

先天性中枢神経脱髄病の治療薬開発に向けた研究

独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所 薬剤治療研究部
山内 淳司
平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 治療薬がない先天性中枢神経脱髄病の創薬標的候補分子の探索研究を行うことを目標にし、インビトロレベルで創薬標的分子の探索研究を行い、その標的候補を動物実験レベルで評価した。その結果、動物実験でも有効な創薬標的分子を同定することができた。

研究組織

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター
山内淳司、宮本 幸
- (2) 首都大学東京 久永眞市
- (3) 株式会社免疫生物学研究所 前田雅弘
- (4) 田辺三菱製薬株式会社 加藤 稔

A. 研究目的

中枢神経脱髄 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は先天性(遺伝性)のグリア細胞の変性症である。現在知られる唯一の先天性の脳および脊髄(中枢神経)のミエリン(髄鞘)形成細胞の変性疾患である。PMD の疫学調査は、はじめ欧米諸国行われ、20 万人から 30 万人に 1 人の割合で病因を有することが明らかにされた。その後、国内でも疫学調査が行われ、およそ 100 家族いることが知られ、その割合は欧米とほぼ同程度であることが明らかにされた。

PMD の原因遺伝子の蛋白質産物は、四回膜貫通型構造を有すると推定される PLP1 である。PMD は、この PLP1 をコードする遺伝子が重複、欠損、変異することでおこる病気である。しかし、この主要な原因遺伝子が数十年前に同定されたにもかかわらず、今日に至っても、特異的治療薬や治療方法が開発されていない。その理由はいくつかあるが、最大の理由は治療薬の標的分子が明らかにされていないことである。

PMD は遺伝性の疾病であるため、それを根本的に治療することは難しいかもしれない。しかし、病態時に強く活性化される分子または分子経路を阻害できれば病態が改善できるのではないかと考えられる。これらの方法は、家族性のパーキンソン病などで提案されている欧米の治療戦略と同じであり、遺伝性の疾病の治療戦略に光明を

与えている。

本研究では、このような考えのもと、PMD 治療薬開発を目的とし、その標的分子を明らかにすることを試みた。独自のインビトロ髄鞘変性システム(共培養系)を利用して、さまざまなライブラリーを用いて PMD 治療薬の標的候補分子を明らかにし、そこで明らかにされた候補分子を動物実験レベルで検証する研究を行った。

B. 研究方法

治療薬の標的候補分子をインビトロで探索し(主として成育セ、首都大、免疫生物の各グループ)、それを動物実験レベル(主として成育セ、免疫生物、田辺三菱の各グループ)で評価する。
【髄鞘変性を再現するインビトロの共培養システム】

神経軸索を伸ばした神経節神経細胞上にオリゴデンドロサイト前駆細胞をまく。およそ 7 日間、2 細胞間の接触培養を行うと、オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索に沿って増殖する。その後、数週間すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞が髄鞘形態をもつオリゴデンドロサイトに分化し、インビトロで髄鞘組織が形成される。

インビトロでの髄鞘形成は、実際に生体内でできる髄鞘形成のタイムコースとほぼ等しく、それぞれの時期の遺伝子変動(トランスクリプトームのプロファイリング)がほぼ生体内と同じであることを確認している。

さて、オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索上で増殖する時期に PLP1 をコードするレトロウイルスを感染させると、髄鞘形成不全がインビトロで再現できる。ただし、感染したオリゴデンドロサイトは病的な状態ではあるが、細胞死は観察されない。この実験系は、研究代表者および研

究分担者らが 2008 年にヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て、同財団を通して特許出願（特願 2008-208155）した培養系に若干の変更を加えたシステムである。

【治療標的候補分子を各種のライブラリーから同定する】

レトロウイルスにコードされた shRNA ライブラリー、阻害剤を中心にした低分子化合物ライブラリー、抗体ライブラリーを用いて治療標的候補分子を明らかにする。

【動物実験レベルで標的分子を評価する】

既存の治療薬は、標的分子の分子機能を阻害することで、その効果を示している例が多い。PMD の場合も上述のスクリーニングで同定される分子は病態時に強く活性化され、それを阻害することで病態が改善されているのではないかと推定される。したがって、標的候補分子をノックアウトまたはノックダウンした遺伝子改変マウスや抑制型変異体を発現した遺伝子改変マウスを PMD 病態モデルマウス（PMD 病態モデルとして一般的に用いられているものは PLP1 のトランスジェニックマウスであり、これを生理学研究所の池中一裕教授から使用許可を受け譲渡された）と交配し、PMD の病態が改善できれば、その標的分子が動物実験レベルでも有効かどうか評価ができるはずである。

【インビボでの標的分子の組織評価試験、機能評価試験】

上述の PMD 病態モデルマウスと交配されたマウスにおいて、髄鞘の組織染色や電子顕微鏡解析でその改善効果を検討する。また、マウスのクランプ試験やローターロッド試験などを用いて、機能改善も評価する。

（倫理面への配慮）

組換え DNA 実験に関しては、独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、首都大学東京、株式会社免疫生物学研究所、田辺三菱製薬株式会社の各委員会で承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。

実験動物および遺伝子改変動物の取り扱いに関しても独立行政法人国立成育医療研究センター研究所、首都大学東京、株式会社免疫生物学研究所、田辺三菱製薬株式会社の各委員会で承認を得ており、3Rs を遵守し実験を行っている。

C. 研究結果

【インビトロ髄鞘変性システムを用いて同定された標的候補分子】

インビトロの実験で同定された候補分子は RNA 干渉、阻害剤、抗体等でその活性が阻害されると髄鞘変性が改善されることが分かった。以下、その中でも「強い」病態改善効果をもったもののみを記載する。

- セリン・スレオニンキナーゼである MAPK
- TACE と推定される蛋白質分解酵素
- ヘレグリン受容体
- 遺伝子番号 0346
- 遺伝子番号 36253
- 遺伝子番号 4240

【動物実験レベルで標的分子を評価する】

上述の治療標的候補分子のなかで、研究計画初年度（平成 24 年度）の最も早期に同定された「MAPK」に関しての研究が進んでいる。またヘレグリン受容体に関しての研究も進めている。

遺伝子改変マウス間の交配により MAPK やヘレグリン受容体の分子活性を PMD 病態モデルマウスの個体レベルで阻害すると、モデルマウスの組織変性が改善され（組織染色レベルと電子顕微鏡レベルの両方）、ローターロッド試験においても強い改善効果が観察された。

D. 考察

この研究で新たに獲得された治療標的候補分子は病態時に強く活性化されていることが推定される。今後、逆に、病態時に特異的に活性化される分子を明らかにし、それを阻害することで新たな治療標的候補分子が明らかにされるのではないかと考えられる。それにより創薬標的の探索研究を広げられるはずである。

ターゲット探索の研究においては、ターゲットの立体分子構造の問題で創薬が困難なケースも出てくるため、この時点で出来る限り多くの分子を明らかにすることが必要である。今後更なる探索研究が必要になると考えられる。

E. 結論

以上をまとめると、

- （１）インビトロレベルで MAPK、ヘレグリン受容体、TACE、0346、36253、4240 が効果の強い PMD 治療標的分子として同定された。
- （２）インビボレベル（組織および神経運動機能改善試験）で MAPK およびヘレグリン受容体が PMD 治療標的分子として有効であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

主要な論文のみを記載。

- (1) Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Tomohiro

Torii, Shou Takashima, Kazumi Kondo, Katsumasa Kawahara, Noriko Nemoto, Jonah R. Chan, Gozoh Tsujimoto, and Akito Tanoue (2012) Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. **Science Signaling** (Science 姉妹誌) 5, ra69

Picked up as 'cover image' :
Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. **Science Signaling** Vol. 5, No. 243 (2012)

毎日新聞夕刊社会面 (同年 9 月 26 日)、朝日新聞朝刊科学面 (10 月 1 日)、Yahoo! ニュースおよび goo ニュース (ともに 9 月 26 日午前に配信) で「髄鞘保護に関わる創薬標的」として報道された。

(2) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Natsuki Yamamori, Toru Ogata, and Akito Tanoue, and Junji Yamauchi* (2013) Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. **Science Signaling** (Science 姉妹誌) 6, ra15:
*Corresponding author

Picked up as 'cover image' : Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. **Sci. Signal.** Vol. 6, No. 265 (2013)
朝日新聞朝刊科学面 (3 月 18 日) で「神経再生を促す創薬標的」として論文の内容が報道された。また、サイエンス・シグナリング日本語版ダイジェストでも紹介された。

2. 学会発表

主たるシンポジウムのみを記載。

(1) 山内淳司、宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人 Knockdown of Dock7 in vivo specifically increases myelin thickness in sciatic nerves without affecting axon thickness (セッション座長 小泉修一、山内淳司) 2013 年 6 月・日本神経科学会・日本神経化学会・日本神経回路学会合同年会・京都

