

地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム(SATREPS)
研究課題別中間評価報告書

1. 研究課題名

デング出血熱等に対するヒト型抗体による治療法の開発と新規薬剤候補物質の探索

2. 研究代表者

2. 1. 日本側研究代表者:生田和良 (大阪大学・微生物病研究所・教授)
2. 2. 相手側研究代表者:Pathom Sawanpanyalert (タイ保健省・医科学局・所長)

3. 研究概要

タイにおいて重要な新興・再興感染症の制圧に向け、有効な治療製剤の開発を進める。特に、デング出血熱などに対して有効なヒト型モノクローナル中和抗体、タイ原産微生物に由来する抗病原体物質の開発を進め、得られた候補について臨床治験が行なわれる道を拓く。

具体的には、デングウイルス、インフルエンザウイルス感染症およびボツリヌス中毒症の治療に有効なヒト型モノクローナル抗体の作製、タイ原産の微生物からの抗デングウイルス効果を有する機能性物質の探索に的を絞って研究を展開する。

4. 中間評価結果

総合評価 (A:所期の計画と同等の取組みが行われている)

本研究課題の上位目標は、デングウイルス、インフルエンザウイルス感染症およびボツリヌス中毒症の治療に有効なヒト型モノクローナル抗体を用いた新規治療法を開発することであり、また、デングウイルスに対して効果を示す化合物をタイ原産微生物より見出し新規薬剤として開発することである。

デングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体の探索では、急性期の患者から血液サンプルを採取することで有望な候補が見出されている。そのデングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体については、米国に特許の仮出願を終了し、2012 年中に PCT 国際特許出願を予定している。さらに、論文として国際誌へ投稿中である。それと並行して、次年度に予定していたサルを用いた評価実験を前倒して実施する計画であり、準備を進めている。

デングウイルスに対する抗体医薬の研究はいくつか報告されているが、実用されたものはまだなく、本プロジェクトで得られているヒト型モノクローナル抗体は1から4型全てのデングウイルスに対し

て中和活性を示すことから今後の評価結果が期待される。

また、デングウイルス感染症にはマウスを用いた一般的な評価系がないため、独自でインターフェロンノックアウトマウスの実験系あるいは日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスを用いたマウスの実験系などの開発を進めている。デングウイルス感染を評価するマウス実験系の構築に成功すればその意義は非常に大きいと考えられる。

一方、インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体の探索に関しては、インフルエンザ患者およびワクチン接種者より血液サンプルを採取し、抗体の探索を実施した。得られたヒト型モノクローナル抗体について、ヒト型抗体のウイルス感染性中和活性判定系で評価し、B型ウイルスおよびA型の一部ウイルスに活性を示すヒト型抗体が得られている。さらに、有効であった候補についてはマウスを用いた感染実験で有効性が確認されている。

これらの進捗状況を鑑み、研究計画は適切であり、その計画が着実に実施されていると評価する。

デングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体については、さらに動物（開発中のマウスおよびサル）での評価試験を実施し、プロジェクト期間終了までに最終候補を絞り込み、予防・治療目的の抗体医薬（品）開発に向けてのアピールを製薬企業等に行い、具体的な開発連携への道筋をつける必要がある。サルでの評価をいかに実施するかは予算面も含めて今後の課題である。

一方、微生物の生産する抗デングウイルス機能性物質の探索は幾つかの有望な粗抽出物が認められているが、まだ最終の候補化合物発見にまで至っておらず、早急に少なくとも2-3の化合物の同定に至るよう取り組みを強化する必要がある。

また、ボツリヌス毒素に対するヒト型モノクローナル抗体の作製は日-タイ双方合意のもと日本で実施しているが、中和活性を有するモノクローナルが1株得られたところである。今後、プロジェクト期間終了までに有望な候補を得るために、さらに取り組みを強化する必要がある。

本プロジェクト終了までにこれらの課題を含頭に置き、引き続き国際共同研究が進められること期待する。

4-1. 国際共同研究の進捗状況について

本プロジェクトは4つの研究テーマ、すなわち、1) デングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体作製、2) デング出血熱に対して有効なタイ原産微生物の生産する新規機能性物質の探索、

