たにスタートした。平成23年度の研究課題は、以前より3年計画で実施中の継続課題を並行して推進した。平成24年度以降の研究事業（政策創薬マッチング研究事業及び創薬基盤推進研究事業）においては、官民共同研究の特色と目的をさらに明確にし、官民共同研究がより有効に機能するため事業内容の見直しを行い、継続課題を含めて大幅な組み直しを図った。具体的には、研究分野を国立試験研究機関が担っている機能に整合させてマッチング研究の一層の充実を図るため、希少疾病や難病等有効な治療法が無い疾患領域、新興・再興感染症等社会的に波及効果が大きく政策的に対応を要する疾患、再生医療等新たな医療技術への対応、これらの研究開発を進める上で欠くことのできない新しい評価科学的手法の開発研究の4分野に整理した。さらに、平成23年度で21課題を研究期間2年で一旦終了させ、平成24年度か

らは、研究期間を2年間とする研究課題を募集し26課題を採択し、政策創薬マッチング研究事業として新たにスタートした。採択に際しては、研究内容の質的評価のみならず官民共同研究である必然性や研究体制などの評価を行い、具体的な成果が期待できる研究課題のみに厳選した。

希少疾病や難病は、その原因究明が進まないこと、医薬品開発リスクが高く市場性が低いこと等から、製薬企業の多くは本疾患群に対する取り組みを躊躇している。本研究事業では、国立試験研究機関が担うべき重要な役割の一つであるこれらの疾病に関する基礎的・基盤的取り組みと医薬関連企業が有する開発に関するノウハウをマッチングさせ、研究開発を進展させる場を提供した。本研究事業では、疾病の病態解明、新規ターゲットの探索やヒット化合物獲得に向けた取り組み等により、これらの疾患群に対する今後の医薬品開発における基盤作りを果たせた。また、医薬品等に係る品質管理戦略は、医薬品関連企業にとって重要な課題である。本研究事業では、「医薬品開発のための評価科学に関する研究」の分野を設定し、本課題に取り組んだ。バイオ医薬品、天然物等では品質基準の設定が困難であり、この課題解決に向け産官学共同研究を通じて評価手法の開発と標準化に向けた取り組み、ガイドライン策定や政策提言等が出来たことは本研究事業の重要な成果である。社会不安に繋がる疾患や政策的に対応を要する疾患に対しての取り組みも精力的に行った。感染症等に対する治療戦略、ワクチンの開発及びその有効性・安全性に関する検討、危機管理のための対応、疫学調査を完遂するとともに、生産体制の維持向上や品質管理に対する官民共同研究に参画した企業の貢献も大きかった。医薬品等開発のための先端的技術・方法の開発としては、創薬に有用なツールである毒性・薬効・動態評価系の構築に動物のみならずiPS細胞等を取り入れ、その汎用性・有用性の検証や標準化を進めた。これは、産官学がそれぞれの役割を十分に果たした相乗効果により達成したものである。その他、iPS細胞等を用いた再生医療や先端的医療

技術の開発に取り組み、多くの成果を得た。

研究成果の国民への普及・還元は、個別課題の学会等での発表、論文投稿、特許出願の他、研究成果発表会の開催により行った。

HS財団は、医療ニーズ等の調査研究やセミナー等の情報提供を通じて、企業ニーズと研究シーズのマッチング環境を提供すると共に、官民共同研究を推進した。調査研究・情報提供等の活動においては、「政策的に取り組むべき疾患等の調査研究」と「創薬技術・戦略に関する調査研究」を二つの軸として、各年度の活動がそれぞれ段階的に進展する3年計画で実施した。政策的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として医療上未充足の疾患について創薬の現状・課題等について調査し、情報提供した。セミナー・ワークショップでは、先端医療に関わる課題や政策的に取り組むべき疾患に焦点を当てた情報提供を行う観点から、テーマを選択した。また、厚生労働省所管の国立試験研究機関の研究を医薬関連企業の研究者等に広く紹介する基礎研究講習会は、官民共同研究のマッチングを推進させる役割を果たした。創薬技術・戦略に関する調査研究では、欧米各国の医薬関連企業、研究・医療機関、行政機関等を訪問し、最新の医薬品産業の動向・開発戦略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。調査結果を元に、本邦における医薬品開発に関する方向性について政策提言として纏めた報告書を刊行した。

