

令和元年度

創薬基盤推進研究事業

公開シンポジウム

革新的医薬品創出の新機軸 ～基盤技術と臨床アプローチ～

要旨集



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

令和元年度 創薬基盤推進研究事業 公開シンポジウム

開催日：令和2年2月3日（月）

会場：ソラシティホール（お茶の水ソラシティ）

〈プログラム〉

13:00 開会挨拶AMEDプログラムディレクター 竹中登一

来賓挨拶 厚生労働省医政局研究開発振興課 課長 伯野春彦

13:10 創薬基盤推進研究事業の概要紹介..... AMED 創薬戦略部医薬品研究課 課長 塩川智規

13:20 第一部：新しい創薬デザイン研究

座長：AMEDプログラムスーパーバイザー 高坂新一

『中分子アゴニスト創薬のロジカルデザイン～OX40 アゴニスト開発を実施例として～』

高折晃史（京都大学）

『抗体を用いた膜タンパク質の構造創薬研究』

岩田 想（京都大学）

『Unstructured タンパク質を標的にしたドラッグデザイン手法の確立を目指した研究』

上村尚人（大分大学）

『疾患モデルとしての有害事象の解析による創薬標的の導出』

金子周司（京都大学）

15:20 休憩

15:35 第二部：臨床開発を目指した創薬研究

座長：AMEDプログラムオフィサー 井上和秀

『革新的医薬品等開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得』

斎藤嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所）

『核酸医薬品の安全性確保のためのオフターゲット作用の評価技術開発』

井上貴雄（国立医薬品食品衛生研究所）

『革新的技術に裏打ちされた有効かつ安全な次世代アジュバント開発』

石井 健（医薬基盤・健康・栄養研究所）

『革新的な粘膜免疫誘導型アジュバントの実用化研究』

植松 智（大阪市立大学）

『筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群の脳内炎症PETイメージングと治療』

渡辺恭良（理化学研究所）

17:40 閉会挨拶AMEDプログラムスーパーバイザー 高坂新一



目 次

創薬基盤推進研究事業の概要紹介 4

第一部：新しい創薬デザイン研究

『中分子アゴニスト創薬のロジカルデザイン～ OX40 アゴニスト開発を実施例として～』..... 6
高折晃史（京都大学）

『抗体を用いた膜タンパク質の構造創薬研究』..... 8
岩田 想（京都大学）

『Unstructured タンパク質を標的にしたドラッグデザイン手法の確立を目指した研究』.....10
上村尚人（大分大学）

『疾患モデルとしての有害事象の解析による創薬標的の導出』.....12
金子周司（京都大学）

第二部：臨床開発を目指した創薬研究

『革新的医薬品等開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得』..14
斎藤嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所）

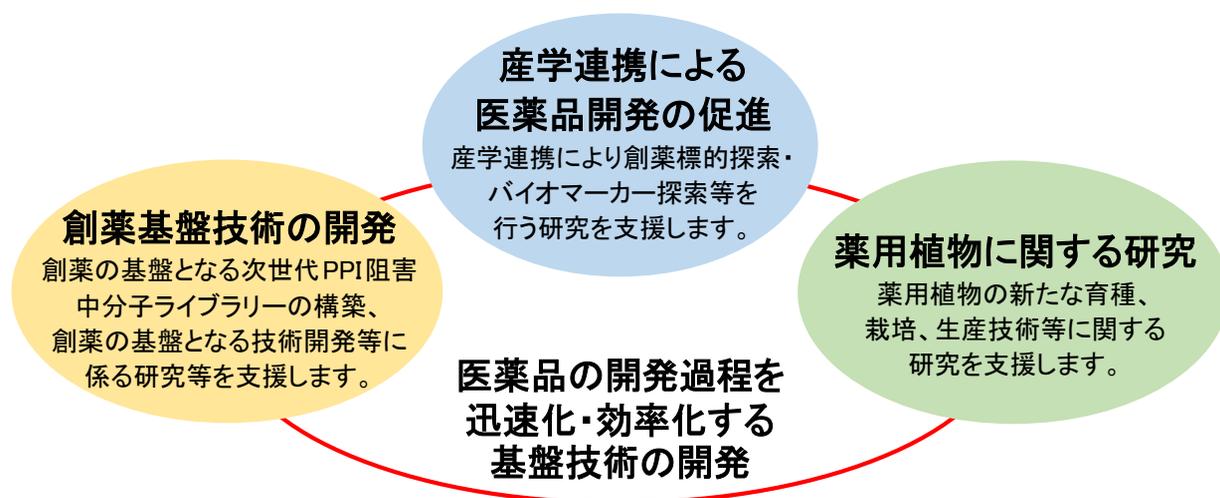
『核酸医薬品の安全性確保のためのオフターゲット作用の評価技術開発』.....16
井上貴雄（国立医薬品食品衛生研究所）

『革新的技術に裏打ちされた有効かつ安全な次世代アジュバント開発』.....18
石井 健（医薬基盤・健康・栄養研究所）

『革新的な粘膜免疫誘導型アジュバントの実用化研究』.....20
植松 智（大阪市立大学）

『筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群の脳内炎症PETイメージングと治療』.....22
渡辺恭良（理化学研究所）

■創薬基盤推進研究事業について



- プログラムスーパーバイザー：高坂 新一（国立精神・神経医療研究センター神経研究所 名誉所長）
- プログラムオフィサー：井上 和秀（九州大学 理事・副学長）
益山 光一（東京薬科大学 薬学部医療薬物学科 教授）

AMED「オールジャパンでの医薬品創出」プロジェクトにおける創薬研究の高度化として位置付けられる創薬基盤推進研究事業は、革新的な医薬品の創出を目指して、創薬の基盤技術に係る研究を推進します。具体的には、新規標的探索や新薬候補物質の効率的な選定等に資するものとして、医薬品の研究開発の効率化・高度化等を支援するための研究を推進します。

■ 医薬品研究開発の効率化等を支援する創薬基盤技術の開発

創薬基盤研究（次世代PPI阻害中分子ライブラリーの構築、創薬デザイン、医薬品製造工程の高度化、DDS技術、生物資源の基盤整備等）、臨床情報に基づく創薬研究（ドラッグ・リポジショニング、コンパニオン診断薬、創薬標的探索等）、個別化医療、創薬に係る人材育成等を支援します。

■ 産学連携等による医薬品開発の促進

革新的な医薬品を創出するためには、疾患に対するアカデミアの先端的な知見を取り入れた臨床研究等を起点にした研究推進が不可欠です。このため、アカデミアの先端的知見に基づく臨床研究等と製薬企業の創薬技術の連携による創薬標的探索等からなる革新的医薬品の研究開発を支援します。

■ 薬用植物の新たな育種、栽培、生産技術等に関する研究

国内の漢方薬安定供給を目的として、薬用植物の国内自給率の向上に向けて、薬用植物の新たな育種、栽培、生産技術等に関する研究を支援します。



M E M O

中分子アゴニスト創薬のロジカルデザイン ～OX40アゴニスト開発を実施例として～

京都大学 大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 教授
高折 晃史

1986年、京都大学医学部卒業、グラッドストーン研究所研究員、京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学助教、講師を経て、2010年より同教授。2016年より京都大学医学部附属病院がんセンター長、2017年より同副病院長。レトロウイルス感染症と血液疾患研究を専門とし、最近は特にAPOBEC3によるがんクローン進化に関する研究を行っている。



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

抗体は、フローサイトメトリを用いた細胞表面抗原診断などのツールであると同時に、免疫チェックポイント阻害薬をはじめとした抗体医薬やCAR-Tに至るまで臨床医学に必須のテクノロジーである。しかしながら、その作成に関しては、Kohler&Milsteinが発明した原理を踏襲しており、膜受容体に細胞外側からアクセスする機能性抗体は、比較的樹立しにくい。

一方、ラクダ科動物(ラマ、アルパカ等)はH鎖のみで構成される抗体(重鎖抗体)を有し、その可変領域はVHH(variable domain of heavy chain of heavy chain antibody)抗体(nanobody)と呼ばれる。VHHは、単一鎖であり、低分子量、かつ安定した物性で、また、改変が容易等の従来型の抗体にない様々な優れた特性を有している(1)。本研究では、VHH抗体工学を利用して、上記課題を解決し、標的エピトープ特異的な抗体を作製可能とする技術開発を目指した。

2. 研究の進捗状況(成果)

アルパカの免疫によって得られたリンパ球から、ファージライブラリを作製、抗原によるパニング濃縮にて、標的抗原結合VHHライブラリを得た。次いで、次世代シーケンサを用いて、これらの抗体遺伝子情報をライブラリ化した(図1)。さらに、「目的に沿った抗体を理論的に獲得する」ため、標的分子に加え既知の複合体(リガンド、機能性抗体、パートナー分子との複合体形成)をバイオパニングの別ソースとして用い、binder library同士をサブトラクトすることにより、重要なエピトープに結合するVHH群を抽出する手法の確立を目指している(COGNANO社特許出願中)。

このコンセプトを実証する1例として、今回、がん免疫での応用が期待されるヒトT細胞の共刺激分子OX40を

モデル分子とした(2, 3)。その結果、ヒトT細胞においてOX40に刺激を入れるアゴニストVHH抗体の取得に短時間で成功した(図2)。これにより、特定の標的エピトープに対する機能抗体を簡便に樹立できるPOCを得られると考えている。

3. 今後の課題

取得した抗OX40-VHH抗体の標的エピトープの決定、結合様式の構造学的情報を取得する。またVHH自身の改変により、より効率の高い、半減期の長いderivativeを取得する。これらにより、標的分子のエピトープ指向性(アゴニスト、アンタゴニスト)VHH抗体を、ロジカルに、そして高率かつ簡便に取得するパイプラインを構築することが可能になると考える。