3) インフルエンザに対するヒト型モノクローナル抗体作製、4) ボツリヌス毒素に対するヒト型モノクローナル抗体作製から構成されている。

1) デングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体

デングウイルス感染症には、効果的な薬剤、ワクチンが無く、その治療薬の開発は世界的に期待されている。これまでに、デングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体のスクリーニングに必要な実験系が大阪大学で構築され、タイ側研究機関に導入された。それを用いて、感染患者から採取されたサンプルにより抗体の探索が実施された。その結果、急性期患者から得られたデングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体が 1 から 4 型全てのデングウイルスに対して中和活性を示したことは、当初の期待に応えるものである。

抗体の可変領域の遺伝子クローニングに関しては、日本側で実験系を確立し、タイ側に技術移転した。マヒドン大学では 18 個、医科学局では 2 個の抗体の遺伝子クローニングを終了した。現在、遺伝子組み換え IgG 抗体の作製をタイおよび日本で行っている。

また、得られた抗体の CHO (哺乳類) 細胞での発現に関する検討も進んでおり、実験系は構築できている。また、将来的な大量製造に向け、遺伝子組換え植物での発現を検討しており、基礎実験としてタバコ細胞での L 鎖の発現に成功した。

一方、デングウイルスに対するヒト型抗体の有効なマウス評価系は確立されておらず、本プロジェクトで新たな評価系の構築を検討中である。つまり、インターフェロンノックアウトマウスの系あるいは日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスを用いたマウスの実験系などを開発中である。デングウイルス感染を評価するマウス実験系はまだなく、構築に成功すればその意義は大きいものと考えられる。

さらに、サルを用いた評価に関しては、アカゲザルあるいはマーモセットを用いた実験を日本で実施することを計画している。

2) デング出血熱に対して有効なタイ原産微生物からの新規機能物質の探索

これまでの成果として、タイ原産の植物、昆虫および土壌から放線菌を分離し、約 200 の培養抽出物を作製した。それら抽出サンプルについて抗デングウイルス活性を測定し、活性の確認された抽出サンプルについて HPLC 解析を行い、10 種の物質を同定した。しかしながら、同定した物質に有望な活性は認められなかった。

現在、植物由来の放線菌の抽出物について精製を進めており、抗デングウイルス活性を有し、毒性を示さない粗抽出サンプルが認められており、大量培養により構造解析用のサンプルを作成する。また、日本側、タイ側で並行して抽出物のスクリーニングを継続して実施する。

3) インフルエンザに対するヒト型モノクローナル抗体

これまでに、タイ側および日本側双方でインフルエンザ患者およびワクチン接種者より血液サ

ンプルを採取し、ヒト型モノクローナル抗体の探索を実施した。得られたヒト型モノクローナル抗体について、大阪大学で確立されたヒト型抗体のウイルス感染性中和活性判定系で評価し、B型ウイルスおよびA型の一部ウイルスに活性を示すヒト型抗体が得られている。さらに、有効であった候補についてはマウスの感染実験においても有効性が確認されている。現在、特許出願および国際誌へ論文投稿の準備を進めている。

抗体の可変領域の遺伝子クローニングに関しては、デングウイルスと同様に実験系を確立し、タイ側に技術移転した。日本側では5個の抗体の遺伝子クローニングが終了し、タイ側でも進行中である。さらに、クローニングした内4つのIgG抗体を作成し、CHO細胞での発現にも成功している。

4) 抗ボツリヌス毒素 ヒト型モノクローナル抗体の作製

ボツリヌス中毒はタイなどでは近年でも発生(アウトブレイク)が認められ、その対策が求められている。これまでの成果として、日本側で、ボツリヌス毒素のトキソイドワクチンを接種した健常人ボランティアから血液を採取し、ハイブリドーマの作製を行った。その結果、7個のヒト型モノクローナル抗体の作製に成功し、そのうちの1株にA型毒素に特異的な中和活性が認められた。中和活性の認められたヒト型抗体のIgG遺伝子のクローニングが終了し、クローニングされたIgG遺伝子を用いて、組み換えIgGの作製を行っている。一方、タイ側では、2010年にボツリヌス中毒のアウトブレイク時のサンプルを用いて、ボツリヌス菌の分離と、その毒素の遺伝子タイピングを進めている。また、さらに新たな日本人ボランティアの血液からの探索も継続中である。