E. 結論

本研究事業は、国立試験研究機関等と民間企業との官民共同研究方式であり、評価技術の開発及び創薬・医療分野での共通基盤の整備に向けて、有望な官民共同研究課題を設定し、効率的に推進した。本研究事業で得た研究成果は、論文投稿や特許出願を介して発信し、創薬研究等に係る基礎技術向上等に寄与した。

HS財団が実施した調査研究・情報提供等の活動では、「政策的に取り組むべき疾患等の調査研

究」と「創薬技術・戦略に関する調査研究」を軸として展開し、医療ニーズ等の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の整備に貢献した。

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24年度(2012年度)国内基盤技術調査報告書「気分障害に関する医療ニーズ調査」(財)ヒューマンサイエンス振興財団、平成25年3月19日 92ページ
2. 平成24年度(2012年度)将来動向調査 報告書「慢性腎臓病(CKD)の将来動向」(財)ヒューマンサイエンス振興財団、平成25年3月19日 99ページ
3. 平成24年度(2012年度)国外調査報告書「創薬基盤強化の新機軸を探るーオープン・イノベーション、バイオマーカーを中心にー」(財)ヒューマンサイエンス振興財団、平成25年3月19日 128ページ
4. 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
5. 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
6. 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ー核酸医薬の最新動向を中心にー」(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

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

平成23年4月～平成26年3月

研究要旨 本研究はエイズにしばしば随伴する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・赤痢アメーバ症に対する新規創薬を目指し、化合物ライブラリーと微生物培養液抽出物ライブラリーを用いた阻害剤の探索、新規創薬標的の探索、標的代謝経路・酵素の生理機能の解明を目的とした。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を数多く微生物培養抽出液からの同定し、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。また、構造既知のライブラリーからも阻害剤を同定した。トキソプラズマおよびコクシジウム関連原虫の創薬に関しても、植物ホルモン、植物ホルモン様化合物の中から、トキソプラズマやアイメリアの増殖抑制・殺滅効果を示す化合物を同定した。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、本研究はエイズ随伴原虫感染症のいずれの疾患に関しても十分な成果を挙げた。

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に伴う赤痢アメーバ症、クリプトスポリジア症、トキソプラズマ症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。

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。トキソプラズマや関連のコクシジア感染症創薬に関しては、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合成・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。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た。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ創薬研究

96 穴プレートでの含硫アミノ酸代謝酵素 SAT および CS 阻害測定系は、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。SAT および CS の 3 種類のアイソザイム (SAT1-3, CS1-3) を全てまたは選択して用いて、微生物代謝産物ライブラリー (100 mg/mL) と糸状菌および放線菌の培養液 (10 mL/ウェル) の阻害活性を測定した。

阻害活性を認めた微生物培養液は、大量に生産培養を行い、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、阻害化合物を単離した。

2. 赤痢アメーバの標的の生理機能の解明

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 $\mu\text{g/ml}$ 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様な薬剤耐性を示した時点で、選択を完了した。

3. トキソプラズマ等コクシジア創薬研究

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 PTG 株と BALB/c マウスを用いた。薬剤効果は、チジアズロンを 12 日間にわたり毎日腹腔内投与し、効果は、マウスの生存率を 20 日間観察し評価した。

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。

4. 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* Nt-P110 株を使用した。継代・虫体・オーシストの分離・脱囊・精製等は常法に従った。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。薬剤の評価には 1 群あたり 5~10 羽の鶏を使用し、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 1×10^5 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。質量分析は常法に従った。

5. クリプトスポリジウム創薬研究

C. *parvum* 由来 NADH-ユビキノン還元酵素 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。

(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

微生物代謝産物ライブラリー 316 化合物のうち、10 化合物が CS1-3 を 50% 以上阻害し、ascofuranone のみ SAT1-3 を 50% 以上阻害した。いずれの阻害もアイソザイム選択性はなかった。微生物培養液は 2 年間で計 12,265 サンプル(糸状菌 6,400、放線菌 5,865)をスクリーニングして、SAT 阻害 369 サンプル、CS 阻害 361 サンプルを見出した。その中から CS 阻害化合物として、xanthofulvin、exophillic acid、panosialin 類縁化合物を単離した。