(2) 山内淳司 Fyn キナーゼと Arf6 交換因子 cytohesin-1 による新規のミエリン形成メカニズム (シンポジウム: 企画/座長 佐藤孝哉、山内淳司) 2013 年 9 月・日本生化学会大会・

横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し。

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

国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
最上知子
平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

抗動脈硬化性リポタンパク HDL の産生促進と機能解明をめざし、HDL を最も多く産生する肝の ABCA1 トランスポーターのヒト肝特異的な転写制御を解明し、胆汁酸基本骨格を持ち ABCA1 発現を顕著に促進する LXR アゴニストを合成した。日本住血吸虫卵成熟や炎症での HDL の意外な機能を明らかにした。

研究組織

- (1)国立医薬品食品衛生研究所 最上知子
- (2) 興和(株)東京創薬研究所
田辺宗平、浅沼章宗、山崎裕之
井上敬介、安部一豊
- (3)サントリービジネスエキスパート(株) 諏訪芳秀
- (4)名古屋市立大学大学院医学研究科
堂前純子、横山信治
- (5)昭和大学薬学部 板部洋之
- (6)広島国際大学薬学部 宇根瑞穂

A. 研究目的

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。HDL は動脈硬化を積極的に退縮する機能を持つことが明らかにされているが、HDL 産生を直接促進する薬は未だ実用化されていない。HDL 産生には肝の ABCA1 トランスポーターが最大の寄与を持ち、血中 HDL の 8 割を産生することが報告されている。マクロファージなど末梢細胞の ABCA1 発現はコレステロール蓄積により核内受容体 LXR 活性化を介して促進されるが、肝 ABCA1 の発現は不変であり、肝独自の制御メカニズムが予想されていた。研究代表者らは、肝の ABCA1 が他組織とは異なるユニークな転写制御ー『肝型と末梢型の二重プロモーター制御』を受ける機構をラット・マウスで初めて発見している。本研究では、①ヒト肝独自の転写制御を解明し、②ABCA1 発現促進化合物を探索・合成する。また③in vivo での効果、④ABCA1 の構造と機能について解明を進めた。さらに、⑤動脈硬化病変形成を解明し、「HDL 上昇」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。

B. 研究方法

HDL 形成トランスポーターABCA1 の転写制御・発現促進化合物の探索、in vivo での効果の検討は、国立衛研・興和・サントリー・広島国際大が手法

や材料を共有し検討を行った。特に、国立衛研がこれまで確立した手法やプライマー配列やプラスミド等の材料を供給し、サントリー・広島国際大がそれぞれ所有する植物成分・胆汁酸代謝物ライブラリーを用いた探索を行い、新規の ABCA1 転写促進化合物の発見につながった。名市大医では ABCA1 や ABCA7 欠損マウスや ABCA1/ABCA7 キメラタンパク発現細胞を用いた解析情報を提供した。

(倫理面への配慮) 当研究では、ヒト組織由来の材料は全て市販品を使用し、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・愛護の精神に基づいて行った。

C. 研究結果

1)ABCA1 のヒト肝での転写制御、発現促進化合物の探索・合成

①ヒト肝に特異的な肝型 ABCA1mRNA バリエント L3 を発見し、肝細胞での HDL 産生に大きく寄与することを示した。L3 型はヒト肝総 ABCA1mRNA の約 25%を占めており、特異的 siRNA でノックダウンすると、肝由来細胞での HDL 産生は大きく低下し、HDL 維持に重要な役割を持つことが示唆された。

L3 バリエント発現は「肝型」のコレステロール応答を示す。応答を担うエンハンサーと転写因子 HNF4α 結合エレメントを ABCA1 遺伝子イントロン 3 に同定し、HNF4α が肝型バリエント L3 および L2b の発現に必須の役割を果たすことを明らかにした。(Ohoka, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012)。引き続き HNF4α 発現量を制御する AMPK シグナルの役割を解析した[最上]。

②ABCA1 発現を促進する食品酒類成分を探索し、ホップ成分の 8-プレニルナリンゲニンにヒト肝特異的な ABCA1 バリエント L3 mRNA1および総 ABCA1 タンパク発現上昇作用、およびごま種子発

芽時に増加する成分に、末梢型 ABCA1 mRNA 発現促進作用を見いだした[諏訪]。

胆汁酸に着目して構造活性相関に基づく誘導体合成を行い、核内受容体 LXR を強力に活性化し、末梢細胞での ABCA1 発現と HDL 産生を顕著に増加する化合物を見いだした。本化合物 24-Nor は、内因性 LXR アゴニストとして知られるオキシステロール 22(R)-hydroxycholesterol を上回る活性をより低濃度で示す一方、胆汁酸をリガンドとする核内受容体 FXR や VDR、エネルギー消費 GPCR である TGR5 には作用を示さず LXR に高選択性であった。また THP-1 マクロファージにおいて ABCA1mRNA 発現ならびに HDL 産生を強力に促進することを確認した(特願 2013)[宇根]。

③前期の研究において、ピタバスタチンおよびアトルバスタチンがラット肝 ABCA1 発現促進作用を有することを見いだしている。In vivo での HDL 上昇効果をコレステラミンとの併用によりラットで検討し、数週間にわたる HDL コレステロール増大、apoA-I mRNA 発現の上昇を見だし、HDL 粒子の亜分画の解析を進めた[田辺]。

④ABCA1 と関連分子 ABCA7 の機能ドメイン解析を行い、粒子径サイズが大きくコレステロール含量の高い HDL を形成するには、ABCA1 の C 末端領域を必要とすることを明らかにした(Abe-Dohmae, *Clinical Lipidology* 2012)[堂前]。

2) HDL の機能、動脈硬化病変の形成

①HDL は日本住血吸虫の卵成熟に必要であり、HDL 粒子のコレステロールエステルを CD36RP を介して虫卵に供給する意外な役割を持つことを発見した。巨大化した CETP 欠損 HDL の機能が低いことから、CEPT 欠損症の分布が日本住血吸虫の歴史的感染地域と重なることとの関連が示唆された(Okumura-Noji, *FASEB J* 2013)。炎症タンパク SAA を含有する HDL の形成の意義を ABCA1 KO マウスにマレイン酸ナトリウム投与するモデルを作成し検討し、HDL に組み込まれない遊離の SAA は腎からの排出が早いことを見いだした[堂前]。

②動脈硬化病変形成の発症期において好発部位の血管壁で変化するタンパクを探索し、中膜平滑筋層で抗酸化タンパクペルオキシレドキシン2の発現低下を見出した[板部]。

D. 考察

本研究では、抗動脈硬化性リポタンパクである HDL の産生促進と機能に着目して検討を行った。HDL の大部分を産生する肝の ABCA1 は他組織とは異なる独自の発現制御を受けるが、本研究ではヒト肝特異的な遺伝子転写制御機構を明らかにした(*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012)。また、HDL

が日本住血吸虫の卵成熟に果たす意外な役割を明らかにした(*FASEB J* 2013)に掲載された。新たに発見したヒト肝特異的な ABCA1 バリエント L3 の機能については、細胞や in vivo での評価モデルを検討中であり、完成できれば創薬への直接貢献が可能となる。

また ABCA1 転写を促進する化合物の探索を官民共同で進め、酒成分から肝型バリエント特異的な促進成分を同定するとともに、胆汁酸誘導体での構造活性相関に基づき、新規で効果の高い(末梢型) ABCA1 発現・HDL 産生促進化合物を合成した。後者は特許出願し、in vivo での検証を進めている。末梢型 ABCA1 発現促進の抗動脈硬化作用は明らかにされており、創薬に直接貢献可能と考えられる。従来知られているコレステロールではなく胆汁酸骨格を持つ化合物が LXR アゴニストとして高い活性を示す予想外の成果であり、学術的意義も高いと考え、現在論文投稿の準備を進めている。

動脈硬化発症進展の機序について、慢性炎症性疾患としての観点から SAA-HDL アミロイドーシスを、また酸化ストレスの観点から抗酸化タンパクを基点に解明を進めた。完全解明により、新たな予防治療戦略に寄与することになる。

E. 結論

- ・ヒト肝特異的 ABCA1 バリエントの発現には転写因子 HNF4 α が必須であること、ABCA1 遺伝子イントロン 3 のエンハンサー領域への結合と転写活性化を明らかにした。

- ・肝型バリエント発現促進成分を酒類より見いだすとともに

- ・ABCA1 発現・HDL 産生を顕著に促進する胆汁酸母核の LXR アゴニストを合成した。

- ・肝 ABCA1 発現促進薬物の HDL 上昇効果を in vivo で検証した。

- ・ABCA1/7 の構造と機能を解析した。

- ・HDL の意外な機能-日本住血吸虫卵成熟に役割を発見した。

- ・動脈硬化初期病変において抗酸化タンパクの低下を見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

主なもの

1. Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T. HNF4 α Increases Liver-specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to ApoA-I in Response to Cholesterol Depletion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2012) 32:1005-1014
2. Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, Ohta N,

