

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

研究進捗状況報告書の概要

1 研究プロジェクト

学校法人名	帝京平成大学	大学名	帝京平成大学
研究プロジェクト名	医薬品リバイバル技術による創薬イノベーション		
研究観点	研究拠点を形成する研究		

2 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

近年、全く新規な医薬品を創出する成功確率は低下傾向にあり、特に我が国では顕著である。それに伴い医薬品の開発費は増大し、医療費の高騰を招いており、医療経済上の問題となっている。私たちは、既存のプロダクト(ドロップした医薬候補品、薬剤耐性出現で使用されなくなった医薬品、副作用の強い医薬品)を、組換えビフィズス菌、一本鎖抗体 を利用して新規な医薬品としてリバイバルさせる技術開発を目指す。

テーマ 1 では、グラム陽性菌で内毒素がなく人体に対して無毒であると考えられる偏性嫌気性菌であるビフィズス菌の腫瘍部位集積性を利用して、遺伝子組換え技術によりビフィズス菌にイムノキシン(抗体・毒素融合体)、細胞死誘導抗体などを発現・分泌させることにより抗腫瘍効果があることを示し、2 件の国際特許出願をした。この技術の実用化を目指し、非臨床試験のための培養法、試験法の開発に取り組むことを計画した。

テーマ 2 では、臨床試験がとん挫したヘビ毒由来の血栓溶解剤と細胞死誘導抗体、多剤耐性菌の出現で効かなくなった抗菌薬について、一本鎖抗体等の技術を用いて再生させる技術開発に取り組み、動物実験モデルでの有効性確認を計画した。

3 研究プロジェクトの進捗及び成果の概要

【テーマ 1】担がんマウスモデルにおいて抗腫瘍効果を発揮する、イムノキシン、細胞死誘導抗体を発現・分泌する遺伝子組換えビフィズス菌の最小投与量を算出し、今後の安全性試験を実施する時の基礎資料とした。腫瘍内でビフィズス菌を増殖させるための栄養補助剤として、ヒトでの臨床応用を考慮した低侵襲性の経口投与可能な栄養補助剤の開発に成功した。ヒトに投与可能な組換えビフィズス菌の培養・精製法、製剤化法に目処を付けた。また、がん細胞内で抗体を標的蛋白質に結合させて細胞増殖を抑える抗 STAT3 抗体/細胞透過活性ペプチド融合蛋白質発現・分泌ビフィズス菌の有用性を確認した。非臨床試験に向けた研究では、一部シンバイオ製薬との共同研究契約(2016年2月~17年1月)の中で実施された。国際出願していた特許2件の内、最初の1件については日本で特許登録された。

【テーマ 2】サブテーマ「抗菌薬の感受性を高める補助薬」では、有望な成果が得られた。緑膿菌排出ポンプ開口部細胞外突出ループ 2 に結合する 3 量体化一本鎖抗体が、高度多剤耐性緑膿菌株および一般株に対して、ペプチド系抗菌薬コリスチンの MIC(最小発育阻止濃度)が 4 分の 1 に低下することが分かった。コリスチンは、カルバペネム系耐性を持つ多剤耐性グラム陰性菌に対して使用されるが、腎障害と神経毒性の副作用があるため、上記抗体との併用によるコリスチン投与量の低減は有効であると考えられる。

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

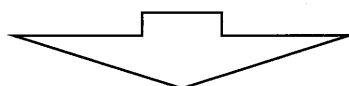
盛根 信也	沖縄県衛生 研究所・研究 員	血栓溶解剤開発	研究データ提供と研究の助 言
良原 栄策	東海大学・工 学部・非常勤 准教授	抗生物質補助薬開発	緑膿菌株の提供と助言

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
なし			

(変更の時期:平成 26 年 9 月18 日)



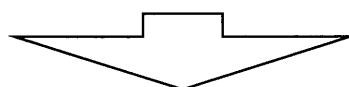
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
薬学部・講師	薬学部・講師	大西 敦	テーマ2メンバー 血栓溶解剤のPOC確 立と実用化

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
大腸がんモデル動物の 作製と経口投与抗体の 薬効評価	薬学部・講師	中村 孝博	経口投与抗体治療薬の POC 確立

(変更の時期:平成 26 年 9 月18 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
帝京平成大学・薬学 部・講師	明治大学・農学部・講師 (帝京平成大学・薬学部・ 特別研究員)	中村 孝博	大腸がんモデル動物の 作製と経口投与抗体の 薬効評価

11 研究進捗状況(※ 5枚以内で作成)

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

【研究プロジェクトの目的・意義】

近年、全く新規な医薬品を創出する成功確率は低下傾向にあり、特に我が国では顕著である。それに伴い医薬品の開発費は増大し、医療費の高騰を招いており、医療経済上の問題となっている。私たちは、既存のプロダクト(ドロップした医薬候補品、薬剤耐性出現で使用されなくなった医薬品、副作用の強い医薬品)を、組換えピフィズス菌、一本鎖抗体を利用して新規な医薬品としてリバイバルさせる技術開発を目指す。このような技術開発による創薬イノベーションは、高齢者が増加し、年々医療費負担が増大している我が国においては、将来的に大きな経済効果を現すものと期待される。