図1:VHH製造パイプライン

CogNano PCT出願中

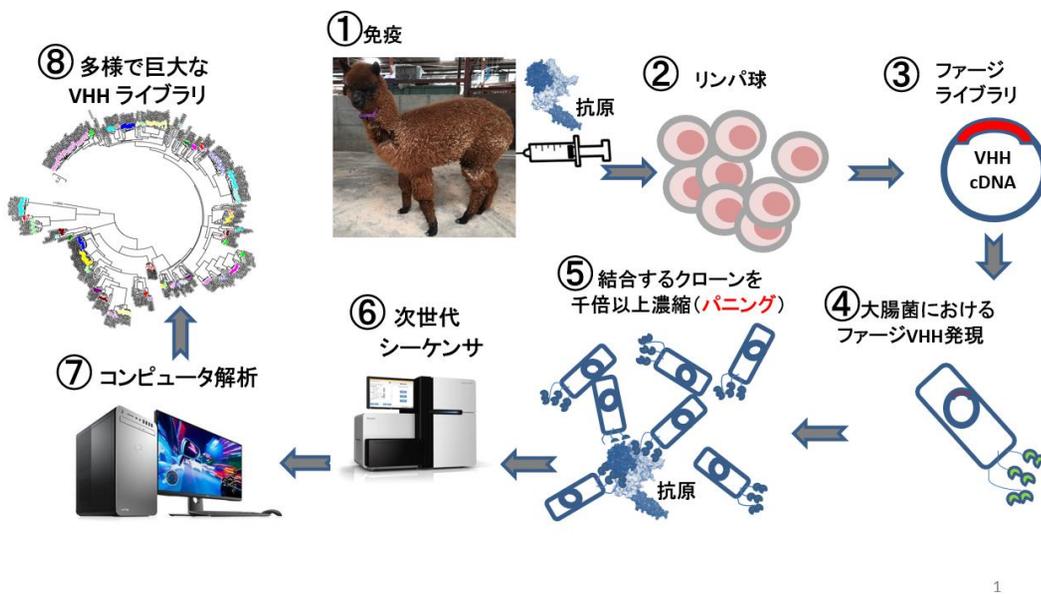
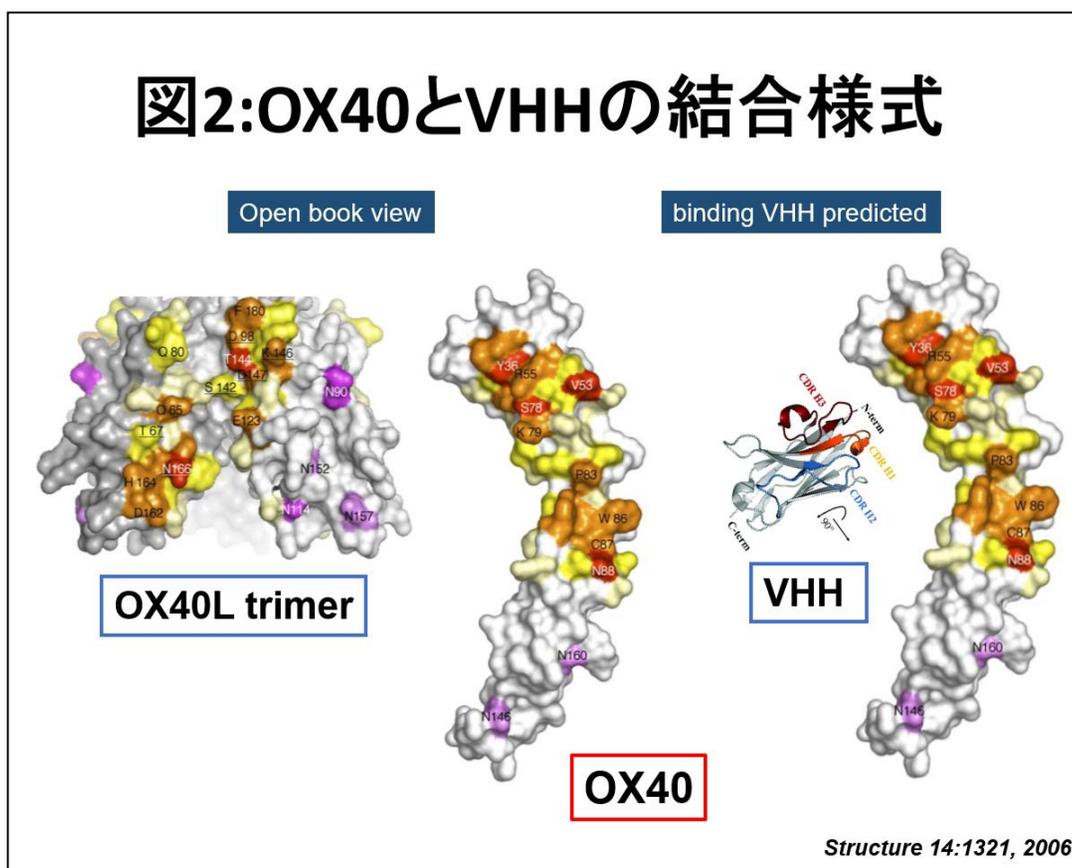


図2:OX40とVHHの結合様式



1. De Vlieger D, Ballegeer M, Rossey I, Schepens B, & Saelens X (2018) Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections. *Antibodies (Basel)* 8(1).
2. Sagiv-Barfi I, et al. (2018) Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy. *Sci Transl Med* 10(426).
3. Imura A, et al. (1996) The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine* 183(5):2185-2195.

抗体を用いた膜タンパク質の構造創薬研究

京都大学 大学院医学研究科 教授

岩田 想

1991年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了。農学博士。2000年より英国インペリアルカレッジ生命科学科教授(～2015年)。2007年より京都大学大学院医学研究科教授、2012年より理化学研究所放射光科学研究センターSACLA利用技術開拓グループ・グループディレクターを併任。専門分野は「X線結晶学」、「膜タンパク質構造生物学」、「Gタンパク質共役受容体の構造解析」および「自由電子レーザーを用いたタンパク質構造解析技術の開発」。



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

膜タンパク質は現在上市されている医薬品の半数以上の作用点であり、今後の抗体医薬品開発の標的としても膜タンパク質の重要性は高い。しかしながら、膜タンパク質の細胞外ドメイン(ECD)を結合標的とする機能性抗体の取得は依然として技術的に難しく、EGFRやPD-1などの大きなECDをもつ膜タンパク質など限られた標的に開発が集中しているため、多様な膜タンパク質に作用する抗体医薬品の新規承認数の順調な伸びにはつながっていない。Gタンパク質共役受容体(GPCR)、チャネル、膜輸送体、膜酵素などのECDが小さい膜タンパク質に対しても効率よくECD構造認識抗体を作製する技術の確立が望まれている。

われわれは長年、ヒト・哺乳類の膜タンパク質のX線結晶構造解析に携わってきたため、高品質の膜タンパク質精製標品を大量生産できるという技術的強みがある。また、膜タンパク質の結晶化においてはしばしば、膜外親水性ドメインに対する立体構造認識抗体(結晶化シャペロン)を結合させて結晶化を促進するが、この目的に適した抗体を効率よく作製する独自の技術も有している。本研究ではこうした膜タンパク質・抗体の生産技術を有機的に連携させて活用しつつ、低免疫原性のヒト抗体作製技術、病態モデルマウスを用いたin vivo薬理活性試験等も取り入れて技術プラットフォームを高度化し、創薬に直結する抗体医薬シーズを効果的に創出してゆくことを目的としている。

2. 研究の進捗状況(成果)

(1) 膜タンパク質の細胞外ドメインを認識する立体構造認識抗体の高効率作製

われわれの抗体技術の中核は、大量に生産できる膜タンパク質精製品を脂質二重膜中に高密度に再構成したプロテオリポソームを用いたリポソーム免疫法、ならびにリポソームELISAスクリーニング技術である。これらの手法を用いればECDが小さな膜タンパク質に対しても

立体構造認識抗体が効率よく取得できる。

GPCR安定化変異体作製技術、種々の融合タンパク質作製技術を駆使し、細胞内ドメインに抗体結合に際して立体障害となる因子(融合タンパク質等)をもった変異体を複数作製し、それを相補的にリポソームELISAの結合標的として用いてサブトラクションスクリーニングを行った結果、GPCRのECDを特異的に認識する立体構造認識抗体を高効率で選抜する技術を開発した。取得した抗体はGPCRの機能を調節する生理活性を有していた。これらの抗体を取得した際のスクリーニングのノウハウは今後のGPCRを標的とした抗体医薬創出に役立てることが可能である。

上記の方法は、GPCRの構造フォールドが束一的であり融合タンパク質を比較的簡単に設計できるという原理に基づいている。非GPCRの膜タンパク質一般に対しては、天然の未変性状態の立体構造を保持し、かつ正しい膜配向性のターゲット膜タンパク質が外被上に高密度に発現したバキュロウイルスを結合標的としてELISA(バキュロウイルスELISA; BV-ELISA)を行えば、ECD認識抗体クローンの判別が容易になり、リポソームELISA(リポソームに再構成された膜タンパク質の膜配向性が制御できない)の限界を補完することが可能となった。

(2) 抗体を用いた膜タンパク質のX線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡単粒子解析

膜タンパク質に立体構造認識抗体(FabまたはFvフラグメント)を結合させて結晶化を促進する手法により、これまでにヒトアデノシンA2a受容体(Nature, 2012)、創薬ターゲット膜酵素の細菌ホモログRce1(Nature, 2013)、ヒトアディポネクチン受容体(Nature, 2015)、ヒト赤血球膜イオン交換体Band3(Science, 2015)、ラットフルクトース輸送体GLUT5(Nature, 2015)、細菌多剤排出輸送体(Nature Commun., 2018)、ヒトプロスタグランジンEP4受容体(Nature Chem. Biol., 2019)、ヒトアンジオテンシンAT2受容体(Nature Struc. Mol. Biol., 2018; Structure, 2020)等の構造解析に成功した(図1)。

立体構造認識抗体はX線結晶構造解析のみならず

ライオ電子顕微鏡単粒子解析にも有用である。膜タンパク質の立体構造認識抗体を作製したものの、膜タンパク質-抗体フラグメント複合体の結晶化が困難なものについては、並行してクライオ電子顕微鏡単粒子解析を進めることで、構造解析の成功率を向上させることができる。膜タンパク質に結合したFabは電子顕微鏡画像の解析においてfiducial markerとして機能するほか、分子サイズの嵩増しと分子全体の動的揺らぎの低減に有効であった。

(3) 膜タンパク質機能を制御する細胞外ドメイン認識抗体の取得と構造学的検証

大腸がん悪性化進展に関与する膜タンパク質候補因子の一つであるテトラスパンinをモデル標的として、BV-ELISA法の実用性の検証を進めた。テトラスパンinの高品質精製標品および従来からの抗体作製・スクリーニング技術(リポソーム免疫、リポソームELISA、蛍光ゲル濾過分析等)を用いて立体構造認識抗体を選別し、さらにその中から膜タンパク質のECD側に結合しているクローンをBV-ELISA法を用いて識別することによ

て、複数のECD構造認識抗体を取得した。

取得した抗体について、in vitro薬理活性評価(高転移性大腸がんオルガノイドの培地に抗体を添加することによる増殖阻害効果、形態変化、浸潤能の変化を観察)とin vivo薬理活性評価(高転移性大腸がんオルガノイドをマウス脾臓に移植後に抗体投与による治療実験)を実施している(図2)。すでに一部のクローンではがん転移を促進する顕著な生理活性をもつことが明らかになっている。機能性抗体の作用機序を構造学的に解明するために、標的テトラスパンin-Fab複合体の構造解析(X線、電顕)も並行して進めている。

3. 今後の展開

病態モデルマウス生体内で、がん悪性化進展に対して明確な生理活性(がん転移の抑制あるいは促進)を示す機能性抗体については、現象全体を俯瞰するトランスオミクス解析や複合体構造解析などを組み合わせ、分子メカニズムの詳細な解明が必要である。