- Brindley PJ, Yokoyama S. CD36-Related Protein in *Schistosoma japonicum*: Candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein for egg maturation. *FASEB Journal*, (2013) 27: 1236-1244
3. Abe-Dohmae S, Yokoyama S. ABCA7: a potential mediator between cholesterol homeostasis and the host defense system. *Clinical Lipidology*, (2012) 7: 677-687
 4. Itabe H.: Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* (2012) 51: 1-8.
 5. Fujino T, Takeuchi A, Maruko-Ohtake A, Ohtake Y, Satoh J, Kobayashi T, Tanaka T, Ito H, Sakamaki R, Kashimura R, Ando K, Nishimaki-Mogami T, Ohkubo Y, Kitamura N, Sato R, Kikugawa K, Hayakawa M. Critical role of farnesoid X receptor for hepatocellular carcinoma cell proliferation. *J Biochem.* (2012) 152:577-86
 6. Yokoyama S, Arakawa , 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. Yokoyama S, Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T, Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K. High-density lipoprotein of Japanese has markedly increased over the past twenty years. *J. Atheroscl. Thromb.* (2013) 21: 148-154.
 8. Yokoyama S. A potential screening factor for accumulation of cholesteryl ester transfer protein deficiency in East Asia: *Schistosoma japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, in press.
 9. Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. Validation study of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples derived from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014, in press.
 10. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda K, Egashira K, Hazen SL, and Kamei M: Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *J. Cell Sci.* (2012) 125: 2407-2415.
 11. Nose F, Yamaguchi T, Kato R, Aiuchi T, Obama T, Hara S, Yamamoto M, and Itabe H.: Crucial role of perilipin-3 (TIP47) in formation of lipid droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophil. *PLoS ONE* 2013, 8: e71542
 12. Hagey LR, Ogawa S, Kato N, Satoh R, Une M, Mitamura K, Ikegawa S, Hofmann AF, Iida TA. novel varanic acid epimer – (24R,25S)-3alpha,7alpha,12alpha,24-tetrahydroxy-5b-cholestan-27-oic acid – is a major biliary bile acid in two varanid lizards and the Gila monster. *Steroids* (2012) 77: 1510-1521
2. 学会発表
主なもの
- 1 井口 裕介、稲本 有紀、森山 紗恵、西巻一最上知子、宇根 瑞穂: LXR活性化能を有する胆汁酸誘導体の探索 第35回胆汁酸研究会(2013.11)
 - 2 Abe-Dohmae S, Nobukuni Y, Hayashi N, Marumo Y, Masumoto J, Yokoyama S. PI3 kinase negatively regulates apolipoprotein-dependent HDL generation HDL Satellite for ISA 2012 (2012.4 , Cairns)
 - 3 加藤里奈、林暢孝、鈴木裕之、松井浩志、宮越由佳、天日雅行、相内敏弘、笹部直子、小浜孝士、山口智広、板部洋之 「平滑筋細胞のperoxiredoxin2の発現は動脈硬化の初期過程に低下する」 第86回日本生化学会 (2013.9 横浜)
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許出願
核内受容体肝臓 X 受容体アゴニスト
井口裕介、宇根瑞穂
特願 2013-183522
(出願年月日:平成 25 年 9 月 3 日)
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

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

国立成育医療研究センター研究所

小野寺 雅史

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 小児難治性疾患に対する遺伝子治療実施のため、GMP 準拠臨床用ウイルスベクターの製造、ヒト造血幹細胞を用いた Dry Run の実施、次世代シーケンサーによる治療用ベクターの染色体挿入部位同定法の開発と臨床用レンチウイルスベクターの評価を行った。

研究組織

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

A. 研究目的

小児難治性疾患の多くは一つの遺伝子異常により病気が発症する単一遺伝病であり、患者体内（細胞）に治療遺伝子を導入することで疾患の治療にあたる遺伝子治療はその開始当初より有効性が期待され、種々の問題はあったもののこれら問題点を解決することで現在では造血幹細胞移植以外治療法が無い難治性疾患に対する有効な治療法として認識されている。ただ、実際に遺伝子治療がヒトを対象として行われているため、その実施に際しては安全性が最優先されることは言うまでもない。特に、使用する臨床用ベクターが最終的には患者体内に投与されるため、その製造にあっては十分な品質管理が求められ、一般には GMP (good manufacturing practice) 準拠にて製造されることとなっている。同様にレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターなど染色体挿入タイプのウイルスベクターを用いた遺伝子治療ではベクターの染色体挿入部位を網羅的に解析することが求められ、その技術開発を含め単に一アカデミアがこれら全ての要求に対応することは至極困難である。よって、基礎研究や患者フォロー以外の分野においてこれら特殊技術を有する国内外の企業と連携することは日本における遺伝子

治療の遂行において必須事項と考える。

本研究では、日本においてこれら遺伝子治療に関わる優れた技術を有するタカラバイオ社と連携して日本における小児難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施に向けた体制整備を行う。

B. 研究方法

1) GMP準拠臨床用ウイルスベクターの製造

現在、当センターでは小児難治性遺伝性疾患である慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD) に対する造血幹細胞遺伝子治療を米国国立衛生研究所 (NIH) との共同研究にて行っているが (平成24年6月 厚生労働大臣承認)、ここで使用されるレトロウイルスベクターは2名分しかなく、今後遺伝子治療を継続していくためには新たに国内で臨床用ウイルスベクターを製造する必要がある。このため、NIHが保有する遺伝子治療用のベクター MFGSgp91のマスターセルバンク 293-SPA-MFGSgp91-155 (MAGENTA Corpが製造) から製造されたワーキングセルバンク (WCB) を15本入手し、そこからの培養上清に関する回収 (ハーベスト) 条件を検討し、臨床研究において使用可能であるかの品質検査も行った。

2) ヒト造血幹細胞への遺伝子導入のDry Run

造血幹細胞遺伝子治療では通常体重あたり 5×10^6 個程度の造血幹細胞 (CD34陽性細胞) への遺伝子導入が求められる。仮に体重を 50kg とすると 2.5×10^8 個程度の造血幹細胞に

治療遺伝子を導入しなければならず、さらにこれら操作は全て無菌的に行わなければならない。このため、これら操作を支障なく行うための標準作業手順書（standard operating procedure: SOP）を作成するため、理化学研究所バイオリソースセンターより、研究用ヒト臍帯血を入手し、比重遠心法にて単核球に分離した後、CliniMacs（Milteny Biotec社）にて分離したCD34細胞に上記タカラバイオ社が製造した臨床用ウイルス（MFGSGP91）を用いて遺伝子導入実験を行った。

3) 治療用ベクターの染色体挿入部位同定

欧州で行われたX連鎖重症複合免疫症に対する遺伝子治療において白血病が発症したことから、現在、レトロウイルスベクター等の染色体挿入タイプのベクターを用いた遺伝子治療臨床研究においてはベクターの染色体挿入部位を網羅的に解析することが求められる。その方法として、ウイルスLTRの配列を基に逆向きにprimerを設計し、DNA伸展することで染色体挿入部を同定するLAM-PCRがあるが、この方法では制限酵素処理を行う必要があり、時に挿入部位によっては検出できないものもある。このため、DNAを物理的に断片化し、それらを次世代シーケンサーで網羅的に解析する方法が、近年、採られてきている。本研究ではEGFP遺伝子が3コピー有するCEM細胞株を用い、これら細胞をソニケーションして断片化し、シーケンシングアダプターをライゲーションした後、電気泳動にて平均300bpと1kpのフラグメントを回収した（Paired-End ライブラリー）。また、ソニケーションにて断片化した平均3kbpのフラグメントを電気泳動で回収し、末端をビオチン標識dNTPsで修復し、環状化した後に400～600bpで再び断片化し、アビジンカラムで回数したMate-Pairライブラリーも用意した。これらサンプルの配列を次世代シーケンサーで解読した。

4) 臨床用レンチウイルスベクターの評価

近年、複数のレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究において白血病の発症という重篤な有害事象が報告されているため、使用するベクターをより安全性なレンチウイルスベクターに変更した遺伝子治療研究が行われている。これに向け本研究でも高力価ウイルス上清が得られるレンチウ

イルスベクターの開発を目指し、使用するプラスミドベクターのgag/polプラスミドを改良し、そのウイルス力価を測定した。同時に臨床用レンチウイルスベクターの製造方法を確立するため、レンチウイルスベクターの大量精製工程中にあるイオン交換クロマトグラフィー（精製工程）や無菌ろ過工程の有効性・安全性に関する検討を行った。