【計画】

研究テーマ1「組換えピフィズス菌をDDSとして利用する医薬品リバイバル技術開発」

静脈内投与により腫瘍内の嫌気性領域で特異的に増殖するピフィズス菌を腫瘍組織へのドラッグデリ

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

バリーシステムとして用いる。遺伝子組換え技術によりイムノキシン(抗体・毒素融合体)や細胞死誘導抗体などをビフィズス菌に発現・分泌させて抗腫瘍効果を得ており、これらの組換えビフィズス菌を用いた癌に対する医薬品(以下の主要サブテーマⅠ、Ⅱ、Ⅲ)の開発につなげることを計画。

【Ⅰ】ビフィズス菌にイムノキシン(抗 EGFR(上皮細胞成長因子受容体)アルパカー本鎖抗体(VHH 抗体)/緑膿菌外毒素 A 融合蛋白質)を発現・分泌させることによる「薬効があっても副作用でドロップした」イムノキシンをリバイバルさせる。

【Ⅱ】ビフィズス菌に抗 TRAIL-R(細胞死誘導リガンド受容体)アルパカー本鎖抗体を発現・分泌させることによる「臨床試験で十分な薬効が出ずにドロップした」抗 TRAIL-R 抗体をリバイバルさせる。

【Ⅲ】「医薬品として上市されていても適応範囲が限られている」抗腫瘍薬である DOXIL (ドキシソルビシンのリポソーム製剤)について、腫瘍組織内でビフィズス菌に腫瘍血管標的ペプチド付加 TNF(腫瘍壊死因子)- α を分泌させ、腫瘍組織内選択的な血管透過性の上昇による Doxil の薬効増大と、それに伴う適応範囲の拡大を図る。

組換えビフィズス菌の薬効増大を図る研究として、以下のバックアップテーマ(1~3)を計画。

- 1) T7 RNA ポリメラーゼの発現系のビフィズス菌への導入による外来タンパク質発現量増強。
- 2) ウエルシュ菌毒素由来蛋白質 C-CPE(クローデイン結合領域)のビフィズス菌導入による菌の腫瘍局在量の増大。
- 3) 細胞透過性 STAT3 (シグナル伝達兼転写活性因子 3) 抗体のビフィズス菌導入による組換え菌の抗腫瘍効果の上乗せ。

ビフィズス菌医薬の臨床試験に向けた実用化研究(①~④)を計画。

- ①種々のがん細胞での in vitro, in vivo での抗腫瘍効果の検討。
- ②マウスで抗腫瘍効果を得られる最小菌数の決定。
- ③臨床応用を考慮した、患者に侵襲性の低い経口投与によるビフィズス菌栄養補助剤開発。
- ④臨床試験用組換えビフィズス菌の培養・精製条件、供給形態の決定。

研究テーマ2「アルパカー本鎖 VHH 抗体を利用した医薬品リバイバル技術開発」

①薬効があっても副作用が強い、患部に十分な量が届かず薬効が出ないという理由で医薬品となっていないものとして、血栓溶解剤(①-1)、抗腫瘍抗体(①-2)、②薬剤耐性化によって使用できなくなっているものとして、多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬を取り上げ、それらをリバイバルさせる技術開発を計画。計画概要は下記の通り。

①-1 血栓溶解剤として利用価値がある、ガラガラヘビ毒由来で出血活性がなく、フィブリン分解活性を持つ Alfimeprase は、血中の α -マクログロブリン(α 2M)で速やかに不活化されるため、臨床第 2 相でドロップした。 α 2M による不活化されない組換えタンパク質の創出を計画。

①-2 血中への投与で肝障害の副作用を生じる抗 TRAILR(がん細胞に細胞死を誘導する生体リガンドの受容体)抗体を、経口投与可能な抗体にして大腸がんの予防・治療薬にする計画。

②多剤耐性緑膿菌で発現が亢進している、排出ポンプ(OprM)開口部細胞外突出ループ1および 2 のペプチド(LP1 および LP2)に結合する一本鎖抗体で、緑膿菌の抗菌薬耐性を低下させる計画。

(2) 研究組織

【研究体制】

研究代表者: 石田功(プロジェクトおよびテーマ 2 の方針決定、テーマ 2 サブテーマ推進)

テーマ 1 リーダー: 平裕一郎

テーマ 1 メンバー: 大学教員 3 名 + RA2 名 + PD1 名(最初の 2 年間のみ)

テーマ 2 リーダー: 石田功

テーマ 2 メンバー: 大学教員 3 名 + 特別研究員(明大農) 1 名 + RA1 名

【研究チーム間の連携】

シンバイオ製薬と共同研究を実施した 1 年間は、代表者とテーマ 2 メンバー 1 名が共同研究実験に関わ

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

った。

【研究支援体制】

帝京平成大学総務チームは、プロジェクト予算措置、RA、PD の雇用契約、特許出願に関わる事務作業・費用支出、及びシンバイオ製薬との共同研究契約書に関わる事務作業・研究費受入を支援した。