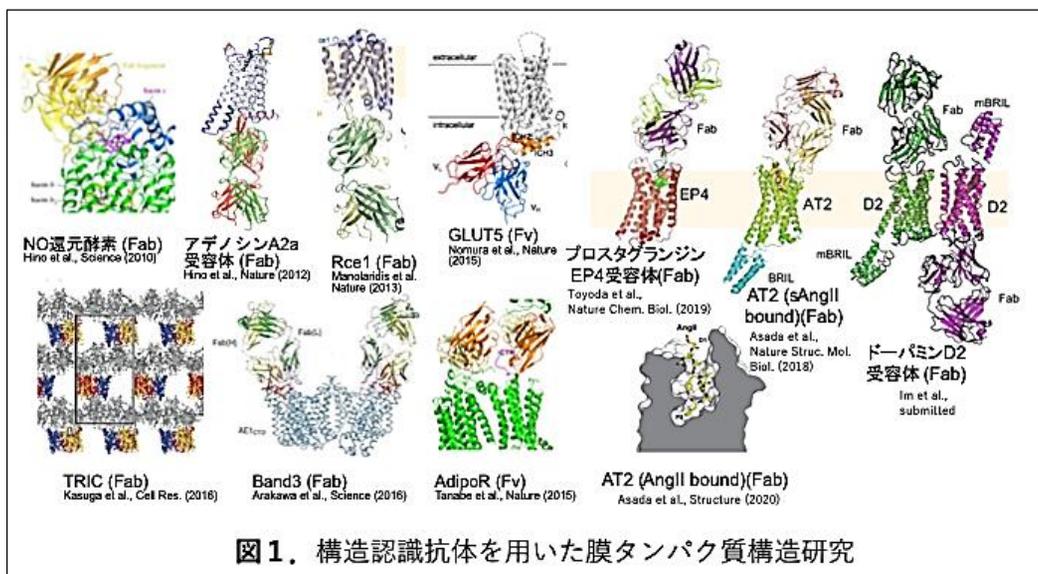


図1. 構造認識抗体を用いた膜タンパク質構造研究

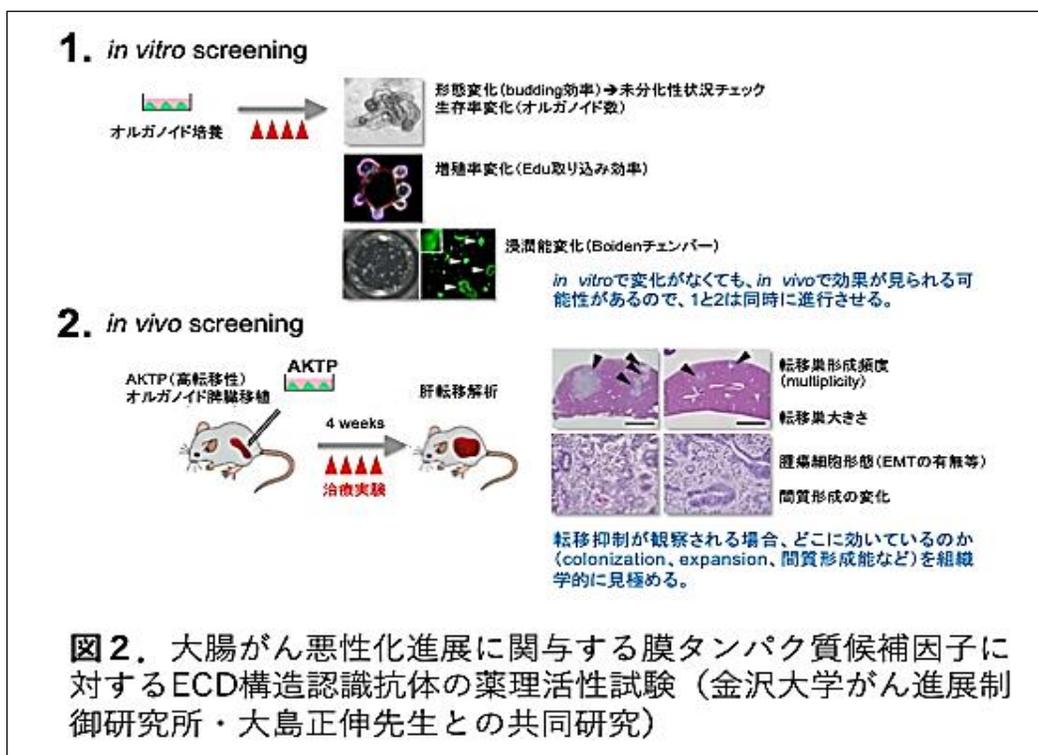


図2. 大腸がん悪性化進展に関与する膜タンパク質候補因子に対するECD構造認識抗体の薬理活性試験(金沢大学がん進展制御研究所・大島正伸先生との共同研究)

Unstructured タンパク質を標的にしたドラッグデザイン手法の確立を目指した研究

— 大分大学における新たなモダリティ創薬と臨床応用に向けた取り組み —

大分大学 医学部臨床薬理学講座 教授
同附属病院 総合臨床研究センター長
大阪大学 医学部未来医療開発部 特任教授
理化学研究所 臨床開発支援室長

上村 尚人

1991年大分医科大学(現・大分大学医学部)卒。同年岡山大学医学部第一内科。1992年同神経内科。1999年大分医科大学大学院博士課程修了。1998年カリフォルニア大学サンフランシスコ校臨床薬理フェロー。2001年同助教級研究員。2004~2014年米国メルク研究所臨床薬理ディレクター及びシニア・プリンシパル・サイエンティスト。2014年~大分大学医学部臨床薬理学講座 教授 同附属病院総合臨床研究センター長、大阪大学医学部未来医療開発部 特任教授(兼)、理化学研究所臨床開発支援室長(兼)



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

新規医薬品開発は、年々レベルが向上して来ているものの、依然として治療法の無い疾患は数多く、特に細胞内のタンパク質間相互作用を標的にした創薬は大きな課題となっている。現在タンパク質間相互作用を標的にした創薬は、抗体を中心とした細胞外タンパク質相互作用を標的にした開発が中心で、医薬品売り上げ上位の半分以上を占めている。しかし抗体などのタンパク質は細胞内へ移行できず、細胞内のタンパク質間相互作用に対する創薬については、良い方法が見いだされていない。Unstructuredタンパク質(IDP)は、細胞内、特に核内においては全タンパク質の約半数を占めており、転写因子や転写活性化調節において中心的な役割を担っている。しかしながら、現在IDPをターゲットとしたドラッグデザイン手法はほとんど確立されておらず、IDPを含む細胞内のタンパク質間相互作用を標的にした創薬は依然難しいと考えられている。そこで本研究では、細胞内において重要な役割をしているUnstructuredタンパク質をターゲットとしたドラッグデザイン手法の確立を目指した。また本研究を推進することと並行して、構築する創薬手法を駆使できる人材(BiologistとChemist)の育成も行い、プロジェクト完了時には、大分大学に創薬センターを作り、その運営の核となる人材となる様に幅広い創薬技術の教育を行った。

2. 研究の進捗状況(成果)

本研究では、疾患の原因となるタンパク質の部分構造(Unstructured領域)を模倣する技術を活用した化合物

を軸とする創薬について行なってきた。既に得られた成果としては、大分大学医学部微生物学講座が見出した狂犬病ウイルス阻害の新たな標的であるNタンパク質のC末を狙った化合物を挙げる事が出来る。手順としては、標的構造を模倣する化合物のデザイン・合成を行い、最初の活性化化合物であるTCB-025を得ることが出来た。この化合物は動物実験でも効果を示したことから周辺化合物の最適化を実施した。その結果、臨床開発化合物の候補としてTCB-231を得ることができた。現在はTCB-231の臨床適応可能性の検討と最適化を進めているところであり、今まで治療法の無い狂犬病をターゲットにした新たな治療薬を目指した開発を進めている。

また本研究では、構築する創薬手法を駆使できる人材(Computational Medicinal BiologistとChemist)2名の育成も行ってきた。大学において創薬開発が実施可能な専門人材を育てるためには、上記の狂犬病ウイルス治療薬開発のようなシーズがなければ難しい。育成対象に対して座学での教育の提供を行うだけでなく、探索の進んだテーマで創薬の各ステップを実践し、創薬の基礎知識とスキルを身につけた研究者としての育成を達成することができたことも大きな成果である。また、本研究を端緒として大分大学の研究開発基盤を強化させ、大学発創薬を加速するための仕組みとして、大分大学医薬品開発クラスターの構築を開始した。本クラスターでは大学の知を結集し令和2年をめぐりにドラッグディスカバリーセンターを設置する予定であり、国際共同研究も実施可能な先端的研究開発基盤の構築と共に、次代を担う人材育成をも可能とする研究開発の実現を目標としている。

3. 今後の課題

細胞内において重要な役割をしているUnstructuredタンパクに焦点を絞り、独自のヘリックス模倣技術を駆使したドラッグデザイン手法の確立を目指してきたが、現在、狂犬病シーズにおける創薬開発の候補化合物のHIT化合物から最適化が実施されている過程にあり、さらなる活性の向上を目指したアプローチを行うことが課題である。

また、本研究終了時となる2019年度末の成果をもって、大分大学の研究開発基盤を強化させ、大学発創薬を加速するために、医薬品開発クラスター構想が実現化され、新しい組織としてドラッグディスカバリーセンターが設置されることとなった。具体的には、大学の知を結集し、国際共同研究も実施可能な先端的な研究開発基盤の構築と共に、次代を担う人材育成をも可能とする研究開発の実現を目標とする。その端緒として「Unstructured領域を標的にしたペプチド模倣技術」を用いた創薬シーズの実現を加速させる予定である。

シーズの探索から初期薬効評価を経て、真のアンメットニーズを充足するためのターゲットプロダクトプロファイルの設定、早期臨床開発計画の立案、創薬化学的な視点からのリード化合物の最適、非臨床における薬効評価、薬物動態的評価、毒性評価を経て、ようやく臨床での検討が実施されるため、様々な専門家により、集学的な検討がなされなければならない。今後大分大学に様々な分野の専門家を集結させることで、グローバル製薬企業の早期開発チームのような研究・開発体制を構築し、多様性の中で将来の医療を支える医薬品開発のスペシャリストを育成する。今後さらに早期臨床開発の専門家、薬事専門家やプロジェクト・マネジャーを配置し、各種創薬シーズに対するシームレスな研究開発を実現させたい。

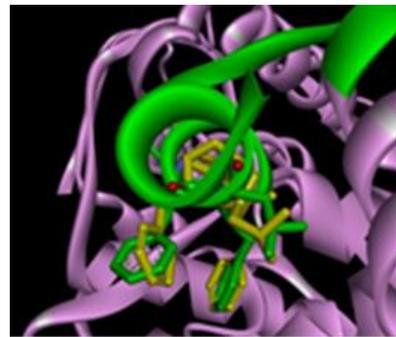


図1 新規化合物と標的となるUnstructured領域の重なり

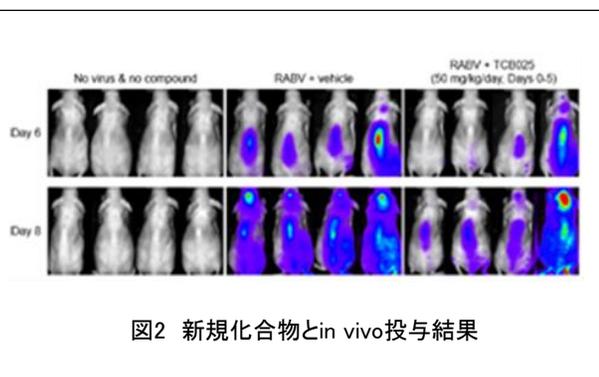


図2 新規化合物とin vivo投与結果

疾患モデルとしての有害事象の解析による創薬標的の導出

京都大学 大学院薬学研究科生体機能解析学分野 教授

金子 周司

1980年京都大学薬学部薬学科卒業、1985年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了・薬学博士、同年富山医科薬科大学和漢薬研究所助手、1988年京都大学薬学部(薬理学講座)助手、1992年同助教授、1998年京都大学大学院薬学研究科(医療薬理学分野)助教授、2004年同研究科(生体機能解析学分野)教授、現在に至る