（倫理面への配慮）

組換え遺伝子実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律及びこれに付随する政令、省令、施行規則並びに告示」に基づき作成された実験計画を遺伝子組換え安全委員会に申請し、承認を受けた後、実験を行う。実験従事者は毎年遺伝子組換え実験安全委員会の講習を受けたのち、登録され研究を行っている。ヒト由来の組織、細胞、臨床材料、ゲノム、遺伝子等由来の試料を用いた実験を行う場合は、「臨床研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「ゲノム薬理学を適用する臨床研究と検査に関するガイドライン」に従い実験計画書を作成し、生命倫理委員会に申請し、審査後、承認を受けて実施している

C. 研究結果

1) GMP準拠臨床用ウイルスベクターの製造

MFGSGp91のMCB（293-SPA-MFGSGp91-155）より製造されたWCBを15本入手し、そこからの細胞がタカラバイオ社にて支障なく培養できたので、高力価の培養上清を回収する方法として添加剤である酪酸ナトリウムの濃度とハーベスト時の適正培地量と温度を検討した。その結果、ハーベスト添加剤である酪酸ナトリウムの濃度は10mMより5mMがよく、その培地量は0.2mL/cm²より0.1mL/cm²が良く、温度に関しては32℃よりも37℃の方が良かった。そして、その最適条件で各種細胞株に遺伝子を導入したところ、その感染効率は平均プロウイルスコピー数で2.74 copies/cellであった。なお、ここで製造された培養上清の品質管理はタカラバイオ社が行い、その品質が臨床用ウイルスベクターとして担保されたため、次のCGD遺伝子治療臨床研究に使用される予定である。

2) 大量ヒト細胞を用いた遺伝子導入の実施

これまでに確立している完全閉鎖系培養システムによる末梢血リンパ球への遺伝子導入法に基づきヒト臍帯血由来の単核球より CliniMacsにて分離されたCD34陽性細胞への遺伝子導入を行った。その結果、CD34陽性細胞の分離度は95%を超え、また、離された細胞を安定して培養することが可能であった。また、EGFP遺伝子を発現するウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験では67.9%という極めて高い遺伝子導入効率を得ることができた。次に、上記臨床用ウイルスベクターを用いたK562細胞への遺伝子導入実験で65.8%とこれも極めて高い遺伝子導入効率を示した。一方、実際に欧州の遺伝子治療で用いられたSF71gp91ベクターを用いた遺伝子導入実験では28.4%であったことから、今回、製造したウイルス上清は実際の遺伝子治療臨床研究においても十分に使用可能であることが示唆された。

3) 治療用ベクターの染色体挿入部位同定

EGFP遺伝子を3コピー有するCEM細胞由来のDNAより調整した3種類のライブラリー (Paired-Endライブラリー: 平均300bpと1kpのフラグメント、Mate-Pairライブラリー: 平均3kbpのフラグメント) を次世代シーケンサーにて解読した。その結果、すべてのライブラリーからその遺伝子挿入部位 (第2、8、14染色体) は同定されたが、その頻度に関してはPaired-Endライブラリーで両方とも93%が単一の配列にマップされたが、Mate-Pairライブラリーでは30%と低い値しか得られなかった。このことからPaired-Endライブラリーの方が利用できるリードペアが多いことが判明し、また、平均300bpと1kpのフラグメントでその頻度に変わりが無かったことから1kpライブラリーが有利と考えられた。同時に、インサート長が短いほど検出の精度 (ジャンクション検出間の距離) は高いが、インサート長が長いほど検出感度 (検出に使われるリードペア数) は上昇することが判明した。

4) 臨床用レンチウイルスベクターの評価

RRE配列を搭載したgag/polプラスミドを用いて作製したレンチウイルスベクターでHT1080細胞に遺伝子導入実験を行うと、30倍希釈した上清で90.2%、90倍希釈した上清で64.8%の感染効率が得られ、RRE配列非搭

載gag/polプラスミドを用いて作製したレンチウイルスベクターでの結果 (30倍希釈で1.0%、90倍希釈で0.6%) と比較して、100倍以上の感染効率が得られ、RRE配列がgag/polプラスミドに有効であることが示唆された。また、本イオン交換クロマトグラフィーによる感染効率の低減は特に見られなかった。本条件で精製は可能と示唆された。無菌ろ過工程に使用した3種類のフィルターで感染効率に大きな差はなかったが、直径47 mm、膜面積17.3 cm²のPVDFフィルターは活性のロスが最も少なかった。

D. 考察

NIH より入手されたウイルス産生細胞から製造された培養上清は種々の培養法の改良により高いウイルス力価をもつことが示され、実際にヒト造血幹細胞を用いた Dry Runにおいてもその有効性は示された。同時に遺伝子治療臨床研究としての品質検査 (細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシンなど) もパスしていることから、次の GCD 遺伝子治療臨床研究において使用する可能である。次にDNA の物理的破砕と次世代シーケンサーによるウイルスベクターの染色体挿入部位網羅的解析が可能であることから、今後はこれまでに得られた LAM-PCR との結果を比較することが重要と考えられた。さらに、今後使用期待されるレンチウイルスベクターも今回の検討から新たなベクターの構築が期待され、これら新規ベクターの早期臨床応用を検討していきたい。

E. 結論

- 1) 今回 NIH より入手したウイルス産生細胞からの培養上清は臨床応用可能と思われた。
- 2) 次世代シーケンサーを用いた治療ベクターの染色体挿入部位解析は可能と思われた。
- 3) 本研究成果から今後日本における造血幹細胞遺伝子治療の実施は可能と思われた。
- 4) 今後のベクターとしてレンチウイルスベクターの使用を検討したと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T, Yoshimura A, Onodera M, Itoh H: Loss of

PDK1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance.

Diabetes 61: 1935-1948, 2012.

2) 堀内清華、石黒精、中川智子、庄司健介、永井章、新井勝大、堀川玲子、河合利尚、渡辺信之、小野寺雅史. 甲状腺機能低下症と1型糖尿病に難治性下痢症を合併し、Foxp3 低下を認めた IPEX 症候群の女児例. *Jpn J Clin Immunol* 35:526-532, 2012.

3) Kawai T et al. Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven Inflammatory Cytokine Production in Chronic Granulomatous Disease. *Clinical Immunology* 147: 122-128, 2013.

4) 河合利尚. 慢性肉芽腫症と他の食細胞機能異常症. *小児内科* 2012; 44 巻:242-243

5) Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, et al.: Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis* doi: 10.1136

6) Akagi K, Kawai T, Watanabe N, et al.: A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2013 May 3.

7) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood* 119(8):e45-56, 2012.

8) Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Current gene therapy* 12(5):410-416, 2012.

9) Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119(26):6234-6242, 2012.

10) Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, *Biological sciences* 368:20110334, 2013.

11) Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther* 21:1424-1431, 2013.

12) Saka K, Kawahara M, Teng J et al. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Journal of biotechnology* 168:659-665, 2013.

13) Saito T, Yano F, Mori D et al. Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One* 8:e74137, 2013.

14) Razak SR, Ueno K, Takayama N et al. Profiling of MicroRNA in Human and Mouse ES and iPS Cells Reveals Overlapping but Distinct MicroRNA Expression Patterns. *PLoS One* 8:e73532, 2013.

15) Nishimura S, Manabe I, Takaki S et al. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metabolism* doi: 10.1016

16) ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *American journal of human genetics* 92:431-438, 2013.

17) Hirose S, Takayama N, Nakamura S et al. Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports* 1:499-508, 2013.

18) Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y et al. Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. *BBRC* 435: 586-591, 2013.

2. 学会発表

1) ONODERA M. What we learnt from the gene therapy for ADA deficiency. Joint symposium Japanese and European societies2; Genetic diseases in the ESGCT 20th annual meeting.

2) Inaki M, Onodera M. Gene transfer to human hematopoietic cells with GaLV pseudotyped retroviruses concentrated from serum-free supernatants by PEG precipitation with polyvalent immunoglobulin. The 15th Annual Meeting of American Society of Gene&Cell Therapy, Philadelphia, 2012. 5.16-19.

3) ONODERA M: Dry run of ex vivo transduction and expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells toward stem cell therapy for chronic granulomatous disease. 19th JSGT meeting at Okayama July.

4) 小野寺雅史:造血幹細胞を標的とした慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療臨床研究に向けたガイドラインの実施。第21回食細胞機能異常症研究会(2013年12月、東京)

5) 田村英一郎、河合利尚、中澤裕美子、原山静子、清水泰岳、伊藤玲子、井田博幸. 慢性肉芽腫症腸炎における腸内細菌スクリーニング検査. 2012 第44回小児感染症学会

6) 勝屋友幾、放生雅章、河合利尚、ほか: 慢性肉芽腫症に過敏性肺炎を合併し腫瘍性陰影を呈した一例、第63回日本アレルギー学会、東京、2013/11/29

7) Kawai T, Nakazawa Y, Uchiyama T, et al.: Effects of chronic granulomatous disease-associated bowel inflammation on microbial gut flora. 第13回アジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学会(第40回日本小児栄養消化器肝臓学会)、東京、2013/11/2

8) Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, et al.: Effect of Thalidomide Therapy on Bowel Inflammation in Chronic Granulomatous Disease. 第13回アジア汎太平洋小児栄養消化器肝臓学会(第40回日本小児栄養消化器肝臓学会)、東京、2013/11/2

9) 河合利尚、中澤裕美子、田村英一郎、ほか: 第45回日本小児感染症学会、単球の活性酸素産生能低下による肉芽腫性腸炎、札幌、2013/10/27

10) 河合利尚、中澤裕美子、渡辺信之、ほか: 慢性

肉芽腫症における肺間質性炎症、第 23 回日本小児
リウマチ学会、埼玉、2013/10/12.