【共同研究機関との連携】

研究資料の入手の他、サブテーマにおける研究アプローチの見直し時に、必要に応じて助言をもらった。

(3) 研究施設・設備等

【研究施設】

中野キャンパス先端技術開発センター(面積:735 m²、使用者数:74 人)

【研究設備】

- 1)Profinia タンパク質精製システムと Experion 自動電気泳動システム(利用時間数:280h)
- 2)BACTRON IV(嫌気性チャンバー)(利用時間数:144h)
- 3)全自動 ELISA マイクロプレートプロセッサ(利用時間数:42h)
- 4)AKTA pure 25 L1(組換えタンパク質精製システム)(利用時間数:72h)

(4) 進捗状況・研究成果等 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び*を付すこと。

【テーマ1】組換えビフィズス菌を DDS として利用する医薬品リバイバル技術開発

<現在までの進捗状況及び達成度>

主要サブテーマ【I】

種々のがん細胞での抗腫瘍効果を確認(<雑誌論文>*4<図書>*1,2<学会発表>*1,3,4,5)した(11(1)の研究テーマ1の実験計画①)。特に、臨床で問題となっているゲフィチニブ(EGFR チロシキナーゼ阻害薬)耐性肺癌に抗 EGFR VHH 抗体/緑膿菌外毒素 A 融合蛋白質発現ビフィズス菌が抗腫瘍効果を発揮するかを検討し、抗腫瘍効果を確認した。マウスでの抗腫瘍効果を得られる最小菌数は、 3×10^9 個と決定された(11(1)の実験計画②)。

主要サブテーマ【II】

種々のがん細胞での抗腫瘍効果を確認(<学会発表>*2)した(11(1)の実験計画①)。また、マウスでの抗腫瘍効果を得られる最小菌数は 3×10^7 個と決定された(11(1)の実験計画②)。

主要サブテーマ【III】

腫瘍血管標的ペプチド付加 TNF- α 分泌ビフィズス菌に関しては、分泌量が少なく抗腫瘍効果は得られなかったため、腫瘍血管標的ペプチド付加しない TNF- α を分泌するビフィズス菌を作製して検討したところ、種々のがん細胞で抗腫瘍効果が得られた(11(1)の実験計画①)。最小菌数は 3×10^7 個までは抗腫瘍効果を確認したが、さらに検討中である。

バックアップテーマ 1)~3)

バックアップテーマ 1)2)については、進展が見られなかった。

バックアップテーマ 3)の抗 STAT3 抗体/細胞透過活性ペプチド融合蛋白質発現・分泌ビフィズス菌について、この組換えビフィズス菌が種々のがん細胞での抗腫瘍効果を確認でき、更に細胞透過活性ペプチドを一本鎖抗体に付加することで、がん細胞内で抗体を標的蛋白質に結合させて細胞増殖を抑えるというユニークな作用機序を証明するデータが得られた。

実用化研究①~④

11(1)の実験計画③のビフィズス菌の栄養補助剤に関して、ラクツロースの腹腔内投与に代わって、侵襲性の低い経口投与法の開発(アミノ酸・ショ糖混合液の経口投与)に成功した。また、11(1)の実験計画④の組換えビフィズス菌培養条件に関して、肉エキスを含有しない安全な培地の開発に成功した。肉エキスはビフィズス菌・乳酸菌の標準的な培地である MRS 培地に含まれるが、これを含有する培地を菌の培養に使用した場合、プリオン蛋白質に代表される動物由来の病原体混入のリスクがあり、これを避ける必要があるため重要な成果である。また、精製条件、凍結保存に関しても、今後の前臨床試験に必要なビフィズス菌の供給に必要な量と質を保ったプロトコルの開発に成功した。

<特に優れた研究成果>

1. バックアップテーマ 3)の抗 STAT3 抗体/細胞透過活性ペプチド融合蛋白質発現・分泌ビフィズス菌について、細胞透過活性ペプチドを一本鎖抗体に付加することで、がん細胞内で抗体を標的蛋白質に結合させて細胞増殖を抑えるというユニークな作用機序を証明するデータが得られた点が、特に優れた研究成果と考える。

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

2. 11(1)の実験計画④の組換えビフィズス菌の培養・精製条件、凍結保存に関して、前臨床試験・臨床試験に向けた原薬(組換えビフィズス菌)の供給プロトコールにめどが立った点である。

<問題点とその克服方法>

組換えビフィズス菌の抗腫瘍効果について、モデルマウスのがん(腫瘍塊)の外縁部数百 μm 以外はがん細胞を殺傷できるが、外縁部の数百 μm は殺細胞効果が少ないという問題点があり、その点の克服が必要となる。このような問題点が生じる理由としては、がんの外縁部は内部とは異なり血管が多く酸素が供給されやすいため、好氣的な領域が広く存在している。酸素が存在すると生存できない偏性嫌気性菌であるビフィズス菌の数は、血管数が少ないがんの内部と比較して相対的に少数となり、抗腫瘍効果が弱くなると考えている。