4-2. 国際共同研究の実施体制について

日本側研究代表者はほぼ毎月の頻度で、タイ側研究機関を訪問し、タイ側研究代表者、グループリーダー、タイ滞在中の日本人専門家、プロジェクト業務調整員と密接に協議を行っており、強いリーダーシップを発揮している。また、その際に、両国研究グループメンバーによる作業部会ミーティングを開催し、各人が作成した月報により研究活動の進捗状況を確認しており、適切に進捗管理が実施されている。また、プロジェクトのホームページを開設し、各研究員の実験情報が共有できるシステムを運用している。さらに、年2回Scientific Meetingが開催されており、各作業部会間での競争意識が促進され、研究活動が活性化されている。

タイ側に予定された研究機器の整備は終了している。今後は、タイ側研究者への若干の研修が必要と考えられる。供与された全ての研究機器の使用頻度は非常に高く、研究活動実施に有効に利用されている。

本事業では感染性病原体を取り扱うため、人体や環境への影響が危惧されるが、実験操作は各施設のバイーセーフティー規制に基づいて実施されている。また、病原体等の取り扱いは本プロジ

エクトで整備された安全キャビネット内 (BSL-2) で行われることとなっている。また、実験操作についても、本事業を通じて整備された SOP に基づいて実施されることとされており、人体または環境への安全配慮が適切になされている。

4-3. 科学技術の発展と今後の研究について

デングウイルス感染症に関しては、全てのタイプのデングウイルスに対して有効なヒト型モノクローナル抗体が見出されており、すでに特許出願されている。今後は本プロジェクトで開発中のマウス実験系およびサルを用いた動物実験により有効性評価を行い、絞込みが実施される。さらに、CHO 細胞あるいは植物バイオテクノロジーを利用した生産系についても検討が行われている。これらの成果をもとに、将来、製薬企業と連携した抗体製剤の開発が期待される。さらに、現状ではデングウイルスを感染させ評価できるマウス実験系がない。本プロジェクトで開発中のマウス実験系が確立できれば今後のデングウイルス感染症への対策研究に大きく貢献すると考えられる。一方、タイ固有の微生物が生産する活性物質の探索研究についても、タイ側への技術移転は完了しており、今後、活性物質の精製・解析が進み有効物質の発見が期待される。

インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体については、B 型ウイルスおよび A 型ウイルスの一部に有効な候補抗体が見出されている。これらについては特許出願および論文投稿の準備が進められており、デングウイルスに対する抗体と同様に薬剤開発候補となることが見込まれる。また、抗体の探索技術は確立されているので、今後さらにブロードなインフルエンザウイルスに中和活性を有するヒト型抗体の発見も期待される。

ボツリヌス毒素に対するヒト型モノクローナル抗体探索については、タイ側の倫理規定などの問題からタイ研究者にトキソイドワクチンが投与できず、実験ができないため遅れ気味である。しかしながら、日本人ボランティアから得られた血液サンプルからの探索が本格的に進められており、全てのタイプのボツリヌス毒素に効果を示す抗体の発見が期待される。

4-4. 持続的研究活動等への貢献の見込み

タイにおけるデング熱、インフルエンザ、ボツリヌス中毒症対策の政策的重要性は維持されており、本事業終了後も継続することが見込まれる。他方、本事業を通じて多くの技術が移転され、ある程度タイ側で確立された技術に関しては技術的持続性が一定程度得られるものと見込まれる。従って、本プロジェクトの対象疾患であるデングウイルス感染症、インフルエンザウイルス感染症およびボツリヌス中毒対策への取り組みはタイ側において、より一層強化されることが期待される。

本プロジェクトを通じて、タイ側研究者はウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体の探索、解析および大量発現、さらに、微生物の生産する新規機能性物質のスクリーニングに関するノウハウを日本での研修、タイ現地での日本人研究者による指導を通じて習得している。これらの技術は、今後、他の病原体の解析にも応用される事が見込まれる。一方、タイ側研究者には自主性という意味では若干もの足りなさを感じる部分があり、特に、抗体の解析など研究内容が高度な技術と知識を必要とする段階になると意欲が低下する傾向にある。プロジェクト後半で、さらに力をつけて自ら研究テーマを立ち上げ、実施できる研究者としてのレベルに到達することを期待したい。

5. 今後の研究の課題

1) デングウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体については、1から4型全てのデングウイルスに対して中和活性を示す有望な候補が見出されている。薬剤開発を考えた場合、動物実験での有効性評価は必須である。

