

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

抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)物質の同定及び HCV ならびにデングワクチンの開発

2. 研究代表者

2. 1. 日本側研究代表者:堀田 博 (神戸大学・大学院医学研究科・教授)
2. 2. 相手側研究代表者:Pratiwi Sudarmono (インドネシア大学・医学部・副学部長)

3. 研究概要

インドネシア特有および日本の薬用植物資源を用いて C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗ウイルス化合物のスクリーニングと作用機序の解析を行い新たなHCV感染に対する薬剤の開発を目指す。また、HCV のエンベロップたんぱく質や非構造タンパク質を発現する組換え水痘生ワクチンを作製、さらに、デングウイルスに対しては prMシグナルーprMーE領域を用いた DNA ワクチンを作製する。それらを動物実験によりウイルス中和抗体や細胞性免疫の誘導能について解析し、新たなワクチンの開発を目標とする。

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、インドネシア特有および日本の薬用植物資源を用いて C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗ウイルス候補化合物のスクリーニングを行い新たな HCV 感染に対する薬剤の開発、HCV のエンベロップたんぱく質や非構造タンパク質を発現する組換え水痘生ワクチンを作製、およびデングウイルスに対する prMシグナルーprMーE領域を利用した DNA ワクチンを作製することである。

薬用植物資源を用いたHCVに対する抗ウイルス候補化合物のスクリーニングについては、薬用植物エキスの抗HCV活性及び細胞障害活性のスクリーニング技術を構築し、薬草成分の分離精製技術、化合物の化学構造解析手法に関する技術とともにインドネシアに移転を行った。神戸大学、インドネシア大学、アイルランガ大学でそれぞれスクリーニングを実施し、いくつかの活性物質を同定したが、臨床応用が期待されるほど有望な物質の発見には到っていない。

また、抗 HCV 物質探索の過程で、HCV 粒子産生を亢進させる天然物質由来の化合物を発見した。この作用は HCV 不活化全粒子ワクチン製造において有効であると考えられる。また、その作用機構等は学術的観点において大きなインパクトを与える興味深い活性である。この化合物の今後の評価および特許取得のための戦略を協議中である。

一方、HCV 治療／予防ワクチンに関する研究では、HCV の非構造タンパク質(NS3) 及びエンベロープタンパク質の一部をコードする遺伝子領域を組み込んだ発現プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドを培養細胞に導入し、HCV タンパク質が予想通り発現されていることを確認した。さらに、マウスにインターフェロン γ の産生をより効率良く誘導する非構造タンパク質をコードする遺伝子領域、及び中和抗体産生を効率良く誘導するエンベロープタンパク質をコードする遺伝子領域を同定した。今後は組み換え水痘ワクチンによる有効性評価が期待される。

また、デング感染症に対するワクチンに関する研究では、デング感染症流行時の患者血清からデングウイルス1 型～4 型をすべて分離し、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群であるprM/E 領域をクローニングした。その各型のprM/E 領域を、哺乳動物細胞発現用ベクターであるpcDNA3 に組み込み、デングウイルス 4 種類のうち3種類(1 型～3型)の血清型のインドネシア流行株に対するDNA ワクチンを構築した。また、それらをヒト用ワクチンベクターであるpUMVC4 に組み込み、ヒトに実用化が可能なDNA ワクチン候補を構築した。デング4型ウイルスについては現在構築中である。

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。

薬用植物資源からの HCV に対する抗ウイルス候補化合物の探索に関しては、既に、スクリーニング技術の移転および基本的な実験機器等の研究設備は整っている。研究進捗状況が順調であることに鑑み、さらに高度な解析機器である NMR 測定装置を今年度末にアイルランガ大学に購入し、来年度には液体クロマトグラフィー・マススペクトロメーター(LC-MS)を購入する予定にしている。これらの機器導入により、当初予定以上の技術移転が可能になる。今後さらにスクリーニングを加速化し、早期に次のステップに進む候補物質の発見を期待する。一方、HCV 粒子産生を亢進させる化合物については、その応用面の見極めなど今後の開発戦略の確立が重要である。

HCV 治療／予防ワクチン候補に関しては、モルモットへの接種実験により中和抗体誘導能及びウイルス特異的細胞性免疫誘導能を実証し、また、デング DNA ワクチン候補は、1 型～4 型混合物をマウスに接種し、各血清型に対する中和抗体産生誘導能および中和抗体産生誘導能に及ぼすデングウイルスタンパク抗原併用効果を実証するなどの動物実験での評価が必要である。