この問題点の克服方法としては、ソラフェニブなどの血管新生阻害剤と組換えビフィズス菌との併用を計画している。これは、血管新生阻害剤によりがん血管の量が減少し、結果として好氣的な領域を減少させることになる。嫌気性菌の生存領域、特に外縁部の嫌気性領域を増大させてビフィズス菌数を増加することで、外縁部に対しても抗腫瘍効果を発揮するようになることを想定している。また、主要サブテーマ【1】について、抗腫瘍効果をえられる最少菌数が、他の抗腫瘍効果を持つ蛋白質を分泌する組換えビフィズス菌より多いため、バックアップテーマ1)を継続し最少菌数の減少を目指す。

<研究成果の副次的効果(実用化や特許の申請など研究成果の活用の見直しを含む。)>

主要サブテーマ【1】については、平成28年10月に、特許第6025127号「抗腫瘍剤、腫瘍検出用マーカー及び経口ワクチン」(〈雑誌論文〉*3)として、特許を取得した。

<今後の研究方針>

<問題点とその克服方法>で記述した研究に加えて、これまでの研究で良好な結果の得られた複数の組換えビフィズス菌株を混合し担癌モデルマウスに投与し抗腫瘍効果を検討し、抗腫瘍効果の向上・幅広い臓器由来の癌で効果を発揮するなどの改善が見られるか検討する。改善が見られた場合、速やかに混合割合を最適化する。

組換えビフィズス菌の大量かつ安定した供給のためのプロトコールについて、これまでの確立した条件下での *in vitro* 及び *in vivo* での各組換えビフィズス菌の薬効の同等性を確認する。薬効の同等性の確認完了後、げっ歯類での安全性試験を予算の許す範囲で外部委託試験にて開始する。

【テーマ2】アルパカー一本鎖VHH抗体を利用した医薬品リバイバル技術開発

テーマの目標は、①薬効があっても副作用が強い、患部に十分な量が届かず薬効が出ないという理由で医薬品となっていないもの(抗体医薬、分解酵素、サイトカイン等の生理活性タンパク質)、②薬剤耐性化によって使用できなくなっているもの(抗菌薬、抗悪性腫瘍薬などの低分子化合物)に焦点を当てて、このような医薬品を、一本鎖抗体を利用して効果の高い医薬品としてリバイバルさせることである。

<現在までの進捗状況及び達成度>

①-1 血栓溶解剤

沖縄ハブ毒由来 HR1 の C 末ペプチドは $\alpha 2$ マクログロブリン ($\alpha 2\text{M}$) による Alfineprase (フィブリン分解酵素を持つ) の不活化を阻害することは無かったため、計画は失敗に終わった。計画を変更し、出血活性はあるがフィブリン分解酵素を持ち、 $\alpha 2\text{M}$ で不活化されない台湾ハブ毒由来 Fibrinlysin と $\alpha 2\text{M}$ で失活する Alfineprase および沖縄ハブ毒由来 HR2 の構造を比較して、台湾ハブ毒由来 Fibrinlysin の出血活性に関わると考えられるプラス・チャージアミノ酸を4カ所見出し、それらを変異させた時に構造変化を起こさない変異体をデザインした。これらの変異体をバキュロウイルス発現系で生産を行った。可溶性タンパク質であるにも関わらず、細胞内で凝集し、可溶性タンパク質として回収されなかった。

①-2 経口抗腫瘍抗体

抗ヒト TRAIL-R 一本鎖多量体抗体を大腸菌、ビフィズス菌、プレビバチルス菌で発現・精製する方法を確立した(〈雑誌論文〉*2〈学会発表〉*4)。生体に投与した上記抗体を定量測定するアッセイ系を確立した。抗マウス TRAIL-R 一本鎖抗体の取得については、抗体発現ファージディスプレイライブラリーの作製まで実施している。家族性大腸線腫症のモデル動物である APC^{min} マウス早期に大腸がんを発症し、血便などを呈し約4ヶ月令で多くの個体が死亡することを確認したが、大腸がんの発症の目安となるポリープ数は個体間で誤差(バラつき)が大きく研究材料として使用するには改良が必要であると判断した。この APC^{min} マウスに、大腸がん誘発化学物質として知られる Dextran sulfate sodium (DSS) を2%の濃度で1週間飲水投与する方法を試みた。投与後7週間で小腸と大腸に多くのポリープが確認され

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

ることを見出し、抗 TRAILR 抗体の抗腫瘍効果を観察する適切なモデルが構築した。発がんを非侵襲的に観察するため、正常細胞ではほとんど発現しておらず、正常細胞が分裂寿命に達した時、発癌ストレスが生じた時に発現する遺伝子 p16^{INK4a} 後方にホタル発光ルシフェラーゼ遺伝子を連結した遺伝子改変動物である p16^{INK4a}-luc マウスの形質を上記大腸がんモデルマウスに導入して、大腸がんを効率よく発症し、大腸がんの発生や腫瘍の大きさを生体イメージングできるマウスの作製に成功した。