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

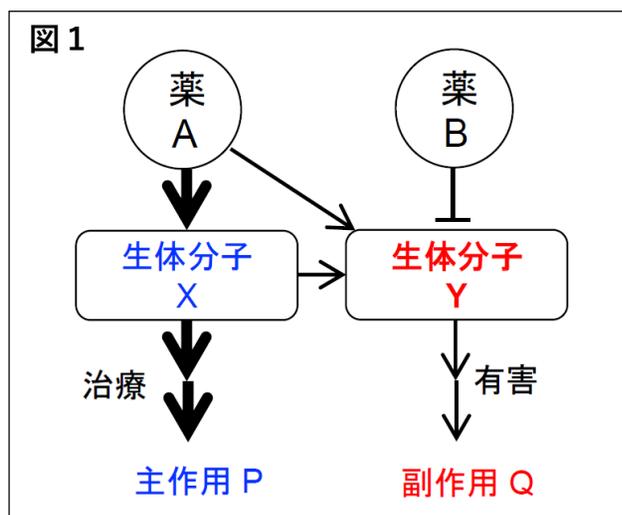
医薬品の好ましくない副作用(以下、有害事象)を治験段階で十分に把握することは難しく市販後調査が必要となる。米国FDAが2000年代より構築してきた有害事象の自発報告データベースFDA Adverse Event Reporting System (FAERS)は2018年までに1000万を超える症例が登録・公開されており、人間での有害な薬効例を記録した貴重な臨床エビデンスの一種と言える。FAERSはレギュラトリーサイエンスにおいて安全性監視に活用されているが、基礎研究や創薬への活用はあまり行われていない。しかしFAERSデータの半数例近くが多剤併用例であることから、あらゆる薬物・薬物相互作用の解析や、有害事象の交絡因子に関する統計学的な研究に用いることができる。

ある薬物Aが生体分子Xを介して治療に繋がる主作用Pを発揮するとき、有害事象Qは別の臓器や細胞にある異なる生体分子Yを介して発現すると考えることができる(図1)。ときに主作用Pと有害事象Qは共通した生体分子Xへの作用で起こり、その場合は細胞特異的な下

流シグナル経路に依存した有害事象となる。FAERSを薬剤誘発性ヒト症状データベースと見なすと、その発生リスクに影響する交絡因子を検討できる。多剤併用例を解析することによって、有害事象Qの発生率を低減する偶然の併用薬Bを探索すれば、薬物Bは元々意図しない薬効によって薬物Aの有害事象を低減する治療薬となるかもしれない。こうして有害事象自発報告の統計学的解析によって、ドラッグ・リポジショニングに至る仮説を導き出せる。

さらに有害事象メカニズムを追究するなら、薬物Aによる有害事象Qをそれ自体で研究する場合に比べて、併用薬BがQを抑制するという事実は未知の生体分子Yを特定する大きな手がかりとなる。こうして特定されたYは有害事象関連分子であると同時に、症状が類似したヒト疾患の表現型に関与する分子であるかもしれない。もしそうなら、創薬標的を創出すること、さらに新化合物を設計する創薬に繋げることができる。以上のようなアイデアに基づいて、我々は有害事象の発症率を低減させる併用薬から新しい創薬標的を見出すプロジェクトを行っている。

図1



2. 研究の進捗状況(成果)

我々はこれまでにクエチアピンによる高血糖・糖尿病の発症をビタミンDの併用が強く抑制することを統計学的に発見し、その仮説を動物・細胞を用いた実験で実証するとともに、インスリン受容体の下流に位置するアダプタータンパク質PI3KR1に新たな創薬標的分子としての重要性を見出した(Nagashima et al. Sci Rep 2016)。現在はレセプトデータや電子カルテといった母数が明確なReal World Dataを用いた実証法を開発しており、それらも活用しつつ表1に掲げるような有害事象を予防ないし改善する併用薬をそれぞれ見出し、その実証実験まですべてに成功した。

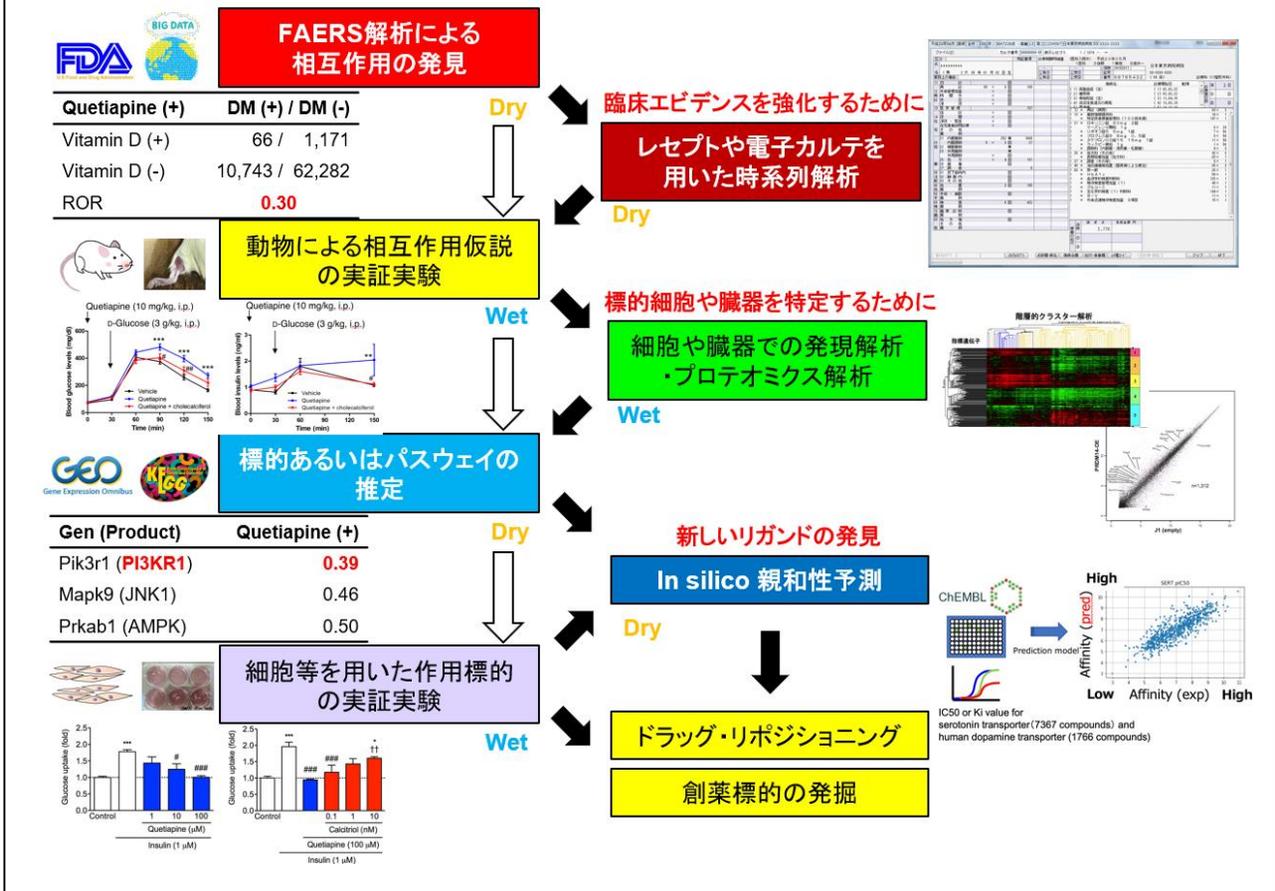
表 1

原因薬	有害事象
クエチアピン	高血糖・インスリン抵抗性
オランザピン	脂質異常症
ドパミンD ₂ 受容体遮断薬 (ハロペリドール他)	遅発性ジスキネジア
ドパミンD _{2/4} 受容体刺激薬 (プラミペキソール他)	強迫性障害
フルオロキノロン系抗菌薬	腱障害
パクリタキセル・ボルテゾミブ	末梢ニューロパチー

3. 今後の課題

現在、図2に示すような戦略で併用薬による改善作用の分子作用メカニズムの特定を急いでいる。本手法で得られた創薬標的に対して高い親和性を示す新規化合物を効率的に創出するため、多数の実測された化合物の受容体親和性データと化合物の化学構造をグラフ畳み込みネットワークに与えて機械学習させ、受容体親和性が不明な化合物について薬理活性を予測するシステムの開発にも着手している。

図 2



革新的医薬品等開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部長

斎藤 嘉朗

1987年九州大学薬学部卒業、1989年同大学院薬学研究科修士課程修了。同年国立衛生試験所（後、国立医薬品食品衛生研究所）機能生化学部・研究員。トロント大学医学部博士研究員、国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・主任研究官、室長、同医薬安全科学部・室長を経て、2010年同医薬安全科学部長（現職）。2019年12月日本薬物動態学会会長。主な研究領域は、医薬品の安全性に関するバイオマーカー同定、生体試料中薬物濃度分析法評価、医療情報データベースを用いた薬剤疫学解析など。



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

革新的医薬品等の開発効率化は、本邦の医薬品産業の活性化につながる重要な課題である。「医薬品の評価方法の開発と標準化」は、その土台を供すものであり、ガイドラインとして承認審査の過程で利用されるだけでなく、企業における医薬品開発段階での有用な判断基準となり、開発の効率化をもたらす。特に、臨床試験段階での副作用による開発中止は、莫大な損害を企業にもたらすため、非臨床段階で予測性高く医薬品候補物質の安全性を適切に評価できることが重要である。しかし、現行の非臨床安全性評価法は、現況に鑑みると十分とは言えず、新規評価手法の開発が求められている。例えば、核酸医薬品では特有の副作用（特に肝毒性）がオフターゲット作用として知られているが、適切な評価法がない。また安全性予測に有用とされるバイオマーカー利用も分析法の評価基準等がないなど、新技術利用のための評価法も必要である。これら革新的医薬品・新技術のさらなる開発・利用活性化のため、標準的評価法の確立による創薬基盤の向上が重要である。本研究は、臨床試験段階での副作用による開発中止回避等、今後の革新的医薬品等の開発効率化に重要な、非臨床試験段階における次世代安全性評価法3種（①マイクロサンプリング技術とその適用のための生体試料中濃度分析（バイオアナリシス）法、②核酸医薬品と次世代低分子薬に関するオフターゲット作用評価系、③胆汁うっ滞を含む肝毒性予測評価系）を開発・標準化することを目的に、平成29年より開始され、現在3年目となっている。

2. 研究の進捗状況（成果）

毒性評価の基礎となる薬物動態に関しては、毒性所見と薬物等の濃度を同一個体で関連解析しうる「マイク

ロサンプリング」とそのためのバイオアナリシス手法の標準化を行っている。

マイクロサンプリングについては、ラットを用いた典型的な非臨床反復投与毒性試験を想定したケースに関し、日本で繁用されている採血手法を用いてマイクロサンプリング影響評価等を行った。また核酸医薬品（アンチセンスオリゴ）、抗体医薬品のLC/MS解析、低分子バイオマーカーにつき、標準的な生体試料中濃度分析法を確立している（一部、完了）。

また、特定分子を標的とする革新的医薬品（広義の分子標的薬）の毒性評価に関し、次世代分子標的薬（核酸医薬品や次世代低分子薬）の安全性確保において問題となっている、オフターゲット作用の評価手法を開発し標準化している。核酸医薬品の成果については、井上室長の項を参照されたい。標的タンパク質を分解に導く次世代低分子薬に関しては、オフターゲット効果の種差を明らかにし、さらにヒト細胞を用いた網羅的評価系の構築を行っている。