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。糸状菌抽出液で SAT3 または CS3 を特異的に阻害する抽出液のうち 5 剤が高度の原虫増殖阻害を示し、うち 3 剤はシステイン・S-メチルシステイン合成経路を標的としていると認められた。

原虫増殖阻害活性を示した放線菌抽出液 CS3 または SAT3 の阻害剤は 4 剤であった。そのうち 1 剤がシステイン合成経路を標的としていると考えられた。

2. 赤痢アメーバ標的の生理機能の解明

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)。Gene silence 法により作成した発現抑制変異体のそれぞれの遺伝子

の発現を確認したところ、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 遺伝子抑制株では CS1-3 が同時に抑制されていた。これらの発現抑制体のインビトロでの増殖を通常の BI-S-33 培地内で観察したところ、SAT1/2, SAT3, CS1-3 抑制株での増殖に相違はなかった。一方システインを含まない培地では、SAT3 抑制株において軽微な、CS1-3 抑制株において重度の増殖抑制が見られた。この結果は SAT1/2 と SAT3 とで機能的な棲み分けがあることが、更に、CS がシステイン飢餓下での赤痢アメーバ栄養型の増殖に必須であることが示された。

3. 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

サイトカイニンのうち、高等植物が産生し、またトキソプラズマも産生するトランス-ゼアチンにより、トキソプラズマのタキゾイトの増殖は有意に上昇した。一方で肥料として用いられている合成サイトカイニンのチジアズロンは増殖を有意に減少させた。また、チジアズロンの抗トキソプラズマ効果はマウスを用いた感染実験でも証明された。休眠ステージであるブラディゾイトに対する植物ホルモンやその阻害剤、農薬など 28 種類の薬剤のスクリーニングの結果、トキソプラズマ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）を見出した。

プロピコナゾールおよびビテルタノールの効果を詳細に検討した結果、両薬剤は、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（対タキゾイト）とビテルタノールよりも優れていた。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および抗タキゾイト活性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。したがって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。

4. 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

アイメリア原虫から質量分析で 41 種類の植物ホルモンおよびそれらの関連物質の検出を行った結果、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）が検出された。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。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）については検出されなかった。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 の増加が確認できた。サリチル酸 (SA) およびオーキシ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した。IAA の代謝物とされるインドール-3-アスパラギン酸 (IAAsp) も脱囊処理後に増加した。SA、IAA および IAAsp 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かった。

2,4-D、グリフォサート、カイネチン、チジアズロン、塩化クロロコリン、ジベレリン酸、ナフタレン酢酸パクロブトラゾール、プロクロラズ、ビテルタノールおよびポリオキシンのアイメリアオーシスト排出に対する効果を評価した。グリフォサート、カイネチン、チジアズロン、塩化クロロコリン、ジベレリン酸、ナフタレン酢酸、ポリオキシンにオーシスト排出の抑制効果が確認された。

更に植物ホルモンおよび抗植物ホルモン阻害剤の脱囊への効果を検証し、天然オーキシンであるインドール酢酸 (IAA) および合成オーキシンであるナフタレン酢酸 (NAA) は、ともに脱囊を顕著に促進し、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、脱囊が顕著に抑制した。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 ヘミ塩酸塩の処理では、ともに脱囊が完全に抑制された。

5. クリプトスポリジウムの創薬研究

Cryptosporidium parvum の膜タンパク質 NADH-ユビキノ還元酵素(ND2)の組換えタンパク発現の至適化に成功した。ND2 の N 末端の短い変異体酵素を段階的に作製し活性の追跡と可溶化、精製条件の検討を行った結果、N 末端欠損は活性に影響を与えないことが明らかとなった。N 末端を短くすることで初めて大腸菌の内膜からの効率的な可溶化が可能になった。しかし、ND2 は精製後の活性が不安定であり、活性を保った状態での精製には更なる検討が必要である。精製酵素は活性測定には不十分な安定性であったが、生理機能解明の有用な抗体作製が可能となった。ND2 はゲノム情報から見出されただけであり、原虫での発現量、局在を調べることが必要である。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が、精製酵素標品の作出に達しなかった。