②抗菌薬の感受性を高める補助薬

多剤耐性緑膿菌で発現が亢進している、排出ポンプ (OprM) 開口部細胞外突出ループ 2 に結合する一本鎖抗体の DNA 配列情報を基に、単量体、2 量体、3 量体 A(3 個をリンカーを介して直列につないだ抗体)、3 量体 B(C 末の Leucine Zipper を介して 3 個束ねた抗体)遺伝子をデザインして人工合成した。これらの VHH 抗体遺伝子を大腸菌で発現させ、可溶性画分を ProteinA カラムで精製して、高い純度の組換えタンパク質を得た。ペプチド系抗菌薬のコリスチンの存在下で高度多剤耐性緑膿菌 (NGGM2.S1 株)、一般株 (PAO-1 株) を含む培養液に 3 量体 B を添加すると、コリスチンの MIC(最小発育阻止濃度) が 4 分の 1 に低下することがわかった。一方、他の抗菌薬(アズトレオナム、オフロキサシン、アミカシン、ゲンタマイシン)存在下では、MIC は変化しなかった。3 量体 B とコリスチンの細胞毒性を検討した。ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) に、3 量体 B、コリスチンをそれぞれ加えて 48 時間培養後、水溶性テトラゾリウム塩を用いて生細胞数測定を行った。3 量体 B 抗体、コリスチンをそれぞれ、MIC の 6 倍濃度、60 倍濃度で添加しても、HepG2 の増殖には影響しなかった。コリスチンの副作用は腎障害と神経毒性であり、腎障害は用量依存的に発現頻度が高くなるとされる。VHH 抗体とコリスチンの併用により、コリスチンの使用量を減少させることができるため、治療に用いる際の副作用発現を抑えられる可能性がある。

<特に優れた研究成果>

②抗菌薬の感受性を高める補助薬

コリスチンの副作用は腎障害と神経毒性であり、腎障害は用量依存的に発現頻度が高くなるとされる。VHH 抗体とコリスチンの併用により、コリスチンの使用量を減少させることができるため、治療に用いる際の副作用発現を抑えられる可能性があること。

<問題点とその克服方法>

①-1 血栓溶解剤

デザインした変異体は、可溶性タンパク質であるはずにも関わらず、細胞内で凝集し、可溶性タンパク質として回収されない。分泌シグナルペプチドを変更し、この問題を改善している。

①-2 経口抗腫瘍抗体

発生した大腸がんが、抗マウス TRAILR 抗体に対する感受性があるかどうかの重要なポイントなる。大腸がん組織の培養中に抗マウス TRAILR 抗体を添加して、p16^{INK4a}-luc のシグナルが減少するかどうかで、がん細胞傷害活性の有無を確認する。

②抗菌薬の感受性を高める補助薬

緑膿菌全身感染モデルマウスの作製と、モデルマウスによる VHH 抗体と抗菌薬の併用効果を測定するに当たって、数 100mg 単位の抗体量が必要となり、大腸菌での生産高率を高める必要がある。発現誘導条件の検討を行っている。

<研究成果の副次的効果(実用化や特許の申請など研究成果の活用の見通しを含む。)>

①-1、②のテーマでは、疾患モデル動物での薬効が確認されれば、特許出願して特許を取得する価値があり、これらを医薬品として開発する製薬企業スポンサーを探せると考えている。

①-2 のテーマでは、遺伝的大腸がん罹患し易い人に予防的に使える可能性はあるが、予防投与という点で実用化に難があるかも知れない。

<今後の研究方針>

①-1 血栓溶解剤

本テーマのコンセプトの正しさを、インビトロ薬理試験で示すことが、次の第一の目標である。

①-2 経口抗腫瘍抗体

マウスに発症した大腸がんが、抗 TRAILR 抗体に感受性であることを調べるのが、次の第一の目標である。

②抗菌薬の感受性を高める補助薬

数 100mg 単位の精製抗体を得るための生産系と緑膿菌全身感染モデルマウスの作製が次の第一の目標である。

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

<今後期待される研究成果>

疾患動物モデルでの有効性が示され、特許出願後に、非臨床試験から関わってもらえる製薬企業を見つけたい。それによって、既存のプロダクト(ドロップした医薬候補品、薬剤耐性出現で使用されなくなった医薬品、副作用の強い医薬品)を、組換えビフィズス菌、一本鎖抗体 を利用して新規な医薬品としてリバイバルさせる技術開発の例を示したことになる。

<自己評価の実施結果及び対応状況>

テーマ1では、平成28年2月～平成29年2月までシンバイオ製薬の支援を受けて、非臨床試験に向けた培養法、試験法を検討した。また、国際出願特許2件(<雑誌論文>*1,2)のうち最初の1件は日本特許(<雑誌論文>*3)を取得し、国外での審査も始まった。2つ目の特許(<雑誌論文>*2)は、日本特許庁の審査が始まり、特許取得に向けて対応している。今後も、再度非臨床試験から支援いただける製薬企業を探して行く。テーマ2では、疾患動物モデルでの有効性が示されておらず、少し遅れている。この点を最重点に進める。