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

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3つの研究テーマ、すなわち、1)薬用植物資源を用いて新たな C 型肝炎ウイルス(HCV)感染に対する薬剤の開発、2)HCV のエンベロープたんぱく質や非構造タンパク質を応用した HCV 治療/予防用組換え水痘生ワクチンを作製、3)デングウイルスの prMシグナルーprM-E領域を利用した DNA ワクチンの作製から構成されている。

1) インドネシア及び日本原産薬用植物/天然物抽出物から抗 HCV 活性を有する新規物質の同定および作用機序の解析

神戸大学において、2010年度に抗HCV活性の測定系を構築した。また、本アッセイ系はその薬剤処理のタイミングをウイルス吸着前と後の2通りに分け、ウイルス吸着阻害効果あるいは吸着以降のウイルス増殖過程における阻害効果の有無を検討することが可能である。次に、神戸大学において、医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センターが保有する薬用植物資源のエキスをを用いて、インドネシア大学においては、外部協力研究機関であるインドネシア科学院(LIPI)から入手したインドネシア原産薬用植物エキスについて、さらに、アイルランガ大学においては、薬学部にてインドネシア原産薬用植物エキスを調製し、抗HCV活性スクリーニングを実施した。その結果、いくつかの候補植物エキスが見出された。医薬基盤研究所薬用植物資源センターにおいては、効果が見られたインドネシア産植物(アイルランガ大学研究者が採取)エキスのうち、1種類のエキスについて、溶媒の分配抽出、カラムクロマト、HPLC等で精製し、10種類の化合物を単離し、化学構造を各種二次元NMRデータにより解析した。また、インドネシア大学では、共同研究機関であるLIPIにおいて、抗HCV活性を示す画分・化合物の精製と分析を行い、抗HCV活性を示した薬用植物(1種類)の特定された画分から、主含有物質と思われる化合物1種を単離し、同定した。またその化合物の単独での抗HCV活性を評価した。単離された11種類の化合物は現在抗HCV活性を詳細に検定中であり、強い抗HCV活性が認められた化合物に関しては、プロジェクト期間終了までに作用機序解析が実施される予定である。

また、抗 HCV 物質探索における HCV 複製の抑制評価過程で、HCV 粒子産生を 20 倍またはそれ以上亢進させる天然物質由来の化合物を発見した。この作用は HCV 不活化全粒子ワクチン製造において収量増加や製造工程の効率化に有効であると考えられる。これは学術的観点において大きなインパクトを与える非常に興味深い活性である。この化合物の特許取得のための戦略を協議中である。

2) 遺伝子組み換え水痘弱毒生ワクチン技術を応用した HCV 治療/予防ワクチン候補の作製

神戸大学において、HCV の非構造タンパク質及びエンベロープタンパク質の一部をコードする

遺伝子領域を組み込んだ種々の発現プラスミドを作製した。非構造タンパク質 NS3 によるワクチンは治療ワクチンとして、エンベロープタンパク質領域からのワクチンは予防ワクチンとしての開発が期待される。HCV の非構造タンパク質 NS3 をコードする遺伝子領域を組み込んだ発現プラスミドに関しては、それらの発現プラスミドをマウスに皮下接種により免疫し、最も効率良くインターフェロン γ の産生を誘導する NS3 の領域を同定した。さらに、培養細胞に導入し、HCV タンパク質が発現されていることを確認した。それらの発現細胞をマウス腹腔内接種により免疫して、最も高力価の中和抗体を誘導するプラスミドを同定した。HCV エンベロープタンパク質領域に関しては、最も高力価の中和抗体を誘導する領域を同定した。次に、選択した候補 NS3 遺伝子を挿入した組換え水痘ワクチン株のウイルスゲノムを作製し、ウイルスの再構築を試み成功した。さらに、再構築された組換えウイルスを水痘ワクチンウイルスの感受性細胞に感染させ、ウイルス感染細胞内における NS3 タンパク質の発現をウェスタンブロット法及び蛍光抗体法などで解析した。