D. 考察

HIV/AIDSに付随する原虫症の治療薬に関しては、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。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た。

赤痢アメーバ症の創薬に関してはめざましい成果を挙げた。塩見らの構造既知のライブラリーからのスクリーニングでも、糸状菌・放線菌の培養抽出液からのスクリーニングに関しても、CS, SATそれぞれ二種類のアイソエンザイムに対する阻害剤・阻害抽出液いずれからも多くのCS, SAT阻害剤候補化合物が発見された。天然物ライブラリーから発見されたCS阻害剤Naphthacemycin A₉および糸状菌培養液上清から精製されたCS阻害剤Xanthohofulvinはいずれも既知の化合物であったが、今後赤痢アメーバ細胞に対する効果、動物感染実験での治療効果などを検証する必要がある。最終年度構造活性相関の示されたアスコフラノン・アスコクロリン等は抗アフリカトリパノソーマを目的として創薬研究が国内で展開しており、今後新規関連化合物が得られ、抗アメーバ創薬に利用出来る可能性がある。更に、最終年度見出したCS阻害化合物のうち、ナフトキノン骨格を持つものが強い阻害活性を示し、CSの補酵素であるピリドキサル5'-リン酸 (PLP) のアンタゴニストとしての作用が予測された。更に、微生物培養液からは、各アイソエンザイム選択的な阻害を示すexophillic acid、panosialin関連化合物等が得られた。今後酵素-阻害剤共結晶構造解析を行い、構造の理解に基づく誘導体化研究を続けていく必要がある。

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、CS 1-3, SAT1,2またはSAT3を別々に抑圧した遺伝子抑圧株の作成とこれらを用いた表現型解析により、システイン飢餓下での増殖抑制が観察され、本経路の酸化ストレス下での必須性が示された。これにより、本経路、その関連酵素(CSおよびSAT)が選択的・合理的な創薬標的であることがあらためて確認された。今後CS, SAT発現抑制形質転換体を用いたメタボローム解析により代謝における本経路の役割を俯瞰的に理解することが必要である。

トキソプラズマ創薬研究においては、植物ホルモンやその阻害剤、農薬など約30種類の薬剤をスクリーニングし、トキソプラズマの急増虫体、緩徐虫体の両ステージに対して有効な薬剤(プロピコナゾールおよびビテルタノール)を同定した。重要な点は両薬剤ともに、急増虫体、緩徐虫体、シスト化虫体のいずれにも有効であったことである。今後これらの薬剤の作用点の解明、動物試験での有効性の確認、誘導体化研究が重要である。

更に、植物ホルモンやその合成経路が原虫薬創薬の合理的標的であることを一般化するために、トキソプラズマ・クリプトスポリジウムら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た解析を行い、トリ感染の原因となるアイメリア感染における糞便中オーシスト排出が試験に供した11薬剤のうち、ジベレリン酸とナフタレン酢酸は、顕著な鶏の増体率の改善効果と新生オーシ

スト数の抑制効果を併せ持つことを示した。創薬の有望なリード化合物になることが示唆された。

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、今後の酵素の性状解析、阻害剤スクリーニングにつなげる予定である。

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)の創薬研究はいずれの感染症に対しても成果を挙げた。特に赤痢アメーバ創薬に関しては当初の計画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、本研究の成果により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

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.

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.