<外部(第三者)評価の実施結果及び対応状況>

テーマ1で、シンバイオ製薬からの支援が打ち切られた理由は、次の2点であった。①組換えビフィズス菌医薬で先行して、2013年から米国で臨床第1相試験を進めているアネロファーマ社の結果が発表されていないことから、ビフィズス菌医薬が好ましい結果になっていないこと懸念する。②膵臓がんに対して、菌の腫瘍内増殖促進のために、高濃度の糖を投与することは好ましくないので懸念する。シンバイオ社共同研究担当者からのコメントは以下の通りであった。「この度は、弊社の事情により共同研究の継続に至ることができず、本当に申し訳ございませんでした。先生方に1年間実施頂いた研究内容・量とも、非常に優れたものであると考えております。先生方の2つのシーズは、今でも画期的治療薬になるポテンシャルがあると信じております。近い将来、再びこれら画期的癌治療に対する夢を、一緒に共有できるようになることを願って止みません。」

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- (1) 遺伝子組換えビフィズス菌 (2) アルパカー一本鎖抗体 (3) _____
 (4) _____ (5) _____ (6) _____
 (7) _____ (8) _____

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文>

- *1 Yuichiro Taira, Isao Ishida. Anti-tumor agent, marker for tumor detection, and oral vaccine agent. 国際出願 PCT/WO2014/010758 (2014.1.16).
 *2 Nishikawa Takeshi, Yuichiro Taira, Ikuko Taira, Isao Ishida. Recombinant anaerobic gram-positive bacteria. 国際出願 PCT/WO2015/104994(2015.7.16).
 *3 平裕一郎、石田功「抗腫瘍剤、腫瘍検出マーカー及び経口ワクチン剤」、日本特許第 6025127号(2016.10.21).
 *4 Y. Taira, I. Taira, I. Ishida「Development of the anti-cancer drug with the recombinant Bifidobacteria, as the drug-delivery system (DDS).」、Yakugaku-Zasshi(2017/2018 掲載予定)

<図書>

- *1 平裕一郎「抗EGFR抗体-緑膿菌外毒素Aサブユニット融合体とビフィズス菌DDSによる抗腫瘍薬の開発」、抗体薬物複合体(ADC)の設計開発(シーエムシー出版)p119-128(2016)
 *2 平裕一郎 平郁子 石田功「抗体薬物複合体におけるDDSの評価」、最新DDS技術の先端バイオ医薬品への応用開発～ナノDDS、リポソーム、表面修飾、プロドラッグなどの最新技術と製剤への具体的応用～(技術情報協会)(2017年6月末発刊予定)

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

<学会発表>

- *1 第 58 回 日本薬学会関東支部大会(2014 年 10 月 4 日、昭和薬科大学)シンポジウム 薬剤系 次世代治療と DDS 技術、「遺伝子組換え嫌気性菌によるがん治療」(招待講演)
- *2 第 135 年会(神戸)日本薬学会(2015 年 3 月 28 日)「細胞死誘導抗体を分泌するビフィズス菌を利用したがん治療」 西川毅、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、磯田勝広、石田功
- *3 第 31 回日本 DDS 学会(2015 年 7 月 2 日)、「抗 TRAIL 受容体アゴニスト一本鎖抗体 発現・分泌ビフィズス菌の抗腫瘍効果の解析」 平裕一郎、西川毅、平郁子、Akter Jesmin、磯田勝広、斎藤浩美、石田功
- *4 第 136 年会(横浜)日本薬学会(2016 年 3 月 28 日)「TRAIL-R1 を標的とした新規 3 価 VHH を分泌するビフィズス菌によるがん治療」 西川毅、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、磯田勝広、石田功
- *5 第 137 年会(仙台)日本薬学会 (2017 年 3 月 26 日) 一般シンポジウム「がんターゲティング療法の最前線」「組換えビフィズス菌を DDS として用いた癌治療法の開発」 平裕一郎

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等
ホームページで公開している場合には、URL を記載してください。

<既に実施しているもの>

私大戦略プロジェクトキックオフミーティング(2014.9.10)、帝京平成大学。

私大戦略プロジェクト帝京大・帝京平成大合同セミナー(2015.2.23)、帝京平成大学。

私大戦略プロジェクト 1 年目報告会(2015.6.24)、帝京平成大学。

私大戦略プロジェクト 2 年目報告会(2016.8.18)、帝京平成大学。

URL: <http://pharm.thu.ac.jp/research/grant.html>

<これから実施する予定のもの>

私大戦略プロジェクト 3 年目報告会、帝京平成大学。

14 その他の研究成果等

「12 研究発表の状況」で記述した論文、学会発表等以外の研究成果及び企業との連携実績があれば具体的に記入してください。また、上記11(4)に記載した研究成果に対応するものには * を付してください。

Nakamura TJ, Nakamura W, Tokuda IT, Ishikawa T, Kudo T, Colwell CS, Block GD, Age-related changes in the circadian system unmasked by constant conditions, eNeuro 2: e0064-15 (2015), doi: 10.1523/ENEURO.0064-15.2015.他 2 報

Ohnishi A, Watanabe J, Ogawa Y, Goto Y, Hattori A, Tsujimoto M, Involvement of Phenylalanine 297 in the construction of the substrate pocket of human aminopeptidase B, Biochemistry, 54, 6062-6070 (2015).他 1 報

15 「選定時」に付された留意事項とそれへの対応

<「選定時」に付された留意事項>

なし

<「選定時」に付された留意事項への対応>

なし

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

16 施設・装置・設備・研究費の支出状況(実績概要) (千円)