3) 各血清型(1 型～4 型)に対して有効性を示すデングウイルス予防 DNA ワクチンの作製

神戸大学において、デング DNA ワクチン作製の戦略を構築し、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prMシグナルーprM-E領域をクローニングするためのプライマー設計を確立した。インドネシア大学において、デング感染患者血清から分離されたデングウイルス1型～3型の prM シグナルーprM-E 領域をプラスミドベクターにクローニングし、トランスフェクトした培養細胞において発現したウイルスタンパクが、デングウイルス1型～3型のエンベロープタンパク質であることを、抗原性解析により明らかにし、デングウイルスタンパクを *in vitro* で正しく発現する DNA ワクチン候補がデングウイルス1型～3型に対してそれぞれ1種類が決定された。デング4型ウイルスについては現在構築中である。インドネシア大学において、デング2型ウイルスを予防する DNA ワクチン候補について、中和抗体産生誘導能を査定するために、マウス実験を進行中である。DNAワクチンが実用化されると格段に簡便・安価で、かつ安全なワクチンになると期待される。

4-2. 国際共同研究の実施体制について

日本側研究代表者が1～3ヶ月に1回の頻度でインドネシア側研究機関を訪問し、インドネシア側研究代表者及びグループリーダー並びに現地研究責任者(JICA 長期専門家)、業務調整員と密接な協議を行っている。それ以外に、頻繁な情報のやり取りを通して、運営・モニタリングに関する協議が継続されている。また、グループミーティングを毎月開催し、グループリーダーは月1回のレポートを研究代表者に提出しており、研究活動の進捗状況は適切にモニタリングされている。このようにプロジェクトの運営管理は効果的に実施され、研究成果の共有されている。さらに、定期的に 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。

予定された研究機器の整備と操作研修は概ね終了しており、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。研究進捗状況が順調であることに鑑み、さらに高度な解析機器である NMR 測定装置を今年度末にアイルランガ大学に購入し、来年度には液体クロマトグラフィー・マススペクトロメーター (LC-MS) を購入する予定にしている。これらの機器導入により、当初予定以上の技術移転が可能になる。また、動物実験を含めた実験操作についても、本プロジェクトで整備された SOP に基づいて実施されており、人体または環境への安全、動物倫理面での配慮が適切になされている。

インドネシア側機関は強いパートナーシップを発揮し、プロジェクトの管理だけではなく、知識や未経験の技術習得に意欲をもった研究者による研究活動への熱心なコミットメントが示されている。

4-3. 科学技術の発展と今後の研究について

抗 HCV 薬開発が活発に行われており、2011 年にはプロテアーゼ阻害剤「テラプレビル」が薬価収載されるなど、HCV 治療のオプションは広がりつつある状況である。しかしながら、現行の最も有効と考えられている併用療法でも 100%の著効率を得ることは困難であり、また、将来の薬剤耐性発現も考慮すれば、作用機序の異なる新規薬剤の開発には大きな意義があり、本プロジェクトで未知の作用機序が期待される抗 HCV 物質の検索は、かかる状況にあっても妥当性は非常に高く維持・継続されるものと考えられる。また、先進諸国で開発した抗ウイルス薬やその他の薬剤はインドネシア国民にとっては非常に高価で、独自の薬剤を開発することはインドネシア政府にとって優先性の高い目標になっている。そのような状況の下で、本プロジェクトにおいて新規抗 HCV 物質を薬用植物資源から発見する、および有効な HCV 治療／予防ワクチン開発を行うことの意義は大きいと考えられる。

DNAワクチン開発について、DNA に対する抗体ができて自己免疫疾患が起こらないか、発がんの危険性はないか等が問題点として挙げられ、日本では安全性評価の体制は試験法やその評価体系に未確立の部分が多く、試行錯誤を慎重に行っている段階状況であり、前臨床試験の実施には若干の困難が伴うことが予想される。また、前臨床試験ではサルなどの動物を用いた実験も必要であるため、製薬企業等の協力が必須となる。一方、インドネシアにおいてはDNAワクチン開発に対する意識が高く、製薬企業等の前臨床試験を実施できる機関の協力が得られる可能性があり、神戸大学、インドネシア側大学のみならず、外部協力研究機関であるLIPIおよびその上部機関である研究技術省 (RISTEK) の協力を受け、現在インドネシア国内の製薬企業への連携の可能性を探っている。