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
- 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 トキシン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
- 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
- Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y.-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, K., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K., and Ōmura, 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
- Jeelani, G., Sato, S., Husain, A., Escueta-de Cadiza, A., Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. PLoS ONE 7, e37740, 2012.
- Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. Biochimie. 94, 1676-1686, 2012.
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1831, 2012.
- 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 2012, 7(3), e32246
- 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 2012, 58: 24-28
- Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S., Kita, K. (2012) Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* J Biochem 151, 589-592
- Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K., Kita, K. (2013) Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide- insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. The J Biochem 153, 267-273
- Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S., Kita, K. (2013) Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum* - A parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle. Gene 516, 39-47
- 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)
- 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 トキシンプラズマ症 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

- 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. 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、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
- Nozaki, T. Evolution of function and import machinery of the mitochondria under anaerobic conditions: Highly divergent mitochondrion-related organelles in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. Mito 21012, Heraklion, Greece, May 9-13, 2012.
- Jeelani, G., Dan, S., Husain, A., Escueta-de Cadiz, Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolome of encystation in *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.
- Chiba, Y., Dan, S., Makiuchi, T., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Organelle metabolomics of *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.
- Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 11-14, 2012.
- Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting. Bangkok, Thailand, Dec 12-14, 2012.
- 野崎智義 寄生生物ミトコンドリアの特性～嫌気環境下における多様化. J-mit, "Mitochondrial Diversity: shall we find out her multiple faces" (日本ミトコンドリア学会), Tsukuba, Ibaraki, Dec 19-21, 2012.
- Mori, M., Masuda, Y., Kasai, R., Masuma, R., Takahashi, Y., Nozaki, T., Shiomi, K., Omura, S. Inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase and serine acetyltransferase discovered from secondary metabolites of microorganisms. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
- 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 2013 年度大会
仙台 March 24-27, 2013.
- 坂元君年 ミトコンドリア呼吸鎖の低酸素適応第
日本農芸化学会東北支部第 13 回若手の会
平成 24 年 10 月
- Nagamune, K., Andrabi, S.B.A., and Matsubara,
R. Apicomplexan parasites and plant
hormones. Protist 2012, July 2012, Oslo
- 松原立真、永宗喜三郎 アピコンプレクサ生物
の植物ホルモンの生理機能 第 45 回日
本原生動物学会大会 2012 年 11 月、兵庫県
姫路市
- 松原立真、永宗喜三郎 “マラリア原虫が持つ植
物ホルモンの網羅的検出と機能解析” 第 1
回日本細胞共生学会若手の会 2012 年 11 月、
下田
- 川原史也 鶏壊死性腸炎実験モデルの構築 茨
城県鶏病研究会 技術研修会、2012 年 8 月
- 松原立真、川原史也、小嶋美紀子、田原美智留、
Andrabi Syed Bilal Ahmad、福士路花、山野
安規徳、榊原均、永宗喜三郎 マラリア原
虫における植物ホルモンの網羅的検出と機
能解析 第 82 回日本寄生虫学会、2013 年
3 月
- 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
第 6 回寄生虫感染免疫研究会、日本、立山
2014 年 3 月 8-9 日
- 酒井一成、森 美穂子、野崎智義、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 2014 年度大会 東京 March
27-30, 2014.
- Nagamune, K. Extracellular Maturation in
Toxoplasma gondii of Plant-like Vacuoles,
Essential Organelles of Apicomplexan
Parasites. International Symposium on
Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic
Cells, July 2013, Kyoto
- 山野安規徳、永宗喜三郎 シストにも有効な抗
トキソプラズマ薬シード 候補の探索” 第
21 回分子寄生虫学ワークショップ 2013 年
8 月、神戸
- Tahara, M., Fkshi, M., Sakura, T., Matsubara, R.,
Yamano, A., Yamagishi, J., and Nagamune,
K. Primaquine-resistance in *Toxoplasma
gondii* is associated with the mutations in
chloroquine resistance transporter (CRT),
which are different from chloroquine
resistance in *Plasmodium falciparum*.
Molecular Parasitology Meeting XXIV,
Woods Hole, MA, USA, September 2013
- 坂本寛和、永宗喜三郎、北 潔、松崎素道 アフ
シシン酸生合成阻害剤フルリトンは貝類寄
生虫 *Perkinsus marinus* の増殖を阻害する
第 77 回日本植物学会 2013 年 9 月、札幌
- 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal
Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山
野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 寄生性原
虫が産生する植物ホルモンの機能解析 第
2 回日本細胞共生学会若手の会 2013 年 9
月、京都
- 松原立真、小嶋美紀子、田原美智留、Syed Bilal
Ahmad Andrabi、福士路花、川原史也、山
野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 寄生性原
虫が産生する植物ホルモンの機能解析 第
46 回日本原生動物学会大会 2013 年 11 月、
広島県東広島市
- 永宗喜三郎 寄生・共生におけるゾンビ化機構
の分子生物学的解析 第 36 回日本分子生物
学会 2013 年 12 月、神戸
- 川原史也、鶏コクシジウム症と壊死性腸炎を再
考する、平成 25 年度秋季全国鶏病技術研修
会、2013 年 10 月
- 川原史也、鶏コクシジウム原虫の分子標的、動物
用ワクチン-バイオ医薬品研究会、2013 年 9
月
- 前善之、松崎素道、北潔、Fevzi Daldal、坂元君
年 α -プロテオバクテリアにおけるユビキノ
ン生合成関連モノオキシゲナーゼ ubiF,
ubiH の判別 第 86 回日本生化学会大会 平
成 25 年 10 月
- 福士実咲、柴谷恵太、Hendri Aldrat、北潔、
Fevzi Daldal、坂元君年 *Rhodobacter*