年度・区分	支出額	内 訳						備考
		法人負担	私学助成	共同研究機関負担	受託研究等	寄付金	その他()	
平成二十六年 度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	10,390	4,027	6,363	0	0	0	
	研究費	28,153	15,300	12,853	0	0	0	
平成二十七 年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	12,873	4,292	8,581	0	0	0	
	研究費	29,244	16,745	12,499	0	0	0	
平成二十八 年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	
	研究費	34,354	17,354	17,000	0	0	0	
総 額	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	23,263	8,319	14,944	0	0	0	
	研究費	91,751	49,399	42,352	0	0	0	
総計	115,014	57,718	57,296	0	0	0	0	

17 施設・装置・設備の整備状況 (私学助成を受けたものはすべて記載してください。)
《施設》(私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。) (千円)

施設の名 称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
該当なし							

※ 私学助成による補助事業として行った新增築により、整備前と比較して増加した面積

0 m²

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

《装置・設備》(私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。)

(千円)

装置・設備の名称	整備年度	型番	台数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
(研究装置) 該当なし				h h h h h			
(研究設備) Profinia タンパク質精製システムと Experion 自動電気泳動システム	平成26年度	620-1012JAEXP	1	280 h	5,151	3,178	私学助成
BACTRON IV (嫌気性チャンバー)	平成26年度	バクトロン600 BAC4-STAND	1	144 h	5,239	3,185	私学助成
全自動ELISAマイクロプレートプロセッサ	平成27年度	9162250000	1	42 h	7,161	4,774	私学助成
AKTA pure 25 L1(組換えタンパク質精製システム)	平成27年度	F9-C(PCセットを含む:Desktop)	1	72 h	5,711	3,807	私学助成
(情報処理関係設備) 該当なし				h h h h h			

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

18 研究費の支出状況

(千円)

年 度	平成 26 年度	(研究テーマ1)		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳		
		主 な 使 途	金 額	主 な 内 容
教 育 研 究 経 費 支 出				
消 耗 品 費	10,745	血清 ろ過実験器具 その他	1,458 615 8,672	Hyclone Laboratories SH30070.03E × 50 自動圧力調整弁 × 1, 透過液流量計 × 1
光 熱 水 費	0			
通 信 運 搬 費	0			
印 刷 製 本 費	0			
旅 費 交 通 費	140	学会出張 研究打ち合せ その他	81 58 1	日本薬学会第135年会 大阪大学研究打ち合せ
報 酬 ・ 委 託 料	2,750	人工遺伝子合成 人工遺伝子合成 その他	859 403 1,488	人工遺伝子合成(846bp・846bp・1962bp・1962bp・756bp・1872b) × 1・指定ヘクター(pKKT427) × 6 人工遺伝子合成(2370bp・2346bp) × 2・指定ヘクター(pKKT427) × 2
(アルパカ飼育費)	2,149	アルパカ飼育費	2,149	アルパカ飼育・研究試料採取
計	15,784			
ア ル パ イ ト 関 係 支 出				
人件費支出 (兼務職員)	0			
教育研究経費支出	0			
計	0			
設 備 関 係 支 出 (1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教育研究用機器備品	1,187	タンパク質濃縮器	1,187	KrosFlo Research II i System(SYR2-U20-01N) × 1式
図 書	0			
計	1,187			
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	0			
ポスト・ドクター	1,961	IVISを用いた抗腫瘍効果の測定等	1,961	学内1人、学外0人、外国0人、学振0人
研究支援推進経費	0			
計	1,961			学内1人、学外0人、外国0人、学振0人

年 度	平成 26 年度	(研究テーマ2)		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳		
		主 な 使 途	金 額	主 な 内 容
教 育 研 究 経 費 支 出				
消 耗 品 費	6,311	遠心機部品 実験用マウス その他	1,681 502 4,127	T9A3177g/60-9 × 3・T15A4177g/60-9 × 1・スイングローター × 1・15TA50T77g/9 × 16・13A50T77g/9 × 4 JAXマウスC57BL/6J-Apc Min J 雄7週齢 × 4
光 熱 水 費	0			
通 信 運 搬 費	0			
印 刷 製 本 費	0			
旅 費 交 通 費	110	学会出張 特別研究員交通費 その他	77 11 22	日本薬学会第135年会 特別研究員交通費
報 酬 ・ 委 託 料	744	人工遺伝子合成 人工遺伝子合成 その他	326 293 125	人工遺伝子合成(1204bp・1198bp・1186bp) × 1 人工遺伝子合成(609bp) × 3
()	0			
計	7,165			
ア ル パ イ ト 関 係 支 出				
人件費支出 (兼務職員)	558	実験動物飼育管理、データ解析	558	時給 1,000円、年間時間数 476時間 実人数 1人
教育研究経費支出	0			
計	558			
設 備 関 係 支 出 (1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教育研究用機器備品	1,498	リアルタイムPCR	1,498	リアルタイム定量PCRシステムMx3000P × 1
図 書	0			
計	1,498			
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	0			
ポスト・ドクター	0			
研究支援推進経費	0			
計	0			学内0人、学外0人、外国0人、学振0人