胆汁排泄機構を備えた*in vitro*肝障害評価系の構築と標準化については、3種の評価系の開発を併行して進めており、胆管側トランスポーターの高発現が認められるなど成果が上がっており、陽性対照薬物を用いた評価を進めている。

3. 今後の課題

現在、主として構築した評価系の検証を行っており、順次、多施設で頑健性の確認を行って標準法とする予定である。さらに、この標準法を用いて種々の被験物質に関してデータを取得し、判定基準案の作成を行う計画である。

本研究の目的と概要

研究目的 臨床試験段階での副作用による開発中止回避等、今後の革新的医薬品等の開発効率化に必要な、非臨床試験段階における次世代安全性評価法3種（①～③）を開発・標準化

研究概要

目標：下記3種の標準的評価法を確立
判定基準の設定等のための基盤データ取得

毒性動態：

① マイコサップリングに関する生体試料中薬物濃度分析(バイオアナリシス)手法の標準化

成果を応用

毒性評価：

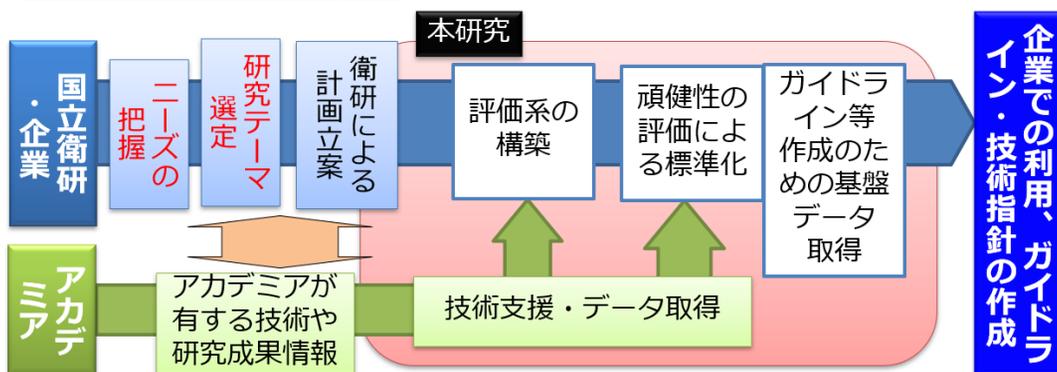
② 次世代分子標的薬のオフターゲット作用評価法の開発と標準化
1: 核酸医薬品、2: 次世代低分子薬
③ 胆汁排泄機構を備えた*in vitro*肝障害評価系の構築と標準化

成果の活用

行政：非臨床安全性評価のガイドラインや技術指針の作成
企業：医薬品開発時に当該技術・判定基準を活用
薬事戦略相談や承認申請資料で利用

医薬品開発期間の短縮、コスト削減、成功確率向上

評価法開発における基本スキームと構成



企業：29社参加

① マイコサップリングに関する生体試料中薬物濃度分析法
グループ長：斎藤 国衛研3、大学1 企業15

成果の *in vivo* 評価への応用

② 分子標的薬のオフターゲット作用の評価法
1) 核酸医薬品 グループ長：井上、大学1、企業6
2) 低分子次世代分子標的薬
グループ長：内藤、国衛研2、企業1

成果の核酸医薬品等評価への応用

③ 胆汁排泄機構を備えた*in vitro*肝障害評価系
グループ長：石田、大学等11、企業13

④ 成果発表会開催等の成果活用：HS財団・高柳

核酸医薬品の安全性確保のためのオフターゲット作用の評価技術開発

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部第2室(核酸医薬室) 室長
井上 貴雄

1998年東京大学薬学部卒業、2003年東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了、同年4月より東京大学大学院薬学系研究科助教。2011年10月、国立医薬品食品衛生研究所に異動、2013年10月に同研究所に核酸医薬を所掌する室が新設され、室長に着任。2014年10月よりAMED設立準備室を併任、2015年4月よりAMEDに出向し、レギュラトリーサイエンス研究の予算配分を担当(規制科学・臨床研究支援室長)。2017年6月に現職に復帰。



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

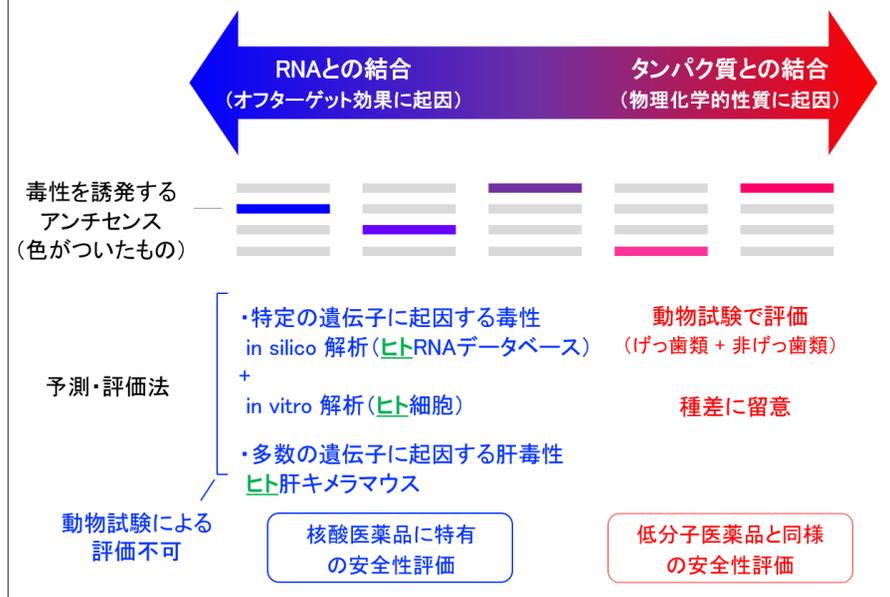
近年、難治性疾患や遺伝性疾患に対する新しいモダリティとして核酸医薬品が注目を集めている。核酸医薬品はタンパク質を標的とする従来の医薬品とは異なり、RNAのレベルで生体を制御できる点が大きな特色であり、この数年で急速に実用化が進んでいる(関連文献)。核酸医薬品に由来する毒性は、RNAとの相補結合に起因する毒性とタンパク質等との結合に起因する毒性に概念的に分類することができる(図1)。このうち、RNAとの結合に起因する毒性(オフターゲット効果に由来する毒性)については、原理的に動物での評価が困難であることから、「ヒト」を対象とした非臨床安全性評価の技術開発が求められている(図1:青)。一方、タンパク質との結合に起因する毒性については、従来の低分子医薬品の毒性発現機構と概念的に同一であり、したがって、動物を用いた一般的な非臨床安全性試験で安全性を評価できると考えられる(図1:赤)。タンパク質との結合に起因する毒性については、核酸医薬品を構成するオリゴ核酸に特有の毒性(クラスエフェクト)も知られており、その代表例としてToll-like receptor (TLR) を介した自然免疫系の活性化が挙げられる。TLRの活性化については配列特異性等の観点から種差が報告されているが、このように種差の影響が考えられる毒性についても、「ヒト」を対象とした評価法の開発が望まれる。

以上の背景を踏まえ、本研究では核酸医薬品の中でも最も開発/実用化が進んでいるアンチセンス医薬品にフォーカスし、ヒト由来の細胞等を用いた非臨床評価技術の確立を目的とする。

2. 研究の進捗状況(成果)

現在臨床開発されているアンチセンス医薬品の多くは、核酸間結合部(リン酸ジエステル結合)がS化(O→S変換)されているほか、核酸の糖部にも化学修飾が施されており、これにより生体安定性ならびに標的RNAとの結合力が飛躍的に向上している(図2)。このうち、Gapmerと呼ばれるアンチセンス医薬品はRNaseHと呼ばれる核内に存在する内在性の酵素と共に機能し、標的RNAを切断することで有効性を発揮する(図2:左下)。Gapmer型アンチセンスではオフターゲット効果に起因する肝毒

【図1】RNAを標的とする核酸医薬品の安全性評価の考え方



性が生じるリスクが知られており、これを予測するための評価技術として、マウスの肝細胞の9割近くがヒト肝由来細胞に置き換わった「ヒト肝キメラマウス」を用いた評価系の構築を進めている。これまでに肝障害時に放出されるヒトALTを特異的に検出するELISA法（残存したマウス肝細胞から放出されるマウスALTは検出しない）を用いて、ヒト肝キメラマウスにおいて肝毒性を誘導する陽性コントロール（低分子化合物ならびにアンチセンス）を複数同定しており、本評価法におけるヒトALT量のダイナミックレンジ等を明らかにしている。

また、アンチセンス医薬品による自然免疫系の活性化についても評価系を検討している。アンチセンスはDNAを基本骨格とする一本鎖オリゴ核酸で構成されているため、一本鎖DNAをリガンドにするTLR9を介した経路の関与が想定されている。そこで、TLR9を活性化するアンチセンスを独自に同定し、ヒトTLR9安定発現細胞（HEK-Blue hTLR9細胞）ならびにヒト末梢血単核球細胞（PBMC）を用いて種々の解析を行った（図3）。この結果、ヒトPBMCのサイトカイン分泌を指標とした解析から、アンチセンスによる自然免疫の活性化にはTLR9に依存し

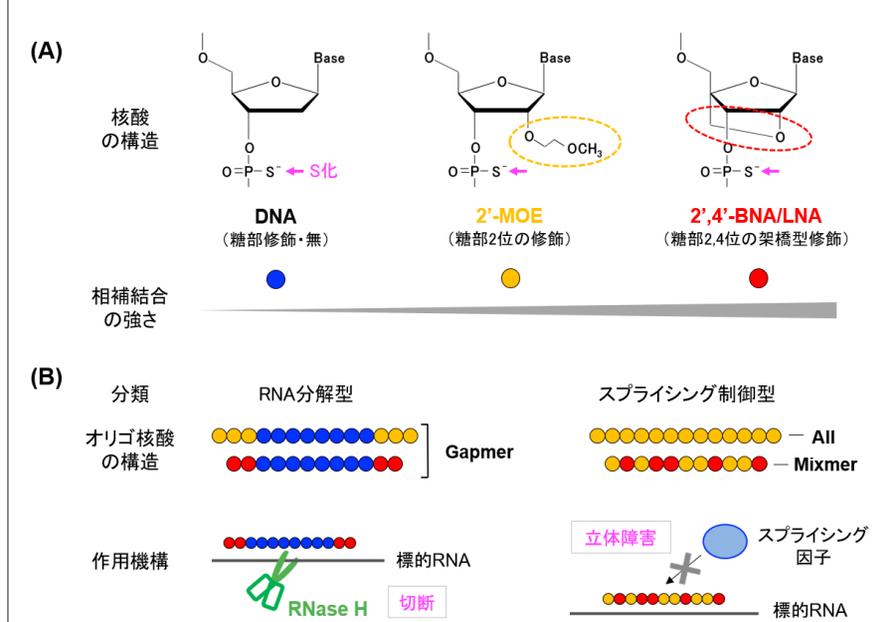
ない経路（TLR9非依存経路）が存在することが示唆された。そこで、この経路を介する自然免疫活性化のin vitro評価系を確立するため、ヒトPBMCを代替するヒト細胞株ならびにTLR9非依存経路の検出に適したサイトカインの探索を行い、候補となるヒト細胞株XおよびサイトカインYを特定した。