capsulatus と Rhodospirillum rubrum 間での
キメラ型コハク酸□ユビキノン還元酵素の
作製 第 86 回日本生化学会大会 平成 25
年 10 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

プロテインノックダウン法を基盤とする創薬研究

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部

内藤 幹彦

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 エストロゲン受容体 (ER)、BCR-ABL 等を標的とする各種 SNIPER 化合物をデザイン、合成し、標的タンパク質分解活性を評価した。SNIPER(ER)は ER タンパク質のプロテアソームによる分解を引き起こし、乳がん細胞にネクロシスを誘導した。

研究組織

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部
内藤幹彦、柴田識人、服部隆行
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部
栗原正明
- (3) 東京大学医科学研究所 井上純一郎
- (4) 同志社大学生命医科学部 西川喜代孝
- (5) 武田薬品工業(株) 化学研究所 長展生

A. 研究目的

癌治療における選択的キナーゼ阻害剤など、病気の原因となっているタンパク質の機能を阻害する分子標的治療薬の開発が近年盛んに行われている。しかし治療の標的となるタンパク質の中には、病態と関連する酵素活性がないために阻害剤を開発しにくいタンパク質もあり、新しい作用機序をもった画期的医薬品の開発が望まれている。病気の原因となっているタンパク質を選択的に分解する事ができれば、従来にない新しい医薬品を創製できると考えられるが、タンパク質の分解を選択的に制御する技術は国内外ともにほとんど研究が行われていない。

課題責任者らは、独自に分子デザイン・合成した低分子化合物を使って、標的タンパク質を特異的にユビキチン化し、プロテアソームで分解するプロテインノックダウン法を開発してきた。このプロテインノックダウン法は、ユビキチンリガーゼ cIAP1 に結合する小分子 (BS) と標的タンパク質に結合するリガンド (X) とのハイブリッド化合物 (BS-X) で両タンパク質を架橋し、標的タンパク質を特異的にユビキチン化するという独創的な作用機序に基づいている。原理的には、リガンド (X) を置換することにより様々なタンパク質

の特異的分解に応用できる汎用性の高い技術である。

本研究では主に Proof of Concept を目的として、プロテインノックダウン技術を基盤とした創薬研究を行う。具体的には、標的タンパク質と結合するリガンドを利用して新しい SNIPER 化合物を開発し、そのプロテインノックダウン活性を *in vitro*、*in vivo* で測定し医薬品候補化合物としての評価を行う。適当なリガンドが見つからない標的タンパク質に対しては、新規結合リガンドの探索を行う。

本研究の最終的な目標は、病原性タンパク質を分解する新しい作用機序の新規医薬品を開発する事であるが、研究期間内にはエストロゲン受容体 (ER)、BCR-ABL 等を標的とする各種 SNIPER を合成し、その活性を評価する事、及び NF κ B シグナル制御因子や BCR-ABL と結合する新規リガンドを探索する事を主な目的とした。