4-4. 持続的研究活動等への貢献の見込み

HCV 感染も HIV/AIDS の co-infection としての重要性が認識されており、また、デングウイルス感染はマラリア、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザヒト感染例、HIV/AIDS、結核と共に五大感染症として位置づけられている。これに加えて、インドネシアでは「悪性腫瘍を惹起するウイルス感染症」を重要感染症として位置付けており、HCV 感染症は重要感染症と考えられている。このように、本プロジェクトの対象疾患である HCV 感染症およびデングウイルス感染症対策への取り組みはインドネシアにおいて一層強化されることとなることから、本プロジェクトの政策的持続性は期待できる。

本プロジェクトを通じて、インドネシア側研究者は天然物からの新規機能性物質のスクリーニング、およびワクチン探索に関するノウハウを日本での研修、インドネシア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。さらに、本プロジェクトで研究機器などの研究環境は充実しつつある。これらの要因から、プロジェクト終了後も、継続的にインドネシアで感染症対策に関する研究テーマを立ち上げ、実施されることが期待される。

5. 今後の研究の課題

- 1) 薬用植物資源からの HCV に対する抗ウイルス候補化合物の探索に関しては、いくつかの活性物質を同定したが、臨床応用が期待されるほど有望な物質の発見には到っていない。今後さらにスクリーニングを加速化し、早期に次のステップに進む有望候補物質の発見を期待する。
- 2) HCV 粒子産生を亢進させる化合物については、HCV 不活化全粒子ワクチン製造などにおいて有効であるなど応用面からも興味を持たれる。しかしながら、その実用化の方向性を見極めるなど、特許出願も含めた今後の開発戦略の確立が重要である。
- 3) HCV 治療／予防ワクチン候補に関しては、モルモットへの接種実験など動物実験により、その効果を実証する必要がある。さらに、水痘ワクチンそのものの安全性はこれまでに確立されているが、そこに組み換え外来遺伝子による有害事象の発生など安全面に考慮し、今後も慎重に検討を続ける必要があると思われる。
- 4) デング DNA ワクチン候補は、1 型～4 型混合物をマウスに接種した各種の動物実験での評価が必要である(各血清型に対する中和抗体産生誘導能および中和抗体産生誘導能に及ぼすデングウイルスタンパク抗原併用効果、免疫マウスにデング 2 型ウイルスで攻撃し、感染防御能を実証など)。また、DNA ワクチン開発については、安全性評価の体制は試験法やその評価体系に未確立の部分があり今後の評価はそれらを見据えて実施する必要がある。

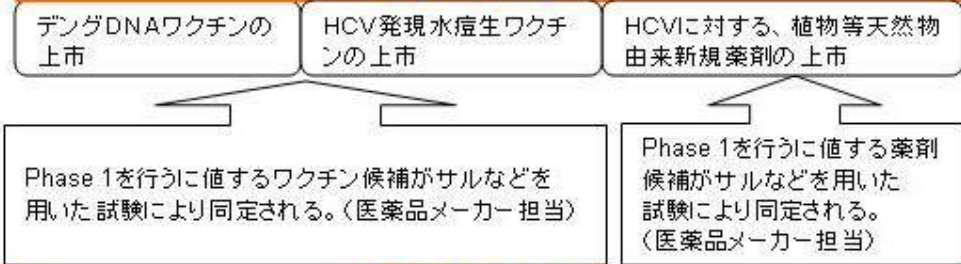
5) インドネシア駐在中の長期専門家に関しては、このプロジェクトへの参画を通じて、多くの研究機器の使用方法を習得し、研究者への指導や、研究施設および機器の整備に大きく貢献している。しかし、その他の若手研究者のインドネシアでの活動が若干不足している。アイルランガ大学の研究設備も充実したのでさらに研究者、特に若手研究者の交流を活発にすることを希望する。

以上

JST従たる評価項目

商品の普及	抗ウイルス効果を有する有効成分が同定され、より毒性の少ない成分による抗ウイルス薬開発に発展する。		
特許出願	抗ウイルス成分を有する抽出物についての特許出願		
レビュー付雑誌への掲載	DNAワクチン開発について掲載	HCV発現水痘ワクチンについて掲載	植物等天然物由来抗HCV成分についての掲載
人材育成	参画学生名でレビュー付雑誌への論文掲載	特命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	サンプル入手経路の確立	

JST上位目標



JST達成目標