3. 今後の課題

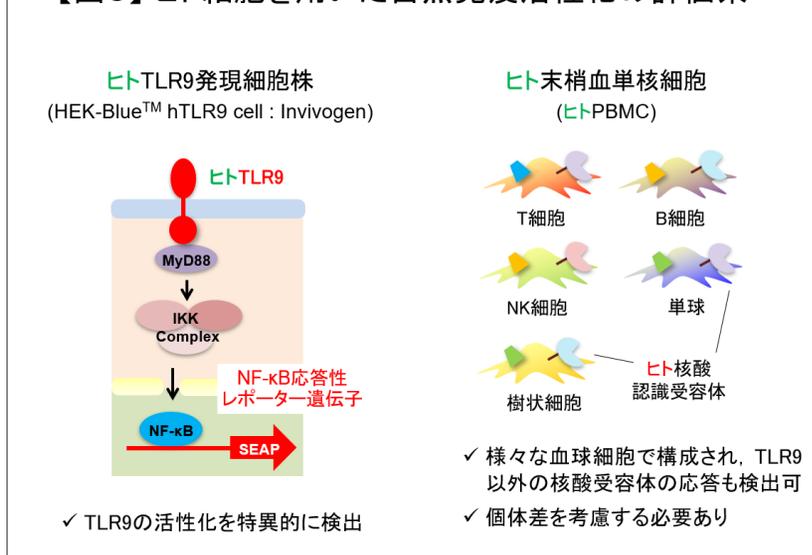
肝毒性の評価法については、ヒト肝キメラマウスと

通常のマウスに対して、数十のGapmer型アンチセンスを投与し、毒性発現のプロファイルが異なること（≒オフターゲット効果に起因する肝毒性を予測できるという科学的根拠）を実験的に示す。自然免疫活性化の評価法（ヒト細胞株X-サイトカインY）については、複数のアンチセンスを用いて系の一般性および有用性を検証する。以上の解析により、アンチセンス医薬品に特有の毒性発現を予測する新規非臨床安全性評価法を確立する。

【図2】アンチセンス医薬品における修飾核酸の配置と作用機序



【図3】ヒト細胞を用いた自然免疫活性化の評価系



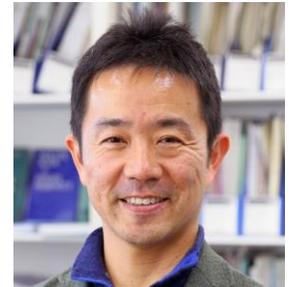
関連文献
 実験医学, Vol.37, No.1 (2019年1月号)
 特集: なぜ、いま核酸医薬なのか-次なる創薬モダリティの本命- (企画: 井上貴雄)

革新的技術に裏打ちされた有効かつ安全な次世代アジュバント開発

東京大学 医科学研究所 ワクチン科学部門 教授
同研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター長
医薬基盤健康栄養研究所 ワクチンアジュバント研究センター
招へいリーダー

石井 健

1993年横浜市立大学医学部卒業。3年半の臨床経験を経て米国FDA・CBERにて7年間研究員、ワクチン臨床試験審査官。2003年JST・ERATO審良自然免疫プロジェクトGL、大阪大学微生物病研究所准教授を経て、2010年より医薬基盤健康栄養研究所アジュバント開発プロジェクトリーダー、創薬デザインセンター長、ワクチンアジュバント研究センター長を経て現在モックアップワクチンプロジェクト招へいリーダー。2010年より大阪大学・免疫学フロンティア研究センター教授兼任。2015-17年日本医療研究開発機構(AMED)に戦略推進部長として出向。平成31年より現職



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

グローバルな創薬の流れにおいて感染症のみならずあらゆる疾患で新たなワクチン開発が進んでいる。アジュバントはワクチンの有効性を誘導し、増強する物質の総称で、ワクチン創薬の鍵を握る。一方で、副作用の問題も危惧されており、副作用予測研究の必要性は以前にも増して高まっている。本研究では、ノーベル賞を受賞した自然免疫研究の知見をトランスレーショナル研究にトランスフォームすべく、新規のアジュバントの開発と分子レベルの作用機序に基づいた「有効性」かつ「安全性」の向上を目指している。安全性の基盤研究としてもアジュバントデータベースの構築を推進し、第12回を重ねた次世代アジュバント研究会を基盤としたアウトリーチ活動を推進する。期待される成果として、ワクチン、アジュバント開発研究者のみならず、ワクチン行政や消費者にも正確かつわかりやすい科学的エビデンスを提供することが可能になり、ワクチン、アジュバントの有効性、安全性の向上技術の確立に寄与することが期待される。

我々は前事業の「アジュバント安全性評価データベースの構築研究」において、アジュバントの安全性や有効性に関する膨大なデータを得ることに成功した。さらに最近では、1)アジュバントの生体内分布、2)食事や代謝の違いが生み出すアジュバントの感受性の違い、3)霊長類を用いた安全性と有効性の評価、などが求められており、それらの情報を利用した、4)トランスオミクス解析も注目されている。

そこで本研究開発では、アジュバントデータベースのデータに加え、上記した4つの評価法を確立し統合することにより、精度の高いアジュバントの評価を構築し、それを利用した有効かつ安全な次世代アジュバントの開発を行う。また、新規アジュバント開発には製薬企業との連携や導出を行うことで、新規アジュバントの実用化を目指す。

本研究開発で目標としている新規アジュバント評価法の確立とガイドライン案の作成は、有効かつ安全な次世代ワクチンアジュバントや適応拡大が進む免疫制御薬としてのアジュバントの開発のためには急務である。事実、我々は製薬企業や大学病院などとアジュバント開発の共同研究を進めているが、安全性および有効性を含めたアジュバント評価法の必要性が

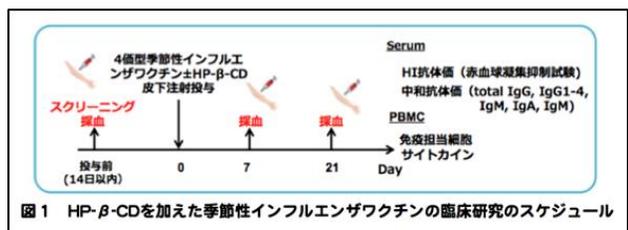
浮き彫りになってきている。そのため、アジュバント開発の技術基盤の向上とともに新規評価法を構築することで、製薬企業のみならずアカデミアにおけるアジュバント開発研究の促進が期待される。またアジュバント開発における行政審査の参考資料としても有用であると考えられる。

2. 研究の進捗状況(成果)

本研究開発は、研究代表者である石井(2019年度まで米田)と分担者である黒田と共同で進めており、事業の開始からこれまで大きく3つの研究に関して検討をすすめた。

1) 新規アジュバントの探索の作用機序解析

我々は新規アジュバントの候補物質としてハイドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CD)を見出した。これまでの遺伝子欠損マウスを用いた解析からHP-β-CDの作用機序の一部を明らかにするとともに、霊長類においてもインフルエンザのワクチンアジュバントとして有効であることを報告してきた。そこで大阪大学医学部呼吸器・免疫内科と共同でHP-β-CDの季節性インフルエンザアジュバントとしての安全性と有効性を確認することを目的とした第I相臨床研究を行った(図1)。



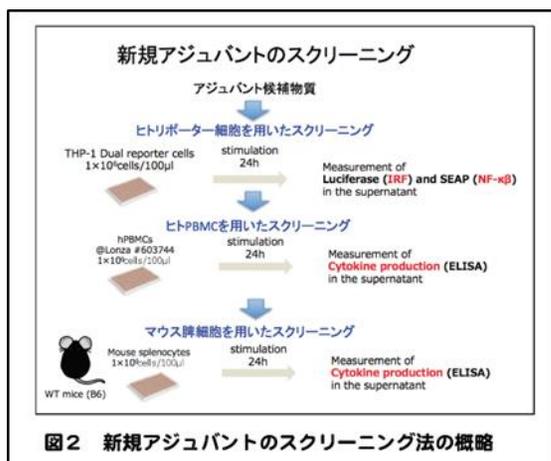
36人の健常人ボランティアを対象に単盲検無作為化比較試験により評価したところ、HP-β-CDワクチンにおいてdose-sparing効果、すなわち抗原を減量(2/3量)してもアジュバント非添加群と同等の効果が認められた。この結果は、HP-β-CDがアジュバントとして機能していることを示している。最近では現行よりも「効果の高い」インフルエンザワクチンが求められているが、年齢を問わず、さらに毎年接種するワクチンに

添加できる安全性が高いアジュバントは開発されていない。HP-β-CD添加のワクチンにおいてdose-sparing効果認められたことから、HP-β-CDは社会的ニーズに沿った新規アジュバントとして有用であると考えている。

さらに我々はHP-β-CDが、現在注目されている経鼻のアジュバントでも有効であることを見出した。遺伝子欠損マウスを用いた作用機序の検討から、経鼻投与ではIL-33を介してアジュバント効果を発揮することが明らかとなった。このようなIL-33誘導型のアジュバントはこれまで報告がなく、ワクチン学会においても新規経鼻アジュバントとして注目された(2019年度に若手奨励賞を受賞)。

2)アジュバントスクリーニング法の立ち上げと評価

HP-β-CDに続く新規アジュバントの探索を進めており、その過程で新規アジュバントを効率よいスクリーニング法の検討を進めてきた。その方法の概略を図2に示す。本スクリーニングではヒト細胞株のリポーター細胞およびヒト末梢血単核球(PBMC)を用い、サイトカイン誘導能を基盤としてスクリーニングを行う。これで得られた候補物質について、さらにin vivoにおけるアジュバント効果のPOC取得の必要性も考え、マウスリンパ球を用いた評価も行う評価系を立ち上げた。実際にこのスクリーニング法が機能するか否かを調べる目的で、医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センターとの共同研究により薬用植物由来エキスをを用い、アジュバントのスクリーニングを行なった。



本研究では74種類のエキスをスクリーニングにかけ、ヒト細胞に反応する15種類のエキスを発見した。さらにマウスの細胞にも反応する4種類のエキスを選別した。これらのエキスのin vivoにおけるアジュバント活性を評価したところ、抗原特異的なIgG抗体を誘導する活性を有していることが明らかとなった。現在はメディシナルケミストリーのラボとの共同研究により種々の低分子化合物、自己集合型化合物、カチオンニックタンパク質の提供を受け、同様のスクリーニングを行い、アジュバント候補物質の探索を行っている。このようなスクリーニング法を確立することで、種々のライブラリーからのアジュバントの探索が可能となる。特に本研究課題で用いた薬用植物由来エキスは経口投与が可能な薬用植物もあるため、幅広い応用が可能なアジュバントとなりうると考えている。