B. 研究方法

SNIPER の分子デザインと化学合成

ER と 4-ヒドロキシタモキシフェンの共結晶 X 線解析図から、ジメチルアミノ基にアルキルリンカーを介してベスタチンを繋いだ分子を設計し、7 ステップで SNIPER (ER) を合成した。他のタンパク質を標的とする SNIPER についても、結晶構造やリガンドの構造活性相関等を参考に分子をデザインし、合成を行った。(主に国立医薬品食品衛生研究所、武田薬品工業で実施)

SNIPER の活性評価

ヒト乳癌細胞由来 MCF-7 等を用いて、

SNIPER 処理による標的タンパク質の減少をウェスタンブロッティングにより評価した。また、標的タンパク質の分解機構及び細胞死の分子機構を生化学的、分子生物学的手法で解析した。(主に国立医薬品食品衛生研究所、武田薬品工業で実施)

リガンド探索

大腸菌又はバキュロウィルスを用いて標的とするタンパク質ドメインのリコンビナントタンパク質を調製し、結合する小分子リガンドを様々な系を利用して探索した。(主に国立医薬品食品衛生研究所、東京大学、同志社大学で実施)

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、カルタヘナ法を遵守し、各課題分担者が所属する研究機関の遺伝子組換え実験安全管理規則等に則って実施した。動物実験は、動物愛護法を遵守し、各課題分担者が所属する研究機関の動物実験規則に則って実施した。

C. 研究結果

SNIPER の合成と活性評価

リンカー長の異なる SNIPER(ER)を各種合成し、その ER 分解活性を評価した結果、特に炭素数 6 のアルキルリンカーを持つ SNIPER(ER)が最も強い活性を示した。次に、ER の分解がユビキチン-プロテアソーム系を介して起きているかどうか確かめるために、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた系とユビキチンリガーゼをノックダウンした系での ER 分解評価を行った。その結果、どちらの系においても ER の分解が抑制されたことから、SNIPER(ER)は化合物デザインの際に想定した通り、cIAP1 によるユビキチン化を介して ER のプロテアソームによる分解を引き起こす事が明らかになった。

SNIPER(ER)で処理した MCF7 細胞は短時間で細胞死を起こしたが、プロテアソーム阻害剤で ER の分解を阻害すると細胞死も阻害された。一方、ER を発現していない U2OS 細胞を SNIPER(ER)で処理しても細胞死は起こらなかった。また細胞死に伴ってカスパーゼ活性化は見られず、ネクローシスマーカーとして知られる HMGB1 タンパク質の漏出が見られた。

ネクローシスによる細胞死では多くの場合 Reactive Oxygen Species (ROS) が関与する

事が知られている。そこで SNIPER(ER)処理による ROS 産生を調べた結果、MCF7 細胞では SNIPER(ER)処理によって ROS の産生が顕著に誘導されたが、U2OS 細胞ではわずかな産生しか認められなかった。この MCF7 細胞での SNIPER(ER)による ROS 産生は MG132 処理によってほぼ完全に阻害された。一方、ROS スカベンジャーである NAC によって SBIPER(ER)処理によるネクローシスは阻害されたが、ER の分解はほとんど阻害されなかった。これらの結果から、SNIPER(ER)は MCF7 細胞などの乳がん細胞でプロテアソームによる ER の分解を誘導し、その後 ROS 産生を惹起してネクローシスを引き起こす事が明らかになった。

上記と同様な方法で、アンドロゲン受容体、TACC3、BCR-ABL 等を標的とする SNIPER を合成してその活性を評価し、in vitro で良好なプロテインノックダウン活性を示す化合物を複数見出した。

新規リガンド探索

BCR-ABL、EML4-ALK、TRAF6 等と結合するリガンドを探索するために、BCR-ABL の Oligo ドメイン、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン及び PH ドメイン、EML4-ALK の ALK ドメイン、TRAF6 の TRAF-C ドメイン等のリコンビナントタンパク質を大腸菌又はバキュロウィルス大量発現系で調製した。これらのタンパク質を利用して各種スクリーニング方法で結合リガンドの探索を行い、標的タンパク質との結合活性を示す新規リガンドを複数見出した。

D. 考察

SNIPER(ER)は ER の分解を誘導したが、メチルベスタチン、4-ヒドロキシタモキシフェン単体、あるいはその混合物では ER の分解は誘導されてなかったことから、ベスタチンと 4-ヒドロキシタモキシフェンをつなぐことで初めて ER 分解が誘導されることが明らかとなった。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 やユビキチンリガーゼをノックダウンした実験により、ER は cIAP1 によるユビキチン化を介してプロテアソームによって分解される事が明らかになった。興味深い事に SNIPER(ER)は乳がん細胞で ER 分解を引き起こした後 ROS 産生を惹起してネクローシス様の細胞死を誘導した。SNIPER(ER)の細胞死誘導活性はタモキシフェンよりもはるかに強力であり、新しい乳がん治療薬としての SNIPER(ER)の可能性を示唆している。活性の強い SNIPER(ER)

について、現在 in vivo での活性評価を検討しており、まだ予備検討の段階ではあるが良好な活性を得ている。

ER 以外の標的タンパク質を分解する SNIPER についても順次その活性評価と分解機構の解析を進めており、研究計画はほぼ当初の予定通り順調に進んだ。

リガンド探索によって見つかった新規リガンドについては、標的タンパク質との結合活性の最適化、構造活性相関解析等を行った後、親和性の高いリガンドを利用して SNIPER 分子をデザインし、合成と活性評価を行う予定である。

E. 結論

2 年間の官民共同研究で、ER をはじめとする複数のタンパク質を標的として、プロテアソームでの分解を誘導する各種 SNIPER 化合物の開発に成功した。SNIPER(ER)は、乳がん細胞における ER の発現そのものを減少させた後、がん細胞を細胞死に導くことから、乳がんに対する新たな治療薬開発につながる事が期待される。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表 (総発表件数4件)

Demizu Y, Okuhira K, Motoi H, Ohno A, Shoda T, Fukuhara K, Okuda H, Naito M, Kurihara M. Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. *Bioorg Med Chem Lett* (2012) 22: 1793-6.

Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami T, Okuda H, Kurihara M, Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor- α and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer Sci* (2013) 104: 1492-8.

T. Shoda, K. Okuhira, M. Kato, Y. Demizu, H. Inoue, M. Naito, M. Kurihara, Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 24, 87-89 (2014)

2. 学会発表(総発表件数 13 件)

Naito, M., Okuhira, K., Demizu, Y., Itoh, Y., Ishikawa, M., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Nishimaki-Mogami, T., Kurihara, M., Hashimoto, Y.:Development of small molecules that induce IAP-mediated ubiquitylation and proteasomal degradation of target proteins in a specific manner. Cell Symposia: Genetics and Chemistry Sharing a Language of Discovery (2012 年 5 月)

奥平桂一郎, 大岡伸通, 最上(西巻)知子, 伊藤幸裕, 石川稔, 橋本祐一, 内藤幹彦: 細胞内に局在するタンパク質を標的としたプロテインノックダウン技術の評価. 日本薬学会第 133 年会(2013 年 3 月)

加藤雅士, 正田卓司, 井上英史, 服部隆行, 内藤幹彦, 栗原正明, 細胞膜透過性蛍光 NTA の設計・合成, 日本薬学会第 133 年会(2013 年 3 月)

Okuhira, K., Demizu, Y., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Nishimaki-Mogami, T., Kurihara, M., Okuda, H., Naito, M. Development of SNIPER(ER) that induces estrogen receptor degradation followed by rapid cell death in breast cancer cells. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research(2013 年 2 月)

加藤雅士, 正田卓司, 奥平桂一郎, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明: エンドキシフェン骨格を持つ新規エストロゲン受容体分解誘導剤の開発, 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム(2013 年 11 月)

奥平桂一郎, 出水庸介, 服部隆行, 大岡伸通, 柴田識人, 最上(西巻)知子, 栗原正明, 奥田晴宏, 内藤幹彦: エストロゲン受容体分解誘導剤による乳癌の細胞死誘導分子機構. 日本薬学会第 134 年会(2014 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

今後出願の予定はあるが、現時点では該当なし