11) Protection of hematopoietic stem cells from
stress-induced functional impairment by very low-dose
interleukin-1 stimulation. Makoto Otsu et al. The 20th
Annual Congress of the European Society of Gene
Therapy. 2012, Paris.

12) Pleiotropic nature of hematopoietic stem cell
responses to an inflammatory niche environment.
Makoto Otsu. The 2nd Joint Global COE Symposium of
the IMSUT & RCAST Global COE, The Univ of Tokyo
and Chiba Univ Global COE. 2013, Tokyo.

13) Alpharetroviral Vectors: Demonstration of Safe and
Efficacious Gene Therapy Using X-CGD
iPSCs. Huan-Ting Lin et al. The 19th Annual Meeting of
the Japan Society of Gene Therapy. 2013, Okayama.

14) Elucidation of Pathophysiological Mechanisms in
Wiskott Aldrich Syndrome Using Induced Pluripotent
Stem Cells (iPSC). Mozghan Khalaj Amirhosseini, et al.
The 19th Annual Meeting of the Japan Society of Gene
Therapy. 2013, Okayama.

15) A Possible Therapeutic Strategy for Genetic
Diseases Using Hematopoietic Stem Cells Generated
From Induced Pluripotent Stem Cells.

16) Makoto Otsu, et al. The 21st Annual Congress of the
European Society of Gene Therapy. 2013, Madrid.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

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
高田 修治
平成23年4月～平成26年3月

研究要旨 約 6,000 種類のヒト全長 cDNA ライブラリ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運用し、関節炎疾患の有力な新規創薬ターゲットを見出した。
OA に関わる microRNA である miR-140 の発現制御領域を探索し、同定した。

研究組織

- (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
高田 修治、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

変形性関節症(OsteoArthritis: OA)、リウマチ疾患(Rheumatoid Arthritis: RA)等の関節炎疾患は加齢により発症率が上がるため、高齢化社会の中、患者数は年々増加しており、今後も増加が続くと推定されている。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時に痛みや可動域が狭まるために運動に制限が加わるため、Quality of life も低下する。近年、関節炎疾患に対する新規治療薬として、TNF α や IL-6 受容体に対するヒト化抗体等の生物学的製剤が登場し、それまでは対症療法が主であった関節炎疾患治療にパラダイムシフトをもたらし、早期の治療により寛解が望めるようになった。しかしながら、副作用の問題等もあり、治療薬のターゲットとなる因子の最適化を含め、まだ解決すべき点が多い。

創薬ターゲットの探索(スクリーニング)において、マイクロアレイによる遺伝子発現の包括的解析等の従来の手法ではほとんどのスクリーニングが終わっており、これまでにない観点での新規スクリーニング法により探索する必要がある。我々が運用しているハイスループット遺伝子導入アッセイシステムは、自動分注機を利用するこ

とにより、生細胞に数千もの遺伝子導入を一度に短時間でこなうことができる。

我々は世界的に使用されている Mammalian Gene Collection (MGC) 由来のヒト cDNA ライブラリの個々のプラスミドを等量ずつ、384 ウェルプレートに高密度に配置させたアッセイプレートを作製し、凍結保存して管理している。このアッセイプレートを使用して疾患マーカー遺伝子の発現を検出するレポータープラスミド等とともにハイスループット遺伝子導入アッセイシステムを運用することにより、疾患に関与する因子を網羅的かつ効率的にスクリーニングすることができる。

本研究では、このハイスループット遺伝子導入スクリーニングシステムを運用し、炎症に関わる遺伝子の発現を制御している因子を探索することで関節炎疾患に関わる遺伝子のスクリーニングを行い、創薬ターゲットの同定を試みた。

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 千種類のヒト全長 cDNA のプラスミドライブラリ(MGC ライブラリ)を 384 ウェルプレートに配置したアッセイプレートを作製した。このアッセイプレートに 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)を繋いだレポータープラスミドと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し、一定時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

このハイスループット遺伝子導入スクリーニングにより得られた候補因子について、Gene Ontology 情報により絞り込み、IL-6 の 3'UTR より、ARE を含む領域と含まない領域をそれぞれ繋

いだ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ない、有力な候補因子を選別した。

この有力な候補因子について、レンチウイルスベクターを設計し、ウイルスを作製、細胞に感染させ、薬剤選別により候補因子を過剰発現する細胞を取得し、IL-6 の発現への影響について検討した。

(2) OA 関連 microRNA、miR-140 の発現制御領域の探索

miR-140 の上流領域をクローニングし、ルシフェラーゼおよび LacZ を含むレポータープラスミドを作製した。このプラスミドを使用してルシフェラーゼアッセイおよび、トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、解析を行った。

(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が、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っていない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究は行っていない。また、独立行政法人国立成育医療研究センターの動物実験委員会の承認を得て研究を行なった。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、許可を得て研究を行なった。

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

炎症反応において重要なサイトカインである IL-6 は近年、3' UTR に存在する ARE により、その mRNA の安定化が制御されていることが明らかとなってきている。しかし、その制御メカニズムは結合するタンパク質をはじめ、多くのことが未解明のままである。そこで、本研究ではヒトの約 6,000 遺伝子を対象としてハイスループット遺伝子導入スクリーニングを行ない、IL-6 の mRNA の安定化に関わる因子を探索した。

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) をルシフェラーゼ遺伝子の下流に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。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結果、本研究では、5000 個の 293T 細胞を用いて遺伝子導入試薬 FuGENE® HD Transfection Reagent は 0.2μl、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。

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い、ルシフェラーゼ活性を低下させた制御因子候補を同定した。得られた候補因子は直接あるいは間接的に IL-6 の 3'UTR に作用する候補因子群である。本研究では直接 IL-6 の 3'UTR に結合して発現を制御する因子を創薬ターゲットとして同定するため、遺伝子データベースに登録されているそれぞれの候補因子の Gene Ontology を調べ、結合し得る因子および、これまでに機能が未知の因子である 20 弱の候補因子について二次スクリーニングの対象とした。

二次スクリーニングとして、mRNA の安定化に重要な ARE 配列に直接作用するか検討するため、IL-6 の 3'UTR の ARE 配列が含まれる領域と含まれない領域を繋いだレポーターベクターを作製し、これらのベクターを使用してレポーターアッセイを行なった。これまでに 12 個の候補因子について検討を行ない、RNA 結合ドメインを持つ候補因子 X を有力な創薬ターゲットとして同定した。

この候補因子 X の機能を解析するため、レンチウイルスベクターを作製し、レンチウイルスを作製、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞に感染させ、薬剤選択により候補因子 X 安定に発現する細胞株を作製した。この細胞に LPS 刺激により IL-6 の発現を誘導後、Actinomycin D により転写を阻害させて IL-6 の安定化への影響を調べたところ、候補因子 X を過剰発現させた細胞で IL-6 の mRNA が安定化されていることを示唆する結果を得た。

(2) OA 関連 microRNA、miR-140 の発現制御領域の探索

近年、長さ 20~25 塩基の non-coding RNA である microRNA (マイクロ RNA) が様々な疾患に関わることが明らかとなってきているが、我々は軟骨特異的に発現し、OA の病態に関わる miRNA として miR-140 を同定している (Miyaki S., et al., Arthritis Rheum. 2009; Miyaki S., et al., Genes Dev. 2010)。しかし、その発現制御メカニズムはほとんどのことが不明のままである。我々はこの OA の病態に関わる miR-140 の発現に関わる因子および

作用する化合物をスクリーニングすることを計画し、まず、発現制御領域の探索を行なった。miR-140 の primary transcript の上流 3kb の DNA 配列の下流に LacZ を繋いだレポーターを組み込んだトランスジェニックマウスを作製し、解析した結果、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。

軟骨分化に重要な転写因子である Sox9 がこの軟骨特異的に発現する miR-140 の発現制御に関わるのではないかという仮説を立てて、この miR-140 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、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確認できた。次に、Sox9 と協調して軟骨分化に関わるという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。また、どの領域がこれら Sox による発現制御に重要か、3~0.3kb 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。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 の発現が確認できた。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。