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

年度	平成 27 年度 (研究テーマ1)	積算内訳		
小科目	支出額	主な用途	金額	主な内容
		教 育 研 究 経 費 支 出		
消耗品費	8,747	ろ過システム部品 ろ過システム部品 その他	1,649 394 6,704	MBT001-5L-S MBTバックシステム特注品10セット mPES KrosFlo モジュール K02-E20U-10-S×2
光熱水費	0			
通信運搬費	0			
印刷製本費	0			
旅費交通費	151	学会出張 学会出張 その他	82 64 5	第62回日本実験動物学会総会 第42回日本毒性学会学術年会
報酬・委託料	3,296	人工遺伝子合成 人工遺伝子合成 その他	547 302 2,447	人工遺伝子合成(4587bp・4569bp)×2・標準ヘクター-(pUC18)×2 人工遺伝子合成(2024bp・990bp)×2・指定ヘクター-(pKKT427)×2
(アルパカ飼育費)	480	アルパカ飼育費	480	アルパカ飼育・研究試料採取
(学会参加費)	43	学会参加費 学会参加費 その他	20 14 9	第31回日本DDS学会学術集会参加費 第62回日本実験動物学会総会参加費
計	12,717			
ア ル パ イ ト 関 係 支 出				
人件費支出 (兼務職員)	0			
教育研究経費支出	0			
計	0			
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教育研究用機器備品	0			
図 書	0			
計	0			
研 究 ス タ ッ プ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	0			
ポスト・ドクター	3,942	IVISを用いた抗腫瘍効果の測定等	3,942	学内1人、学外0人、外国0人、学振0人
研究支援推進経費	0			
計	3,942			学内1人、学外0人、外国0人、学振0人

年度	平成 27 年度 (研究テーマ2)	積算内訳		
小科目	支出額	主な用途	金額	主な内容
		教 育 研 究 経 費 支 出		
消耗品費	6,944	電子天びん他 実験用マウス その他	615 309 6,020	電子天びんXS105DUV×1他 SPFマウス(KNS/Slc6週齢♀)×80
光熱水費	0			
通信運搬費	0			
印刷製本費	0			
旅費交通費	28	特別研究員交通費 特別研究員交通費 その他	9 3 16	特別研究員交通費 特別研究員交通費
報酬・委託料	1,168	タンパク質発現 人工遺伝子合成 その他	355 194 619	タンパク質受託発現サービスBreviMAX standard 人工遺伝子合成(1563bp・1566bp)×1
()	0			
計	8,140			
ア ル パ イ ト 関 係 支 出				
人件費支出 (兼務職員)	1,172	実験動物飼育管理、データ解析	1,172	時給 1,000円、年間時間数 985時間 実人数 1人
教育研究経費支出	0			
計	1,172			
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教育研究用機器備品	3,273	細胞破砕機 実体顕微鏡システム その他	1,143 798 1,332	MICROSMASH MS-100R×1等 研究用高級実体顕微鏡システム透過LED照明付SZX16-3151×1
図 書	0			
計	3,273			
研 究 ス タ ッ プ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	0			
ポスト・ドクター	0			
研究支援推進経費	0			
計	0			学内0人、学外0人、外国0人、学振0人

法人番号	131148
プロジェクト番号	S1411026

年 度	平成 28 年度 (研究テーマ1)		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	13,848	抗体 実験用マウス その他	515 374 12,959
光 熱 水 費	0		
通 信 運 搬 費	0		
印 刷 製 本 費	0		
旅 費 交 通 費	185	学会出張 学会出張 その他	64 58 63
報 酬・委 託 料	4,584	抗血清の抗原特異的精製他 人工遺伝子合成 その他	499 268 3,817
(アルパカ飼育費)	822	アルパカ飼育費	822
(学会参加費)	52	学会参加費 学会参加費 その他	30 11 11
計	19,491		
ア ル パ イ ト 関 係 支 出			
人件費支出 (兼務職員)	0		
教育研究経費支出	0		
計	0		
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	0		
図 書	133	研究図書 研究図書 その他	76 49 8
計	133		
研 究 ス タ ッ プ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	0		
ポスト・ドクター	0		
研究支援推進経費	0		
計	0		学内0人、学外0人、外国0人、学振0人

年 度	平成 28 年度 (研究テーマ2)		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	5,633	試薬 試薬 その他	363 346 4,924
光 熱 水 費	0		
通 信 運 搬 費	0		
印 刷 製 本 費	0		
旅 費 交 通 費	31	特別研究員交通費	31
報 酬・委 託 料	2,642	研究補助派遣 研究補助派遣 その他	626 610 1,406
()	0		
計	8,306		
ア ル パ イ ト 関 係 支 出			
人件費支出 (兼務職員)	1,429	実験動物飼育管理、データ解析	1,429
教育研究経費支出	0		
計	1,429		時給 1,100円、年間時間数 1032時間 実人数 1人
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	4,995	オールインワン蛍光顕微鏡	4,995
図 書	0		
計	4,995		オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700×1
研 究 ス タ ッ プ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	0		
ポスト・ドクター	0		
研究支援推進経費	0		
計	0		学内0人、学外0人、外国0人、学振0人