3)アジュバントの生体内分布の解析

薬物の有効性や安全性の評価としてPK/PDによる動態を解析が行われているが、アジュバントは局所への滞留性やリン

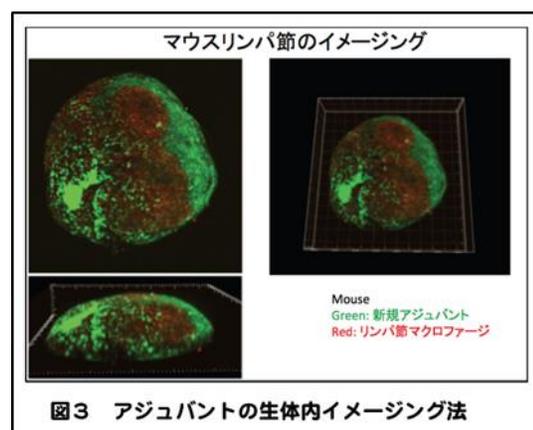


図3 アジュバントの生体内イメージング法

パ節への指向性などもあるため、その動態をPK/PDにより評価するのは困難である。本研究課題ではアジュバントの生体内分布を評価する手法として、二光子励起顕微鏡を用いたアジュバントの生体内イメージング法を構築することで、その動態を検討した。核酸アジュバントであるCpGオリゴヌクレオチドを蛍光標識し、マウスの足蹠に皮下投与する。またリンパ節の免疫担当細胞を発光させる手段として、マクロファージに対する蛍光標識抗体や特定の免疫細胞が発光するリポーターマウスを用いた。CpGは投与後速やかにリンパ節に移行した。リンパ節にはCD169陽性マクロファージとMARCO陽性マクロファージが存在するが、CpGは主にMARCO陽性細胞に取り込まれることが明らかになった。この結果から、本生体内イメージング法はアジュバントの生体内分布を評価するのに適した手法であると考えられた。今後も解析を進めていき、アジュバントの評価法の一つとして手法の確立を目指す。

3. 今後の課題

令和元年度より研究代表者が米田より石井に代わり東京大学医科学研究所に異動、分担者の黒田が兵庫医科大学へ異動したため、当該年度は医薬基盤健康栄養研究所を主体として今後も共同で進めながらも令和2年度より上記3か所にて個々の課題(下記)を検討する予定である。

<新規アジュバントの探索>

<アジュバントの作用機序解析>

<バイオインフォマティクス解析によるアジュバントの評価>

<食事、腸内細菌、代謝とアジュバント効果についての解析>

<霊長類を用いたアジュバントの解析>

参考文献 (2018-2019)

1. Nagatake T, Hirata SI, Koga T, Kuroda E, Kobari S, Suzuki H, Hosomi K, Matsumoto N, Yanrismet Y, Shimajou M, Morimoto S, Sasaki F, Ishii KJ, Yokomizo T, Kunisawa J. BLT1 mediates commensal bacteria-dependent innate immune signals to enhance antigen-specific intestinal IgA responses. *Mucosal Immunol.* 2019 in press.
2. Yamamoto T, Masuta Y, Momota M, Kanekiyo M, Kanuma T, Takahama S, Moriishi E, Yasutomi Y, Saito T, Graham BS, Takahashi Y, Ishii KJ. A unique nanoparticulate TLR9 agonist enables a HA split vaccine to confer FcγR-mediated protection against heterologous lethal influenza virus infection. *Inr Immunol.* 2019 31(2):81-90.
3. Hayashi T, Momota M, Kuroda E, Kusakabe T, Kobari S, Makisaka K, Ohno Y, Suzuki Y, Nakagawa F, Lee MSJ, Coban C, Onodera R, Higashi T, Motoyama K, Ishii KJ, Arima H. DAMP-Inducing Adjuvant and PAMP Adjuvants Parallely Enhance Protective Type-2 and Type-1 Immune Responses to Influenza Split Vaccination. *Front Immunol.* 2018 9:2619.
4. Temizoz B, Kuroda E, Ishii KJ. Combination and inducible adjuvants targeting nucleic acid sensors. *Curr Opin Pharmacol.* 2018 41:104-113.
5. Masuta Y, Yamamoto T, Natsume-Kitatani Y, Kanuma T, Moriishi E, Kobiyama K, Mizuguchi K, Yasutomi Y, Ishii KJ. An Antigen-Free, Plasmacytoid Dendritic Cell-Targeting Immunotherapy To Bolster Memory CD8(+) T Cells in Nonhuman Primates. *J Immunol.* 2018 200(6):2067-2075.
6. Tanaka M, Kobiyama K, Honda T, Uchio-Yamada K, Natsume-Kitatani Y, Mizuguchi K, Kabashima K, Ishii KJ. Essential Role of CARD14 in Murine Experimental Psoriasis. *J Immunol.* 2018 200(1):71-81.

革新的な粘膜免疫誘導型アジュバントの実用化研究

大阪市立大学 大学院医学研究科 ゲノム免疫学 教授
東京大学 医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター
自然免疫制御分野 特任教授

植松 智

1997年 大阪市立大学医学部卒業、同大学附属病院研修医、2004年 大阪大学大学院医学系研究科博士課程卒業、医学博士、2004年 大阪大学微生物病研究所助教、2009年 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任准教授、2012年 東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター自然免疫制御分野自然免疫制御分野特任教授 現在に至る、2014年 千葉大学大学院医学研究院粘膜免疫学教授、2018年 大阪市立大学大学院医学研究科ゲノム免疫学教授 現在に至る



【発表要旨】

1. 研究背景と目的

全身性の強力な病原体特異的IgGとTh1応答と感染門戸の粘膜で高力価の病原体特異的分泌型IgA(sIgA)を誘導する次世代ワクチンの開発が求められている。申請者は腸管でIgA誘導責任樹状細胞(DC)を同定し、そのレチノイン酸合成酵素Raldh2の発現がIgA誘導に必須である知見を得た(1,2)。スクリーニングの結果β 1,3-グルカンがDCにおいてRaldh2を誘導することを見出した。DCの活性化のためにCpG DNAを、粘膜型に変換(Raldh2を発現)するためにβ 1,3-グルカンを用い、抗原と不完全フロイントアジュバント(IFA)と共に筋注すると、抗原特異的なIgG(血中)とsIgA(糞中)を誘導した。初期免疫後、経口、経気道、経膈に抗原のみを追加免疫することで非常に高力価の抗原特異的sIgAを長期間誘導した。この免疫法を新規ワクチン接種法として特許出願した(PCT/JP2016/67403)3)。IFAは効果の高いアジュバントだが、安全性の面から人への応用が難しい。本研究課題では、田辺三菱製薬と共同研究を行い、当該免疫法の人への実用化に向けてリポソームまたはエマルジョンを基剤に製剤化を行い、これらのワクチン接種による製剤の滞留性(H29-30)、免疫誘導効果をマウス(H29-R2)及びサル(R1-R3)で評価する。当該免疫誘導法は、抗原特異的sIgA誘導には経粘膜ワクチンが不可欠という今までの概念を覆す革新的な感染予防法であり、申請者がこれまで行って来た腸管の樹状細胞の研究成果を基盤とした独創的かつ世界最先端の技術である。本プロジェクトでワクチンの基剤をIFAからリポソームまたはエマルジョンに改変し、安全かつ効果的、臨床応用可能な粘膜ワクチンが完成すると考える

2. 研究の進捗状況

1) リポソームまたはエマルジョンを基剤にしたワクチン製剤の滞留性の評価

田辺三菱製薬との共同研究において、IFAの粒子性という点で類似のリポソーム、またはIFAの滞留性という点で類似のエマルジョンを基剤としてOVA、CpG DNA、β 1,3-グルカンを包埋する製剤を調製する。ヒトへの生態適合性が高いと期待される赤血球膜の脂質膜組成(Phosphatidylcholine:Cholesterol = 3:1)を模倣したリポソームを作成する。一方、ヒトへの使用実績のあるスクアランをベースとして、Tween 80とSpan 85を含有する水中油中水型(W/O/W)エマルジョンを使用する。蛍光標識CpGの蛍光量を指標に、筋注投与した直後の蛍光量を100%とした時の24、48時間後の蛍光残存率を滞留性として評価し、動的光散乱法(Dynamic Light Scattering)を用いて粒子径の評価をする。作成したリポソームでは滞留性は向上しなかった。ただし、150 nmほどの粒子径であることから、樹状細胞への取り込み、所属リンパ節への移行効率が向上することが期待された。一方、リポソームと同様にエマルジョンの滞留性を評価すると、滞留性が有意に向上するのが分かった。研究計画の予定通り、H30年度末までに滞留性の評価を終了し、エマルジョンの滞留性がリポソームよりも優れていることを確認した。

2) リポソームまたはエマルジョンを基剤にしたワクチン製剤によって誘導される免疫応答の解析と基剤の最適化

リポソームを基剤にOVA、CpG DNA、β 1,3-グルカン包埋した製剤をマウスに筋注し、Ag特異的IgG(血中)とAg特異的IgA(糞中)の誘導を検討した。リポソームの場合は、IFAと比較して抗原特異的なIgAは弱かった。そのため、プライム後、粘膜面に抗原を付加してもIFAほどのIgA誘導効果が認められなかった。そこで、0週と3週にプライムを行い、7週目に抗原の経口負荷をおこなったところ、IFAと同程度のIgA誘導能となった。この様に、リポソームの免疫誘導能はIFAに比較してかなり弱いことが明らかになった。一方、エマルジョンによる免疫

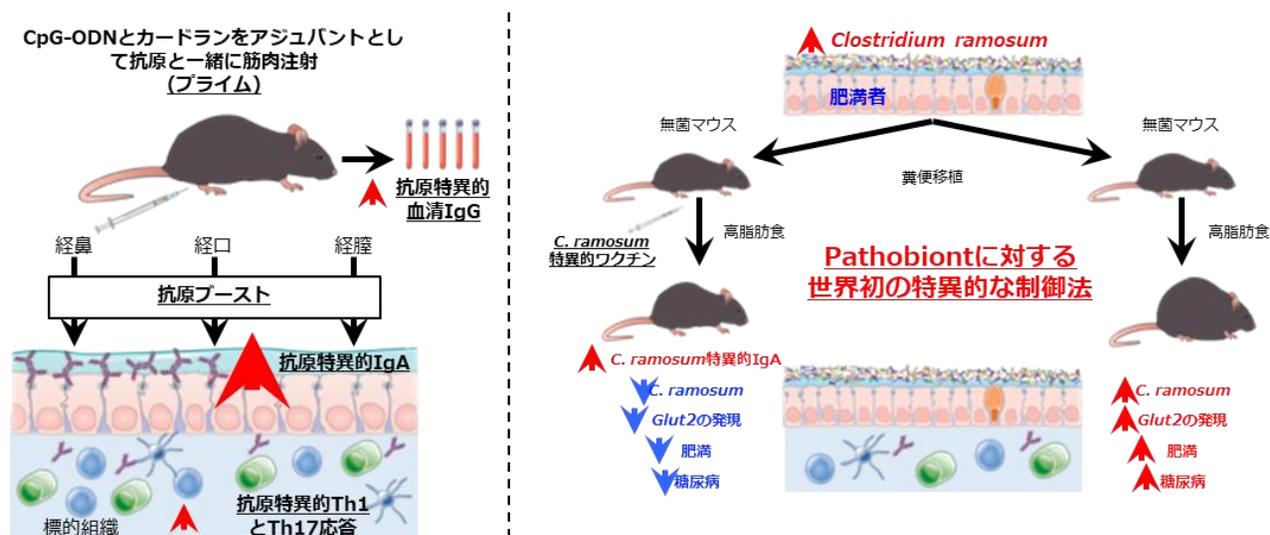
は、プライム後3週後にIFAと同様に一過性の抗原特異的なIgAの誘導が認められた。さらにプライム後6週後に抗原を経口負荷すると、高力価の抗原特異的なIgAを腸管で誘導することに成功した。この様に、IgAに代表される粘膜免疫応答の誘導に関して、エマルジョンによる免疫法がIFAの免疫誘導に近いことが分かった。

3) カニクイザルにおけるワクチン効果の評価

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センターにおいて、カニクイザルにおけるワクチン効果に関して評価を行う。令和元年度は、予備検討を実施する。

3. 今後の展開

カニクイザルの実験において、条件検討をしていく過程でワクチン製剤の微調整が必要と考える。変更に従い、免疫誘導能に関して再検証するとともに、ヒト樹状細胞を用いて同様の応答が誘導されるかさらに検証を行う。令和元年度は卵白アルブミンを抗原としてワクチン効果の予備検討を行う。8週以降に経口でOVAのブーストを行い、効果を見る。令和2年度以降、田辺三菱製薬との共同研究により、肺炎球菌の抗原を用いてワクチン効果の評価を行う。肺炎球菌抗原特異的IgAが安定的に誘導出来れば、肺炎球菌の感染実験も行う予定である。



(文献)

1) **Uematsu S**, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*. 9(7):769-776, 2008.