これらの結果から miR-140 の上流 3kb の領域で Sox ファミリーである L-Sox5、Sox6、Sox9 が協調的に働き、miR-140 の軟骨特異的な発現制御に関わることを明らかにした。

また、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。そこで、ヒトの miR-140 の上流 3kb 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ルシフェラーゼアッセイによる検討を行なった。その結果、ヒトにおいても SOX9 により miR-140 の発現が制御されていることを示唆する結果を得た。

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

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いる (Neininger A., et al., J Biol Chem. 2002)。様々な RNA 結合タンパク質がこの ARE に結合することで、mRNA を安定化あるいはその逆に不安定化 (分解) へと導くと考えられているが、結合する因子やその制御メカニズム、疾患への関わりについてはほとんどが未解明のままである。炎症性サイトカイン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・不安定化に関わる全因子が解明できれば病態メカニズムの解明および新規創薬ターゲットの同定に極めて有用である。

本研究ではこの IL-6 の ARE を含む 3'UTR に作用し、その mRNA の安定化に関わる因子を探索し、新規の IL-6 の制御因子候補を複数見出した。また、更なるスクリーニングと詳細な解析により、有力な創薬ターゲット候補を見出している。今後は、この創薬ターゲット候補について疾患モデルマウスを使用して発現抑制、強制発現による検討を行ない、新規治療法や予防法、診断法の開発を試みる。

(2) OA 関連 microRNA、miR-140 の発現制御領域の探索

我々はこれまでに、miR-140 が軟骨細胞特異的に発現し、OA の病態に関わる因子であることを明らかにしてきた (Miyaki S., et al., Arthritis Rheum. 2009; Miyaki S., et al., Genes Dev. 2010)。しかし、その発現制御機構は不明であった。本研究では、*in vivo* での miR-140 の軟骨特異的な発現制御領域を明らかにし、軟骨分化のマスター転写因子である Sox9 と、L-Sox5、Sox6 (Sox-trio) が協調的に働き、miR-140 の発現を制御していることを明らかにした。

本研究ではさらにヒトの miR-140 の上流 3kb 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、Sox-trio との共発現によりルシフェラーゼの活性が増加することを確認した。このことは、ヒトにおいても同様に miR-140 の上流領域でこれら Sox-trio によりその軟骨での発現が制御されていることを示唆する。

今後は、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で、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試みる。

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用により、多くの疾患メカニズムの解明につながる事が期待できると考えられる。

E. 結論

全長 cDNA ライブラリ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システムを用いて、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は、IL-6 の発現制御を介して OA や RA 等の炎症性疾患の病態に関わる可能性がある。今後、更なる解析を続け、新規治療薬の開発を試みる。

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。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. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H. L-Sox5 and Sox6 enhance chondrogenic miR-140 expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J Biol Chem.* 2012 **287**(26): 22206-15.
2. Yamashita S and Asahara H. miRNA functions in Arthritis. *Curr Rheumatol Rev.* 2012, **8**, 98-102.
3. Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012; **8**(9): 543-552.

2. 学会発表

1. 山下 聡、味八木 茂、加藤 義雄、横山 茂俊、佐藤 天平、Francisco Barrionuevo、秋山 治彦、Gerd Scherer、高田 修治、浅原 弘嗣 Sox trio (Sox5、Sox6、Sox9)による軟骨での miR-140 の発現制御 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11~14 日
2. 山下 聡、味八木 茂、加藤 義雄、横山 茂俊、佐藤 天平、Francisco Barrionuevo、秋山 治彦、Gerd Scherer、高田 修治、浅原 弘嗣 Sox trio による軟骨での miR-140 の発現制御 第 26 回日本軟骨代謝学会、大阪、2013 年 3

月 1~2 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請中

「miR-140 の発現を制御する DNA 及び該 DNA を利用した薬剤のスクリーニング方法」

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

バイオ医薬品の合理的品質管理技術の開発と標準化

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部
川崎 ナナ
平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 バイオ医薬品の QbD 実現に向け、(1) 糖鎖及び分子変化体評価のための PAT 手法、標準的糖鎖試験法及び ELISA 法、(2) 新規基材由来医薬品の品質管理方法、並びに(3) ウイルス安全性評価のためのモデルウイルス等を開発した。また、(4) 各種抗薬物抗体測定法の有用性を評価した。

研究組織

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化

- 1) 国立衛研 川崎 ナナ, 橋井 則貴, 原園 景, 鈴木 琢雄
- 2) 協和発酵キリン(株)生産本部 柳原 繁弘
- 3) 中外製薬(株)CMC 開発部 岡本 寿美子, 寺島 勇
- 4) 一般財団法人 化学及血清療法研究所 鳥飼 正治
- 5) アステラス製薬(株)イノベーション 森 啓太郎, 山口 秀人
- 6) 大日本住友製薬(株)技術研究本部 佐藤 貴之
- 7) 一般社団法人 日本血液製剤機構 村上 弘次
- 8) 第一三共(株)研究開発本部 古賀 淳一
- 9) (株)住化分析センターファーマ大阪事業所 岩田 美紀
- 10) 武田薬品工業(株)CMC 研究センター 前田 瑛起, 濱地 芳典, 山田 英丙
- 11) (株)東レリサーチセンター 水野 保子
- 12) 持田製薬(株)製剤研究所 大庭 澄明

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発

- 1) 国立衛研 石井 明子
- 2) 東レ(株)愛媛工場動物薬室 田中 貴
- 3) (独)農業生物資源研究所 瀬筒 秀樹
- 4) 徳島大学大学院 HBS 研究部 伊藤 孝司
- 5) 群馬大学大学院工学研究科 武田 茂樹

(3) ウイルス安全性評価方法の開発

- 1) 国立衛研 遊佐 敬介
- 2) 一般社団法人 日本血液製剤機構 坂井 薫

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化

- 1) 国立衛研 新見 伸吾
- 2) 中外製薬(株)臨床企画推進部 西宮 一尋

A. 研究目的

ICH Q8-11 が調和されたことにより、バイオ医薬品の開発と製造においても、サイエンスとリスクマネジメントプロセスを取り入れたクオリティ・バイ・デザイン (QbD) の考えが導入されるようになってきた。バイオ医薬品開発においては、

有効成分の特性、分子変化体、工程由来不純物、及びウイルス等の混入汚染物質等が、予め設定された限度、範囲、分布を超えたときに、PK, PD, 免疫原性、及び毒性等に与える影響の不確かさを考慮して品質管理の優先度を決めること、また、影響の大きさ、逸脱頻度、及び検出能力を基に品質管理戦略、すなわち原材料管理、工程パラメータ、工程内管理試験、プロセス評価、並びに規格及び試験方法等の選択及び組み合わせを考えることが肝要である。前例の少ないバイオ医薬品の QbD の実現に向けて、産官学での理解の共有化、特性解析、特性と PK, PD, 免疫原性、毒性との関係の解明、及び品質管理のための技術開発と標準化が不可欠である。本研究では、バイオ医薬品の QbD への適用を目指して以下の(1)～(4)の研究を行った。

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化：

①PAT 開発 QbD の実現に向けて注目されているプロセス解析工学 (PAT) 手法として、LC/MS を用いた抗体医薬品のグリコフォーム解析法、及び分子変化体解析法を開発する。

②糖鎖試験法 すでに終了した単糖、及び中性オリゴ糖 (HPLC 法) に続く糖鎖の試験法として、中性オリゴ糖 (キャピラリー電気泳動(CE)法)、酸性オリゴ糖、及びグリコフォーム試験を検討し、試験に求められる要件の明確化、並びに試験の標準化を行う。研究結果を基に日局糖鎖試験法原案を作成する。

③結合活性試験法 結合活性試験法の標準化の一環として、ELISA 法の標準化を行う。H24 年度は非競合法 ELISA, H25 年度は競合法 ELISA を対象とし、多機関で試験デザイン、データ解析方法、及び試験成立条件の最適化を行う。研究結果を基

に日局参考情報 ELISA 原案を作成する。また、前期間に終了した表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) 標準化の研究結果を基に、日局参考情報 表面プラズモン共鳴法原案を作成する。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発: CHO 細胞や大腸菌等に代わる基材(宿主)としてトランスジェニック (Tg) 動植物を用いた医薬品開発が活発化しており、新規基材の管理要件を明確にすることが求められている。そこで、日本発の生産基材として注目されている Tg カイコについて、バイオ医薬品を試験的に製造し、課題と対応方策を考察する。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発: バイオ医薬品開発において求められるウイルスクリアランス試験には専門施設・技術が必要であり、コストがかかる。そこで、感度・安全性・簡便性が高い非感染性人工ウイルス様粒子の開発を行う。また、蛍光標識したウイルスを用いる新規のウイルス感染性評価手法を構築する。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化: 抗薬物抗体の出現は有効性や安全性に影響を与える可能性があるが、バイオ医薬品に対する抗薬物抗体の評価は容易ではなく、様々な手法が用いられている。そこで、抗薬物抗体測定法の標準化を目的として、各種試験法により抗体価を測定し、分析能パラメータを評価する。