- ・デングウイルスの感染を評価できるマウスの実験系がない現状から、自らマウス実験系を開発する必要がある。残りのプロジェクト期間で有効なマウス実験系が構築できるかが課題となる。

- ・サル(アカゲザル、マーモセット)を用いた評価系は知られているが、試験に高額な予算が必要であり、本プロジェクトでは新たな評価戦略の構築が必要である。試験に用いる抗体サンプルの確保とともに今後の大きな課題と考えられる。

2) タイ原産微生物からのデングウイルスに対する有効な新規機能性物質の探索については、タイではあまり実施されていなかった微生物生産物のスクリーニングに関する技術移転が順調に行われている点では成果がみられる。しかし、実際の有効物質発見という点では、まだ成果は得られていない。導入した実験機材(HPLC など)をフルに活用したスクリーニングの加速化が必要である。また、微生物の分離源についてもタイ特有の生物資源(薬用植物など)を使用するなど探索実験の質の向上についても検討を期待する。

3) インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体については、B型ウイルスおよびA型ウイルスの一部に有効な候補が見出され、マウス実験系でもある程度の効果が認められている。しかしながら、インフルエンザウイルスは流行するタイプが多様なため、現在見出されている抗体では臨床現場での使用に限られることが考えられる。さらにブロードなタイプのインフルエンザウイルスに対して活性を示す抗体の探索・発見が期待される。

4) ボツリヌス毒素に対する抗体探索はタイ側研究者が倫理面から実験が行えないなどの問題があり、日本側で1種類の毒素(A型)に効果を示す抗体が得られているのみである。しかしながら、現在日本人研究者ボランティアにトキソイドワクチンを接種し、その採血したサンプルからの探索が行われており、今後の研究の加速が必要である。

5) ボツリヌス中毒はタイなどの途上国では、頻繁にアウトブレイクが起こっている状態であり、さらに世界的にはバイオテロの危険からも重要視されている。その意味から、有効な抗体の発見は意義がある成果になる。その意味からもボツリヌス毒素に対する研究は重要であるが、現状ではほとんど研究が行われていない。日本にはボツリヌス毒素に関する世界的にも優秀な研究者が存在するので、本プロジェクトで改めてボツリヌス毒素に対する研究が活性化することを期待している。

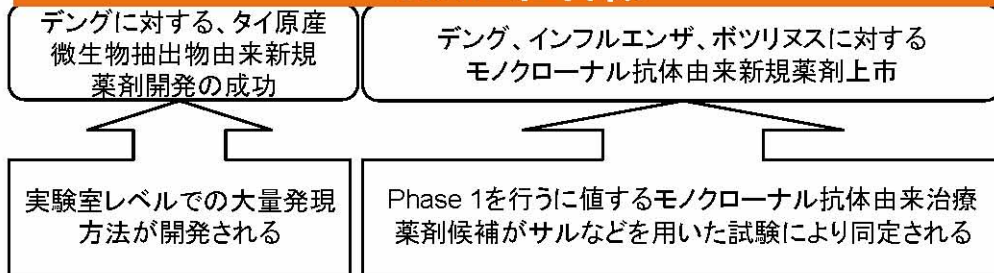
以上

研究課題名	デング出血熱等に対するヒト型抗体による治療法の開発と新規薬剤候補物質の探索
研究代表者名 (所属機関)	生田 和良 (大阪大学 微生物病研究所 教授)
研究期間	H20採択 平成21年7月1日から平成25年3月31日まで (4年間)
相手国名	タイ王国
主要相手国研究機関	タイ保健省・医科学局、マヒドン大学

JST従たる評価項目

商品の普及	各国の研究所SPYMEGの利用が増加	他の感染症研究やワクチン開発への応用	マウスモデル系の普及
特許出願	新規モノクローナル抗体生成法の特許出願		新規物質の発見と利用法の特許出願
レビュー付雑誌への掲載	新規モノクローナル抗体生成法について掲載	Antibody-dependent enhancement現象による病態機序について掲載	新規物質の発見と利用方法について掲載 新規物質の抗ウイルス作用機序について掲載
人材育成	参画学生名でレビュー付雑誌への論文掲載		特任研究員、特任助教名でレビュー付雑誌への論文掲載
生物資源へのアクセスの確立	病原体持ち帰りによる日本でのストック確保	(免疫応答能を有する)血液サンプル入手経路の確立	

JST上位目標



JST達成目標