2) Fujimoto K, Karuppuchamy T, Takemura N, Shimohigoshi M, Machida T, Haseda Y, Aoshi T, Ishii KJ, Akira S, **Uematsu S**. A new subset of CD103+CD8a+ DCs in the small intestine express TLR3, TLR7 and TLR9, and induce Th1 response and CTL activity. *J Immunol*. 186(11):6287-95, 2011.

3) Fujimoto K, Kawaguchi Y, Shimohigoshi M, Gotoh Y, Nakano Y, Usui Y, Hayashi T, Kimura Y, Uematsu M, Yamamoto T, Akeda Y, Rhee JH, Yuki Y, Ishii KJ, Crowe SE, Ernst PB, Kiyono H, **Uematsu S**. Antigen-specific Mucosal Immunity Regulates Development of Intestinal Bacteria-mediated Diseases. *Gastroenterology*. 2019 Aug 21. pii: S0016-5085(19)41241-9.

2019年8月に採択された当該論文に関して、大阪市立大学、東京大学医科学研究所、AMEDと共同でプレスリリースを行いました。当該ワクチン技術を用いて、肥満に関わる特殊な腸内細菌を制御し、肥満及び糖尿病の発症をマウスモデルで抑制しました。朝日新聞、毎日新聞、日本経済新聞、日本テレビZIP、NHK正午、夕方ニュース、朝日放送ラジオおはようパーソナリティ道上洋三です、ニュートン等各種メディアで報道して頂きました。

夢の肥満ワクチン、糖尿病ワクチンの開発へ

世界初！腸内細菌が起す病気の革新的な治療法を開発

～抗原特異的な粘膜免疫応答をあらゆる臓器で誘導できる新規ワクチン接種法を用いた革新的予防・治療法～

(特許情報)

実施年度：2016

発明の名称：ワクチン用アジュバント、ワクチン、及び免疫誘導方法

発明者：植松智、武村直紀

出願人：国立大学法人東京大学

出願国：国際

出願番号：PCT/JP2016/067403

出願日：2016/10/06

登録番号：特許6534146

登録日：2019/06/07

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群の脳内炎症PETイメージングと治療

理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー
理化学研究所 健康生き活き羅針盤リサーチコンプレックス推進プログラム
プログラムディレクター

渡辺 恭良

1976年 京都大学医学部卒業、1980年 京都大学大学院医学研究科博士課程修了(医学博士)、大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門・研究部長、大阪市立大学大学院医学研究科・教授を経て、2008年 理化学研究所分子イメージング科学研究センター長、2013年 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター長、同年 大阪市立大学・健康科学イノベーションセンター・所長、2017年より現在 理化学研究所健康生き活き羅針盤リサーチコンプレックス推進プログラム・プログラムディレクター、2018年より現在 理化学研究所生命機能科学研究センター・チームリーダー、一般社団法人日本疲労学会・理事長



【発表要旨】

1. 研究の背景と目的

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群(ME/CFS)は、原因不明の激しい疲労・倦怠感とともに、労作後に増悪する極度の倦怠感、微熱、疼痛、脱力、認知機能障害、睡眠障害等の多彩な症状が長期にわたり継続し、日常生活や社会生活に支障をきたす疾患である。病因も未解明で、確定診断に用いられる特異的バイオマーカーも確立していないので、治療法に関しても世界的に様々な試みはあるが、未だ系統的な治療戦略は確立していない。私たちは、この疾患に対し、血液因子や機能検査による客観的な疾患バイオマーカーを探索するとともに、PETやMRI、MEGなどを用いたイメージング研究により、ME/CFSの病態科学研究を推進してきた。2014年に発表したPETと ^{11}C PK-11195を用いた脳内炎症の検出は、本疾患の病態の鍵として、世界的に注目された。2017年度からは、AMED GAPFREE2研究費により、新規高感度のマイクログリア活性化マーカー検出PETリガンドである ^{18}F DPA-714を用いたPET/MRI試験を開始し、多くの共同研究者とともに、様々なバイオマーカーや評価尺度を計測してきた。2019年度からは、このPET試験に基づいた脳内炎症の健常者閾値を規定し、その閾値より上の患者に対する脳内炎症治療薬を用いた介入試験により、脳内炎症が病態のコアであることのPOCを取ること、また、層別試験による治療薬開発を行うことを目的にした。

2. 研究の進捗状況(成果)

ME/CFS患者の約40%の脳に健常者の閾値を超えるかなりの程度の脳内炎症が認められることが判明した。このPETによる脳内炎症をバイオマーカーとして、マイクログリア活性化抑制薬の効果を検討する研究を開始した。一方、慢性～亜急性激疲労の動物モデルを用いたリバーストランスレーショナル研究も並行して進めた。ME/CFS患者に対するPETでの脳内炎症以外の血液バイオマーカーも並行して探索し、細胞外小胞の増加と小胞内の成分分析研究により、アクチンネットワークを構成するタンパク質の数値が、亜急性疲労(疲労症状を有するものの6ヶ月以上継続しない)患者や、うつ病患者と比較しても高いことを発見した。

3. 今後の課題

今回試験では、30例のPET脳内炎症陽性のME/CFS患者をリクルート・登録しマイクログリア活性化抑制薬の効果を確かめる予定で活動しているが、「寝ていても厳しい倦怠感がある」患者に対する臨床試験なので、検査の場にはかなりの回数出向いていただくことの困難さがある。また、これより多数の患者を対象としたRCTを組むことはさらに大変な困難が予想される。

【参考文献】

1. Nakatomi, Y., et al.: Neuroinflammation in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a ^{11}C -(R)-PK11195 positron emission tomography study. *J. Nucl. Med.*, 55(6):945-950, 2014.
2. 渡辺恭良, 倉恒弘彦: 慢性疲労症候群の病態機序とその治療、「神経治療学」33巻1号 p. 40-45、2016年
3. 大村裕、渡辺恭良: 「脳と疲労～慢性疲労とそのメカニズム～」共立出版株式会社ブレインサイエンスシリーズ25、2009年
4. 渡辺恭良編「最新・疲労の科学～日本発: 抗疲労・抗過労への提言」別冊『医学のあゆみ』医歯薬出版株式会社、2010年
5. *Fatigue Science for Human Health* (Watanabe Y. et al. eds.), Springer, 2008.
6. Watanabe Y, Kajimoto, O., and Kuratsune, H.: Biochemical indices of fatigue for anti-fatigue strategies and products. In: Matthews G, et al. (eds), *The Handbook of Operator Fatigue*. Ashgate Publishing Limited, Great Britain, pp. 209-224, 2012.
7. 渡辺恭良、水野敬: 疲労と回復の科学、日刊工業新聞社、2018年
8. 渡辺恭良編 特集「疲労の医学」月刊『BIO Clinica』2020年1月号
9. Eguchi, A., et al.: Identification of actin network proteins, talin-1 and filamin-A, in circulating extracellular vesicles as blood biomarkers for human myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity*, S0889-1591(19)30762-7, 2019.

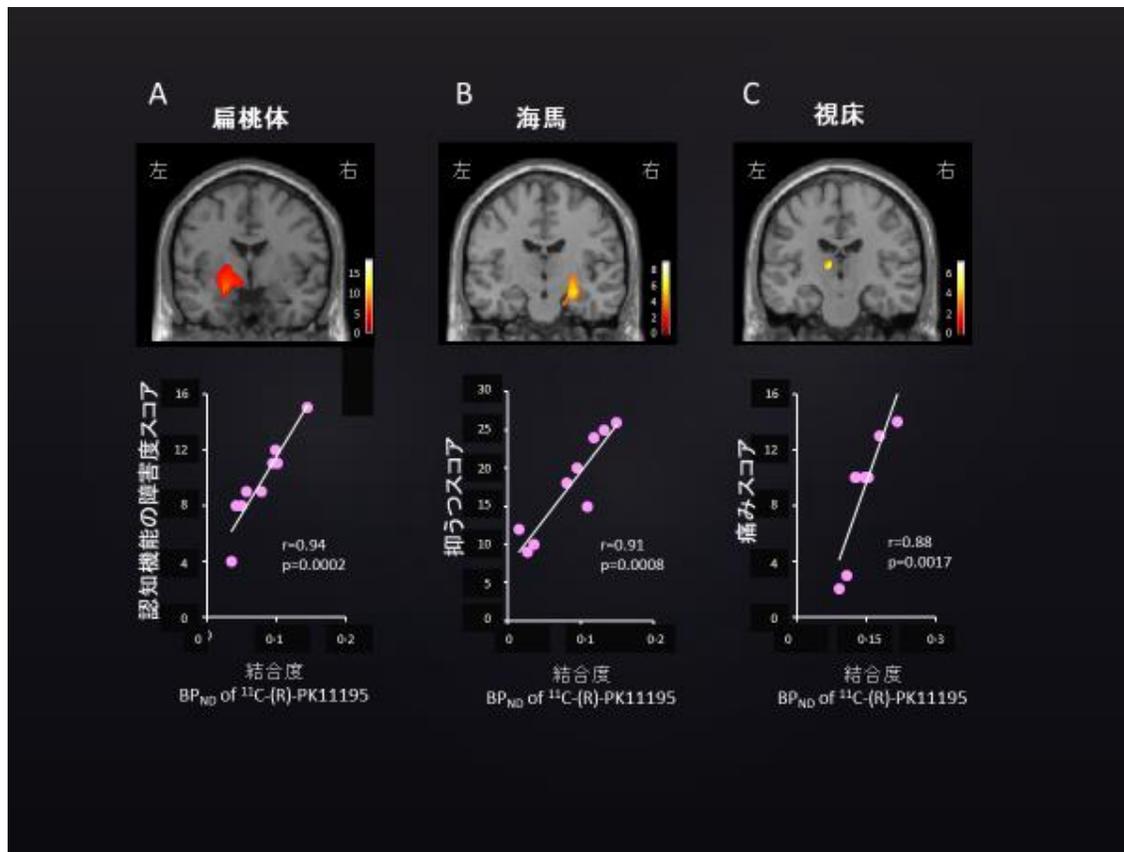


図. 筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) のPETにより検出された複数脳部位 (A:扁桃体、B:海馬、C:視床) での脳内炎症の程度 (横軸) と複数の症状スコアとの相関。文献1参照。



M E M O



国立研究開発法人 **日本医療研究開発機構**

創薬戦略部 医薬品研究課

〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-7-1 読売新聞ビル22階
TEL: 03-6870-2219 FAX: 03-6870-2244