B. 研究方法

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化

①PAT 開発 モデルとして、抗 TNF- α 抗体をスパイクした CHO 細胞培養上清を用いた。

②糖鎖試験法 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質由来糖鎖を酸性オリゴ糖モデルとして用い、多機関により分析条件の最適化、試験法の妥当性を評価した。中性糖の CE/FL の条件最適化を行い、多機関共同にて精度を調べた。Fc 融合タンパク質を用いて、グリコフォーム分析の適用可能性を調べた。

③結合活性試験法 H24 年度は、非競合法 ELISA のモデルとして、抗 TNF- α 抗体医薬品と抗原の結合活性測定系、H25 年度は、競合法 ELISA のモデルとして、ビオチン化抗体(抗体薬物複合体モデル)と抗原の結合活性測定系について、6 機関で各々測定条件を設定した。各機関で設定した条件で各 6 回の測定を行った結果を用い、ELISA に適した試験デザイン、データ解析方法、及び試験成立条件について検討した。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質

管理方法の開発: 抗 CD20 抗体等のモデルタンパク質を中部絹糸腺に発現する Tg カイコを作製し、組換えタンパク質の試験的製造と特性解析を行った。生産された組換えタンパク質の糖鎖構造は、糖ペプチドの LC/MS により、抗体依存性細胞傷害活性は、Daudi 細胞を標的細胞、ヒト末梢血単核球をエフェクター細胞とし、死細胞より放出された LDH の活性を指標に解析することにより、また、宿主由来タンパク質は市販のヒト血清を用いた免疫学的手法により評価した。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発: ウイルス様粒子の作製には、非エンベロープウイルスである E 型肝炎ウイルス (HEV) の外殻構造を構成するウイルスカプシドタンパク質の産生系を利用した。感染性による評価と定量 PCR による評価を行った。また、ウイルスクリアランス試験に最もよく使われるモデルウイルスのひとつであるマウスパルボウイルス (MVM) を用いて、Alexa Fluo 488 で蛍光標識したウイルス粒子を作製し、その感染性を評価した。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化: 抗モデル抗体医薬品抗体(抗 mAb 抗体)を購入して、各種分析法により抗 mAb 抗体を測定し、分析能パラメータを多機関で評価した。

(倫理面への配慮)

市販品を試料として用いていることから、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果及び考察

(1) 品質特性解析・試験方法の開発と標準化:

①PAT 開発

抗体のグリコフォームモニタリングシステムとして、LC/MS、カラムスイッチング、及び抗体の濃縮を目的とした抗 TNF- α 抗体親和性ペプチドカラムまたはプロテイン A カラムを組み合わせたシステムを構築した。また、抗体のメチオニン酸化やアスパラギンの脱アミド化など複数の分子変化体を短時間で評価することを目的として、トリプシンを固定させたフューズドシリカカラムを組み込んだ LC/MS システムを構築し、試料の前処理、測定、解析、レポートの作成を全て自動化することに成功した。これらのシステムは、抗体の培養工程における迅速特性解析法として利用できる可能性があり、工程開発や管理手法開発における実験計画法などへの利用が期待される。

②糖鎖試験法

1) 酸性オリゴ糖解析技術の開発と標準化

2AB HILIC/FL, 2AA IEX HILIC/FL, HPLC/PAD

及び 2AA CE/FL の分析条件の最適化を行い、適切な特異性及び精度を持つことを確認した。これらの方法は、酸性オリゴ糖鎖の試験方法として利用可能であると思われた。

2) 中性オリゴ糖の CE/FL の標準化

APTS CE/FL 法分析条件の最適化を行い、再現性の評価を行った。1 機関にてデータを取得できなかったが、他の 6 機関において類似したプロファイルが得られた。非特異的なピークが生じる場合があることが確認され、PNGase F を用いて糖鎖を遊離する際の pH により糖鎖の異性化が生じることが分かった (Anal Chem. 2009 15; 81: 6823-6829)。今後、適切な遊離条件を確認し、標準的分析法として報告する予定である。

3) グリコフォーム分析の標準化及び試験に求められる要件

IEF, cIEF (及び icIEF), CZE, IEX, MS 等の手法を用いて、Fc 融合タンパク質のグライコフォーム分析の分析条件の最適化を試みた。Fc 融合タンパク質は、分子量が大きく (92 kDa)、不均一性が高い (N-及び O-結合型糖鎖結合部位がそれぞれ、6 及び 4 カ所) ため、いずれの方法でも十分な分離は得られなかった。グリコフォーム分析では、試料の構造の複雑さ、分子量、その他の特性により、分離が難しい場合があり、標準化は難しいと思われた。対象医薬品ごとに、有効性及び安全性に関与する糖鎖構造の違いを反映したプロファイル取得を検討することが重要と思われた。

以上の研究成果、及びこれまでに得られた単糖・中性オリゴ糖の成果を統合して、糖鎖試験法設定における要件をまとめ、二回のグループ会議での議論を経て、日局一般試験法、及び参考情報糖鎖試験法草案を作成した。

③結合活性試験法

1) ELISA

非競合法 ELISA 及び競合法 ELISA に適した試験デザイン、データ解析手法を明らかにするため、以下の方法 1~3 について検討した。

方法 1: 適切な希釈倍数で調製した試料について、標準物質の用量反応曲線 (検量線) をもとに、標準物質に対する相対的な濃度を算出し、標準物質に対する相対活性とする方法

方法 2: 標準物質と試料それぞれについて用量反応曲線を取得し、最大レスポンスの 50% に相当するレスポンスを与える用量 (非競合法では EC_{50} 、競合法では IC_{50}) の比から標準物質に対

する相対活性を算出する方法

方法 3: EC_{50} や IC_{50} 付近で用量反応を直線で近似できる領域を用いて、同じレスポンスを生じる用量比をもとに標準物質に対する相対活性を算出する方法

最も良い結果が得られたのは方法 2 であった。但し、方法 2 には、重み付けの有無や、標準物質と試料の回帰曲線の形状を同一とするか等の選択により、種々の回帰方法があり、測定条件により、適した回帰方法は異なっていた。従って、方法 2 を用い、適切な回帰方法を選択することが妥当であると考えられた。

次に、方法 1~3 で使用可能であると考えられた試験成立条件 (下記 (a)~(f)) について検討した。

- (a) QC 試料 (既知濃度試料) を用いた試験成立の判定
- (b) 試料の測定濃度の CV 値を用いた試験成立判定
- (c) 検量線を用いて back-calculation した検量線用標準物質濃度の真度・精度を用いた試験成立判定
- (d) 検量線の形状による試験成立判定
- (e) 標準物質と試料の用量反応曲線の類似性
- (f) 直線性、平行性の判定

方法 1 では主に (a)~(d) が使用されるが、(b), (c) で良好な判定が可能であると考えられた。方法 2 の試験成立条件として使用される (e) については、extra sum of square 法 (標準物質と試料に共通する回帰式を適用した場合と、個別の回帰を適用した場合の残差分散を、分散分析で比較する方法)、及び、equivalence test (回帰式のパラメータ等に予め許容範囲を設定する方法) について検討した。extra sum of square 法ではデータのばらつきが大きいほど判定が甘くなるため、equivalence test が有用であると考えられた。方法 3 で使用される (f) についても、分散分析を用いた場合、データのばらつきが判定に影響した。

データのばらつきが判定に影響を与える場合、試験の不良により本来の活性と異なる数値となったケースの排除が困難になるため、equivalence test などによりどれだけ厳しく判定できるかが、試験法を設定する上での鍵となると考えられる。

上記の成果を基に、ELISA を用いた結合性試験について、測定様式、操作法、品質管理試験への応用、試験成立条件に関する解説と留意点をまとめ、日局参考情報原案を作成した。

2) SPR

SPR 法を用いた結合性試験について、装置、測定法、データ解析法、品質管理試験への適用（システム適合性の設定法等）に関する解説と留意点をまとめ、日局参考情報原案を作成した。原案は、日局原案審議委員会生物薬品委員会に提出した。

(2) 新規基材を用いて製造される医薬品の品質管理方法の開発：抗 CD20 抗体、TNFR-Fc 融合タンパク質、リソソーム病治療薬候補カテプシン A 及び糖尿病治療薬候補ネスファチン、がん抗原 MAGE、ネコインターフェロン等、種々の組換えタンパク質の発現に成功し、Tg カイコがバイオ医薬品の生産用基材として有用である可能性を示した。Tg カイコから得られた組換えタンパク質の特性解析結果、Tg カイコを用いた製造工程の特徴、及び、細胞基材を用いて生産されるバイオ医薬品について蓄積されている品質関連の知見をもとに、Tg カイコを用いて製造されるバイオ医薬品の品質管理の課題として、①翻訳後修飾、②製造工程由来不純物、③ウイルス等混入汚染物質、④原材料の管理手法、及び⑤初期工程の管理手法を抽出した。モデル抗 CD20 抗体の特性解析では、①に関連して、Tg カイコ由来抗体は動物細胞由来抗体に比べて、フコースを持たない糖鎖の含量が高く、高い抗体依存性細胞傷害活性を示すことを明らかにした。また、②に関連して、宿主由来タンパク質の解析を行った。さらに、④に関連して、品質の一定性確保のために重要な原材料となる Tg カイコの管理手法確立を目指し、凍結卵巣及び凍結精子によるバンク作製法の改良を行った。これらの成果をもとに、Tg カイコ由来バイオ医薬品の品質評価・管理手法の要件の公開に向けて準備中である。

(3) ウイルス安全性評価方法の開発：HEV のカプシドタンパク質をバキュロウイルスに組み込みウイルス様粒子を作製し、ウイルスコピー数のモニター用 short DNA を取り込ませて、人工ウイルス粒子を作製した。現在、高感度化に向けた検討と、プロセス評価への応用性を評価中である。また、MVM の Alexa Fluor 488 による蛍光標識体及び未標識体の感染宿主域を CPE、ウイルス DNA コピー数の測定により評価し、蛍光標識体を用いた場合でも、ウイルス感染を追跡することができることを明らかにした。

(4) 免疫原性評価方法の開発と標準化：ウサギ抗 mAb 抗体をモデルとして、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した抗 mAb 抗体の SPR 法、ELISA 法、及び電気化学発光測定法などの各種汎用法の有用性評価を多機関で行い、各抗薬物抗体測定法のマトリックス効果、精度、カットポイント、特異性及び感度等を明らかにした。

D. 結論

バイオ医薬品の QbD 実現に向けて、

- (1) PAT 手法として、抗体医薬品のグリコフォーム、及び分子変化体のモニタリングシステムを開発した。酸性オリゴ糖試験法、中性糖鎖の APTS 誘導体化 CE/FL 法及び ELISA による結合活性試験法を標準化し、日局原案を作成した。また、SPR 法の日局原案を作成し、日局原案審議委員会生物薬品委員会に提出した。
- (2) モデルタンパク質の試験的製造と特性解析結果をもとに、Tg カイコがバイオ医薬品生産用基材として有用である可能性を示した。また、Tg カイコに関連する品質上の課題を抽出し、Tg カイコ由来バイオ医薬品の品質管理要件をまとめた。
- (3) ウイルス安全性評価用の非感染性ウイルス粒子を開発した。また、ウイルス感染性評価に利用可能な新規蛍光標識ウイルスを開発した。
- (4) 抗薬物抗体測定用各種試験法の分析能パラメータを比較し、それぞれの有用性を確認した。

E. 研究発表

1) 海外

原著論文による発表	5 件
総説等の発表	1 件
学会発表	6 件

2) 国内

原著論文による発表	0 件
総説等の発表	8 件
学会発表	30 件

3) 政策提言

3 件

主な研究発表

海外：総説等

Kuribayashi R, et al: Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD).
<http://jcggdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow.action>

海外：原著論文

- 1) Takakura D., et al.: Selective glycopeptide profiling by acetone enrichment and LC/MS. *Journal of Proteomics*. in press
- 2) Takakura D., et al.: An improved in-gel digestion method for efficient identification of protein and glycosylation analysis of glycoproteins using guanidine hydrochloride. *Proteomics*. in press
- 3) Hashii N., et al.: Characterization of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* in press

海外：学会発表

- 1) Itoh K, et al.: Transgenic silkworm as a novel therapeutic glycoenzyme resource for lysosomal storage diseases. 26th International Carbohydrate Symposium (2012.7) Madrid
- 2) Niimi S: Risk factors, clinical consequence and mitigation of immunogenicity. Immunogenicity for Biopharmaceuticals & Biosimilars Asia (2012.10) Singapore
- 3) Niimi S: Requirement for Approval of Biotechnology-derived Pharmaceuticals in the Clinical trials from the Perspective of Immunogenicity-consideration Based on the Examination Reports 2nd Novel Immunotherapeutics. Summit Immunogenicity & Immunotoxicity (2013.2) San Diego
- 4) Kawasaki N: Current situation and issues in Japanese Pharmacopoeia. 10th Annual Meeting DIA Japan 2013 (2013. 11) Tokyo
- 5) Niimi S: Government-private Sector Joint Research Project to Establishment and Standardize Immunogenicity Assays in Japan. Id. (2014.1) San Diego

国内：総説等

- 1) 原園 景ら：抗体医薬品の標準的糖鎖試験法：2-アミノベンザミド誘導体化及び親水性相互作用クロマトグラフィー／蛍光検出：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 44, 357-361 (2013)
- 2) 新見伸吾：バイオ医薬品の免疫原性予測方法. 同上, 44, 26-35 (2013)
- 3) 新見伸吾：バイオ医薬品の免疫原性が薬物動態, 有効性, 安全性に及ぼす影響とその軽減戦略. 同上, 44, 114-122 (2013)

国内：学会発表

- 1) 瀬筒秀樹ら：バイオ医薬品生産に向けた遺伝子組換えカイコ技術の開発と課題. 第5回公開シンポジウム「カイコ産業の未来」(2013. 1) 東京
- 2) 原園 景ら：液体クロマトグラフィー, キャピラリー電気泳動及び質量分析を用いた抗体医薬品糖鎖プロファイリング法の比較. 日本薬学会第133年会 (2013. 3) 横浜
- 3) 川崎ナナら：バイオ医薬品ヒト初回投与試験のリスク低減に向けて —抗体医薬品作用機序の解析. 同上 (2013. 3) 横浜
- 4) 石井明子ら：トランスジェニックカイコを用いた抗体医薬品開発の可能性と課題. 同上シンポジウム「カイコを用いた新規医薬品と評価システムの開発」(2013.3) 横浜
- 5) 瀬筒秀樹：カイコの遺伝子工学と応用. 同上シンポジウム (2013.3) 横浜
- 6) 伊藤孝司：トランスジェニックカイコを用いたリソソーム病治療薬の開発. 同上シンポジウム (2013.3) 横浜

- 7) 瀬筒秀樹ら：後部絹糸腺における水溶性組換えタンパク質の発現の試み. 日本蚕糸学会第83回大会 (2013. 3) つくば
- 8) 伊藤孝司ら：ガラクシアリドーシス治療薬候補としてのトランスジェニックカイコ由来ヒトカテプシン A の解析. 第54回日本生化学会中国・四国支部例会 (2013.5) 徳島.
- 9) 伊藤孝司ら：バイオ医薬品の生産基材としてのトランスジェニックカイコとネオグライコバイオロジクス創製への応用. 日本糖質学会第32回年会 (2013.8) 大阪
- 10) 瀬筒秀樹ら：トランスジェニックカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシン A の糖鎖修飾と機能評価. 同上(2013.8) 大阪
- 11) 橋井則貴：抗体医薬品高親和性ペプチドカラムの開発とバイオアナリシスへの応用. 第61回質量分析総合討論会 (2013.9) つくば
- 12) 多田 稔ら：トランスジェニックカイコを用いて生産された抗 CD20 抗体の特性解析. 第86回日本生化学会 (2013.9) 横浜
- 13) 伊藤孝司ら：ガラクシアリドーシス治療薬候補としてのトランスジェニックカイコ由来ヒトカテプシン A の解析. 同上(2013.9)
- 14) 伊藤 孝司：ネオバイオロジクスの精製とリソソーム病治療薬開発へのアプローチ. 第5回全国共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム(2013.11) 徳島
- 15) 伊藤孝司ら：リソソーム病治療薬候補としてのトランスジェニックカイコ絹糸腺由来組換えヒトカテプシン A の機能解析と分子装飾. 第4回グライコバイオロジクス研究会 (2013.11) 札幌.
- 16) 川崎ナナ：バイオ医薬品の糖鎖試験の現状と課題. 第24回クロマトグラフィー科学会議 (2013.11) 東京
- 17) 森脇有加ら：医薬品承認申請を念頭においた抗体医薬の分析技術. 同上 (2013.11) 東京
- 18) 武田茂樹, 瀬筒秀樹, 他6名：インスリン分泌促進物質の精製と解析. 第36回日本分子生物学会 (2013.12) 神戸

政策提言

- 1) 表面プラズモン共鳴法 日局参考情報原案：日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会に提出 (2013年3月)
- 2) 糖鎖試験法 日局一般試験法, 及び参考情報原案：同上 (2014年3月提出予定)
- 3) ELISA 法 日局参考情報原案:同上 (2014年3月提出予定)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 1件

- 1) 特願 2013-005478 「抗 TNF α 抗体親和性ペプチド, ペプチドカラム, 及び抗 TNF α 抗体親和性ペプチドのスクリーニング方法」
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし