

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発
(複数課題プログラム)

評価用資料

令和元年12月26日

経済産業省 商務・サービスグループ

生物化学産業課

第1章 複数課題プログラムの概要	1
I. 複数課題プログラムの概要	
1. 事業アウトカム	5
2. 複数課題プログラムの内容及び事業アウトプット	5
3. 当省（国）が実施することの必要性	7
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ	7
5. 複数課題プログラムの実施・マネジメント体制等	8
6. 費用対効果	10
第2章 複数課題プログラムを構成する研究開発課題（プロジェクト）の概要	
A 国際基準に適した次世代抗体医薬品等の製造技術開発	
I. 研究開発課題（プロジェクト）概要	11
1. 事業アウトカム	12
2. 研究開発内容及び事業アウトプット	12
3. 当省（国）が実施することの必要性	26
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ	27
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等	27
6. 費用対効果	30
B 天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術開発	
I. 研究開発課題（プロジェクト）概要	31
1. 事業アウトカム	32
2. 研究開発内容及び事業アウトプット	32
3. 当省（国）が実施することの必要性	57
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ	57
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等	59
6. 費用対効果	61
C 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発	
I. 研究開発課題（プロジェクト）概要	62
1. 事業アウトカム	63
2. 研究開発内容及び事業アウトプット	63
3. 当省（国）が実施することの必要性	71
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ	71
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等	72
6. 費用対効果	74
D 糖鎖利用による革新的創薬技術開発	
I. 研究開発課題（プロジェクト）概要	75
1. 事業アウトカム	76
2. 研究開発内容及び事業アウトプット	77
3. 当省（国）が実施することの必要性	86
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ	86
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等	88
6. 費用対効果	90

第1章 複数課題プログラムの概要

I. 複数課題プログラムの概要

複数課題プログラム名	次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発
上位施策名	<ul style="list-style-type: none"> ○健康・医療戦略（平成 26 年 7 月 22 日閣議決定、平成 29 年 2 月 17 日一部変更） ○医療分野研究開発推進計画（平成 26 年 7 月 22 日閣議決定、平成 29 年 2 月 17 日一部変更） ○日本再興戦略 2016（平成 28 年 6 月 6 日閣議決定） ○第 5 期科学技術基本計画（平成 28 年 1 月 22 日閣議決定） ○未来投資戦略 2017（平成 29 年 6 月 9 日閣議決定）
担当課室	商務・サービスグループ 生物化学産業課

複数課題プログラムの目的・概要

<複数課題プログラム全体>

我が国を筆頭とした地球規模での高齢化に伴って、医薬品産業は年率約 8%で成長を続けており、近い将来、自動車産業を超える市場規模になることが予想されている。近年は、日本が得意としてきた従来の低分子化合物を中心とした医薬品に代わって、抗体医薬品等を中心としたバイオ医薬品が急速に普及してきている。しかしながら、我が国はその流れに乗り遅れており、世界市場における我が国発の医薬品のシェアは伸び悩んでいるのが実情である。さらに、急速な高齢化によって医薬品の輸入が増大していることも相まって、結果的に大幅な輸入超過に陥っているため、国としても日本再興戦略等で成長産業の柱として位置付けて支援を実施しているところである。

医療の課題として、患者の QOL を向上させるとともに、医療費増加の抑制を図る必要があるところ、早期に疾病を探知し生存可能性を向上させる「先制医療」、及び個人差を踏まえたより効能の高い治療を行う「個別化医療」の実現が求められている。先制医療に関しては、国内外でがん・認知症等の疾患に対して、早期診断を可能とする診断薬・診断機器の開発が進められているものの（国内：日立、島津、シスメックス等、海外：Roche、Dako、Illumina、Abbott、GE 等）、重症化していない段階での指標を同定するのが難しいことに加え、技術の有用性・臨床的意義を示すためには、多数の臨床検体を収集して解析する必要があること等の理由から、各疾患に対する予測性・確度の高い検診方法は確立されていない。個別化医療に関しては、低分子医薬品の投与を主とした、有効患者の幅は広いものの、治療効果が限定的な医療から、技術革新に伴って開発される新規形態の医薬品（抗体等を中心としたバイオ医薬品）を用いた、特定の患者群に適した治療効果の高い個別化医療へと展開が進みつつある。

本事業では、健康長寿社会の実現及び医薬品産業の競争力向上を目指し、先制医療の推進を目的として「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発（平成 26～30 年度）」を、個別化医療の推進を目的として「国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発（平成 25～29 年度）」、「天然化合物及び IT を活用した革新的医薬品創出技術開発（平成 25～29 年度）」、「糖鎖利用によるバイオ医薬品の高度創薬技術の開発（平成 28 年度～継続中）」を実施した。

< A. 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発 >

薬効が高く副作用の少ない抗体医薬品は近年市場が大幅に拡大しているが、我が国には製造技術に関する基盤が無いため、国内製薬企業は欧米製の装置を導入、もしくは主に海外の医薬品製造受託機関（CMO）への製造委託によって製造を行っているのが現状である。本技術開発では、抗体医薬品製造に関連する技術を有する国内企業・大学・公的研究機関を結集させ、複雑で多機能な抗体医薬品の製造技術を国際基準に適合したレベルで確立するため、細胞培養により抗体を生産する上流プロセス、生産された抗体を精製し原薬とする下流プロセスそれぞれの技術開発を行うとともに両プロセスの最適化を行い、国産技術に基づく革新的な抗体医薬品製造のプラットフォームを構築する。

< B. 天然化合物及び IT を活用した革新的医薬品創出技術開発 >

医薬品の開発には膨大な開発費と時間が必要であり、創薬研究の効率化に資する基盤技術の開発が望まれている。本技術開発では、「①次世代型有用天然化合物の生産技術開発」において、微生物が生産する天然化合物を基とした医薬品開発の促進において課題となる「物質生産に関与する遺伝子を活用しきれない」、「化合物の生産量が少ない」という点を克服するために、巨大合成遺伝子の組換え技術及び取り扱いが容易な生産用微生物株を用いた化合物の生産技術開発を行った。また、「②ITを活用した革新的医薬品創出基盤技術開発」においては、創薬プロセスをITの活用により合理化・最適化し、創薬効率を向上させるために、従来の低分子化合物スクリーニングのみからでは得られない構造的多様性を有する医薬品候補化合物の設計を可能にする *in silico* シミュレーション/スクリーニングソフトウェアを開発する。

< C. 体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発 >

高齢化に伴いがんや認知症の患者は増加を続けており、低侵襲な早期診断技術の確立が強く望まれている。本技術開発では、末梢血中に存在するマイクロ RNA に着目し、13種類のがん及び認知症の患者においてそれぞれ特徴的なマイクロ RNA のパターンを見出すとともに、採血した少量の血液から簡便に測定可能な診断システムを併せて開発することで、低侵襲ながん及び認知症の早期診断技術を確立する。

< D. 糖鎖利用による革新的創薬技術開発 >

抗体を中心とした分子標的薬の開発では創薬標的の枯渇が問題となっており、タンパク質だけでなく、そこから伸びる糖鎖も含めた「糖タンパク質」を標的とする創薬技術の確立が期待されている。本技術開発では、我が国の糖鎖に関連する基礎技術を集約し、極微量の糖鎖標的を検出する技術、構造解析する技術、糖鎖標的を製造する技術、糖鎖標的を認識する捕捉分子を作成する技術を開発・統合することで、がん細胞等の疾患細胞表面に発現する特異的な構造を持つ糖タンパク質を標的とした画期的な新薬開発に繋がる技術基盤を構築する。

＜複数課題プログラム全体＞の予算額等（委託） （単位：百万円）

開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成 25 年度	令和 5 年度	令和元年度	令和 6 年度 (予定)	技術研究組合、 大学等
H28FY 執行額	H29FY 執行額	H30FY 執行額	総執行額	総予算額
6,420	5,790	5,744	32,156	32,266

執行額には AMED 管理費を含む。

＜A. 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発＞の予算額等（委託）

（単位：百万円）

開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成 25 年度	平成 29 年度	平成 27 年度	平成 29 年度	次世代バイオ医薬品製造技術研究組合等
H27FY 執行額	H28FY 執行額	H29FY 執行額	総執行額	総予算額
3,054	2,790	2,550	13,734	13,824

＜B. 天然化合物及び IT を活用した革新的医薬品創出技術開発＞の予算額等

（単位：百万円）

開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成 25 年度	平成 29 年度	平成 27 年度	平成 29 年度	次世代天然物化学技術研究組合等
H27FY 執行額	H28FY 執行額	H29FY 執行額	総執行額	総予算額
800	1,150	900	4,450	4,450

＜C. 体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発＞の予算額等

（単位：百万円）

開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成 26 年度	平成 30 年度	平成 28 年度	平成 30 年度	国立がん研究センター、東レ等
H28FY 執行額	H29FY 執行額	H30FY 執行額	総執行額	総予算額
1,585	1,437	1,552	7,898	7,899

< D. 糖鎖利用による革新的創薬技術開発 > の予算額等

(単位：百万円)

開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成 28 年度	令和 2 年度	平成 30 年度	令和 2 年度 (予定)	慶應義塾大学、 産業技術総合研 究所等
H28FY 執行額	H29FY 執行額	H30FY 執行額	総執行額	総予算額
812	805	1,046	2,663	2,675

1. 事業アウトカム

<複数課題プログラム全体>

以下のA～Dに示す各プロジェクトのアウトカムを統合し、先制医療、個別化医療の推進に資する創薬基盤技術の開発を着実に推進する。

<A. 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発>

事業アウトカム指標		
指標：「開発成果による製品の導入実績」 事業で確立した技術から製品として上市された数 (ただし目標最終年度の指標はトータルシステムとしての導入実績数)		
指標目標値 (累積値)		
事業開始時 (平成 25 年度)	計画：－	実績：－
中間評価時 (平成 27 年度)	計画：6	実績：7 (達成)
終了時評価時 (平成 29 年度)	計画：23	実績：28 (達成)
目標最終年度 (令和 5 年度)	計画：10 (トータルシステムとして導出した件数)	

<B. 天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術開発>

事業アウトカム指標		
指標：「開発成果によるソフトウェアの利用件数」 開発したシミュレーションソフトウェアを利用している国内企業等の数		
指標目標値		
事業開始時 (平成 25 年度)	計画：－	実績：－
中間評価時 (平成 27 年度)	計画：10	実績：18 (達成)
終了時評価時 (平成 30 年度)	計画：25	実績：43 (達成)
目標最終年度 (令和 5 年度)	計画：60	

<C. 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発>

事業アウトカム指標		
指標：「開発成果による製品の数」 開発したデータベース及びmiRNA測定技術を利用した製品の上市数		
指標目標値 (累積値)		
事業開始時 (平成 26 年度)	計画：－	実績：－
中間評価時 (平成 28 年度)	計画：0	実績：0
終了時評価時 (平成 30 年度)	計画：0	実績：0
目標最終年度 (令和 5 年度)	計画：5	

<D. 糖鎖利用による革新的創薬技術開発>

事業アウトカム指標		
指標：「各要素技術の開発成果等の利用実績」 確認した糖鎖ターゲット及び構造設計図の治療薬、診断薬開発への利用件数ならびに当課解析装置の導出や受託解析件数		
指標目標値 (累積値)		
事業開始時 (平成 28 年度)	計画：－	実績：－
中間評価時 (平成 30 年度)	計画：2	実績：1 (未達成)
終了時評価時 (令和 2 年度予定)	計画：15	実績：－
目標最終年度 (令和 7 年度)	計画：125	

2. 複数課題プログラムの内容及び事業アウトプット

(1) 複数課題プログラムの内容

本事業は、先制医療の実現を目的として、がん等の疾患を低侵襲かつ超早期に診断可能なツール

の開発（体液中マイクロRNA測定基盤技術開発）を実施するとともに、個別化医療の実現を目的として、国内の技術を結集した抗体医薬品の製造技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術）、創薬の効率化・高度化に資する技術開発（天然物及びITを活用した革新的医薬品創出技術開発）、創薬標的の拡大と副作用の低減に資する技術開発（糖鎖利用による革新的創薬技術開発）を実施するものである。

（２）事業アウトプット

＜A. 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発＞

事業アウトプット指標		
「バイオ医薬品製造技術の各工程の技術の確立数」		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成25年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成27年度）	計画：11	実績：22（達成）
終了時評価時（平成30年度）	計画：80	実績：130（達成）

＜共通指標実績＞

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプの作成
176	－	79	－	－	－	－

＜B. 天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術開発＞

事業アウトプット指標		
「病気の原因となる標的タンパク質に対する医薬品候補化合物を特定するソフトウェアに係る革新的アルゴリズムの確立」		
指標目標値		
事業開始時（平成25年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成27年度）	計画：60%	実績：60%（達成）
終了時評価時（平成30年度）	計画：100%	実績：100%（達成）

＜共通指標実績＞

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプの作成
268	－	4	－	－	－	－

＜C. 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発＞

事業アウトプット指標		
「がんやアルツハイマーを特定するための診断アルゴリズム数」		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成26年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成28年度）	計画：5	実績：5（達成）
終了時評価時（平成30年度）	計画：15	実績：20（達成）

＜共通指標実績＞

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプの作成
82	－	51	－	－	－	－

<D. 糖鎖利用による革新的創薬技術開発>

事業アウトプット指標		
「候補となる糖鎖ターゲット分子の解析数（糖鎖配列等）」		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成 28 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成 30 年度）	計画：10	実績：11（達成）
終了時評価時（令和 2 年度）	計画：25	実績：－

<共通指標実績>

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプ作成
47	-	5	-	-	-	-

3. 当省(国)が実施することの必要性

質の高い医療の提供による国民の健康増進、増大を続ける医療費の適正化、医療分野の産業競争力の向上を目指して、本事業では「先制医療」、「個別化医療」の推進に資する基盤技術開発を実施している。日本再興戦略 2016 においても、「先制医療」や「個別化医療」を実現するための研究開発の推進について言及されており、これらは国の重要な政策課題であると言える。また、本事業の目標を達成するためには、技術シーズを有するアカデミア等の複数の研究機関、疾患サンプルを提供する臨床機関、薬事承認に向けた支援を行う規制当局、実用化を担う機器メーカー、試薬メーカー、製薬企業等が連携し、一丸となって研究開発を実施することが必須であり、民間企業等が単独で取り組むことが困難な事業内容であるため、国が主導して産学官の連携を促すことが適切である。

【参考：国の施策における位置付け】

- (1) 健康・医療戦略（平成 26 年 7 月 22 日閣議決定、平成 29 年 2 月 17 日一部変更）
- (2) 医療分野研究開発推進計画（平成 26 年 7 月 22 日閣議決定、平成 29 年 2 月 17 日一部変更）
- (3) 日本再興戦略 2016（平成 28 年 6 月 6 日閣議決定）
- (4) 第 5 期科学技術基本計画（平成 28 年 1 月 22 日閣議決定）
- (5) 未来投資戦略 2017（平成 29 年 6 月 9 日閣議決定）

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

下図のとおり、先制医療の実現に資する早期診断技術の開発、国産技術を結集した抗体医薬品の製造技術や糖鎖を利用した高度創薬技術開発、天然化合物や IT を活用した医薬品の新規創出技術開発の実施を通じて、開発課題毎に設定したアウトカム達成を目指す。さらにその先には、国民の健康増進、我が国の医薬品産業の競争力強化、医療経済の適正化等へとインパクトが広がっていくものと期待される。各開発課題の詳細なロードマップについては、第 2 章の当該項目を参照されたい。

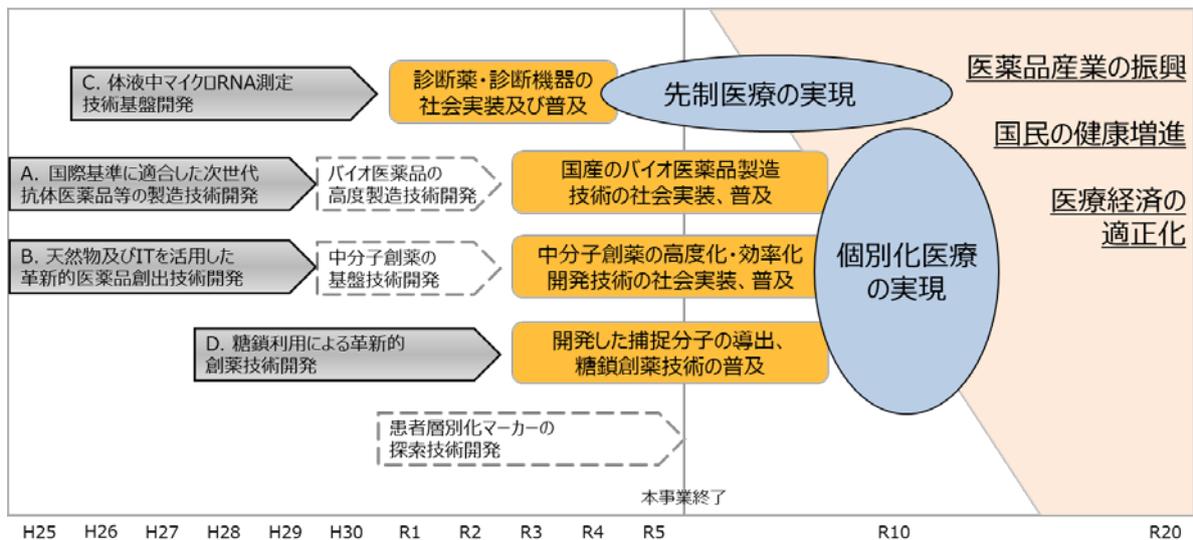


図 1-1. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

5. 複数課題プログラムの実施・マネジメント体制等

下図のとおり、「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」は、経済産業省直執行事業として平成 25 年度に 2 課題（「国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発」、「天然化合物及び IT を活用した革新的医薬品創出技術開発」）で開始したが、平成 27 年度に国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）が創設されたことに伴い、平成 26 年度から NEDO 事業として既に開始していた「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」と併せて AMED へ事業移管された。平成 28 年度には「糖鎖利用による革新的創薬技術開発」が追加され、現在の 4 課題体制の事業となった。

また、事業の実施・マネジメント体制としては、当省から AMED へ予算（補助金）を支出し、AMED が公募により実施者を選定している。さらに、AMED は本事業の研究分野に関して優れた学識経験や研究開発の実績等を有し、研究開発の課題の評価及び業務運営に関して見識を有する専門家をプログラムディレクター（PD）、プログラムスーパーバイザー（PS）、プログラムオフィサー（PO）として各 1 名配置している。PD、PS、PO は協力して事業全体の課題を把握するとともに、各研究内容の進捗評価や分野間協力の推進等の高度な専門的調整を行い、優れた成果を実用化へつなげるために、当課、AMED 担当課（医薬品研究課）と連携して事業運営を行っている（下図参照）。さらに、各開発課題単位で外部有識者（通常 7～10 名程度）により構成される課題評価委員会を構成し、事業の中間評価及び事後評価を実施している。5 年間の事業であれば、3 年目に中間評価を実施し、研究課題を構成する各要素技術開発について、継続の可否の判断や改善点の洗い出し等を行い、事業後半の研究計画へ反映させている。また、事業終了後の事後評価では研究開発成果のレビューを実施し、事業成果を社会実装していくための助言をいただいている。以上のように、本事業では課題評価委員会、PD、PS、PO 等からの指摘事項等を研究開発計画や実施計画に反映させつつ事業運営をするマネジメント体制を確保している。

また、コンソーシアム内において実施者の間で知財合意書を締結して各実施者の有する権利関係を明確にしたり、知財の専門家を配置して知的財産の管理や周辺特許の調査等を行う等、各プロジェクトにおいて適切な知財管理ができるよう、体制を整えている。また AMED では、事業で得られた研究成果の実用化を促進するために、知財戦略や導出戦略についてコンサルテーションする AMED 知的財産コンサルタントを配置している。

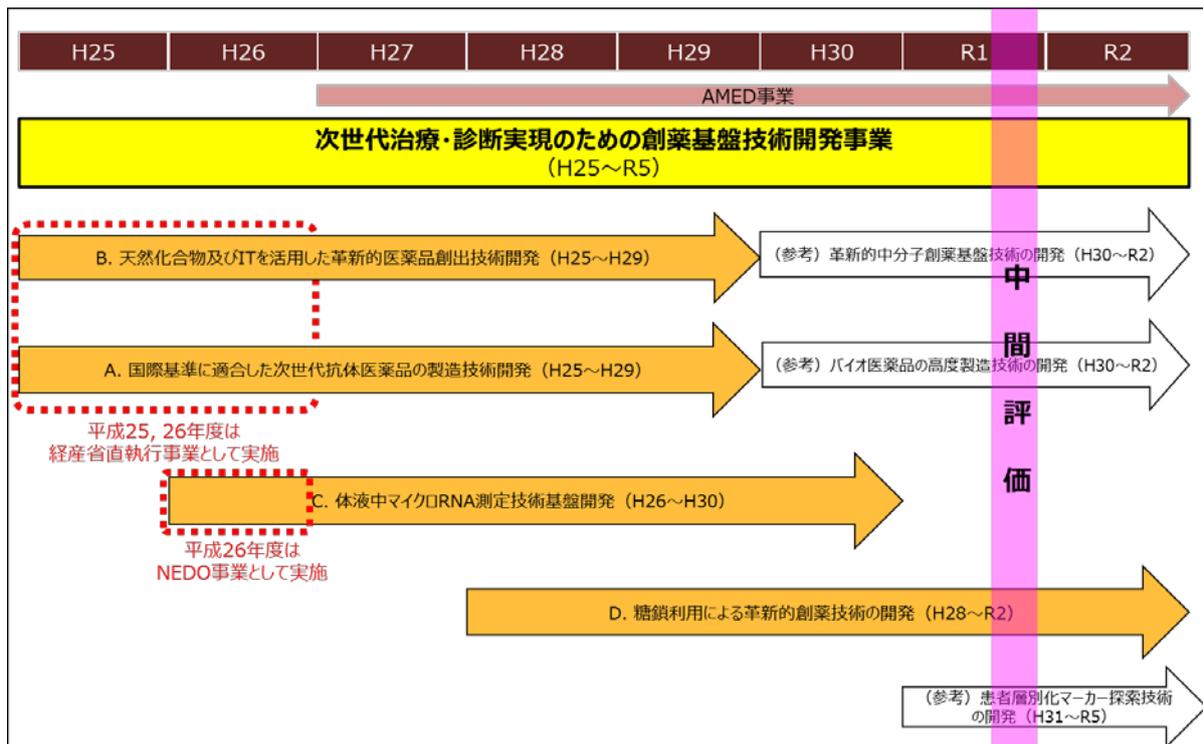


図 1-2. 本事業の変遷

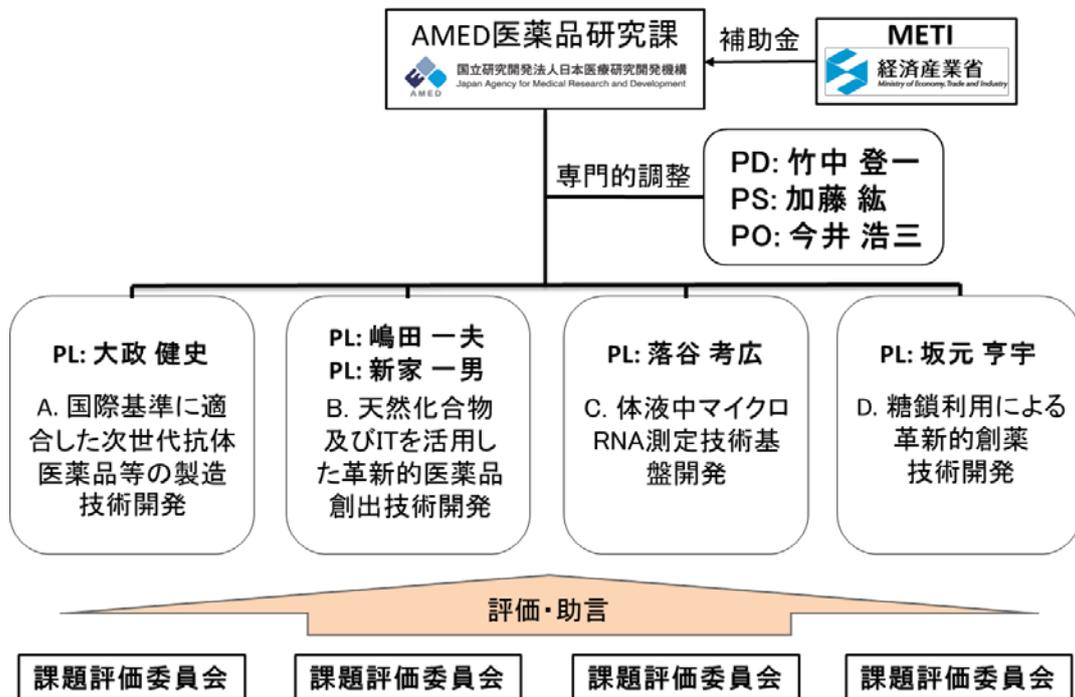


図 1-3. 本事業の実施・マネジメント体制

6. 費用対効果

本事業では、国産技術を利用した抗体医薬品の製造技術、天然物及びITを活用した創薬の効率化技術、マイクロRNAを利用した低侵襲がん診断技術、糖鎖識別による抗体医薬品の創薬標的の拡大と副作用の低減に資する技術の4つの創薬基盤技術開発を実施した。これにより、我が国発の技術・装置等を用いた抗体医薬品や中分子医薬品、診断薬の創出を促進することで、国内製薬企業の競争力強化と医薬品の輸入超過の改善を図るとともに、国民の健康増進、医療費の適正化にも貢献することを目標としている。本事業は、事業開始から6年間（平成30年度まで）で、総額約321億円の費用で実施された。

本事業において主要なターゲットの一つとして注力している抗体医薬品を例にすると、その世界市場は2015年に約8.6兆円であったが、2030年には28兆円まで伸びると予測されている。しかしながら、2015年時点における国内の抗体医薬品売上高7,250億円のうち、国内で生産された抗体医薬品の割合はわずか5%程度にとどまっており（出典：「製薬協ニューズレター2017年9月号」のデータより算出）、医薬品の輸入超過増大の原因であることはもちろん、国内企業の医薬品であっても製造を海外企業に委託すること等により国費が流出してしまっており、製造技術・装置の国産化も含めて国内生産割合を引き上げていくことが急務である。また、世界の医薬品市場（世界売上3億ドル以上）における日本発医薬品の売上シェアの推移（2008年11.5%⇒2014年9.9%）（出典：ユート・ブレン事業部「Pharma Future」2015年5月号）、日本の医療用医薬品の承認数変化（2008年2,458件⇒2015年1,069件）（出典：日本製薬工業会DATA BOOK 2017）からも分かるように、我が国の製薬企業の研究開発能力や目利き力の低下が危惧されている。本事業で開発した創薬基盤に関する技術成果が新たな創薬開発等につながり、世界市場における我が国発の医薬品の割合を引き上げることができれば、その経済効果は極めて大きいと推測される。具体的に、波及効果となり得る項目を以下に示す。

（1）国内医薬品産業の競争力強化、輸入超過の改善

糖鎖制御による革新的な医薬品開発の実現、天然化合物の効率的な生産技術やITを活用した創薬の効率化に資する技術等の開発・普及により、我が国発の医薬品の創出を促進することで、製薬企業の競争力強化を図るとともに、国内の医薬品市場における輸入品割合の低減、国内医薬品の輸出の増加に貢献することを目指す。さらに、抗体医薬品製造における細胞株や培養・精製装置等を全て国産化・プラットフォーム化して社会実装することで、海外の製造技術に依存している現状から脱却し、製造コストの低減を目指す。さらに、医薬品製造の受託を行う企業の新規参入を促す。

（2）国民の健康増進、患者のQOLの向上、医療費の適正化

マイクロRNAによるがんの早期診断を実現し、早期に適切な介入を行うことで、重篤ながん患者を減らすことで国民の健康増進に寄与するとともに、医療費の削減を目指す。また、糖鎖技術の活用を代表とする、より副作用の少ない医薬品の開発に資する技術を開発することで、患者のQOLの向上を目指す。

第2章 複数課題プログラムを構成する研究開発課題（プロジェクト）の概要

A. 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

プロジェクト名	国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術開発			
行政事業レビューとの関係	平成30年度行政事業レビューシート（事業番号0034）			
上位施策名	<ul style="list-style-type: none"> ○健康・医療戦略（平成26年7月22日閣議決定、平成29年2月17日一部変更） ○医療分野研究開発推進計画（平成26年7月22日閣議決定、平成29年2月17日一部変更） ○日本再興戦略2016（平成28年6月6日閣議決定） ○第5期科学技術基本計画（平成28年1月22日閣議決定） ○未来投資戦略2017（平成29年6月9日閣議決定） 			
担当課室	生物化学産業課			
<p><u>プロジェクトの目的・概要</u></p> <p>薬効が高く副作用の少ない抗体医薬品は近年市場が大幅に拡大しているが、我が国には製造技術に関する基盤が無い場合、国内製薬企業は欧米製の装置を導入、もしくは主に海外の医薬品製造受託機関（CMO）への委託によって抗体医薬品の製造を行っているのが現状である。</p> <p>本技術開発では、抗体医薬品製造に関連する要素技術を有する国内企業・大学・公的研究機関を結集させ、複雑で多機能な抗体医薬品の製造技術を国際基準に適合したレベルで確立するため、細胞培養により抗体を生産する「上流プロセス」、生産された抗体を精製し原薬とする「下流プロセス」、それらを総括する「品質評価技術」、「ウイルス等安全管理技術」のそれぞれについて技術開発を行うとともに、それらの要素技術を有機的に結合させ、プロセス全体として最適化することにより、国産技術に基づく革新的な抗体医薬品製造のプラットフォームを構築することを目指す。</p>				
予算額等（委託）				（単位：百万円）
開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成25年度	平成29年度	平成27年度	平成29年度	次世代バイオ医薬品製造技術研究組合等
H27FY 執行額	H28FY 執行額	H29FY 執行額	総執行額	総予算額
3,054	2,790	2,550	13,734	13,824

1. 事業アウトカム

事業アウトカム指標		
指標：「開発成果による製品の導入実績」 事業で確立した技術から製品として上市された数 (ただし目標最終年度の指標はトータルシステムとしての導入実績数)		
指標目標値 (累積値)		
事業開始時 (平成 25 年度)	計画：－	実績：－
中間評価時 (平成 27 年度)	計画：6	実績：7 (達成)
終了時評価時 (平成 29 年度)	計画：23	実績：28 (達成)
目標最終年度 (令和 5 年度)	計画：10 (トータルシステムとして導出した件数)	

本プロジェクトでは、抗体医薬品製造に関連する要素技術を有する 28 企業が参画して研究開発を実施しており、これら企業が本事業において確立した技術を基にした製品の開発、社会実装を担う。事業期間内は進捗を確認できるよう抗体医薬品製造に必要な様々な製品単位 (培地、培養装置、カラム、シングルユースバッグ等) の上市数を指標として設定しており、事業終了時点で 23 の目標に対して 28 の製品が本事業から生み出された。一方、本事業の最終目標はあくまで、これら国産技術をパッケージ化した抗体医薬品製造のプラットフォーム技術として製薬企業、医薬品製造受託機関 (CMO) 等 (主に次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の賛助会員企業を想定) に導出することであるため、目標最終年度 (令和 5 年度) の指標は「トータルシステムとしての導出件数」として 10 件を設定している。

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

(1) 研究開発内容

課題 1 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術		
	研究開発項目	代表者
①	生産細胞構築技術の開発	九州大学 上平 正道
②	高性能培養技術の開発	日立製作所 村上 聖
③	高度ダウンストリーム技術の開発	山口大学 山本 修一
④	先進的品質評価技術	産業技術総合研究所 本田 真也
⑤	ウイルス安全性管理技術の開発 (H27～)	神戸大学 内田 和久
⑥	次世代プラットフォーム化技術の確立	大阪大学 大政 健史
課題 2 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術のうち高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発に係るもの (H26～)		
①	長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発	神戸大学 柘植 謙爾
②	抗体生産遺伝子クラスター設計技術開発	神戸大学 近藤 昭彦

課題 1 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術

21 世紀の製薬産業の成長エンジンは、抗体医薬品に代表されるバイオ医薬品となっているが、その最も大きなボトルネックは複雑かつ高度な生物を用いた製造技術にある。そこで、我が国の英知を結集し、次世代バイオ医薬品等の製造に対応するため、(I) 細胞構築・培養によりタンパク質 (抗

体)を生産する「上流プロセス」と、精製して原薬とする「下流プロセス」、それらを総括する「品質評価技術」、そして国内では評価施設や技術開発が十分に整備されていない「ウイルス等安全性管理技術」をそれぞれ革新し、さらに、(Ⅱ)これまで個別に開発されていたこれらの要素技術を有機的に結合させ、プロセスを全体として構築・最適化することにより、国際基準に適合する次世代抗体医薬等の産業技術基盤を確立することを目標として、大規模かつ相互に連携した個別開発項目を設定し、研究開発を行った。

具体的に実施した課題として、①生産細胞構築技術の開発、②高性能細胞培養技術の開発、③高度ダウンストリーム技術の開発、④先進的品質評価技術の開発、⑤ウイルス等安全性管理技術の開発の5つの要素技術開発課題を設定し、さらに⑥として各技術のプラットフォーム化を検討した。

①生産細胞構築技術の開発

現在、抗体医薬品の生産はそのほとんどがチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた細胞培養により生産されており、CHO細胞を用いたバイオ医薬品生産はグローバルスタンダードになっている。しかし、CHO細胞を用いたバイオ医薬品生産プロセスでは、遺伝子導入による生産細胞の構築から培養条件の設定、実生産プロセスの構築までに、長期間にわたる試行錯誤的あるいは経験的な選択手法がとられており、メカニズムに裏付けされた生産細胞構築はほとんど行われていない。

そこで、CHO細胞を用いた生産細胞構築技術として、特定染色体遺伝子の導入および増幅、人工染色体の利用、翻訳効率向上に関する技術開発を行った。これら生産細胞構築技術プラットフォームの開発を行った結果、3~5 g/Lの生産レベルの細胞を10週間で構築できるようになった。また、チャイニーズハムスターの卵巣組織由来オリジナル不死化細胞を用いて、従来のCHO細胞での抗体生産性の2倍以上となる7日間で5 g/Lを達成した。

②高性能細胞培養技術の開発

高性能細胞培養技術の開発では、共通技術として培地、添加剤の開発を行うとともに、小規模な細胞スクリーニング、プロセス構築、生産培養に至る一連の工程における高性能なシングルユース培養装置の開発、計測制御技術、スケールアップにおける同等性評価技術の開発を行った。

その結果、高生産性かつ安定な抗体製造を支えるプラットフォーム培地を開発し、小規模培養装置においては、スクリーニングで重要度の高い再現性を確認した。生産規模培養装置では50Lで既存品と開発装置の抗体医薬培養試験を実施し、国際基準に適合した既存製品と比較して遜色のない生産性を有するという結果を得た。

③高度ダウンストリーム技術の開発

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の製造において、下流の精製工程(ダウンストリームプロセス、DSP)は、複数のクロマトグラフィーと膜分離により構成される複雑なプロセスである。DSPが製造コストの50-70%以上を占めることが知られており、その効率化は重要な課題である。

DSPの根幹となるクロマトグラフィー分離剤については、先行品を上回る様々な高性能分離剤の開発に成功した。これら分離剤を充填したプロセス設計用プレパックカラム(1-40 mL)、小型製造用1 Lプレパックカラムをハウジング、充填装置と共に開発した。神戸GMP施設において50L培養液からシングルユースシステムで5種類の高効率DSPプラットフォームを開発し、既存プロセスの半分以下の時間で実施できることを実証した。さらに、DSP用高速PAT装置も開発し、実用性を確認した。

④先進的品質評価技術の開発

本課題は、バイオ医薬品の分子不均一性に焦点をあて、バイオ医薬品の立体構造変化による不均一性、会合凝集による不均一性および翻訳後修飾による不均一性を評価するための先進的な分析技術と専用の分析装置等の開発を実施した。

その結果、立体構造恒常性を高感度に検出できる非天然型構造抗体検出装置、会合凝集体のサイズ分布を広範囲に解析できる分級デバイス、オリゴ糖鎖プロファイルを迅速に解析できる分析キット、糖鎖分析の互換性を向上させる標品としての完全化学合成糖鎖、および目的物由来不純物を迅速に解析できる抗体医薬用二次元電気泳動装置の開発に成功した。開発品の一部については事業期間内の製品化に成功し、導出実績を示した。

⑤ウイルス等安全性管理技術の開発

ウイルス等安全性管理技術は、バイオ医薬品の開発や承認申請に必須であるが、日本国内では評価施設や技術開発が十分に整備されていない。そこで、未整備となっているバイオ医薬品製造工程開発における迷入ウイルスへの対応、すなわち CHO 細胞などの宿主細胞、原材料、アクシデント等からのウイルス迷入等を高感度・広範囲に検出すると共に、工程から迷入ウイルスを除去するための基盤技術を国際的なガイドラインに沿った形で開発整備できるよう、大きく「ウイルス安全性評価試験実施体制の基盤整備」と「ウイルス管理技術開発のための高感度検出技術」の2分野に分けて、基本的な技術の開発を実施した。

ウイルス安全性試験を実施するための BSL2 レベルラボを設置し、バイオ医薬品の初期開発に必要な二つのウイルス (MVM および MuLV) を ATCC から購入し、ウイルスバンク化するとともに、大量培養する系を立ち上げた。また、ウイルスの *in vitro* アッセイ系や PCR 検出系を確立した。これらを用いてウイルスクリアランス試験を実際に実施できる体制を構築した。

⑥国際基準に適合した次世代プラットフォーム化技術の確立

次世代抗体医薬等の製造工程のプラットフォーム化の POC (Proof Of Concept) として、研究開発課題①～⑤において開発された各種技術を有機的に連結させ、細胞株構築から品質評価までの高度先進技術を統合して、国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造のためのトータルシステム・トータルソリューションの提供に資する技術開発とその実証を行った。

ICH ガイドラインに適合する形で GMP 準拠での技術評価・検証の施設整備に取り組み、構築したマスターセルバンク (MCB) を順次拡大培養し、200L 規模までの培養 (アップストリーム工程) を実施し、除細胞処理、クロマトグラフィー、ウイルス不活化、ウイルス除去処理を組み合わせた精製による原薬製造 (ダウストリーム工程)、および、得られた原薬に関する理化学分析による品質分析を実施するための施設としての整備を行った。施設設計においては、シングルユース技術を用いた製造と製造作業においてワンウェイ方式を取り入れたことに大きな特徴がある。整備した施設のバリデーションを行い、cGMP に適合した製造施設として完成させた。また、細胞構築技術開発の進展に伴う MCB 構築のための施設整備および治験薬製造のための施設整備に着手した。これら神戸・横浜・福島 GMP 集中研等において、細胞構築、培養、生産、実製造まで見据えた整備を行い、参照製造、実証パイプラインを実施し、開発技術の性能の確かさを検証し、上下流プロセスのワンストップ体制を構築した。

課題2 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術のうち高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発に係るもの

本開発課題では、低分子型の抗体分子 (低分子抗体) を酵母で生産する際の生産性を向上させるために必要な遺伝子群をまとめて酵母に組み込むためのシームレスなシステムを構築することを目指して研究開発を遂行した。具体的には、100 を超える既報遺伝子に加えて、ゲノムデザインサイクル (GDC) の手法で新たに探索される候補遺伝子も含めて、すべての遺伝子をひとまとめにつないで巨大分子を正確かつ迅速に構築する技術とそれらを酵母に迅速に導入する技術開発を行った。

①長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発

OGAB 法 (Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*) による長鎖 DNA 自動合成のトータルシステムをより実用的なレベルに高めることを目標として、プレジジョン・システム・サイエンス社の作成した長鎖 DNA 自動合成装置の Breadboard を利用し、DNA の希釈、濃度測定、等モル濃度混合の一連の自動化を、実際の集積用の DNA 材料を用いて、遺伝子集積が可能かについて検証した。OGAB 法によるコンビナトリアルライブラリーの構築において、OGAB ブロックの調製のための制限酵素反応条件を改良することにより、約 4 万 8 千の抗体生産関連遺伝子群のコンビナトリアルライブラリーの構築に成功した。さらに、長鎖 DNA 自動合成プロトタイプ機の開発を実施し、ハイスループット化のために処理可能なサンプル数を倍の 96 サンプルまで増やしたこと、さらに、DNA 濃度測定にかかる時間を短縮するために、8 本すべての分注ノズルに吸光度測定機構を搭載し、DNA 濃度測定の工程を大幅に短縮することが可能となった。

②抗体生産遺伝子クラスター設計技術開発

生産宿主のゲノム設計や各種の解析支援システムの開発と GDC を効率よく回すための技術開発や有用性評価を進めた。微生物による低分子抗体生産をモデルとして抗体生産基本株を構築し、高生産性に関わる遺伝子やゲノム変異を迅速に同定するための基盤技術を開発した。さらに、細胞内生理状態の網羅的解析と情報解析を組み合わせた鍵因子の探索・推定技術や、長鎖 DNA 合成技術を利用した高生産株の構築技術の開発、即ち、長鎖 DNA で発現するための有用遺伝子を抽出するための変異解析システムや有効な遺伝子組み合わせを推定するためのネットワーク解析システム、さらには遺伝子クラスター全体を合理的に設計・最適化するための基盤技術開発を進めた。抗体の遺伝子を酵母等の微生物に導入して生産を行うとともに、変異導入や遺伝子導入等により抗体生産量の変化する株の構築を行った。そして、取得した株の生理状態の変動を網羅的かつ詳細に分析し、情報科学的解析を併用することによって高い生産性を実現するための改変ポイントを推定し、推定した改変ポイントをゲノムや長鎖 DNA 上に集積した株を作成し、生理状態の変動を同様に解析することによって、さらなる改変ポイントの推定に成功した。この過程を繰り返すことによって、目標とする生産性を達成する株の樹立を目指した研究開発を行った。このような方法論をベースに、長鎖 DNA 自動合成装置を核とした遺伝子設計と合成のスキームを開発することで、様々な種類や特異性を有する低分子抗体高生産株を迅速かつ効率的に樹立するためのプラットフォームを確立する研究開発を行った。CHO 細胞での抗体高生産マスター株の作出においても有効な手段として応用できる革新的な研究開発スキームの確立に向けて研究開発を推進することができた。

(2) 事業アウトプット

事業アウトプット指標		
「バイオ医薬品製造技術の各工程の技術の確立数」		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成 25 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成 27 年度）	計画：11	実績：22（達成）
終了時評価時（平成 29 年度）	計画：80	実績：130（達成）

< 共通指標実績 >

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプ作成
176	－	79	－	－	－	－

本プロジェクトの成果として、論文を 176 報、学会・シンポジウム等の発表を 651 件行った。また、開発した抗体医薬品製造技術に関連する特許 79 件を国内外に出願した。

(学会誌、雑誌等による発表論文一覧)

1. Enhancement of glycosylation by stable co-expression of two sialylation-related enzymes on Chinese hamster ovary cells. Nguyen T. S., Misaki R., Ohashi T. and Fujiyama K. J. Biosci. Bioeng. (2018)
2. Targeted knock-in of an scFv-Fc antibody gene into the hprt locus of Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 and CRIS-PITCh systems. Kawabe Y, Komatsu S, Komatsu S, Murakami M, Ito A, Sakuma T, Nakamura T, Yamamoto T, Kamihira M. J. Biosci. Bioeng. (2018)
3. Retention mechanism of proteins in hydroxyapatite chromatography -multimodal interaction based protein separations: A model study. Itoh F, Yoshimoto N, Yamamoto S. Current Protein and Peptide Science (2018)
4. バイオ医薬品プロセス関連技術についての海外動向調査(2)
渡邊正人 バイオサイエンスとインダストリー (2018)
5. Microchip electrophoresis utilizing an in situ photopolymerized Phos-tag binding polyacrylamide gel for specific entrapment and analysis of phosphorylated compounds. Yamamoto S, Himeno M,

- Kobayashi M, Akamatsu M, Satoh R, Kinoshita M, Sugiura R, Suzuki H. *Analyst*. (2017)
6. Calibration-free concentration analysis for an analyte prone to self-association. Imamura H., Honda S. *Analy. Biochem.* (2017)
7. Crystal Structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. H. Suzuki, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2017)
8. 微生物酵素を用いた均一糖鎖を持つバイオ医薬品の調製
苔米地祐輔、加藤紀彦、山本憲二 *Bio. Clinica.* (2017)
9. Successful removal of porcine circovirus-1 from immunoglobulin G formulated in glycine solution using nanofiltration. Bao RM, Shibuya A, Uehira T, Sato T, Urayama T, Sakai K, Yunoki M. *Biologicals* (2017)
10. e-Polylysine-Based Thermo-Responsive Adsorbents for Immunoglobulin Purification. 丸山優史, 渋谷啓介 *Biomaterials Science.* (2017)
11. Application study of 1,2- α -L-fucosynthase: Introduction of Fuc α 1-2 Gal disaccharide structures on N-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide. Sugiyama Y, Katoh T, Honda Y, Gotoh A, Ashida H, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* (2017)
12. A simple method for calculating the productivity of polyphenol separations by polymer-based chromatography. N. Yoshimoto, Y. Sugiyama, S. Yamamoto. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* (2017)
13. Modeling and simulation of the redox regulation of the metabolism in *Escherichia coli* at different oxygen concentrations. Yu Matsuoka, Hiroyuki Kurata. *Biotechnol. Biofuels.* (2017)
14. Cell-surface expression levels are important for fine-tuning the performance of receptor tyrosine kinase-based signalobodies. Nakabayashi, H., Kawahara, M., Nagamune, T. *Biotechnol. J.* (2017)
15. Choosing the right protein A affinity chromatography media can remove aggregates efficiently. T. Yada, K. Nonaka, M. Yabuta, N. Yoshimoto, S. Yamamoto. *Biotechnol. J.* (2017)
16. Chemo-enzymatic synthesis of the glucagon containing N-linked oligosaccharide and its characterization. Higashiyama T, Umekawa M, Nagao M, Katoh T, Ashida H, Yamamoto K. *Carbohydr. Res.* (2017)
17. Structural characterization of the immunostimulatory exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048. Matsuzaki C, Takagaki C, Tomabechi Y, Forsberg LS, Heiss C, Azadi P, Matsumoto K, Katoh T, Hosomi K, Kunisawa J, Yamamoto K, Hisa K. *Carbohydr. Res.* (2017)
18. Online cleanup liquid chromatography for the analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides labeled with 7-amino-4-methylcoumarin. Nagatomo Y., Hashimoto S., Kishimoto Y., Hayakawa T., Yamamoto S., Kinoshita M., Suzuki S. *Chromatography* (2017)
19. Electrostatic engineering of the interface between heavy and light chains promotes antibody Fab fragment production. Ohmuro-Matsuyama, Y., Mori, K., Hamada, H., Ueda, H., Yamaji, H. *Cytotechnology* (2017)
20. Modifications of a signal sequence for antibody secretion from insect cells. Ohmuro-Matsuyama, Y., Yamaji, H. *Cytotechnology* (2017)
21. Enhanced IgG1 production by overexpression of nuclear factor kappa B inhibitor zeta (NFKBIZ)

in Chinese hamster ovary cells. Masayoshi Onitsuka, Yukie Kinoshita, Akitoshi Nishizawa, Tomomi Tsutsui, Takeshi Omasa. *Cytotechnology* (2017)

22. Combination of SDS-PAGE and intact mass analysis for rapid determination of heterogeneities in monoclonal antibody therapeutics. Yamada H, Matsumura C, Yamada K, Teshima K, Hiroshima K, Kinoshita M, Suzuki S and Takehi K. *Electrophoresis* (2017)

23. Chemo-enzymatic synthesis of a glycosylated peptide containing a complex N-glycan based on unprotected oligosaccharides by using DMT-MM and Endo-M. Y. Tomabechi, T. Katoh, M. Kunishima, T. Inazu, K. Yamamoto. *Glycoconj. J.* (2017)

24. Plug-plug kinetic capillary electrophoresis for in-capillary exoglycosidase digestion as a profiling tool for the analysis of glycoprotein glycans. Yamagami M, Matsui Y, Hayakawa T, Yamamoto S, Kinoshita M, Suzuki S. *J. Chromatogr A.* (2017)

25. Accumulative scFv-Fc antibody gene integration into the hprt chromosomal locus of CHO cells. Xue Wang, Yoshinori Kawabe, Risa Kato, Takeshi Hada, Akira Ito, Yoshimasa Yamana, Masako Kondo, Masamichi Kamihira. *J. Biosci. Bioeng.* (2017)

26. Efficient production of an antibody Fab fragment by transient gene expression in insect cells. Mori, K., Hamada, H., Ogawa, T., Ohmuro-Matsuyama, Y., Katsuda, T., Yamaji, H. *J. Biosci. Bioeng.* (2017)

27. Improved kinetic model of *Escherichia coli* central carbon metabolism in batch and continuous cultures. Hiroyuki Kurata, Yurie Sugimoto. *J. Biosci. Bioeng.* (2017)

28. Improved recombinant antibody production by CHO cells using a production enhancer DNA element with repeated transgene integration at a predetermined chromosomal site. Kawabe Y, Inao T, Komatsu S, Huang G, Ito A, Omasa T, Kamihira M. *J. Biosci. Bioeng.* (2017)

29. Lengthening of high-yield production levels of monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells by downregulation of breast cancer. Rima Matsuyama, Noriko Yamano, Namiko Kawamura, Takeshi Omasa. *J. Biosci. Bioeng.* (2017)

30. Friability testing as a new stress-stability assay for biopharmaceuticals. T. Torisu, T. Maruno, S. Yoneda, Y. Hamaji, S. Honda, T. Ohkubo, S. Uchiyama. *J. Pharm. Sci.* (2017)

31. Recent Topics of Research in the Characterization and Quality Control of Biopharmaceuticals in Japan. Ishii-Watabe A, Shibata H, Harazono A, Hyuga M, Kiyoshi M, Saitoh S, Iwura T, Torisu T, Goda Y, Uchiyama S. *J. Pharm. Sci.* (2017)

32. Fate of a stressed therapeutic antibody tracked by fluorescence correlation spectroscopy: Folded monomers survive aggregation. H. Imamura, A. Sasaki, S. Honda. *J. Phys. Chem. B.* (2017)

33. Analytical ultracentrifugation with fluorescence detection system reveals differences in complex formation between recombinant human TNF and different biological TNF antagonists in various environments. Krayukhina E, Noda M, Ishii K, Maruno T, Wakabayashi H, Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A, Kato M, Uchiyama S. *Mabs* (2017)

34. Conformational and Colloidal Stabilities of Human Immunoglobulin G Fc and Its Cyclized Variant: Independent and Compensatory Participation of Domains in Aggregation of Multidomain Proteins. S. Yageta, R. Shibuya, H. Imamura, S. Honda. *Molecular Pharmaceutics* (2017)

35. X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog. W. Shihoya, T. Nishizawa, K. Yamashita, A. Inoue, K. Hirata, FMN. Kadji, A. Okuta, K. Tani, J. Aoki, Y. Fujiyoshi, T. Doi, O. Nureki. *Nature Structure & Molecular Biology* (2017)

36. Amplification of a transgene within a long array of replication origins favors higher gene

expression in animal cells. Kiwamu Ohsaki, Yusuke Ohgaki, Noriaki Shimizu. PLoS ONE (2017)

37. Simplified methods based on mechanistic models for understanding and designing chromatography processes for proteins and other biological products -Yamamoto Models and Yamamoto Approach-. N. Yoshimoto, S. Yamamoto. Preparative Chromatography for Separation of Proteins (Book, Wiley) (2017)

38. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. Mimura Y, Katoh T, Fahey R, O'Flaherty R, Izumi T, Mimura-Kimura Y, Utsunomiya T, Mizukami Y, Yamamoto K, Matsumoto T, Rudd PM. Protein & Cell. (2017)

39. AlphaScreen-based homogeneous assay using a pair of 25-residue artificial proteins for high-throughput analysis of non-native IgG. Y. Senga, H. Imamura, T. Miyafusa, H. Watanabe, S. Honda. Scientific Reports (2017)

40. A systematic approach to time-series metabolite profiling and RNA-seq analysis of Chinese hamster ovary cell culture. H. Hsu, M. Araki, M. Mochizuki, Y. Hori, M. Murata, P. Kahar, T. Yoshida, T. Hasunuma, A. Kondo. Scientific Reports (2017)

41. The cryo-EM structure of gastric H⁺,K⁺-ATPase with bound BYK99, a highaffinity member of K⁺-competitive, imidazo[1,2-a]pyridine inhibitors. K. Abe, J. Shimokawa, M. Naito, K. Munson, G. Sachs, H. Suzuki, K. Tani, Y. Fujiyoshi. Scientific reports (2017)

42. Application of LC-MS/MS analysis for time-lapse amino acid metabolomics in CHO cell culture. Hsu, H., Hasunuma, T., Araki, M., Yoshida, T., Hori, Y., Murata, M., Kondo, A. Shimadzu Journal (2017)

43. バイオ医薬品プロセス関連技術についての海外動向調査(1)
渡邊正人 バイオサイエンスとインダストリー (2017)

44. 「バイオ医薬品の分析のコツ—品質評価のための基礎と応用 第4回分光学的性質を利用してタンパク質の構造を知る」
本田真也、今村比呂志、渡邊秀樹、宮房孝光 ファームテクジャパン (2017)

45. 日本発次世代創薬のための化学：抗体医薬品開発の現状と展望
津本浩平、長門石暁 化学と工業, 日本化学会 (2017)

46. バイオ医薬品のクロマトグラフィー分離プロセス
山本修一 化学工学 (2017)

47. CHO 細胞における組換えタンパク質生産性向上技術の開発
山野範子、大政健史 月刊 PharmStage (2017)

48. 人工改変を駆使した高機能性次世代がん治療抗体の開発
浅野竜太郎、熊谷 泉 月刊ファインケミカル (2017)

49. キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用
河原正浩 生物工学会誌 (2017)

50. 抗体の品質・物性評価に関する解説(2)：プロセス・製剤における評価
長門石暁, 津本浩平 製剤機械技術学会誌 (2017)

51. カラムスイッチングによる連続クロマトグラフィー分離操作
杉山征輝、吉本則子、山本修一 日本食品工学会誌 (2017)

52. 巨大なタンパク質やバイオナノ粒子の拡散係数の測定方法
濱地正嵩、吉本則子、山本修一 日本食品工学会誌 (2017)
53. 最適化された繰り返しクロマトグラフィー操作条件に基づいた連続クロマトグラフィーの操作条件および生産性計算方法
杉山征輝、吉本則子、山本修一 日本食品工学会誌 (2017)
54. Trend of serum-free cryopreservative media. Ogawa A, Terada S. Internal medical review. (2016)
55. A simple method for predicting the adsorption performance of capture chromatography of proteins, Japan. Noriko Yoshimoto, Tomokazu Yada, and Shuichi Yamamoto. Japan Journal of Food Engineering (2016)
56. 抗体精製用プロテイン A クロマトグラフィー担体の高機能化
西八條正克, 鴻池史憲, 荻原侑莉恵, 中野喜之, 船木正大, 水口和信 日本生物工学会大会トピックス集. (2016)
57. バイオ医薬品の不均一性評価
本田真也 HPLC,GC の測定条件設定テクニックと解析 事例集(技術情報協会) (2016)
58. バイオ医薬品の保存安定性評価
本田真也 HPLC,GC の測定条件設定テクニックと解析 事例集(技術情報協会) (2016)
59. Biosensing Probe for Quality Control Monitoring of the Structural Integrity of Therapeutic Antibodies. Watanabe H., Yageta S., Imamura H., Honda S. Analytical Chemistry (2016)
60. Synthesis, structure, and evaluation of a β -cyclodextrin-artificial carbohydrate conjugate for use as a doxorubicin-carrying molecule. Yamanoi T, Oda Y, Katsuraya K, Inazu T, Hattiri K. Bioorg. Med. Chem. (2016)
61. Transglycosidase-like activity of *Mucor hiemalis* endoglycosidase mutants enabling the synthesis of glycoconjugates using a natural glycan donor. Sakaguchi K., Katoh T. and Yamamoto K. Biotech. Appl. Biochem. (2016)
62. Complete NMR assignment of a bisecting hybridtype oligosaccharide transferred by *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase. Yamanoi T, Oda Y, Katsuraya K, Inazu T, Yamamoto K. Carbohydrate Research (2016)
63. Cryo-electron microscopy for structure analysis of membrane proteins in the lipid bilayer. K. Abe, Y Fujiyoshi. Curr. Opin. Struct. Biol. (2016)
64. Sericin in the isolating solution improves the yield of islets isolated from the pancreas. Shigehiro Yokoi, Makoto Murakami, Mitsuhiro Morikawa, Takanori Goi, Akio Yamaguchi, Satoshi Terada. Cytotechnology (2016)
65. Surface plasmon resonance biosensing of the monomer and the linked dimer of the variants of protein G under mass transport limitation. Imamura H., Honda S. Data in Brief (2016)
66. Characterization of physiologic phenotypes of dentate gyrus synapses of PDZ1/2 domain-deficient PSD-95 knockin mice. H. Nagura, T. Doi, Y. Fujiyoshi. European J. Neuroscience (2016)
67. Molecular determinants of prokaryotic voltage-gated sodium channels for recognition of local anesthetics. T. Shimomura, K. Irie, Y. Fujiyoshi. FEBS J. (2016)
68. Anti-EGFR scFv tetramer (tetrabody) with a stable monodisperse structure, strong anticancer

effect, and a long in vivo half-life. Asano R., Koyama N., Hagiwara Y., Masakari Y., Orimo R., Arai K., Ogata H., Furumoto S., Umetsu M., Kumagai I. *FEBS Open Bio* (2016)

69. Current landscape of protein glycosylation analysis and recent progress toward a novel paradigm of glycoscience research. Yamamoto S., Kinoshita M., Suzuki S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2016)

70. Increased recombinant protein production owing to expanded opportunities for vector integration in high chromosome number Chinese hamster ovary cells. Noriko Yamano, Mai Takahashi, Haghparsad Mohammad Ali Seyed, Masayoshi Onitsuka, Toshitaka Kumamoto, Jana Frank, Takeshi Omasa. *J. Biosci. Bioeng.* (2016)

71. Metabolic analysis of antibody producing Chinese hamster ovary cell culture under different stresses conditions. Badsha M. B, Kurata H, Onitsuka M, Oga T, Omasa T. *J. Biosci. Bioeng.* (2016)

72. Capillary electrochromatography using monoamine- and triamine-bonded silica nanoparticles as pseudostationary phases. Takeda Y., Hayashi Y., Utamura N., Takamoto C., Kinoshita M., Yamamoto S., Hayakawa T., Suzuki S. *J. Chromatogr. A* (2016)

73. Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. A. Oshima, T. Masuzawa, K. Murata, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.* (2016)

74. Thermostabilization of the human endothelin type-B receptor. A. Okuta, K. Tani, S. Nishimura, Y. Fujiyoshi, T. Doi. *J. Mol. Biol.* (2016)

75. Generation of a Mutant *Mucor hiemalis* Endoglycosidase That Acts on Core-fucosylated N-Glycans. Katoh T., Katayama T., Tomabechi Y., Nishikawa Y., Kumada J., Matsuzaki Y. and Yamamoto K. *J. Biol. Chem.* (2016)

76. Kinetics of Antibody Aggregation at Neutral pH and Ambient Temperatures Triggered by Temporal Exposure to Acid. Imamura H., Honda S. *Journal of Physical Chemistry B* (2016)

77. 創薬につながる低温電子顕微鏡を用いた構造生理学の発展
藤吉好則 *Medchem News* (2016)

78. 均一な糖鎖を持つバイオ医薬品の開発
苫米地祐輔、加藤紀彦、山本憲二 *Medical Science Digest.* (2016)

79. Two-dimensional crystal structure of aquaporin-4 bound to the inhibitor acetazolamide. A. Kamegawa, Y. Hiroaki, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *Microscopy* (2016)

80. Claudin-21 has a paracellular channel role at tight junctions. H. Tanaka, Y. Yamamoto, H. Kahihara, Y. Yamazaki, K. Tani, Y. Fujiyoshi, K. Mineta, K. Takeuchi, A. Tamura, S. Tsukita. *Molecular and Cellular Biology.* (2016)

81. Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. W. Shihoya, T. Nishizawa, A. Okuta, K. Tani, N. Dohmae, Y. Fujiyoshi, O. Nureki, T. Doi. *Nature* (2016)

82. Atomic structure of the innexin-6 gap junction channel determined by cryo-EM. A. Oshima, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *Nature Commun.* (2016)

83. Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy. Ota C, Noguchi S, Nagatoishi S, Tsumoto K. *Pharm Res.* (2016)

84. Cloning and characterization of a human genomic sequence that alleviates the repeat-induced gene silencing. Miki Fukuma, Yuto Ganmyo, Osamu Miura, Takashi Ohyama and Noriaki Shimizu. *PLoS ONE* (2016)

85. Epigenetic Repeat-Induced Gene Silencing in the Chromosomal and Extrachromosomal Contexts in Human Cells. Sho-hei Mitsuda and Noriaki Shimizu. PLoS ONE (2016)
86. 次世代がん治療薬を目指した低分子二重特異性抗体の開発と高機能化
浅野竜太郎, 熊谷泉 酵素工学ニュース (2016)
87. がん治療を目指した二重特異性抗体の開発
浅野竜太郎, 熊谷泉 細胞 (2016)
88. 抗体精製用アフィニティークロマトグラフィー担体の開発
西八條正克, 村田大, 水口和信 細胞 (2016)
89. 人工抗体の機能的構造形態に関する研究
浅野竜太郎 生化学 (2016)
90. 抗体の品質・物性評価に関する解説 (1): 会合凝集形成と熱安定性の評価.
長門石暁, 津本浩平 製剤機械技術学会誌 (2016)
91. バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター肺組織からの無血清馴化不死化細胞株の樹立
山野範子, 大政健史 第 68 回日本生物工学会トピックス集 (2016)
92. Approaches to Quality Risk Management When Using Single-Use Systems in the Manufacture of Biologics. Akiko Ishii-Watabe, Akihiko Hirose, Noriko Katori, Norikata Hashii, Susumu Arai, Hirotooshi Awatsu, Akira Eiza, Yoshiaki Hara, Hideshi Hattori, Tomomi Inoue, Tetsuya Isono, Masahiro Iwakura, Daisuke Kajihara, Nobuo Kasahara, Hiroyuki Matsuda, Sei Murakami, Taishiro Nakagawa, Takehiro Okumura, Takeshi Omasa, Shinya Takuma, Iyo Terashima, Masayoshi Tsukahara, Maiko Tsutsui, Takahiro Yano, Nana Kawasaki. AAPS Pharma Sci Tech. (2015)
93. A rapid and highly sensitive microchip electrophoresis of monoand mucin-type oligosaccharides labeled with 7-amino-4-methylcoumarin. Yamamoto S, Nagai E, Asada Y, Kinoshita M, Suzuki S. Anal. Bioanal. Chem. (2015)
94. Chiral separation of D/Laldoses by micellar electrokinetic chromatography using a chiral derivatization reagent and a phenylboronic acid complex. Yamamoto S, Tamata Y, Sejima K, Kinoshita M, Suzuki S. Anal. Bioanal. Chem. (2015)
95. Salt tolerant chromatography provides salt tolerance and a better selectivity for protein monomer separations. N. Yoshimoto, D. Itoh, Y. Isakari, A. Podgornik, S. Yamamoto. Biotechnol. J. (2015)
96. Construction of a gene knockout CHO cell line using a simple gene targeting method. Marina Aga, Noriko Yamano, Toshitaka Kumamoto, Jana Frank, Masayoshi Onitsuka, and Takeshi Omasa. BMC Proceedings (2015)
97. Increased antibody productivity in Chinese Hamster Ovary cells through induction of chromosomal instability by cell fusion. YuanShan Lai, Noriko Yamano, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa. BMC Proceedings (2015)
98. Stability difference of each chromosome in Chinese Hamster Ovary cell line. Noriko Yamano, Toshitaka Kumamoto, Mai Takahashi, Jana Frank, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa. BMC Proceedings (2015)
99. Adaptive Assembly: Maximizing the Potential of a Given Functional Peptide with a Tailor-Made Protein Scaffold. Watanabe H, Honda S. Chem. Biol. (2015)
100. Synthesis of quaternary ammonium derivatives of cellulose as the coating reagents for capillary

- electrophoresis. Yamamoto S, Iwata T, Nishiwaki K, Kinoshita M, Suzuki S. *Chromatography* (2015)
101. Bovine F1FoATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. C. Jiko, K.M. Davies, K.S. Itoh, K. Tani, S. Maeda, D.J. Mills, T. Tsukihara, Y. Fujiyoshi., W. Kuehlbrandt and C. Gerle. *eLIFE* (2015)
102. Homologous recombination-independent large gene cassette knock-in in CHO cells using TALEN and MMEJ-directed donor plasmids. Sakuma T, Takenaga M, Kawabe Y, Nakamura T, Kamihira M, Yamamoto T. *International Journal of Molecular Science*. (2015)
103. Efficient enrichment of high-producing recombinant Chinese hamster ovary cells for monoclonal antibody by flow cytometry. Okumura T, Masuda K, Watanabe K, Miyadai K, Nonaka K, Yabuta M, Omasa T. *J. Biosci. Bioeng.* (2015)
104. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins. Krayukhina E., Tsumoto K., Uchiyama S., Fukui K. *J. Pharm. Sci.* (2015)
105. Domain structure of growth signalobodies critically affects the outcome of antibody library selection. Yoshida, R., Kawahara, M., Nagamune, T. *J. Biochem.* (2015)
106. Improved gene amplification by cellcycle engineering combined with the CreloxP system in Chinese hamster ovary cells. Rima Matsuyama, Tomomi Tsutsui, Kyoung Ho Lee, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa. *J. Biosci. Bioeng.* (2015)
107. Improved transgene integration into the Chinese hamster ovary cell genome using the Cre-loxP system. Inao T, Kawabe Y, Yamashiro T, Kameyama Y, Wang X, Ito A, Kamihira M. *J. Biosci. Bioeng.* (2015)
108. Rapid evaluation of N-glycosylation status of antibodies with chemiluminescent lectinbinding assay. Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa. *J. Biosci. Bioeng.* (2015)
109. An intracellular domain with a novel sequence regulates cell surface expression and synaptic clustering of leucinerich repeat transmembrane proteins in hippocampal neurons. K. Minatohara, Y. Murata, Y. Fujiyoshi and T. Doi. *J. Neurochemistry* (2015)
110. Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles. Totoki S, Yamamoto G, Tsumoto K, Uchiyama S, Fukui K. *J. Pharm. Sci.* (2015)
111. 標準手順書 I (第2版) MAB 組合 筑波集中研 MAB 組合 (2015)
112. 標準手順書 II (第1版) MAB 組合 筑波集中研 MAB 組合 (2015)
113. 平成 26 年度次世代バイオ医薬品製造技術組合報告書と知的財産に関する動向調査報告書
バイオインダストリー協会 MAB 組合 (2015)
114. Model for the architecture of claudinbased paracellular ion channels through tight junctions. H. Suzuki, K. Tani, A. Tamura, S. Tsukita and Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.* (2015)
115. Conformational and Colloidal Stabilities of Isolated Constant Domains of Human Immunoglobulin G and Their Impact on Antibody Aggregation under Acidic Conditions. Yageta, S., Lauer, T., Trout, B., Honda, S. *Molecular Pharmaceutics* (2015)
116. Studies on Lactam Formation of Arginine derivatives. R. Akashi and T. Inazu. *Peptide Science 2014: Proceedings of the 51st Japanese Peptide Symposium* (2015)
117. Structure of the artificial protein AF.p17 developed by adaptive assembly. Watanabe H, Honda S. *Photon Factory Activity Report* (2015)

118. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin. Y. Saitoh, H. Suzuki, K. Tani, K. Nishikawa, K. Irie, Y. Ogura, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. Science (2015)
119. GraDeR: membrane protein complex preparation for single-particle cryo-EM. F. Hauer, C. Gerle, N. Fischer, A. Oshima K. Shinzawa-Itoh, S. Shimada, K. Yokoyama, Y. Fujiyoshi and H. Stark. Structure (2015)
120. 次世代バイオ分離プロセスの開発
吉本則子, 山本修一 ケミカルエンジニアリング (2015)
121. 高機能な二重特異性抗体医薬の開発
浅野竜太郎, 杉山在生人, 熊谷泉 バイオサイエンスとインダストリー (2015)
122. 次世代バイオ医薬品製造技術開発~高生産用 CHO 細胞株の開発を中心にして
大政健史 バイオサイエンスとインダストリー (2015)
123. 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の取り組みについて
大政健史 ファルマシア (2015)
124. 微生物のエンドグリコシダーゼを用いた生理活性物質の合成
山本 憲二 化学と生物 (2015)
125. スクリーニング用小型培養システムの開発
新井進 化学工学会 バイオ部会 NewsLetter (2015)
126. バイオ医薬品製造の精製技術と求められる固定相
本田真也 吸着・分離材料の設計, 性能評価と新しい応用 (技術情報協会) (2015)
127. エンド-M 酵素を用いる抗体糖鎖の改変技術と改変用糖鎖供与体の化学合成
松崎祐二, 熊田純一, 山本憲二 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
128. ケミカルシャペロンを用いた蛋白質凝集防止培地の開発
鬼塚正義, 大政健史 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
129. シングルユース培養バックによる微生物・動物細胞培養
松田博行 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
130. 哺乳類人工染色体ベクターの抗体タンパク質生産技術への応用
田地野浩司, 山内清司 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
131. 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて
松田博行 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
132. 自動電気泳動装置
木下英樹, 矢部公彦, 松永貴輝 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
133. 「第 1 章 バイオ医薬品生産における次世代生産技術について (大政健史)」 「[第 4 編 細胞培養] 第 1 章 細胞培養における代謝と酸素供給の基本 (大政健史)」

- 大政健史 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて (シーエムシー出版) (2015)
134. 二重特異性抗体を用いたがん治療
浅野竜太郎, 杉山在生人, 熊谷泉 細胞 (2015)
135. 高機能抗体発現系の開発
増田兼治, 奥村武, 種村裕幸, 川原弘之, 野中浩一, 藪田雅之, 佐藤和明, 谷内清人, 堀内貴之, 窪田みち, 上野智規, 後藤希代子, 佐伯尚史 第 67 回日本生物工学会大会トピックス集 (2015)
136. 二次元電気泳動技術を用いた抗体医薬評価方法の検討
後藤真一, 矢部公彦, 松永貴輝, 木下英樹 第 67 回日本生物工学会大会トピックス集 (2015)
137. 世界の成長エンジンを目指して~次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の取り組みについて~
大政健史 都市政策 (2015)
138. エンド型グリコシダーゼを利用した糖鎖合成
梅川碧里, 芦田久, 山本憲二 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック ~創薬・医療から食品開発まで~(NTS 出版) (2015)
139. 複合糖質合成
稲津敏行 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック ~創薬・医療から食品開発まで~(NTS 出版) (2015)
140. バイオ医薬・再生医療を支えるプラントソリューション
百田芳則 日立概論 (2015)
141. Chromosome rearrangement and gene amplification. Takeshi Omasa and Kyoung Ho Lee. Animal Cell Technology (Roland Wagner and Hansjurg Hauser (eds.)) (De Gruyter) (2014)
142. Development of the Glycopeptide-synthesizing System Using Immobilized Endo-M and DMC. H. Hirose, K. Haneda, and T. Inazu. Proceedings of the 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium & the 50th Japanese Peptide Symposium (2014)
143. 「第 2 章 第 2 節[7] 細胞培養過程における抗体凝集抑制-ケミカルシャペロン:トレハロースの影響-」
鬼塚正義、大政健史 <最新>動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、技術情報協会 (2014)
144. Imparting Albumin-Binding Affinity to a Human Protein by Mimicking the Contact Surface of a Bacterial Binding Protein. Oshiro S, Honda S. ACS Chem. Biol. (2014)
145. Separation of Nano- and Micro-Sized Materials by Hyphenated Flow and Centrifugal Field-Flow Fractionation. H. Kato and A. Nakamura. Anal. Meth. (2014)
146. Real-time Noninvasive Monitoring of UV Lightinduced Cell Death by the Deflection of a Probe Beam. Xing-Zheng Wu, Tomohisa Kato, and Satoshi Terada. Analytical Science (2014)
147. Complementary elementary modes for fast and efficient analysis of metabolic networks. Md. Bahadur Badsha, Ryo Tsuboi, Hiroyuki Kurata. Biochem. Eng. J. (2014)
148. Recent advances in antibody engineering. M. Kiyoshi, J.M. Caaveiro, E. Miura, S. Nagatoishi, M. Nakakido, S. Soga, H. Shirai, S.Kawabata, and K. Tsumoto. Biochim. Biophys.Acta (2014)
149. CADLIVE toolbox for MATLAB: automatic dynamic modeling of biochemical networks with comprehensive system analysis. Kentaro Inoue, Kazuhiro Maeda, Takaaki Miyabe, Yu Matsuoka, Hiroyuki Kurata. Bioproc. Biosyst. Eng. (2014)

150. S-Fms signalobody enhances myeloid cell growth and migration. Kawahara, M., Hitomi, A., Nagamune, T. *Biotechnol. J.* (2014)
151. Expression of the clustered NeuAc α 2-3Gal β O-glycan determines the cell differentiation state of the cells. Higashi K, Asano K, Yagi M, Yamada K, Arakawa T, Hashi T, Mori T, Sumida K, Kushida M, Ando S, inoshita M, Takehi K, Tachibana T, Saito K. *J. Biol. Chem.* (2014)
152. Engineered protein A ligands, derived from a histidine-scanning library, facilitate the affinity purification of IgG under mild acidic conditions. Tsukamoto M, Watanabe H, Ooishi A, Honda S. *J. Biol. Eng.* (2014)
153. Tracing Primordial Protein Evolution Through Structurally Guided Stepwise Segment Elongation H. Watanabe, K. Yamasaki, and S. Honda. *J. Biol. Chem.* (2014)
154. Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture. Masayoshi Onitsuka, Akira Kawaguchi, Ryutarō Asano, Izumi Kumagai, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and Takeshi Omasa. *J. Biosci. Bioeng.* (2014)
155. Rakkyo fructan as a cryoprotectant for serumfree cryopreservation of mammalian cells. Akiko Ogawa, Shinya Mizui, Yasuhito Chida, Masafumi Shimizu, Satoshi Terada, Takeshi Ohura, Kyo-ichi Kobayashi, Saori Yasukawa, and Nobuyuki Moriyama. *J. Biosci. Bioeng.* (2014)
156. Trehalose suppresses antibody aggregation during the culture of Chinese hamster ovary cells. Masayoshi Onitsuka, Miki Tatsuzawa, Ryutarō Asano, Izumi Kumagai, Akihiro Shirai, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa. *J. Biosci. Bioeng.* (2014)
157. Rearranging the domain order of a diabody-based IgG-like bispecific antibody enhances its antitumor activity and improves its degradation resistance and pharmacokinetics. Ryutarō Asano, Ipppei Shimomura, Shota Konno, Akiko Ito, Yosuke Masakari, Ryota Orimo, Shintaro Taki, Kyoko Arai, Hiromi Ogata, Mai Okada, Shozo Furumoto, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai. *Mabs* (2014)
158. 標準手順書 I (第 1 版) MAB 組合 筑波集中研 MAB 組合 (2014)
159. 平成 25 年度次世代バイオ医薬品製造技術組合報告書と知的財産に関する動向調査報告書
バイオインダストリー協会 MAB 組合 (2014)
160. Capillary-based lectin affinity electrophoresis for interaction analysis between lectins and glycans
Kinoshita M, Takehi K. *Methods Mol. Biol.* (2014)
161. The Effect of Glycosylation on the Antibody Recognition of a MUC2 Mucin Epitope. Uray, K., Mizuno, M., Inazu, T., Goto, K., and Hudecz, F. *Peptide Sci.* (2014)
162. 「バイオ医薬品の品質分析技術の課題と展望 (後編)」
本田真也 PHARM TECH JAPAN (2014)
163. 「バイオ医薬品の品質分析技術の課題と展望 (前編)」
本田真也 PHARM TECH JAPAN (2014)
164. Structural analysis of carboxymethyl cellulose used as an antiadhesive for surgical wound healing. Yamada K, Kinoshita M, Jo Y, Inoue T, Aoshima M, asegawa K, Sei K, Kita S, Takehi K. *Yakugaku Zasshi* (2014)
165. 「8.6.2 染色体工学」
大政健史 化学便覧 応用化学編 第 7 版 (2014)

166. Temperature dependent study of thermal diffusion for aqueous solutions of α -, β -, and γ -cyclodextrin. H. Shinohara, R. Kita, N. Shinyashiki, S. agihara, K. Kabayama, and T. Inazu. AIP Conf. Proc. (2013)
167. Rapid construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle checkpoint engineering. K.H.Lee, M. Onitsuka, K. Honda, H. Ohtake, and T. Omasa. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2013)
168. Construction of antibody/insulin receptor chimera for growth induction of mammalian cells. Nakabayashi, H., Kawahara, M., Tanaka, K., Nagamune, T. Cytotechnology (2013)
169. Establishment of a mammalian cell line suitable for industrial production of recombinant protein using mutations induced by high-energy beam radiation. Y. Chida, K. Takagi, S. Terada. Cytotechnology (2013)
170. Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression. Ahmad M Haredy, Akitoshi Nishizawa, Kohsuke Honda, Tomoshi Ohya, Hisao Ohtake and Takeshi Omasa. Cytotechnology (2013)
171. Overexpression of mutant cell division cycle 25 homolog B (CDC25B) enhances the efficiency of selection in Chinese hamster ovary cells. Kyoung Ho Lee, Tomomi Tsutsui, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and Takeshi Omasa. Cytotechnology (2013)
172. Rice bran extract affects differentiation of mesenchymal stem cells potency into osteogenic cells. K. Fukumoto, T. Tsuno, M. Taniguchi, S. Terada. Cytotechnology (2013)
173. Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T, Takehi K. J. Chromatogr. A. (2013)
174. Common glycoproteins expressing polylectosamine-type glycans on matched patient primary and metastatic melanoma cells show different glycan profiles. Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Takehi K. J. Proteome Res. (2013)
175. Generation of highproducing cell lines by overexpression of cell division cycle 25 homolog A in Chinese hamster ovary cells. Kyoung Ho Lee, Tomomi Tsutsui, Kohsuke Honda, Ryutarō Asano, Izumi Kumagai, Hisao Ohtake, and Takeshi Omasa. J. Biosci. Bioeng. (2013)
176. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. Ito T, Tsumoto K. Protein Sci. (2013)

3. 当省(国)が実施することの必要性

第1章 I. 3. 「当省(国)が実施することの必要性」の記載を参照されたい。

本プロジェクトとしては特に、生産細胞株の構築から培養・精製に関する技術、品質管理技術等、極めて多くの技術の組み合わせ・すり合わせが必要となる困難な研究開発であり、様々な業種の民間企業に加えて、大学、国研等のアカデミアの技術の結集無しでは実現不可能なものである。国が主体的にそれらを結集させ、オールジャパン体制で、我が国発の抗体医薬品製造システムの構築、実用化、普及を目指していくことが適切である。

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

下図のとおり、本プロジェクトにおいては、生産細胞株の構築から培養技術、精製技術、品質管理技術の開発を並行して実施するとともに、平成27年度からはウイルス管理技術の開発を追加することで、抗体製造において必要とされる技術を網羅的に開発する体制を整えて事業を進めた。さらに、将来の企業導出を見据えて、プラットフォーム化を検証するための集中研究拠点の整備を事業前半に進めた。これにより、事業後半はGMP（Good Manufacturing Practice for Drugs：医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理に関する基準）に準拠した施設において、各開発課題で生み出された技術、装置を順次集中研究拠点に持ち込み、一連の製造ラインとして整備・検証することで成果のプラットフォーム化を進めることができ、実際の医薬品製造の現場において求められるポイントを十分に考慮した形で研究開発を行うことができた。これにより、事業期間内に複数の開発品が上市され、順調に社会実装を進めている。最終目標であるトータルシステムとして開発したプラットフォーム技術を導出することを目指して、本プロジェクト後も取り組みを継続しているところである。

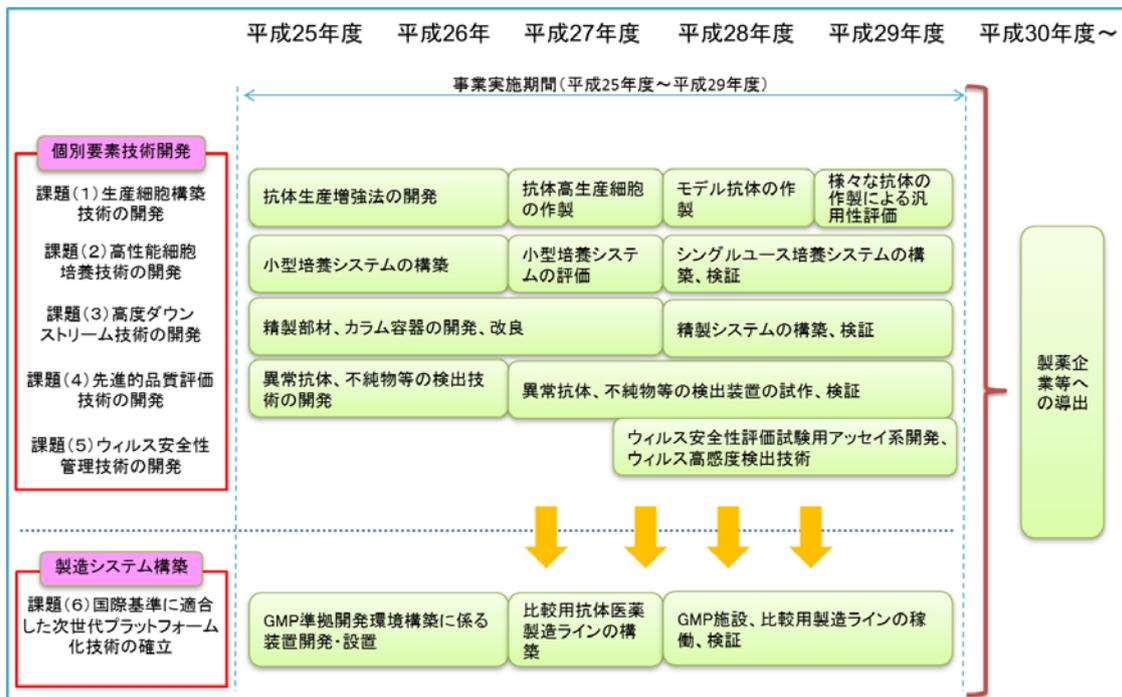


図 2-A-1. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

下図のとおり、バイオプロセス工学の分野で著名な専門家である大阪大学の大政健史氏を研究開発責任者とし、各要素技術を有する28企業、4大学、1国研、3団体が結集した「次世代バイオ医薬品製造技術研究組合」を組織し、一体的な研究開発を行う体制を整備した。本組合では、賛助会員制度を設けており、ここにユーザーとなり得る製薬企業、CMO等を参画させることで、各社の様々なユーザーニーズを研究開発に反映させられる体制としている。これにより、社会実装を十分に考慮したプラットフォームの開発が可能となっている。また、組合として、知財管理等を担う代理人と契約しつつ、組合内にも知財担当者を配置したほか、組合参画機関間で、組合員が以前から有する知財、及びプロジェクト期間中に得られた知財についての共用ルールを定め、プロジェクトにより得られる知財の適切な管理、及びスムーズな研究開発の実施に努めた。

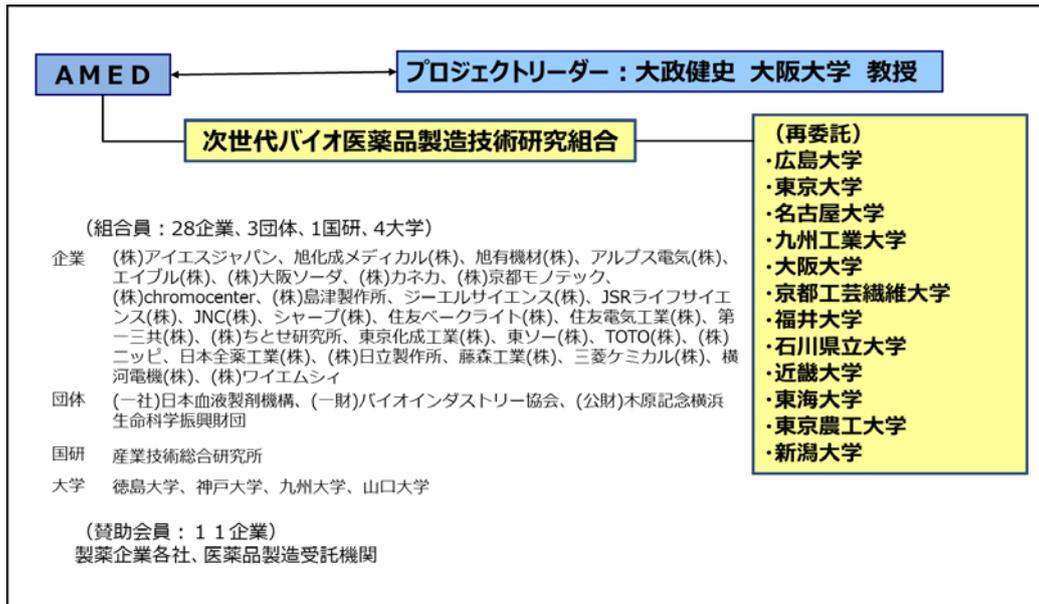


図 2-A-2. 事業実施体制図

開発課題別の参加者に関する情報を含めた体制図を下図に示す。各企業等が要素技術開発を実施し、それを集中研究拠点に持ち寄ってプラットフォーム化を進め、最終的にはそれらを一つにまとめることでトータルシステムとして完成させることを目指して事業を推進した。

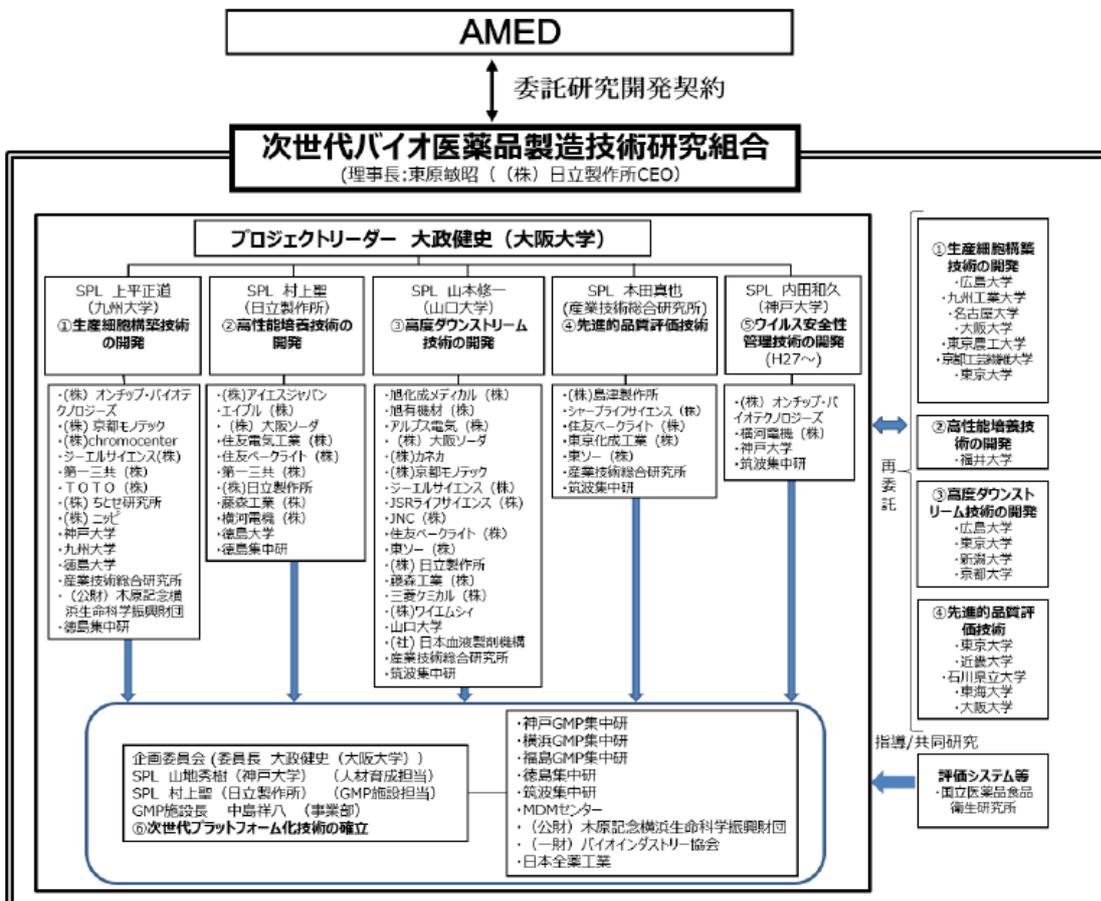


図 2-A-3. 各技術開発の参加者と事業実施体制

なお、本プロジェクトについては、AMED の課題評価委員会にて下記のように事後評価が行われている。

<委員>

課題 1 国際基準に適合した次世代抗体医薬品等の製造技術事業

	氏名	所属、役職（評価当時）
	青柳 秀紀	筑波大学 生命環境科学研究科生命環境系 教授
	伊東 祐二	鹿児島大学大学院 理工学研究科 教授
	神谷 典穂	九州大学大学院 工学研究院 教授
	河野 晃	武田薬品工業株式会社 ファーマシューティカルサイエンス 光バイオロジクス マニュファクチュアリング ヘッド
	北川 尚美	東北大学大学院 工学研究科 教授
	高木 睦	北海道大学大学院 工学研究院 教授
	西川 光郎	大塚製薬株式会社 事業開発部 次長
	本多 裕之	名古屋大学 予防早期医療創成センター 教授
委員長	山口 照英	金沢工業大学 金沢工大研究センター 加齢医工学先端技術研究所 所長

<評価結果（AMED 事後評価報告書から引用）>

【評価結果】

特に優れている

【評価コメント】

GMP 準拠製造施設を持ち、これを活かした研究開発が可能な体制を構築した。開発当初から、実用化を指向し、上下流技術を総合的かつ有機的に連携させ、医薬品製造における GMP 製造という特殊性に対応できる技術に特化し、その実現に向けて、開発体制の整備を着実にやっている。

課題2 高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発

	氏名	所属、役職（評価当時）
	大河内 美奈	東京工業大学 物質理工学院応用化学系 教授
委員長	木野 邦器	早稲田大学 理工学術院先進理工学部応用化学科 教授
	五味 勝也	東北大学大学院 農学研究科 教授
	佐藤 あやの	岡山大学大学院 自然科学研究科 准教授
	清水 典明	広島大学大学院 生物圏科学研究科 教授
	田淵 久大	中外製薬株式会社 製薬研究部 主席研究員 CMC 研究開発プロフェッショナル職
	横田 匡美	シミック JSR バイオロジックス株式会社 取締役 研究開発担当

<評価結果（AMED 事後評価報告書から引用）>

【評価結果】

優れている

【評価コメント】

独自技術である OGAB 法による長鎖 DNA 自動合成のトータルシステムの主要部分をほぼ完成したこと、ならびに2種類の DNA 導入システムを開発し微生物発現系を利用した抗体分子の効率的な生産システムの構築し、本研究の目的をほぼ達成したことは評価できる。その優位性を生かして、長鎖クラスター遺伝子領域の強制発現による抗体高生産株構築など、ピキア酵母を使った新展開を期待したい。そのためには、生産された抗体分子の抗原認識能や類似抗原との交差性、糖鎖付加などの特性評価を行い、抗体医薬品の生産系としての可能性を品質、収率、収量の観点で定量的に示し、その優位性をアピールしていく必要がある。

6. 費用対効果

抗体医薬品の世界市場は2015年に約8.6兆円であったが、2030年には28兆円まで伸びると予測されている。この予測は、国内製薬企業の抗体医薬品のパイプラインが増加し続けている（2019年時点で200本以上。低分子医薬品の四分の一を超えた）こと、さらに、二重特異性抗体や抗体薬物複合体（ADC）等の次世代抗体医薬品の出現からも裏付けられており、抗体医薬品は今後10年、20年先を見据えた上でも極めて重要なモダリティであることが示唆されている。しかしながら、2015年時点における国内の抗体医薬品売上高7,250億円のうち、国内で生産された抗体医薬品の割合はわずか5%程度にとどまっており（出典：「製薬協ニューズレター2017年9月号」のデータより算出）、医薬品の輸入超過増大の原因であることはもちろん、国内企業の医薬品であっても製造を海外企業に委託すること等により国費が流出してしまっており、製造技術・装置の国産化も含めて国内生産割合を引き上げていくことが急務である。本プロジェクトでは海外製の技術や細胞に頼らない、完全国産技術により革新的な抗体医薬品製造のプラットフォーム化を目指すもので、この技術基盤が確立し、今後の国内製薬企業におけるパイプラインへ適用していくことができれば、その経済効果は極めて大きいと推測される。

B. 天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術開発

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

プロジェクト名	天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術開発																							
行政事業レビューとの関係	平成30年度行政事業レビューシート（事業番号0034）																							
上位施策名	<ul style="list-style-type: none"> ○健康・医療戦略（平成26年7月22日閣議決定、平成29年2月17日一部変更） ○医療分野研究開発推進計画（平成26年7月22日閣議決定、平成29年2月17日一部変更） ○日本再興戦略2016（平成28年6月6日閣議決定） ○第5期科学技術基本計画（平成28年1月22日閣議決定） ○未来投資戦略2017（平成29年6月9日閣議決定） 																							
担当課室	生物化学産業課																							
<p>プロジェクトの目的・概要</p> <p>医薬品の開発には膨大な開発費と時間が必要であり、創薬研究の効率化に資する基盤技術の開発が望まれている。本技術開発では、「①次世代型有用天然化合物の生産技術開発」において、微生物が生産する天然化合物を基とした医薬品開発の推進において課題となる「物質生産に関する遺伝子を活用しきれない」、「化合物の生産量が少ない」という点を克服するために、巨大合成遺伝子の組換え技術及び取り扱いが容易な物質生産用微生物株を用いた化合物の生産技術開発を行う。</p> <p>また、「②ITを活用した革新的医薬品創出基盤技術開発」において、ITの活用により創薬のプロセスを合理化・最適化し、創薬効率を飛躍的に向上させるために、従来の低分子化合物スクリーニングのみからでは得られない構造的多様性を有する医薬品候補化合物の設計を可能にする <i>in silico</i> シミュレーション／スクリーニングソフトウェアを開発する。</p>																								
<p>予算額等（委託） （単位：百万円）</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>開始年度</th> <th>終了年度</th> <th>中間評価時期</th> <th>終了時評価時期</th> <th>事業実施主体</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>平成25年度</td> <td>平成29年度</td> <td>平成27年度</td> <td>平成29年度</td> <td>次世代天然物化学技術研究組合等</td> </tr> <tr> <td>H27FY 執行額</td> <td>H28FY 執行額</td> <td>H29FY 執行額</td> <td>総執行額</td> <td>総予算額</td> </tr> <tr> <td>800</td> <td>1,150</td> <td>900</td> <td>4,450</td> <td>4,450</td> </tr> </tbody> </table>					開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体	平成25年度	平成29年度	平成27年度	平成29年度	次世代天然物化学技術研究組合等	H27FY 執行額	H28FY 執行額	H29FY 執行額	総執行額	総予算額	800	1,150	900	4,450	4,450
開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体																				
平成25年度	平成29年度	平成27年度	平成29年度	次世代天然物化学技術研究組合等																				
H27FY 執行額	H28FY 執行額	H29FY 執行額	総執行額	総予算額																				
800	1,150	900	4,450	4,450																				

1. 事業アウトカム

事業アウトカム指標		
指標：「開発成果によるソフトウェアの利用件数」 開発したシミュレーションソフトウェアを利用している国内企業等の数		
指標目標値		
事業開始時（平成 25 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成 27 年度）	計画：10	実績：18（達成）
終了時評価時（平成 29 年度）	計画：25	実績：43（達成）
目標最終年度（令和 5 年度）	計画：60	

本プロジェクトの事業アウトカム指標は、開発成果であるシミュレーションソフトウェア「myPresto」を利用する国内企業の数として、事業終了時点（終了評価時）で 25 社、目標最終年度の令和 5 年度に 60 社を設定した。本件数は、利用企業単位で 1 社とカウントしており、指標値を計測する年度時点において利用中の企業数を示している。

終了時評価時（平成 29 年度末）においては、89 者が当該ソフトウェアを利用しており、内訳はアカデミア（大学、公的研究機関等）が 46 者、企業が 43 社となっている。これら企業の内訳としては、30 社が自社における創薬研究に活用している製薬企業等であり、残り 13 社は当該ソフトウェアを用いた受託解析等を行う IT 企業等である。

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

（1）研究開発内容

課題 1 次世代型有用天然化合物の生産技術開発		
	研究開発項目	代表者
①	有用天然化合物生産の高度化・高品質化	次世代天然物化学研究組合 新家 一男
②	有用天然化合物生産の多様化	次世代天然物化学研究組合 新家 一男
課題 2 IT を活用したタンパク質の構造解析情報に基づく創薬基盤技術開発		
①	革新的 <i>in silico</i> シミュレーション／スクリーニングソフトウェアの開発	大阪大学 中村 春木
②	核磁気共鳴法（NMR）によるタンパク質の生理的条件下における動的立体構造取得技術の開発	次世代天然物化学研究組合 嶋田 一夫
③	X 線及び電子線によるタンパク質及びその化合物複合体の精緻立体構造取得技術の開発	名古屋大学 藤吉 好則
④	医薬品候補化合物の疾患関連タンパク質を標的とする治療効果の検証系の開発	山梨大学 久保田 健夫

課題 1 次世代型有用天然化合物の生産技術開発

天然化合物は人類の叡智を超えた構造を持ち、1928 年のペニシリン発見以降、抗菌剤、抗カビ剤、抗がん剤、高脂血症剤、免疫抑制剤など多様な疾患領域で、数多くの物質が医薬品となっている。現在上市されている医薬品の 6 割強が天然化合物あるいは天然化合物の構造を模倣して開発されており、その中でも、放線菌という微生物群が生産する二次代謝産物は微生物医薬品の 7 割を占める。

しかしながら、長年の研究により、多くの化合物が単離されてきた代償として、新規化合物の取得が困難になってきている。また、多くのノウハウの蓄積がある放線菌であっても、医薬品開発に必要となる化合物量を安定的に生産するためには、未だに多くの課題が残っている。

一方で、最近のゲノム解析の結果から、放線菌中には人類がこれまで利用出来なかった多くの未利用生合成遺伝子が存在することが明らかになってきた。生合成遺伝子を用いた異種発現生産技術は、天然化合物を安定的に生産させること、および未利用生合成遺伝子を用いた新規化合物の取得を可能にする強力な技術・ツールになり得ると考えられる。生合成遺伝子を用いた異種発現生産研究は、この20年間に世界中で精力的に行われてきたが、小さな生合成遺伝子サイズで生産されるような分子量の小さな化合物を対象に行われてきたに過ぎない（RiPPs 生合成経路で生合成されるペプチド系化合物は除く）。それに対し、医薬品となっている多くの天然化合物は、分子量の大きな化合物であり、これまでの技術では生合成遺伝子を用いた異種発現では生産することが出来なかった。この理由は、これらの化合物の生合成遺伝子が100 kb、時には200kbにもおよぶ巨大な遺伝子クラスターであるため、生合成遺伝子クラスター全体のクローニングおよび宿主微生物への遺伝子導入が、現在の技術レベルでは困難であるためである。欧米では、今後予想される安価かつ大量ゲノムシーケンスに対応した、効率的な天然化合物生産システムの開発が進められているが、例えば遺伝子の配列が判明しても、この巨大遺伝子クラスターを扱う技術が無ければ、これらの遺伝子を応用した化合物生産は出来ない。そこで、医薬品開発を主目的とした天然化合物の異種発現技術の開発は、安定的かつ効率的な生産を可能にすると共に、新規化合物の創出が期待されるなど、今後の天然化合物の医薬品として応用していくには必須である。

本研究開発では、我が国が強みとする微生物ライブラリーや天然物化学に対する知識・ノウハウ等を最大限に活用し、優れた医薬品候補となりうる天然化合物を安定的かつ効率的に生産するための技術開発を行った。具体的には、放線菌を中心とした有望な医薬品候補となり得る天然化合物の生合成遺伝子クラスターの中でも、120 kb を超える巨大な生合成遺伝子クラスターの取得技術と導入技術、生産に適した宿主菌株の開発を行った。また、放線菌同様多くの生合成遺伝子を保有する *Pseudomonas* 属などの真正細菌、さらには海洋生物に共生する難培養微生物等の二次代謝産物生産へも適用可能な技術の多様化を図った。

①有用天然化合物生産の高度化・高品質化

- ・これまで培ってきた正確なシーケンス解析技術をさらに高度化し、放線菌のように GC 含量が高く、繰り返しの多いゲノム配列についてもより正確にシーケンスできるようになった。その技術の高さは参画企業からも認識されており、自社化合物の異種発現生産に向けた生合成遺伝子クラスター情報の取得、遺伝子情報を用いた生産性向上あるいは生産性向上の因子解明といった目的のゲノム解析依頼は全部で83件あった。
- ・有用天然化合物を生産する放線菌67株について、150kb以上の大腸菌人工染色体（Bacterial Artificial Chromosome : BAC）ライブラリーを調製し、そのうち27菌株の放線菌に対しては200kb超サイズのBACライブラリーの調製を行い、全て成功した。最大BACクローンは266kbであった。
- ・SAP法という線状染色体を用いるこれまでに無い画期的な新技術を開発することにより、生産性が高いもののこれまで遺伝子導入が困難であった *S. avermitilis* 由来の SUKA 株に対して、200kb以上の種々の生合成遺伝子クラスターを導入することができることを確認した。
- ・制御因子導入による化合物生産増強については、既知の臨床応用抗生物質など数個の化合物についてはその効果が確認できたが、未利用生合成遺伝子を含め多くの生合成遺伝子発現誘導あるいは生産性向上への汎用性はなかった。プロモーターに関しては、培養時期依存性のプロモーターを発見・開発し、放線菌における二次代謝生産における遺伝子発現誘導における、これまでに無い最も強力なツールになることを明らかにした。これにより、通常の異種発現では全く生産しなかった化合物が生産できることが判明した。

②有用天然化合物生産の多様化

- ・ *Pseudomonas* 属およびその近縁種と、*Paenibacillus* 属（グラム陽性）、*Bacillus* 属（グラム陽性）、*Mycobacterium* 属（グラム陽性）、*Lysobacter* 属（グラム陰性）、*Sorangium* 属（グラム陰性）から、生合成遺伝子クラスターの取得を行った（目的化合物生合成遺伝子10個、未利用遺伝子5個）。

- ・難培養海洋微生物及び土壌微生物について、ゲノムを分解させずに BAC ライブラリー化する技術を開発した。土壌サンプルからは 120 kb を超える BAC クローンの開発が可能となった。この中から 7 個以上の生合成遺伝子クラスターを取得した。
- ・ *Pseudomonas* 属においては、*Pseudomonas putida* KT2440 株および BAC ベクターの改良を行う事により、異種発現可能なホストの開発を行うことができた。
- ・ 79 個の未利用生合成遺伝子クラスターについて異種発現生産の検証を行い、11 個の化合物（誘導体を除く）の異種発現に成功した。また、これとは別に未利用テルペン合成酵素 7 種を選抜し、異種発現の検討を行った結果、13 個の新規化合物の創製に成功した。

課題 2 IT を活用した革新的医薬品創出基盤技術開発

創薬標的となる多様な細胞内タンパク質及び受容体について、X 線及び電子線を用いたタンパク質精緻立体構造情報に加えて、核磁気共鳴法 (NMR) を用いた生理的条件下における動的立体構造情報、並びに中分子以上の活性天然化合物とタンパク質との複合体立体構造解析に基づくユニークなタンパク質/化合物相互作用情報を取得し、これらの情報を計算パラメーターとして取り込むことで、従来の低分子化合物スクリーニングのみからは得られない構造的多様性を有する医薬品候補化合物設計を可能にする「革新的 *in silico* シミュレーション/スクリーニングソフトウェア」を開発する。さらに、開発したソフトウェアを、臨床的見地から選択した特定の創薬標的タンパク質に適用して医薬品候補化合物を取得し、病態モデル細胞/病態モデル動物を用いてその効果を検証することにより、従来の創薬プロセスとの比較において、本創薬基盤ツールの有用性を実証し、医薬品産業での普及を促す。具体的には、以下の研究開発を連携して行う。

- ①革新的 *in silico* シミュレーション/スクリーニングソフトウェアの開発
- ②核磁気共鳴法 (NMR) によるタンパク質の生理的条件下における動的立体構造取得技術の開発
- ③X 線及び電子線によるタンパク質及びその化合物複合体の精緻立体構造取得技術の開発

①革新的 *in silico* シミュレーション/スクリーニングソフトウェアの開発

i) 化合物リガンド・データベースの開発

スクリーニング用に入手可能な化合物データベース (DB) の新規構築を目的として、市販化合物等約 4200 万件の化合物情報を収集し、LigandBOX-DB として 720 万件を公開した (Kawabata et al., Biophysics, 2013)。欧州 EBI のタンパク質—化合物相互作用データベースである ChEMBL のデータを基にして、ドッキングスコアを記述子とし、自動的に QSAR モデルを生成する docking-score QSAR 法を開発した。本手法での誤差は、1 kcal/mol と、通常のドッキングソフトの 10-100 倍の高精度を実現した (Fukunishi et al., Mol. Informatics, 2017; Ibid. 2018)。

ii) 化合物設計・合成評価用ソフトウェアの新規開発

合成容易性予測では、既存の医薬品など 250 種類以上について、合成科学者の合成難易度評価を再現する機械学習ソフトを開発した (Fukunishi et al., J. Chem. Inf. Model., 2014; Fukunishi et al., Curr. Pharm. Des. 2016)。分子の合成展開の候補を示すソフトウェアでは、既存の化合物を合理的にフラグメントに分解し、これらのフラグメントを与えた母核に連結して、合成展開の可能性を提示するソフトウェアを開発・公開した。

iii) タンパク質の動的構造変化を考慮した、高速・高精度のタンパク質/リガンド複合体、およびタンパク質/タンパク質複合体モデリング手法の新規開発

通常の分子動力学 (MD) 計算よりもはるかに高い効率で構造探索を行い、より正確な構造アンサンブルを構築できる V-AUS 法 (Higo et al., J. Comput. Chem., 2015) および VcMD 法 (Higo et al., J. Phys. Chem., 2017; Hayami et al., J. Comput. Chem., 2018) を開発し、静電相互作用を高速に行う ZMM 法と先進的な並列化手法を組み込んだ myPresto/psygene, omegagene に搭載した。この応用によりタンパク質/リガンド、およびタンパク質/タンパク質複合体のモデリングを自由エネルギー地形に基づき行う一方、NMR、X 線結晶解析グループおよび製薬企業との協力により、自由度の高いタンパク質複合体に対する種々のモデルを作成した (Iida et al., J. Comput. Chem., 2016; Kasahara et al., Nucl. Acids Res., 2018)。

iv) 最新の GPU 及びメニーコア PC クラスタを用いたスクリーニングソフトの高速化・高精度化

MD 計算プログラム myPresto/psygene を GPU 専用ソフト (myPresto/psygene-G) に加えて、比較的小さな系に対して単一の GPU コアで高速に計算を実施する myPresto/omegagene を開発・公開した (Kasahara et al., Biophys. Physicobiol., 2016)。一方、タンパク質-薬物ドッキングソフト myPresto/sievgene の並列化を行い、オリジナルな myPresto/sievgene の精度を保ったまま、メニーコア PC 上で 20-70 倍の高速化を達成した。

v) 極めて高い精度の結合力を推定できる力場パラメーター計算と分子シミュレーション技術の開発

ドッキング計算でのスクリーニングによる結合力推定のため、半経験的量子化学計算ソフト「MOPAC」を改良して各化学結合の種類に応じて原子部分電荷を補正し、高精度の原子電荷を与える MOPAC AM1BCC 電荷を計算できるようにした。この手法は、項目 i) における LigandBOX-DB でのデータ構築に用いられ、一般にも公開した。一方、マルチカノニカル MD 計算による構造探索と SRPG 法を組み合わせ、リガンドの binding/unbinding のパスに沿った熱力学積分を行い、リガンドの結合自由エネルギーを高精度に予測する一般的な手法を開発した (Nguyen et al., J. Chem. Inf. Model., 2015; Bekker et al., J. Chem. Theory Comput., 2017)。

vi) ユーザー・インターフェースの開発

Windows、Mac、Linux など代表的な OS で動作可能なグラフィックインターフェイス (GUI) である “myPresto portal” を開発し、新 myPresto (myPresto version 5) として公開した (<https://www.mypresto5.jp/>)。myPresto の種々のソフトウェア類の入出力を整理して GUI から容易に実行できるようにし、化合物の分子編集、タンパク質系の準備、分子シミュレーション、化合物ドッキングなどがマウス操作で行える。また、自前の PC クラスタ等のハードを必要とせず、クラウド上の PC クラスタを利用する実証実験も行った。GUI 製品の市販化が組合企業 2 社から始まり、関連ソフト開発やサービスも複数の企業で開始された。

vii) 新 myPresto による探索的実証研究

水溶性 PI5P4K キナーゼの阻害化合物を、200 万化合物から myPresto により選択した 1,167 種類を 200 種に絞り込み、NMR 法による活性検証を実施して IC₅₀ が 10 μ M 以下の阻害化合物を 12 個、1 μ M 以下のものを 2 個見出すとともに、その複合体の X 線結晶構造解析も実施した。転写制御因子 mSin3 の構造から myPresto の種々のソフトウェアと DB により阻害化合物を選択し、NMR 法により 50 種以上の活性化化合物を見出した。企業との共同研究により農薬開発を進め、アゴニスト活性を持つものを見出した。

②核磁気共鳴法 (NMR) によるタンパク質の生理的条件下における動的立体構造取得技術の開発

i) 創薬標的タンパク質の高感度 NMR を可能とする試料調製法及び測定法の開発

a) 昆虫細胞発現系を用いた重水素化タンパク質調製法の開発および実証研究

多くの創薬標的タンパク質の発現において必須な昆虫細胞発現系において、重水素標識による NMR シグナルの高感度化 (5 倍以上) を世界で初めて達成した。開発した手法は投稿論文に発表 (Kofuku et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2014) して、プロトコル化した。さらに、従来用いていたメチオニンに加えてアラニン、イソロイシン、ロイシン、スレオニン、バリンをプローブとするための標識法の開発にも成功した。上記 6 種類のアミノ酸は、創薬標的タンパク質として重要な膜タンパク質の膜貫通領域に多く存在することから、膜タンパク質の高感度 NMR 解析に特に有用であり、膜タンパク質を標的とした創薬開発に寄与できる。実際に創薬標的タンパク質である β_2 AR および P2X 受容体 (Minato et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2016) について、脂質二重膜中での動的構造を初めて解析することに成功した。したがって、生理的環境である脂質二重膜中での動的構造解析が可能となり、薬物候補化合物が結合した状態での薬効発現をより正確に予測できるようになった。

b) 高分子量タンパク質の新規運動性解析法の開発

創薬標的タンパク質の動的構造情報を抽出するうえで問題となっていた分子量限界を克服し、リガンドの結合解離や酵素活性に重要なマイクロ秒からミリ秒の時定数で生じる動的構造情報を抽出するための多量子緩和解析法を開発した。開発した手法はプロトコル化が行われ、コントロールタンパク質を用いた一連の検討から有効性を実証したうえで投稿論文として発表し、細胞内シグナル伝達を担う Gai3 タンパク質とその発がん性変異体のがん化機構の解明 (Toyama et al., Nat.

Commun., 2017)、および分子量 20 万を超える膜タンパク質 KirBac チャネルの機能解明に成功した (Toyama et al., J. Am. Chem. Soc., 2016)。

ii) 創薬標的タンパク質に対するリガンド結合部位の精密同定法の開発

タンパク質と複合体を形成した時の局所の運動性と空間相補性を指標に、結合状態で運動性が高く、空間相補性が低い個所を特定することで、より親和性が強く、特異性が向上したリガンドを得る方法を確立した (Mizukoshi et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2016)。加えて、本手法を発展させ、ライブラリー化合物に多く含まれるフッ素核への適用を可能にした (Tokunaga et al., Molecules, 2017)。

iii) 創薬標的タンパク質の動的構造情報抽出法の開発及び得られた情報の計算科学的手法への導入

a) GPCR のシグナル選択性を制御する動的構造の情報を抽出する方法の開発・応用

μ オピオイド受容体、P2X 創薬標的膜タンパク質における、活性を決定する動的構造平衡を解明することに成功した (Okude et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2015; Minato et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2016)。さらに、 β_2 アドレナリン受容体、アデノシン A_{2A} 受容体、CXCR4、 μ オピオイド受容体に加えて、 δ オピオイド受容体においても構造平衡が薬効度およびシグナル選択性に関与していることが明らかとなった。

また、アレチンシグナルを活性化する状態である、C 末端領域がリン酸化された β_2AR において、リン酸化された部位と膜貫通領域が相互作用することにより、 β_2AR がアレチンシグナルの活性化に適した構造となることが明らかになった。このように、シグナル選択性を制御する動的構造の情報を抽出する方法を確立した (Shiraishi et al., Nat. Commun., 2017)。

b) 新 myPresto による探索的実証研究

新 myPresto により、複数の GPCR のリガンド候補化合物を設計して、実際に合成した。活性を評価したところ、候補化合物の一つが部分アゴニストとして機能することが明らかとなった。さらに、NMR により解析したところ、本候補化合物存在下において、GPCR が活性型と不活性型が同程度存在する構造平衡状態にあることを示した。したがって、一連の新 myPresto の手法が、実際の新規化合物の設計に有用であることが実証された。

③X 線及び電子線によるタンパク質及びその化合物複合体の精緻立体構造取得技術の開発

i) 構造不安定かつ高分子量タンパク質の構造解析向けに構造を安定化する技術の開発

構造が不安定で構造解析が不可能であった高分子量タンパク質の構造解析を可能にするために、変異を導入することで構造を安定化する技術開発を、GPCR であるエンドセリン受容体 B 型 (ETBR) で行い、アゴニストとの複合体、リガンドフリー受容体、さらに 2 種類のアンタゴニストとの複合体の構造解析に成功し、Nature 誌等に発表した (J. Mol. Biol., 428, 2265-2274, 2016; Nature, 537, 363-368, 2016; Nat. Struct. Mol. Biol., 24, 758-764, 2017)。この方法で作製した変異体の機能が野生型と変わらないことも確認し、本技術のプロトコルを作成した。

ii) 生理的条件下における精緻な立体構造情報を取得する技術の開発

a) 電子線結晶学を用いることで生理的条件下における電位感受性 Na^+ チャネルの構造解析に成功し、電位感受性 Na^+ チャネルが速い gating をする機構の一端が理解できるようになった。この例のように、膜内で膜タンパク質の構造を解析する技術開発を行い、膜内での構造解析の重要性と有用性を示した (J. Mol. Biol., 425, 4074-4088, 2013; eLIFE, 06119, 10.7554, 2015)。

b) 浮腫や視神経脊髄炎治療の鍵となるアクアポリン - 4 (AQP4) について、生理的条件下で構造解析することで初めてチャネル内の水分子を分離して観察できることを示していた。また、その阻害剤候補として見出していたアセタゾラミド (AZA) はヒトの AQP4 を十分に阻害できないことを見出した。それゆえ、ラット AQP4 と AZA との複合体の構造解析を解析し (Microscopy, 65, 177-184, 2016)、その分解能を 2.8 Å まで向上させることで、ヒトの阻害剤を開発する構造情報を得た。IT 創薬として阻害剤設計を可能にする精緻な立体構造情報を得る技術を開発した。

iii) 既知の立体構造情報に基づいて新規の標的タンパク質の立体構造を効率よく解析する技術の開発

a) 脊椎動物のギャップ結合チャネルである、コネキシンの構造を結晶学で解析していたので、無脊

椎動物のギャップ結合チャネル、イネキシンの構造を同じく結晶学で解析することを目指した。低い分解能（10Å）でも既知の構造から興味深い解析が出来た（J. Mol. Biol., 428, 1227-1236, 2016）。さらに効率の良い解析を可能にするために、単粒子解析法を用いた膜タンパク質の高分解能の構造解析を行う上で必要な界面活性剤を除く方法を開発した（Structure, 23, 1769-1775, 2015）。このGraDeR法を開発することによって、イネキシンが形成するギャップ結合の構造を、単粒子解析法を用いて、短期間に3.3Å分解能で構造解析することに成功した（Nat. Commun., 7, 13681, 2016）。この例の様に、既知の情報を活用して効率よく構造解析する方法の開発に成功した。特に、単粒子解析が強力なことが確認できた。

b) 既知構造のホモログがある可溶性タンパク質の構造解析は試料の精製が出来れば、単粒子解析法を用いることで、数週間での構造モデル作製が可能な技術開発を行った。

iv) タンパク質／化合物複合体の立体構造を解析する技術の開発

a) クローディング関連の構造解析で2報をScience誌に発表した（Science, 344, 304-307, 2014; Science, 347, 775-778, 2015）。

b) i) において記述したETBRとアゴニスト及びアンタゴニストとの複合体の構造を解析してNature誌などに発表した（J. Mol. Biol., 428, 2265-2274 (2016), Nature, 537, 363-368 (2016), Nature Structure & Molecular Biology, 24, 758-764 (2017)）。

c) ii) において記述したアクアポリン4と阻害剤の複合体の構造を10Å、3Å、2.8Åという3種類の分解能で解析して、3Åより高い分解能の解析が創薬において重要であることを確認し、Drug Rescuingを実証できるようにした。

d) iii) において記述したギャップ結合チャネルの高効率の単粒子解析は特筆できる。多く創薬標的タンパク質の構造が速く解析出来るようになった。

本プロジェクトの成果の1つとして、株式会社CeSPIAを2017年4月17日に創設した。株式会社CeSPIAでは、製薬企業からの依頼に応じて構造解析を実施している。

(2) 事業アウトプット

事業アウトプット指標		
「病気の原因となる標的タンパク質に対する医薬品候補化合物を特定するソフトウェアに係る革新的アルゴリズムの確立」		
指標目標値		
事業開始時（平成25年度）	計画：—	実績：—
中間評価時（平成27年度）	計画：60%	実績：60%（達成）
終了時評価時（平成29年度）	計画：100%	実績：100%（達成）

<共通指標実績>

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプの作成
268	—	4	—	—	—	—

本プロジェクトの成果として、研究課題①については論文を119報、学会等での発表98件、特許を2件出願した。また、研究課題②については、論文を149報、学会等での発表164件、特許を2件出願した。

（学会誌、雑誌等による発表論文一覧）

研究課題① 次世代型有用天然化合物の生産技術開発

1. New hydroxamate metabolite, MBJ-0003, from *Micromonospora* sp. 29867. Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Miho Izumikawa, Ikuko Kozono, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. J. Antibiot., 67 (3), 261-263 (2014). doi: 10.1038/ja.2013.124.

2. Establishment of the absolute configuration of the 34-membered polyol macrolide compound

JBIR-129. Teppei Kawahara, Shuichi Ohira, Miho Izumikawa, Hiroshi Tanaka and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 67 (5), 419-420 (2014). doi: 10.1038/ja.2014.7

3. Genome-based discovery of a novel membrane-bound 1,6-dihydroxyphenazine prenyltransferase from a marine actinomycete. P. Zeyhle, J. S. Bauer, J. Kalinowski, K. Shin-ya, H. Gross and L. Heide. *PLoS ONE* 2015, 9 (6): e99122. doi:10.1371/journal.pone.0099122

4. MBJ-0086 and MBJ-0087, new bicyclic depsipeptides, from *Sphaerisorangium* sp. 33226. T. Kawahara, M. Itoh, M. Izumikawa, J. Hashimoto, N. Sakata, T. Tsuchida and K. Shin-ya. *J. Antibiot.*, 2015, 68 (1), 67-70 (2015). doi: 10.1038/ja.2014.98.

5. Stereochemical assignment of the protein-protein interaction inhibitor JBIR-22 by total synthesis. Al. R. Healy, M. Izumikawa, A. M. Z. Slawin, K. Shin-ya and N. J. Westwood. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (2015) 54 (13):4046-50. doi: 10.1002/anie.201411141

6. Saccharothriolides A-C, novel phenyl-substituted 10-membered macrolides isolated from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. Shan Lu, Shinichi Nishimura, Go Hirai, Masashi Ito, Teppei Kawahara, Miho Izumikawa, Mikiko Sodeoka, Kazuo Shin-ya, Toshio Tsuchida and Hideaki Kakeya. *Chem. Commun.*, (2015) 51 (38), 8074-8077. doi: 10.1039/c5cc01953b.

7. MBJ-0110, a novel cyclopeptide isolated from the fungus *Penicillium* sp. f25267. Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Ikuko Kozone, Miho Izumikawa, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, in press. doi: 10.1038/ja.2015.78.

8. Pyrrolidine-containing peptides, JBIR-126, -148 and -149, from *Streptomyces* sp. NBRC 111228. Miho Izumikawa, Teppei Kawahara, Noritaka Kagaya, Hideki Yamamura, Masayuki Hayakawa, Motoki Takagi, Masahito Yoshida, Takayuki Doi and Kazuo Shin-ya. *Tetrahedron Lett.* (2015) 56 (39), 5333-5336. doi: 10.1016/j.tetlet.2015.07.080.

9. Novel thioviridamide derivative—JBIR-140: heterologous expression of the gene cluster for thioviridamide biosynthesis., Miho Izumikawa, Ikuko Kozone, Junko Hashimoto, Noritaka Kagaya, Motoki Takagi, Hanae Koiwai, Mamoru Komatsu, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Haruo Ikeda and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 68 (8), 533-536 (2015). doi: 10.1038/ja.2015.20.

10. New acylated anthocyanins from purple yam and their antioxidant activity. Chiemi Moriya, Takahiro Hosoya, Sayuri Agawa, Yasumasa Sugiyama, Ikuko Kozone, Kazuo Shin-ya, Norihiko Terahara and Shigenori Kumazawa. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79 (9), 1484-1492 (2015). doi:10.1080/09168451.2015.1027652.

11. Synthesis of marine oxylipin topsentolide A1 and its stereoisomers, and determination of the absolute configuration of the natural product. Ken Ishigami, Munetaka Kobayashi, Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya and Hidenori Watanabe. *Tetrahedron*, 71 (44), 8436-8443 (2015). doi:10.1016/j.tet.2015.09.013

12. Identification and characterization of the Streptazone E biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. Shoto Ohno, Yohei Katsuyama, Yuka Tajima, Miho Izumikawa, Motoki Takagi, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Kazuo Shin-ya and Yasuo Ohnishi. *Chembiochem*, 16(16), 2385-2391 (2015). doi: 10.1002/cbic.201500317.

13. Foxo3a Inhibitors of Microbial Origin, JBIR-141 and JBIR-142. Teppei Kawahara, Noritaka Kagaya, Yuichi Masuda, Takayuki Doi, Miho Izumikawa, Kumiko Ohta, Atsushi Hirao and Kazuo Shin-ya. *Org. Lett.*, 17 (21), 5476-5479 (2015). doi: 10.1021/acs.orglett.5b02842.

14. Nozomi Nagano, Myco Umemura, Miho Izumikawa, Jin Kawano, Tomoko Ishii, Moto Kikuchi, Kentaro Tomii, Toshitaka Kumagai, Akira Yoshimi, Masayuki Machida, Keietsu Abe, Kazuo Shin-ya, Kiyoshi Asai. Class of cyclic ribosomal peptide synthetic genes in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 86, 58-70 (2016). doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.010.

15. MBJ-0110, a novel cyclopeptide isolated from the fungus *Penicillium* sp. f25267. Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Ikuko Kozone, Miho Izumikawa, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 69 (1), 66-68 (2016). doi: 10.1038/ja.2015.78.
16. Biosynthesis of mercapturic acid derivative of the labdane-type diterpene, cyslabdan that potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cyslabdan is generated by mycothiol-mediated xenobiotic detoxification. Haruo Ikeda, Kazuo Shin-ya, Tohru Nagamitsu and Hiroshi Tomoda. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43 (2-3), 325-342 (2016). doi 10.1007/s10295-015-1694-6.
17. Curromycin A as a GRP78 downregulator and a new cyclic dipeptide from *Streptomyces* sp. Yoichi Hayakawa, Minami Akimoto, Akari Ishikawa, Masumi Izawa and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 69 (3), 187-188 (2016). doi: 10.1038/ja.2015.115.
18. JBIR-76 and JBIR-77, modified naphthoquinones from *Streptomyces* sp. RI-77. Keiichiro Motohashi, Miho Izumikawa, Noritaka Kagaya, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 69 (9), 707-708 (2016). doi: 10.1038/ja.2015.135.
19. Identification of the Fluvirucin B2 (Sch 38518) biosynthetic gene cluster from *Actinomadula fulva* subsp. *indica* ATCC 53714: Substrate specificity of the α -amino acid selective adenylating enzyme FlvN. Akimasa Miyanaga, Yuki Hayakawa, Mario Numakura, Junko Hashimoto, Kuniko Teruya, Takashi Hirano, Kazuo Shin-ya, Fumitaka Kudo and Tadashi Eguchi. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 80 (5), 935-941 (2016). doi: 10.1080/09168451.2015.1132155.
20. Methylbenzene-containing polyketides from a *Streptomyces* that spontaneously acquired rifampicin resistance: structural elucidation and biosynthesis. J Wei Li Thong, Kazuo Shin-ya, Makoto Nishiyama and Tomohisa Kuzuyama. *Nat. Prod.*, 79 (4), 857-864 (2016). doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00922.
21. tRNA-dependent aminoacylation of an amino-sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotic. Chitose Maruyama, Haruka Niikura, Miho Izumikawa, Junko Hashimoto, Kazuo Shin-ya, Mamoru Komatsu, Haruo Ikeda, Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Jun Ishikawa and Yoshimitsu Hamano. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82 (12), 3640-3648 (2016). doi: 10.1128/AEM.00725-16.
22. Involvement of the Baeyer-Villiger monooxygenase lfnQ in the biosynthesis of isofuranonaphthoquinone scaffold of JBIR-76 and -77. Yohei Katsuyama, Kaoru Sone, Ryutaro Satou, Miho Izumikawa, Motoki Takagi, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Kazuo Shin-ya and Yasuo Ohnishi. *Chembiochem*, 17 (11), 1021-1028 (2016). doi: 10.1002/cbic.201600095.
23. Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. Danyao Du, Yohei Katsuyama, Hiroyasu Onaka, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Kazuo Shin-ya and Yasuo Ohnishi. *Chembiochem*, 17 (15), 1464-1471 (2016). doi: 10.1002/cbic.201600167.
24. Novel arginine-containing peptides MBJ-0173 and MBJ-0174 from *Mortierella alpina* f28740. Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Ikuko Kozone, Miho Izumikawa, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 70 (2), 226-229 (2017). doi: 10.1038/ja.2016.116.
25. Synthesis of spiromamakone a benzo analogues via double oxa-Michael addition of 1,8-dihydroxynaphthalene. Hirokazu Tsukamoto, Shogo Hanada, Koichi Kumasaka, Noritaka Kagaya, Miho Izumikawa, Kazuo Shin-ya and Takayuki Doi. *Org. Lett.*, 18 (19), 4848-4851 (2016). doi: 10.1021/acs.orglett.6b02328.
26. Genome mining of amino group carrier protein-mediated machinery: discovery and biosynthetic characterization of a natural product with unique hydrazone unit. Kenichi Matsuda, Fumihito Hasebe, Yuh Shiwa, Yu Kanesaki, Takeo Tomita, Hirofumi Yoshikawa, Kazuo Shin-ya, Tomohisa Kuzuyama and Makoto Nishiyama. *ACS Chemical Biology*, 12 (1), 124-131 (2017). doi:

10.1021/acscchembio.6b00818.

27. Complete genome sequence and expression profile of the commercial lytic enzyme producer *Lysobacter enzymogenes* M497-1. Hideto Takami, Atsushi Toyoda, Ikuo Uchiyama, Takehiko Itoh, Yoshihiro Takaki, Wataru Arai, Shinro Nishi, Mikihiko Kawai, Kazuo Shin-ya and Haruo Ikeda. *DNA Research*, 24 (2), 169-177 (2017). doi: 10.1093/dnares/dsw055.

28. Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides. Lihan Zhang, Takuya Hashimoto, Bin Qin, Junko Hashimoto, Ikuko Kozone, Teppei Kawahara, Masahiro Okada, Takayoshi Awakawa, Takuya Ito, Yoshinori Asakawa, Masashi Ueki, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada, Toshiyuki Wakimoto, Haruo Ikeda, Kazuo Shin-ya and Ikuro Abe. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 56 (7), 1740-1745 (2017). doi: 10.1002/anie.201602611.

29. N-phenylacetylation and NRPS with substrate promiscuity for biosynthesis of heptapeptide variants, JBIR-78 and JBIR-95. Kunpei Takeda, Kohei Kemmoku, Yasuharu Satoh, Yasushi Ogasawara, Kazuo Shin-ya and Tohru Dairi. *Unique ACS Chem. Biol.*, 12 (7), 1813-1819 (2017). doi: 10.1021/acscchembio.7b00314.

30. Biosynthetic origin of the hydroxamic acid moiety of trichostatin A: Identification of unprecedented enzymatic machinery involved in hydroxylamine transfer. Kei Kudo, Taro Ozaki, Kazuo Shin-ya, Makoto Nishiyama and Tomohisa Kuzuyama. *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (20), 6799-6802 (2017). doi: 10.1021/jacs.7b02071.

31. Identification of a gene cluster for telomestatin biosynthesis and heterologous expression using a specific promoter in a clean host. Keita Amagai, Haruo Ikeda, Junko Hashimoto, Ikuko Kozone, Miho Izumikawa, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Takemichi Nakamura, Hiroyuki Osada, Shunji Takahashi and Kazuo Shin-ya. *Sci. Rep.*, 7(1), 3382 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-03308-5.

32. Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole. Takahiro Nakamura, Sachiko Okabe, Haruka Yoshida, Keisuke Iida, Yue Ma, Shogo Sasaki, Takao Yamori, Kazuo Shin-ya, Ichiro Nakano, Kazuo Nagasawa and Hiroyuki Seimiya. *Sci. Rep.*, 7(1), 3605 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-03785-8.

33. A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis. Shinya Ito, Koji Ogawa, Koh Takeuchi, Motoki Takagi, Masahito Yoshida, Takatsugu Hirokawa, Shoshiro Hirayama, Kazuo Shin-ya, Ichio Shimada, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume and Kazuhiro Nagata. *J. Biol. Chem.*, 292(49), 20076-20085 (2017). doi: 10.1074/jbc.M117.815936

34. Functional analysis of methyltransferases participating in streptothricin-related antibiotic biosynthesis. Haruka Niikura, Chitose Maruyama, Yasushi Ogasawara, Kazuo Shin-ya, Tohru Dairi and Yoshimitsu Hamano. *J. Biosci. Bioeng.*, 125(2), 148-154 (2018). doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.09.004.

35. 難培養微生物ゲノムを利用した新奇天然化合物生産、新家 一男、現代化学、(2015)、531 (2015年6月号)、32

36. 世界最大級の天然物ライブラリーを用いた大規模スクリーニングシステムと異種発現システムを用いた次世代型天然化合物創薬の展開、新家 一男、MEDICHEM NEWS、Vol. 25, No. 1, pp. 28-32 (2015)

37. Novel thioviridamide derivative - JBIR-140: heterologous expression of the gene cluster for thioviridamide biosynthesis., Miho Izumikawa, Ikuko Kozone, Junko Hashimoto, Noritaka Kagaya, Motoki Takagi, Hanae Koiwai, Mamoru Komatsu, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Haruo Ikeda and Kazuo Shin-ya. *J. Antibiot.*, 2015, 68 (8), 533-536. doi: 10.1038/ja.2015.20.

38. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D. E. Cane and H. Ikeda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112(3), 857-862. doi: 10.1073/pnas.1422108112
39. Biosynthesis of versipelostatin: identification of an enzyme-catalyzed [4+2]-cycloaddition required for macrocyclization of spirotetronate-containing polyketides. T. Hashimoto, J. Hashimoto, K. Teruya, T. Hirano, K. Shin-ya, H. Ikeda, H.-W. Liu, M. Nishiyama and T. Kuzuyama. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137 (2), 572-575. doi: 10.1021/ja510711x
40. Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. Y. Yamada, S. Arima, T. Nagamitsu, K. Johmoto, H. Uekusa, T. Eguchi, K. Shin-ya, D. E. Cane and H. Ikeda. *J. Antibiot.*, 2015, 68 (6), 385-394. doi: 10.1038/ja.2014.171
41. Structural basis for the 4'-hydroxylation of diclofenac by a microbial cytochrome P450 monooxygenase. L.-H. Xu, H. Ikeda, L. Liu, T. Arakawa, T. Wakagi, H. Shoun and S. Fushinobu. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99, 3081-3091.
42. Total synthesis of (+)-clavulatriene A. Synthesis. F. Ito, Y. Ohbatake, S. Aoyama, T. Ikeda, S. Arima, Y. Yamada, H. Ikeda and T. Nagamitsu. *Synthesis* 2015, 47(09), 1348-1355. doi:10.1055/s-0034-1379898.
43. Characterization of the biosynthetic gene cluster for maklamycin, a spirotetronate-class antibiotic of the endophytic *Micromonospora* sp. NBRC 110955. R. Daduang, S. Kitani, J. Hashimoto, A. Thamchaipenet, Y. Igarashi, K. Shin-ya, H. Ikeda, T. Nihira. *Microbiol. Res.* 2015, 180:30-39.
44. 29-Deoxymaklamycin, a new maklamycin analogue produced by a genetically engineered strain of *Micromonospora* sp. NBRC 110955. R. Daduang, S. Kitani, Y. Sudoh, I. Grace U. Pait, A. Thamchaipenet, H. Ikeda, Y. Igarashi, T. Nihira. *J. Biosci. Bioeng.* 2015, 120(6), 608-613 DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.04.004.
45. Chemical diversity of labdane-type bicyclic diterpene biosynthesis in Actinomycetales microorganisms. Y. Yamada, M. Komatsu, H. Ikeda. *J. Antibiot.* 2016, 69, 515-523. DOI:10.1038/ja.2015.147.
46. Biosynthesis of mercapturic acid derivative of the labdane-type diterpene, cyslabdan that potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Cyslabdan is generated by mycothiol-mediated xenobiotic detoxification. Ikeda, H. Shin-ya, K. Nagamitsu, T. Tomoda, H.: *J. Ind. Microl. Biotechnol.* 2016, 43:325-342.
47. Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogues expressed in vivo. Ozaki, T., Yamashita, K., Goto, Y., Shimomura, M., Hayashi, S., Asamizu, S., Sugai, Y., Ikeda, H., Suga, H., Onaka, H., *Nat. Commun.* 2016, 8, 14207. DOI: 10.1038/ncomms14207.
48. Substitution of a Single Amino Acid Reverses the Regiospecificity of the Baeyer–Villiger Monooxygenase PntE in the Biosynthesis of the Antibiotic Pentalenolactone Chen, K., Wu, S., Zhu, L., Zhang, C., Xizng, W., Deng, Z., Ikeda, H., Cane, DE., Zhu, D. *Biochemistry* 2016, 55, 6696-6704.
49. High production of a class III lantipeptide AmfS in *Streptomyces griseus*. Takano, H., Matsui, Y., Nomura, J., Fujimoto, M., Katsumata, N., Koyama, T., Mizuno, I., Amano, S., Shiratori-Takano, H., Komatsu, M., Ikeda, H., Ueda, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016, 81, 153-164.
50. Characterization of AvaR1, a butenolide-autoregulator receptor for biosynthesis of a *Streptomyces* hormone in *Streptomyces avermitilis*. Sultan, SP., Kitani, S., Miyamoto, KT., Iguchi, H., Atago, T., Ikeda, H., Nihira, T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 9581-9591.
51. Hydroxylation of flavanones by cytochrome P450 105D7 from *Streptomyces avermitilis*. Liu, L.,

- Yao, Q., Ma, Z., Ikeda, H., Fushinobu, S., Xu, L.H. *J. Mol. Catalysis. B. Enzymatic.* 2016, 132, 91-97.
52. tRNA-dependent aminoacylation of an amino sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotic. Maruyama, C., Niikura, H., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Shin-ya, K., Komatsu, M., Ikeda, H., Kuroda, M., Sekizuka, T., Ishikawa, J., Hamano, M. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 3640-3648.
53. Nitrogen oxide cycle regulates nitric oxide levels and bacterial cell signaling. Sasaki, Y., Oguchi, H., Kobayashi, T., Kusama, S., Sugiura, R., Moriya, K., Hirata, T., Yukioka, Y., Takaya, N., Yajima, S., Ito, S., Okada, K., Ohsawa, K., Ikeda, H., Takano, H., Ueda, K., Shoun, H. *Sci. Reports* 2016, 6, 2208.
54. Chemical diversity of labdane-type bicyclic diterpene biosynthesis in Actinomycetales microorganisms. Yamada, Y., Komatsu, M., Ikeda, H. *J. Antibiot.* 2016, 69, 515-523.
55. Natural products discovery from microorganisms in the post-genome era. Ikeda, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017, 81, 13-22.
56. Complete genome sequence and expression profile of the commercial lytic enzyme producer *Lysobacter enzymogenes* M497-1. Takami, H., Toyoda, A., Uchiyama, I., Itoh, T., Takaki, Y., Arai, W., Nishi, S., Kawai, M., Shin-ya, K., Ikeda, H. *DNA Res.* 2017, 24, 1-9.
57. Hydroxylation of compactin (ML-236B) by CYP105D7(SAV_7469) from *Streptomyces avermitilis*. Yao, Q., Ma, L., Liu, L., Ikeda, H., Fushinobu, S., Xu, L.H. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 27(5), 956-964. DOI: 10.4014/jmb.1610.10079.
58. Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides. Zhang, L., Hashimoto, T., Qin, B., Hashimoto, J., Kozone, I., Kawahara, T., Okada, M., Awakawa, T., Ito, T., Asakawa, Y., Ueki, M., Takahashi, S., Osada, H., Wakimoto, T., Ikeda, H., Shin-ya, K., Abe, I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, 56, 1740-1745.
59. Heterologous production of kasugamycin, an aminoglycoside antibiotic from *Streptomyces kasugaensis*, in *Streptomyces lividans* and *Rhodococcus erythropolis* L-88 by constitutive expression of the biosynthetic gene cluster. Kasuga, K., Sasaki, A., Matsuo, T., Yamamoto, C., Minato, Y., Kuwahara, N., Fujii, C., Kobayashi, M., Agematsu, H., Tamura, T., Komatsu, M., Ishikawa, J., Ikeda, H., Kojima, I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101(10), 4259-4266. DOI: 10.1007/s00253-017-8189-5.
60. Identification of gene cluster for telomestatin biosynthesis and efficient production in heterologous host using specific promoter. Amagai, K., Ikeda, H., Hashimoto, J., Kozone, I., Izumikawa, M., Kudo, F., Eguchi, T., Nakamura, T., Osada, H., Takahashi, S., Shin-ya, K. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 3382. doi: 10.1038/s41598-017-03308-5.
61. Activation of cryptic phthoxazolin A production in *Streptomyces avermitilis* by the disruption of autoregulator-receptor homologue AvaR3. Suroto, D.A., Kitani, S., Miyamoto, K.T., Sakihama, Y., Arai, M., Ikeda, H., Nihira, T. *J. Biosci. Bioeng.*, 2017, 124(6), 611-617. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.06.014.
62. Identification and characterization of lbpA, an indigoidine biosynthetic gene in the γ -butyrolactone signaling system of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. Pait, I.G.U., Kitani, S., Kurniawan, Y.N., Asa, M., Iwai, T., Ikeda, H., Nihira, T. *J. Biosci. Bioeng.*, 2017, 124(4), 369-275. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.04.020.
63. Characterization of bafilomycin biosynthesis in *Kitasatospora setae* KM-6054 and comparative analysis of gene clusters in Actinomycetales microorganisms. Nara, A., Hashimoto, T., Komatsu, M., Nishiyama, M., Kuzuyama, T., Ikeda, H. *J. Antibiot.*, 2017, 70(5), 616-624.
64. ポストゲノム時代に向けた微生物由来天然物医薬品の探索研究、池田 治生、化学と生物 Vol.

54, No. 1, 17-26 (2016).

65. 格別なる贈り物・エバーメクチンの発見から生合成研究まで、池田 治生、学術の動向 2016年2月号 2-8, (2016)

66. 池田 治生 “天然物医薬品を生産する *Streptomyces* 属のゲノム構造”, *ゲノム微生物学会ニュースレター* No. 13, 3-8 (2016).

67. RK-270A-C, new oxindole derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library of *Streptomyces* sp. RK85-270. Jun-Pil Jang, Toshihiko Nogawa, Masakazu Uramoto, Akiko Okano, Yushi Futamura, Takeshi Shimizu, Shunji Takahashi, Jae-Hyuk Jang, Jong Seog Ahn, Hiroyuki Osada. *J. Antibiot.*, 68 (4), 293-295 (2015). doi: 10.1038/ja.2014.141.

68. A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis. Naoki Kato, Toshihiko Nogawa, Hiroshi Hirota, Jae-Hyuk Jang, Shunji Takahashi, Jong Seog Ahn, Hiroyuki Osada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 460 (2), 210-215 (2015). doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.011.

69. Identification of middle chain fatty acyl-CoA ligase responsible for the biosynthesis of 2-alkylmalonyl-CoAs for polyketide extender unit. Takeshi Miyazawa, Shunji Takahashi, Akihiro Kawata, Suresh Panthee, Teruo Hayashi, Takeshi Shimizu, Toshihiko Nogawa, and Hiroyuki Osada. *J. Biol. Chem.*, 290 (45), 26994-27011 (2015). doi: 10.1074/jbc.M115.677195.

70. Haenamindole, an unusual diketopiperazine derivative from a marine-derived *Penicillium* sp. KCB12F005. Jong Won Kim, Sung-Kyun Ko, Sangkeun Son, Kee-Sun Shin, In-Ja Ryoo, Young-Soo Hong, Hyuncheol Oh, Bang Yeon Hwang, Hiroshi Hirota, Shunji Takahashi, Bo Yeon Kim, Hiroyuki Osada, Jae-Hyuk Jang, Jong Seog Ahn. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25 (22), 5398-5401 (2015). doi: 10.1016/j.bmcl.2015.09.026.

71. Unantimycin A, a new neoantimycin analog isolated from a microbial metabolite fraction library. Chung Liang Lim, Toshihiko Nogawa, Akiko Okano, Yushi Futamura, Makoto Kawatani, Shunji Takahashi, Darah Ibrahim, Hiroyuki Osada *J. Antibiot.*, 69 (6), 456-458 (2015). doi: 10.1038/ja.2015.124.

72. A crotonyl-CoA reductase-carboxylase independent pathway for assembly of unusual alkylmalonyl-CoA polyketide synthase extender units. Lauren Ray, Timothy R. Valentic, Takeshi Miyazawa, David M. Withall, Lijiang Song, Jacob C. Milligan, Hiroyuki Osada, Shunji Takahashi, Shiou-Chuan Tsai, Gregory L. Challis. *Nat. Commun.*, 7, 13609 (2016). doi: 10.1038/ncomms13609.

73. Identification of a novel sesquiterpene biosynthetic machinery involved in astellolide biosynthesis. Yasutomo Shinohara, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada, Yasuji Koyama. *Sci. Rep.*, 6, 32865 (2016). doi: 10.1038/srep32865.

74. Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides. Lihan Zhang, Takuya Hashimoto, Bin Qin, Junko Hashimoto, Ikuko Kozone, Teppei Kawahara, Masahiro Okada, Takayoshi Awakawa, Takuya Ito, Yoshinori Asakawa, Masashi Ueki, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada, Toshiyuki Wakimoto, Haruo Ikeda, Kazuo Shin-ya and Ikuro Abe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56 (7), 1740-1745 (2017). doi: 10.1002/anie.201611371.

75. Identification of gene cluster for telomestatin biosynthesis and efficient production in heterologous host using specific promoter. Keita Amagai, Haruo Ikeda, Junko Hashimoto, Ikuko Kozone, Miho Izumikawa, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Takemichi Nakamura, Hiroyuki Osada, Shunji Takahashi, and Kazuo Shin-ya., *Sci. Rep.*, 7, 3382 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-03308-5.

76. Novel squalene-producing thraustochytrids found in mangrove water. Masato Otagiri, Ammara

Khalid, Shigeharu Moriya, Hiroyuki Osada, and Shunji Takahashi. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 81 (10), 2034-2037 (2017). doi: 10.1080/09168451.2017.1359485.

77. Wakodecalines A and B, new decaline metabolites isolated from a fungus *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058. Nogawa Toshihiko, Kato Naoki, Shimizu Takeshi, Okano Akiko, Futamura Yushi, Shunji Takahashi, Hiroyuki Osada. *J Antibiot.*, 71, 123-128, (2018). doi: 10.1038/ja.2017.103.

78. Development of a terpenoid-production platform in *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. Ammara Khalid, Hiroshi Takagi, Suresh Panthee, Makoto Muroi, Joe Chappell, Hiroyuki Osada, and Shunji Takahashi. *ACS Synth. Biol.*, 6(12), 2339-2349 (2017). doi: 10.1021/acssynbio.7b00249.

79. 宮澤岳、高橋 俊二、長田 裕之
ポリケチド化合物の生合成に参与する新規カルボキシル化酵素
バイオサイエンスとインダストリー 75 (4), 315-317 (2017).

80. New 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazoles derived from the thermophilic bacterium *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1T. J, S, Park, S, Yabe, K, Shin-ya, M, Nishiyama and T, Kuzuyama. *J. Antibiot.*, 2015, 68 (1), 60-62. doi: 10.1038/ja.2014.93.

81. Biosynthesis of versipelostatin: identification of an enzyme-catalyzed [4+2]-cycloaddition required for macrocyclization of spirotetronate-containing polyketides. T. Hashimoto, J. Hashimoto, K. Teruya, T. Hirano, K. Shin-Ya, H. Ikeda, H.-W. Liu, M. Nishiyama and T Kuzuyama. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 572-575. doi: 10.1021/ja510711x.

82. Methylbenzene-containing polyketides from a *Streptomyces* that spontaneously acquired rifampicin resistance: structural elucidation and biosynthesis. Thong WL, Shin-ya K, Nishiyama M, Kuzuyama T. *J. Nat. Prod.* 2016 79, 857-64. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00922.

83. Biosynthesis of the antituberculous agent caprazamycin: Identification of caprazol-3"-phosphate, an unprecedented caprazamycin-related metabolite. Shiraishi T, Hiro N, Igarashi M, Nishiyama M, Kuzuyama T. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016, 62, 164-6. doi: 10.2323/jgam.2016.01.002.

84. Biosynthesis of Trehangelin in *Polymorphospora rubra* K07-0510: Identification of Metabolic Pathway to Angelyl-CoA. Inahashi Y, Shiraishi T, Palm K, Takahashi Y, Ōmura S, Kuzuyama T, Nakashima T. *Chembiochem.* 2016, 17, 1442-7. doi: 10.1002/cbic.201600208.

85. Mechanistic insights into Diels-Alder reactions in natural product biosynthesis. Hashimoto T, Kuzuyama T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016, 35, 117-123. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.09.015.

86. Genome Mining of Amino Group Carrier Protein-Mediated Machinery: Discovery and Biosynthetic Characterization of a Natural Product with Unique Hydrazone Unit. Matsuda K, Hasebe F, Shiwa Y, Kanesaki Y, Tomita T, Yoshikawa H, Shin-ya K, Kuzuyama T, Nishiyama M. *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 124-131. doi: 10.1021/acscchembio.6b00818.

87. Biosynthetic studies on terpenoids produced by *Streptomyces*. Kuzuyama T. *J Antibiot.* 2017, doi: 10.1038/ja.2017.12.

88. Amino-group carrier-protein-mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. Hasebe F, Matsuda K, Shiraishi T, Futamura Y, Nakano T, Tomita T, Ishigami K, Taka H, Mineki R, Fujimura T, Osada H, Kuzuyama T, Nishiyama M. *Nat. Chem. Biol.* 2016, 12, 967-972. doi: 10.1038/nchembio.2181.

89. Characterization of bafilomycin biosynthesis in *Kitasatospora setae* KM-6054 and comparative analysis of gene clusters in Actinomycetales microorganisms. Nara A, Hashimoto T, Komatsu M, Nishiyama M, Kuzuyama T, Ikeda H. *J. Antibiot.* 2017, 70, 616-624. doi: 10.1038/ja.2017.33.

90. Structural Insights into the CotB2-Catalyzed Cyclization of Geranylgeranyl Diphosphate to the Diterpene Cyclooctat-9-en-7-ol. Tomita T, Kim SY, Teramoto K, Meguro A, Ozaki T, Yoshida A, Motoyoshi Y, Mori N, Ishigami K, Watanabe H, Nishiyama M, Kuzuyama T. ACS Chem. Biol. 2017, 12, 1621-1628. doi: 10.1021/acscchembio.7b00154.
91. Biosynthetic Origin of the Hydroxamic Acid Moiety of Trichostatin A: Identification of Unprecedented Enzymatic Machinery Involved in Hydroxylamine Transfer. Kudo K, Ozaki T, Shin-ya K, Nishiyama M, Kuzuyama T. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 6799-6802. doi: 10.1021/jacs.7b02071.
92. Methylcobalamin-Dependent Radical SAM C-Methyltransferase Fom3 Recognizes Cytidylyl-2-hydroxyethylphosphonate and Catalyzes the Nonstereoselective C-Methylation in Fosfomycin Biosynthesis. Sato S, Kudo F, Kim SY, Kuzuyama T, Eguchi T. Biochemistry. 2017, 56, 3519-3522. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00472.
93. Fosfomycin Biosynthesis via Transient Cytidylylation of 2-Hydroxyethylphosphonate by the Bifunctional Fom1 Enzyme. Cho SH, Kim SY, Tomita T, Shiraishi T, Park JS, Sato S, Kudo F, Eguchi T, Funa N, Nishiyama M, Kuzuyama T. ACS Chem. Biol. 2017, 12, 2209-2215. doi: 10.1021/acscchembio.7b00419.
94. Structure and Mechanism of the Monoterpene Cyclolavandulyl Diphosphate Synthase that Catalyzes Consecutive Condensation and Cyclization. Tomita T, Kobayashi M, Karita Y, Yasuno Y, Shinada T, Nishiyama M, Kuzuyama T. Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 14913-14917. doi: 10.1002/anie.201708474.
95. [4+2]-環化付加反応によるポリケタイド大環状化機構の発見. 橋本拓哉、葛山智久. バイオサイエンスとインダストリー 2015, 73: 380-382.
96. テルペン環化酵素による巧みな合成の技—遠距離ヒドリドシフトと炭素-炭素結合の組換えを一気に触媒—. 寺本和矢、葛山智久. 化学と生物 2016, 54: 534-536.
97. Novel thioviridamide derivative—JBIR-140: heterologous expression of the gene cluster for thioviridamide biosynthesis. Miho Izumikawa, Ikuko Kozono, Junko Hashimoto, Noritaka Kagaya, Motoki Takagi, Hanae Koiwai, Mamoru Komatsu, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Haruo Ikeda and Kazuo Shin-ya. J. Antibiot., 68 (8), 533-536 (2015). doi: 10.1038/ja.2015.20.
98. Identification and characterization of the Streptazone E biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. Shoto Ohno, Yohei Katsuyama, Yuka Tajima, Miho Izumikawa, Motoki Takagi, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Kazuo Shin-ya and Yasuo Ohnishi. ChemBiochem, 16(16), 2385-2391 (2015). doi: 10.1002/cbic.201500317.
99. Involvement of the Baeyer-Villiger monooxygenase IfnQ in the biosynthesis of isofuranonaphthoquinone scaffold of JBIR-76 and -77. Yohei Katsuyama, Kaoru Sone, Ryutaro Satou, Miho Izumikawa, Motoki Takagi, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Kazuo Shin-ya and Yasuo Ohnishi. ChemBiochem, 17 (11), 1021-1028 (2016). doi: 10.1002/cbic.201600095.
100. Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. Danyao Du, Yohei Katsuyama, Hiroyasu Onaka, Manabu Fujie, Noriyuki Satoh, Kazuo Shin-ya and Yasuo Ohnishi. ChemBiochem, 17 (15), 1464-1471 (2016). doi: 10.1002/cbic.201600167.
101. Antifungal activity of microbes obtained from subtropical region, Okinawa, against *Magnaporthe oryzae*. Ueno M, Quyet NT, Shinzato N, Matsui T. Trop Agr Deveop. 60:48-52 (2016)
102. Complete mitochondrial genome of *Cacospongia mycofijiensis* (Dictyoceratida: Demospongiae): the first report for the sponge family Thorectidae. Aoyama H, Saitoh S, Park S, Shirai Y, Shinzato N. Mitochondrial DNA Part B 1:477-478 (2016)

103. Colorimetric detection of the adenylation activity in nonribosomal peptide synthetase, Chitose Maruyama, Haruka Niikura, Masahiro Takakuwa, Hajime Katano, and Yoshimitsu Hamano, *Methods Mol. Biol.*, 2016, 1401, 77-84.
104. Ion-transfer voltammetry of streptothricin antibiotics with differently sized lysine oligomers at a nitrobenzene | water interface Kohei Uematsu, Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano, Hajime Katano, *J. Electroanal. Chem.*, 2015, 754, 143-147.
105. Synthesis of (2S,3R,4R)-3,4-dihydroxyarginine and its inhibitory activity against nitric oxide synthase. MASUDA Y, MARUYAMA C, KAWABATA K, HAMANO Y, and DOI T. *Tetrahedron*, 2016, 72, 5602-5611.
106. tRNA-dependent aminoacylation of an amino-sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotic. MARUYAMA C, NIIKURA H, IZUMIKAWA M, HASHIMOTO J, SHIN-YA K, KOMATSU M, IKEDA H, KURODA M, SEKIZUKA T, ISHIKAWA J, and HAMANO Y. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82, 3640-3648.
107. Functional analysis of methyltransferases participating in streptothricin-related antibiotic biosynthesis. Haruka Niikura, Chitose Maruyama, Yasushi Ogasawara, Kazuo Shin-ya, Tohru Dairi, and Yoshimitsu Hamano. *J. Biosci. Bioeng.*, 125(2), 148-154.
108. 抗菌ペプチド、 ϵ -ポリ-L-リジン合成におけるポリマー鎖長決定機構, 濱野吉十, バイオサイエンスとインダストリー (財団法人バイオインダストリー協会), 2015, Vol. 73, No. 6, 476-481.
109. 典的分析化学手法の現代天然物化学研究への活用, 濱野吉十, 木元久, 高橋正和, 片野肇, 古化学と生物 (日本農芸化学会誌), 2015, Vol. 53, No. 12, 822-825.
110. ホモポリアミノ酸を合成する新規ペプチド合成酵素, 濱野吉十, 日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター, 2015, Vol. 29, No. 4, 3-6.
111. Total synthesis and structure determination of JBIR-108 — a 2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-2,3-dihydro-3(2H)-furanone isolated from *Streptomyces gramineus* IR087Pi-4. K. Fujiwara, H. Tsukamoto, M. Izumikawa, T. Hosoya, N. Kagaya, M. Takagi, H. Yamamura, M. Hayakawa, K. Shin-ya and T. Doi. *J. Org. Chem.*, 80 (1), 114-132 (2015). doi: 10.1021/jo502198y
112. Total Synthesis and Structure Elucidation of JBIR-39: A linear hexapeptide possessing piperazic acid and γ -hydroxypiperazic acid residues. M. Yoshida, N. Sekioka, M. Izumikawa, I. Kozone, M. Takagi, K. Shin-ya and T. Doi. *Chem. Eur J.*, 21 (7), 3031-3041 (2015). doi: 10.1002/chem.201406020
113. Asymmetric total synthesis of ent-pyrripyropene A. S. Fuse, A. Ikebe, K. Oosumi, T. Karasawa, K. Matsumura, M. Izumikawa, K. Johmoto, H. Uekusa, K. Shin-ya, T. Doi, and T. Takahashi. *Chem. Eur. J.*, 21 (26), 9454-9460 (2015). doi: 10.1002/chem.201500703
114. Synthesis of (2S,3R,4R)-3,4-dihydroxyarginine and its inhibitory activity against nitric oxide synthase. Y. Masuda, C. Maruyama, K. Kawabata, Y. Hamano, and T. Doi. *Tetrahedron*, 72 (36), 5602-5611 (2016). doi: 10.1016/j.tet.2016.07.050
115. Synthesis of Spiromamakone A Benzo Analogues via Double Oxa-Michael Addition of 1,8-Dihydroxynaphthalene. H. Tsukamoto, S. Hanada, K. Kumasaka, N. Kagaya, M. Izumikawa, K. Shin-ya, and T. Doi. *Org. Lett.*, 18 (19), 4848-4851 (2016). doi: 10.1021/acs.orglett.6b02328
116. Stereoselective Synthesis of beta-Amino Acid Derivatives by Asymmetric Mannich Reaction in Flow. M. Yoshida, K. Umeda, and T. Doi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 90(10), 1157-1163 (2017). doi: 10.1246/bcsj.20170194

117. Systematic Analysis of the Relationship among 3D Structure, Bioactivity, and Membrane Permeability of PF1171F, a Cyclic Hexapeptide with Paralyzing Effects on Silkworms. Y. Masuda, R. Tanaka, A. Ganesan, and T. Doi. *J. Org. Chem.*, 82(21), 11447-11463 (2017). doi: 10.1021/acs.joc.7b01975

118. A small compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis. S. Ito, K. Ogawa, K. Takeuchi, M. Takagi, M. Yoshida, T. Hirokawa, S. Hirayama, K. Shin-ya, I. Shimada, T. Doi, N. Goshima, T. Natsume, and K. Nagata. *J. Biol. Chem.*, 292, 20076-20085. doi: 10.1074/jbc.M117.815936

119. 生物活性環状ペプチド PF1171 類と apratoxin C の全合成と三次元構造解析、増田裕一、土井隆行、化学工業、67(10), 18-25 (2016).

研究課題② IT を活用したタンパク質の構造解析情報に基づく創薬基盤技術開発

1. Takeshi Kawabata, Yusuke Sugihara, Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura, LigandBox: A database for 3D structures of chemical compounds. *BIOPHYSICS*9, 113-121 (2013)

2. Takamasa Arakawa, Narutoshi Kamiya, Haruki Nakamura, Ikuo Fukuda, Molecular dynamics simulations of a double-stranded DNA in an explicit solvent model with zero-dipole summation method. *PLoSOne*8 (10), e76606 (2013)

3. Tadaaki Mashimo, Takayuki Kochi, Yoshifumi Fukunishi, Narutoshi Kamiya, Yu Takano, Ikuo Fukuda, Haruki Nakamura, Molecular Dynamics Simulation Accelerated by GPU for GPCR with a non-Ewald Algorithm. *TSUBAME ESJ.* 10, 25-29 (2013)

4. Tadaaki Mashimo, Yoshifumi Fukunishi, Narutoshi Kamiya, Yu Takano, Ikuo Fukuda, Haruki Nakamura. Molecular Dynamics Simulations Accelerated by GPU for Biological Macromolecules with a Non-Ewald Scheme for Electrostatic Interactions. *J. Chem. Theory Comput.* 9(12), 5599-5069 (2013)

5. 鷹野優、中村春木、"タンパク質計算科学の進展" *パリティ* 29 (1), 63-64 (2014)

6. Yohta Fukuda, Ka Man Tse, Masami Lintuluoto, Yoshifumi Fukunishi, Eiichi Mizohata, Hiroyoshi Matsumura, Hideto Takami, Masaki Nojiri, Tsuyoshi Inoue. Structural insights into the function of a thermostable copper-containing nitrite reductase. *J. Biochem.*155 (2), 123-135 (2014)

7. Junichi Higo, Koji Umezawa. Free-energy landscape of Intrinsically disordered proteins investigated by all-atom multicanonical molecular dynamics, a chapter in a book "Protein Conformational Dynamics" (Han, K., Zhang, X., and Yang, M. eds.) Springer (invited paper) in press (2014)

8. 肥後順一、梅澤公二、"全原子コンピュータシミュレーションで解き明かす天然変成タンパク質の分子認識機構" *生物物理* 54 (2), in press (2014)

9. Bhaskar Dasgupta, Haruki Nakamura, Akira R. Kinjo, Rigid-body motions of interacting proteins dominate multi-specific binding of Ubiquitin in a shape-dependent manner. *Proteins*, 82 (1), 77-89 (2014).

10. Bhaskar Dasgupta, Kota Kasahara, Narutoshi Kamiya, Haruki Nakamura, Akira Kinjo, Specific non-local interactions are not necessary for recovering native protein dynamics. *PLoS One* 9 (3), e91347 (2014).

11. Hiroki Shirai, Kazuyoshi Ikeda, Kazuo Yamashita, Yuko Tsuchiya, Jamica Sarmiento, Shide Liang, Tatsuaki Morokata, Kenji Mizuguchi, Junichi Higo, Daron M. Standley, Haruki Nakamura, High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations. *Proteins* 82 (8) 1624-1635 (2014).

12. Ikuo Fukuda, Narutoshi Kamiya, Haruki Nakamura, The Zero-multipole summation method for estimating electrostatic interactions in molecular dynamics: analysis of the accuracy and application to liquid systems. *Journal of Chemical Physics*, 140, 194307 (2014).
13. Takeshi Kawabata, Haruki Nakamura, 3D flexible alignment using 2D maximum common substructure: dependence of prediction accuracy on target-reference chemical similarity. *Journal of Chemical Information and Modeling* 54 (7), 1850-1863 (2014).
14. Yosuke Nishikawa, Takuji Oyama, Narutoshi Kamiya, Takahide Kon, Yoko Y. Toyoshima, Haruki Nakamura, Genji Kurisu, Structure of the entire stalk region of the dynein motor domain. *Journal of Molecular Biology* 426, 3232–3245 (2014).
15. Kazuo Yamashita, Kazuyoshi Ikeda, Karlou Amada, Shide Liang, Yuko Tsuchiya, Haruki Nakamura, Hiroki Shirai, Daron M Standley, Kotai Antibody Builder: Automated, high-resolution structural modeling of antibodies. *Bioinformatics*, 30 (22), 3279-3280 (2014).
16. Kota Kasahara, Ikuo Fukuda, Haruki Nakamura, A Novel Approach of Dynamic Cross Correlation Analysis on Molecular Dynamics Simulations and its Application to Ets1 dimer–DNA Complex. *PLoS ONE* 9 (11), e112419 (2014).
17. Takanori Sugihara, Junichi Higo, Haruki Nakamura, Local Representation of N-Body Coulomb Energy with Path Integrals. *J. Phys. Soc. Jpn.* 83, 063001 (2014).
18. Yoshifumi Fukunishi, Takashi Kurosawa, Yoshiaki Mikami, Haruki Nakamura. Prediction of synthetic accessibility based on commercially available compound databases. *J. Chem. Inf. Model.* 54 (12), 3259-3267 (2014).
19. Tsuyoshi Terakawa, Junichi Higo, Shoji Takada. "Multi-scale ensemble modeling of modular proteins with intrinsically disordered linker regions: Application to p53." *Biophys. J.* 107, 721–729 (2014).
20. 福田育夫 「分子動力学計算における新規非エバルト法の開発と応用, *生物物理* 55 (1), 037-039 (2015).
21. Junichi Higo, Bhaskar Dasgupta, Tadaaki Mashimo, Kota Kasahara, Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura, Virtual-system coupled adaptive umbrella sampling to compute free-energy landscape for flexible molecular docking. *J. Comput. Chem.* 36 (20), 1489-1501 (2015).
22. Hiroyuki Okazaki, Shuso Takeda, Eriko Ikeda, Yoshifumi Fukunishi, Hiroyuki Ishii, Aya Taniguchi, Miki Tokuyasu, Taichi Himeno, Kazuhiro Kakizo, Kenji Matsumoto, Mitsuru Shindo, Hironori Aramaki. Bongkreic acid as a selective activator of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) isoform. *The Journal of Toxicological Sciences.* 40 (2), 223-233 (2015).
23. Hung Nguyen, Tien Tran, Yoshifumi Fukunishi, Junichi Higo, Haruki Nakamura, Ly Le, Computational Study of Drug Binding Affinity to Influenza A Neuraminidase Using Smooth Reaction Path Generation (SRPG) Method. *J. Chem. Inf. Model.*, in press (2015).
24. Ikuo Fukuda, Kei Moritsugu, Double Density Dynamics: Realizing a joint distribution of a physical system and a parameter system. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, in press (2015).
25. 肥後順一、"天然変性蛋白質-新しい蛋白質像-" *日本物理学会誌*, in press (2015).
26. Kota Kasahara, Neetha Mohan, Ikuo Fukuda, Haruki Nakamura, mDCC_tools: Characterizing Multi-modal Atomic Motions in Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics* 32, 2531-2533 (2016).
27. Narutoshi Kamiya, Tadaaki Mashimo, Yu Takano, Takahide Kon, Genji Kurisu, Haruki Nakamura,

Elastic properties of dynein motor domain obtained from all-atom molecular dynamics simulations. *Protein Engineering, Design and Selection* 29, 317-325 (2016).

28. Kota Kasahara, Benson Ma, Kota Goto, Bhaskar Dasgupta, Junichi Higo, Ikuo Fukuda, Tadaaki Mashimo, Yutaka Akiyama, Haruki Nakamura. myPresto/omega gene: a GPU-accelerated molecular dynamics simulator tailored for enhanced conformational sampling methods with a non-Ewald electrostatic scheme. *Biophysics and Physicobiology*, 13, 209-216 (2016).

29. Shinji Iida, Tadaaki Mashimo, Takashi Kurosawa, Hironobu Hojo, Hiroya Muta, Yuji Goto, Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura, Junichi Higo. Variation of free - energy landscape of the p53 C - terminal domain induced by acetylation: Enhanced conformational sampling. *Journal of Computational Chemistry*, 37, 2687-2700 (2016).

30. Bhaskar Dasgupta, Higo Junichi, Haruki Nakamura. Faster Binding Free-Energy Landscape Calculation by Virtual-State Coupled Adaptive Umbrella Sampling. *Biophysical Journal*, 110, 55a (2016).

31. Bhaskar Dasgupta. Virtual system Coupled Adaptive Umbrella Sampling: An efficient method to compute potential of mean force along a reaction-coordinate (特集 HPCI を利用した研究成果). *Cybermedia HPC journal*, 6, 7-11 (2016).

32. Bhaskar Dasgupta, Haruki Nakamura, Junichi Higo. Flexible binding simulation by a novel and improved version of virtual-system coupled adaptive umbrella sampling. *Chemical Physics Letters*, 662, 327-332 (2016).

33. Masahiko Okuda, Junichi Higo, Tadashi Komatsu, Tsuyoshi Konuma, Kenji Sugase, Yoshifumi Nishimura. Dynamics of the Extended String-Like Interaction of TFIIIE with the p62 Subunit of TFIIH. *Biophysical J.*, 111, 950-962 (2016).

34. Yoshifumi Fukunishi, Tadaaki Mashimo, Kiyotaka Misoo, Yoshinori Wakabayashi, Toshiaki Miyaki, Seiji Ohta, Mayu Nakamura, Kazuyoshi Ikeda. Miscellaneous topics in computer-aided drug design: Synthetic accessibility and GPU computing, and other topics. *Current pharmaceutical design*, 22, 3555-3568 (2016).

35. Ikuo Fukuda, Coupled Nosé-Hoover Lattice: A set of the Nosé-Hoover equations with different temperatures. *Physics Letters A* 380, 2465—2474 (2016).

36. 肥後順一、“現代物理のキーワード「天然変性蛋白質---新しい蛋白質像---」” *日本物理学会誌* 71 巻 2 号, 78-79 (2016).

37. Koji Umezawa, Jun Ohnuki, Junichi Higo, Mitsunori Takano. “Intrinsic disorder accelerates dissociation rather than association.” *Proteins*. 84, 1124-1133 (2016).

38. Sinji Iida, Haruki Nakamura, Junichi Higo. “Enhanced conformational sampling to visualize a free-energy landscape of protein complex formation.” *Biochemical J.* 473, 1651–1662 (2016).

39. Jinzen Ikebe, Koji Umezawa, Junichi Higo. “Enhanced sampling simulations to construct free energy landscape of protein-partner substrate interaction.” *Biophysical Rev.*, 8, 45–62 (2016).

40. Yoshifumi Fukunishi, Satoshi Yamasaki, Isao Yasumatsu, Koh Takeuchi, Takashi Kurosawa, Haruki Nakamura. Quantitative Structure - activity Relationship (QSAR) Models for Docking Score Correction. *Molecular Informatics*, 36, 1600013 (2017).

41. Junichi Higo, Kota Kasahara, Bhaskar Dasgupta, Haruki Nakamura. Enhancement of canonical sampling by virtual-state transitions. *The Journal of Chemical Physics*, 146, 044104 (2017).

42. Kota Kasahara, Masaaki Shiina, Ikuo Fukuda, Kazuhiro Ogata, Haruki Nakamura, *Molecular*

mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1–CBF β –Ets1 on the TCR α gene enhancer. *PloS One* 12, e0172654 (2017).

43. Ikuo Fukuda, Kei Moritsugu, Coupled Nosé-Hoover Equations of Motions without Time Scaling. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 50, 015002 (2017).

44. Gert-Jan Bekker, Narutoshi Kamiya, Mitsugu Araki, Ikuo Fukuda, Yasushi Okuno, Haruki Nakamura, Accurate prediction of complex structure and affinity for a flexible protein receptor and its inhibitor. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13, 2389-2399 (2017)

45. Junichi Higo, Kota Kasahara, Haruki Nakamura, Multi-dimensional virtual system introduced to enhance canonical sampling. *Journal of Chemical Physics* 147, 134102 (2017).

46. Yasuhiro Imada, Haruki Nakamura, Yu Takano, Density functional study of porphyrin distortion effects on redox potential of heme. (2017) *Journal of Computational Chemistry*, in press. Published on 2-September-2017.

47. 福西快文, 若林良徳, 真下忠彰. データベース利用での分子シミュレーション: 半シミュレーション的学習法. *分子シミュレーション研究会会誌アンサンブル* 19 (4), 245-255 (2017).

48. 福田育夫, 「長距離力をいかに精度よく効率的に見積もるか—零多重極子和法による静電相互作用計算—」, (“How can we evaluate long-range interactions accurately and efficiently? --calculation of electrostatic interaction by the zero-multipole summation method--”) *日本物理学会誌*, 72, 793-799 (2017)

49. Yoshifumi Fukunishi, Yasunobu Yamashita, Tadaaki Mashimo, Haruki Nakamura. Prediction of Protein–compound Binding Energies from Known Activity Data: Docking - score - based Method and its Applications. *Molecular Informatics* 14 February 2018 (in press).

50. Functional dynamics of cell surface membrane proteins. Noritaka Nishida, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Shunsuke Imai, Pavlos Stampoulis, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Ichio Shimada. *J. Magn. Reson.* (invited review)(2013) 241, 86-96.

51. Rapid identification of ligand-binding sites by using an assignment-free NMR approach. Yuya Kodama, Koh Takeuchi, Nobuhisa Shimba, Kohki Ishikawa, Ei-ichiro Suzuki, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. *J. Med. Chem.* (2013) 56(22), 9342-9350.

52. Perdeuteration and methyl-selective ¹H, ¹³C-labeling by using a *Kluyveromyces lactis* expression system. Mayumi Miyazawa-Onami, Koh Takeuchi, Toshiaki Takano, Toshihiko Sugiki, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. *J. Biomol. NMR* (2013) 57, 297-304.

53. Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins Noritaka Nishida, Maho Yagi-Utsumi, Fumihito Motojima, Masasuke Yoshida, Ichio Shimada, Koichi Kato. *J. Biosci. Bioeng.* (2013) 116, 160-164.

54. Identification of a Binding Element for the Cytoplasmic Regulator FROUNT in the Membrane-proximal Carboxy-terminal Region of Chemokine Receptors CCR2 and CCR5. Etsuko Toda, Yuya Terashima, Kaori Esaki, Sosuke Yoshinaga, Minoru Sugihara, Yutaka Kofuku, Ichio Shimada, Makiko Suwa, Shiro Kanegasaki, Hiroaki Terasawa, Kouji Matsushima. *Biochem J.*, (2013) 457, 313-22.

55. Structure of the Mouse Sex Peptide Pheromone ESP1 Reveals a Molecular Basis for Specific Binding to the Class C G-protein-coupled Vomeronasal Receptor. Sosuke Yoshinaga, Toru Sato, Makoto Hirakane, Kaori Esaki, Takashi Hamaguchi, Sachiko Haga-Yamanaka, Mai Tsunoda, Hiroko Kimoto, Ichio Shimada, Kazushige Touhara, Hiroaki Terasawa. *J. Biol. Chem.* (2013) 288, 16064-16072.

56. Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. Takumi Ueda, Koh Takeuchi, Noritaka Nishida, Pavlos Stampoulis, Yutaka Kofuku, Masanori Osawa, Ichio Shimada. *Q.Rev.Biophys.*(2014) in press.
57. Structure-based approach to improve a small-molecule inhibitor by the use of a competitive peptide ligand. Katsuki Ono, Koh Takeuchi, Hiroshi Ueda, Yasuhiro Morita, Ryuji Tanimura, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2014) 53,2597-601.
58. Large Protein Complexes Revealed by Solution-State NMR: G Proteins and G Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Ion Channel. Masanori Osawa, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Koh Takeuchi, Ichio Shimada. *Advances in Biological Solid-State NMR*, Royal Society of Chemistry, (2014) 501-532.
59. Allosteric enhancement of enzymatic activity and substrate selectivity of MAP kinase p38 α by the docking interaction. Yuji Tokunaga, Koh Takeuchi, Hideo Takahashi, Ichio Shimada. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2014) 21, 704-11.
60. Functional dynamics of deuterated β 2-adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR. Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraishi, Keita Kondo, Takuya Mizumura, Shiho Suzuki, and Ichio Shimada. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2014) 3(49), 13376-9.
61. Dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor LmrR. Koh Takeuchi, Yuji Tokunaga, Misaki Imai, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada. *Sci. Rep.* 4, 6922, (2014)
62. Structural basis for the binding of the membrane-proximal C-terminal region of chemokine receptor CCR2 with the cytosolic regulator FROUNT. Esaki K., Yoshinaga S., Tsuji T., Toda E., Terashima Y., Saitoh T., Kohda D., Kohno T., Osawa M., Ueda T., Shimada I., Matsushima K., Terasawa H. *FEBS J.* (2014) 281(24), 5552-66.
63. Development of a method for reconstruction of crowded NMR spectra from undersampled time-domain data. Takumi Ueda¹, Chie Yoshiura¹, Masahiko Matsumoto¹, Yutaka Kofuku, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada. *J. Biomol. NMR* (2014) DOI: 10.1007/s10858-015-9908-9
64. Suppression of problematic compound oligomer by co-solubilization of non-detergent sulfobetaines. Yumiko Mizukoshi, Koh Takeuchi, Misa Arutaki, Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada. *ChemBioChem* (2015)10(4):736-41.
65. Backbone resonance assignments for G protein α 3 subunit in the GDP-bound state. Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Ichio Shimada. *Biomol. NMR Assign.* (2014) 8, 237-41.
66. Backbone and side-chain ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments of the microtubule-binding domain of yeast cytoplasmic dynein in the high and low-affinity states. Osamu Takarada, Noritaka Nishida, Masahide Kikkawa, Ichio Shimada. *Biomol. NMR Assign.* (2014) 8, 379-82.
67. Mechanical force effect on the two-state equilibrium of the hyaluronan binding domain of CD44 in cell rolling. Takashi Suzuki, Miho Suzuki, Shinji Ogino, Ryo Umemoto, Noritaka Nishida, and Ichio Shimada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (2015)112(22):6991-6.
68. Structure-Based Development of a Protein-Protein Interaction Inhibitor Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6. Jun Moriya, Koh Takeuchi, Kenji Tai, Kenzo Arai, Naoki Kobayashi, Naoki Yoneda, Yoshifumi Fukunishi, Atsushi Inoue, Miho Kihara, Takumi Murakami, Kenichi Chiba, and Ichio Shimada. *J. Med. Chem.*, (2015) 58(14):5674-83.
69. Structural basis for the inhibition of voltage-dependent K⁺ channel by gating modifier toxin. Shin-ichiro Ozawa, Tomomi Kimura, Tomohiro Nozaki, Hitomi Harada, Ichio Shimada, and Masanori Osawa. *Sci. Rep.* (2015)18;5:14226.doi:10.1038/srep14226

70. Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR. Koh Takeuchi, Haribabu Arthanari, Ichio Shimada, Gerhard Wagner. *J Biomol NMR* (2015) 63, 323-31.
71. Elucidation of the CCR1-and CCR5-binding modes of MIP-1 α by application of an NMR spectra reconstruction method to the transferred cross-saturation experiments. Chie Yoshiura¹, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Masahiko Matsumoto, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, and Ichio Shimada. *J Biomol NMR* (2015) 63, 330-40.
72. Conformational equilibrium of μ -opioid receptor determines its efficacies and functional selectivities. Junya Okude, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Motohiko Sato, Naoyuki Nobuyama, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Takuya Mizumura, Kento Onishi, Mei Natsume, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, Takefumi Kuranaga, Masayuki Inoue, Ichio Shimada. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2015) 54, 15771-6.
73. Nitrogen-detected TROSY yields comparable sensitivity to proton-detected TROSY for non-deuterated, large proteins under physiological salt conditions. Koh Takeuchi, Haribabu Arthanari, Misaki Imai, Gerhard Wagner, and Ichio Shimada. *J Biomol NMR* (2016) 62,143-51.
74. NMR method for characterizing microsecond-to-millisecond chemical exchanges utilizing differential multiple-quantum relaxation in high molecular weight proteins. Yuki Toyama, Masanori Osawa, Mariko Yokogawa, and Ichio Shimada. *J. Am. Chem. Soc.* (2016) 138, 2302-11.
75. Conductance of P2X₄ receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Takumi Ueda, and Ichio Shimada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (2016) 113, 4741-6.
76. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for structural analysis of actin-binding proteins in complex with actin. Shuxian Huang, Ryo Umemoto, Yuki Tamura, Yutaka Kofuku, Taro Q.P. Uyeda, Noritaka Nishida, and Ichio Shimada. *Sci Rep.* (2016) 6, 33690, doi: 10.1038/srep33690.
77. Improvement of ligand affinity and thermodynamic properties by NMR based evaluation of local dynamics and surface complementarity in the receptor bound state. Yumiko Mizukoshi, Koh Takeuchi, Misa Arutaki, Yuji Tokunaga, Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa, and Ichio Shimada. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2016) doi: 10.1002/anie.201607474.
78. Disulfide mapping the voltage-sensing mechanism of a voltage-dependent potassium channel. Tomohiro Nozaki, Shin-ichiro Ozawa, Hitomi Harada, Tomomi Kimura, Masanori Osawa, and Ichio Shimada. *Sci Rep.* (2016) 6:37303. doi: 10.1038/srep37303.
79. Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses. Yuki Toyama, Hanaho Kano¹, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, and Ichio Shimada. *Nat. Commun.* (2017) doi: 10.1038/ncomms14523
80. Dynamic transcriptional regulation by a multidrug transcriptional repressor LmrR. Koh Takeuchi, Misaki Imai, and Ichio Shimada. *Sci Rep.* (2017) 7(1):267. doi: 10.1038/s41598-017-00257.
81. ATP-dependent modulation of MgtE in Mg²⁺ homeostasis. Tomita A, Zhang M, Jin F, Zhuang W, Takeda H, Maruyama T, Osawa M, Hashimoto KI, Kawasaki H, Ito K, Dohmae N, Ishitani R, Shimada I, Yan Z, Hattori M, Nureki O. *Nat Commun.* 2017 Jul 27;8(1):148. doi: 10.1038/s41467-017-00082-w.
82. Forbidden Coherence Transfer of ¹⁹F Nuclei to Quantitatively Measure the Dynamics of a CF₃-Containing Ligand in Receptor-Bound States. Tokunaga Y, Takeuchi K, Shimada I. *Molecules.* 2017 Sep 7;22(9). pii: E1492. doi: 10.3390/molecules22091492.
83. A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could

represent a potential remedy for fibrosis. Ito S, Ogawa K, Takeuchi K, Takagi M, Yoshida M, Hirokawa T, Hirayama S, Shin-Ya K, Shimada I, Doi T, Goshima N, Natsume T, Nagata K. *J. Biol. Chem.* 2017 Oct 12. pii: jbc.M117.815936. doi: 10.1074/jbc.M117.815936.

84. Nuclear Magnetic Resonance Approaches for Characterizing Protein-Protein Interactions. Toyama Y, Mase Y, Kano H, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I. *Methods Mol Biol.* 2018;1684:115-128. doi: 10.1007/978-1-4939-7362-0_10.

85. Dynamic domain arrangement of CheA-CheY complex regulates bacterial thermotaxis, as revealed by NMR. Yuichi Minato, Takumi Ueda¹, Asako Machiyama, Hideo Iwaï, and Ichio Shimad. *Sci Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-16755-x.

86. Phosphorylation-induced conformation of 2-adrenoceptor related to the arrestin recruitment revealed by NMR. Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Yutaka Kofuku, Shunsuke Imai, Kunio Nakata, Toshimi Mizukoshi, Takumi Ueda, Hideo Iwaï, Ichio Shimada. *Nat. Commun.* 2018 Jan 15;9(1):194. doi: 10.1038/s41467-017-02632-8.

87. Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail. Ryoichi Sawazaki, Shunsuke Imai, Mariko Yokogawa, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino, Muneyo Mio, Kazuhiro Mio, Ichio Shimada, and Masanori Osawa. *Sci Rep.* (2018). Jan 23;8(1):1455. doi: 10.1038/s41598-018-19659-6.

88. Balanced regulation of redox status of intracellular thioredoxin revealed by in-cell NMR. Ayano Mochizuki, Arata Saso, Qingci Zhao, Satoshi Kubo, Noritaka Nishida, Ichio Shimada. *J. Am. Chem. Soc.* (2018) Mar 14;140(10):3784-3790. doi: 10.1021/jacs.8b00426.

89. Structural basis for the ethanol action on G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 revealed by NMR spectroscopy. Yuki Toyama, Hanaho Kano, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawaa, and Ichio Shimada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (2018) 115(15):3858-3863. doi: 10.1073/pnas.1722257115.

90. Functional Roles of Mg²⁺-binding Sites in Mg²⁺-dependent Gating of an Mg²⁺ Channel, MgtE, Revealed by NMR. Tatsuro Maruyama, Masanori Osawa, Shunsuke Imai, Motoyuki Hattori, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, and Ichio Shimada. *eLife* (2018) Apr 3;7. pii: e31596. doi: 10.7554/eLife.31596.

91. Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of 2-adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system. Yutaka Kofuku, Tomoki Yokomizo, Shunsuke Imai, Yutaro Shiraishi, Mei Natsume, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, Kunio Nakata, Shunsuke Igarashi, Hideyuki Yamaguchi, Toshimi Mizukoshi, Ei-ichiro Suzuki, Takumi Ueda, and Ichio Shimada. *J. Biomol NMR* (2018) Mar 8. doi: 10.1007/s10858-018-0174-5.

92. Two alternative conformations of a voltage-gated sodium channel. CJ.Tsai, K.Tani,K. Irie, Y.Hiroaki, T.Shimomura, DG. McMillan, GM. Cook, GFX. Schertler, Y.Fujiyoshi and XD. Li. *J. Mol. Biol.*, 425, 4074-4088 (2013).

93. Structure and closure of connexin gap junction channels. Atsunori Oshima, *FEBS Lett.*, In press(2014).

94. Crystal structure of a Claudin provides insight into the architecture of tight junctions. H. Suzuki, T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki and Y. Fujiyoshi. *Science*, 344, 304-307 (2014).

95. Control of spontaneous Ca²⁺ transients is critical for neuronal maturation in the developing neocortex. Y. Bando, K. Irie, T. Shimomura, H. Umeshima, Y. Kushida, M. Kengaku, Y. Fujiyoshi, T. Hirano and Y. Tagawa. *Cerebral Cortex*, 1-12 (2014).

96. Systematic comparison of molecular conformations of H⁺,K⁺-ATPase reveals an important

contribution of the A-M2 linker for the luminal gating. K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi. *J. Biol. Chem.*, 289, 30590-30601 (2014).

97. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. H. Suzuki, K. Tani, A. Tamura, S. Tsukita and Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.*, 427, 291-297 (2015).

98. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. Y. Saitoh, H. Suzuki, K. Tani, K. Nishikawa, K. Irie, Y. Ogura, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. *Science*, 347, 775-778 (2015).

99. Water channel structures analysed by electron crystallography. K. Tani and Y. Fujiyoshi *Biochem. Biophys. Acta.*, 1840, 1605-1613(2014)

100. Bovine F1FoATP synthase monomers bend the lipid bilayer in 2D membrane crystals. C. Jiko, K.M. Davies, K.S. Itoh, K. Tani, S. Maeda, D.J. Mills, T. Tsukihara, Y. Fujiyoshi W. Kuehlbrandt and C. Gerle *eLIFE*, 06119,1-36 (2015)

101. An intracellular domain with a novel sequence regulates cell surface expression and synaptic clustering of leucine-rich repeat transmembrane proteins in hippocampal neurons. K. Minatohara, Y. Murata, Y. Fujiyoshi and T. Doi. *J. Neurochemistry*, 134, 618-628 (2015).

102. GraDeR: membrane protein complex preparation for single-particle cryo-EM. F. Hauer, C. Gerle, N. Fischer, A. Oshima K. Shinzawa-Itoh, S. Shimada, K. Yokoyama, Y. Fujiyoshi and H. Stark. *Structure*, 23, 1769-1775 (2015).

103. Development of the field of structural physiology. Y. Fujiyoshi. *Proc., Jpn Acad., Ser. B*, 91, 447-468 (2015).

104. Characterization of physiologic phenotypes of dentate gyrus synapses of PDZ1/2 domain-deficient PSD-95 knockin mice. H. Nagura, T. Doi and Y. Fujiyoshi. *European J. Neuroscience*, 43, 618-625 (2016).

105. Claudin-21 has a paracellular channel role at tight junctions. H. Tanaka, Y. Yamamoto, H. Kashihara, Y. Ymazaki, K. Tani, Y. Fujiyoshi, K. Mineta, K. Takeuchi, A. Tamura and S. Tsukita. *Molecular and Cellular Biology*, 36, 1-10 (2016).

106. Two-dimensional crystal structure of aquaporin-4 bound to the inhibitor acetazolamide. A. Kamegawa, Y. Hiroaki, K. Tani, and Y. Fujiyoshi. *Microscopy*, 65, 177-184 (2016).

107. Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. A. Oshima, T. Matsuzawa, K. Murata, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *J. Mol. Biol.*, 428, 1227-1236 (2016).

108. Thermostabilization of the human endothelin type-B receptor. A. Okuta, K. Tani, S. Nishimura, Y. Fujiyoshi and T. Doi. *J. Mol. Biol.*, 428, 2265-2274 (2016)

109. Molecular determinants of prokaryotic voltage-gated sodium channels for recognition of local anesthetics. T. Shimomura, K. Irie and Y. Fujiyoshi. *FEBS J.*, 283, 2881-2895 (2016).

110. Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. W. Shihoya, T. Nishizawa, A. Okuta, K. Tani, N. Dohmae, Y. Fujiyoshi, O. Nureki. and T. Doi. *Nature*, 537, 363-368 (2016).

111. Atomic structure of the innexin-6 gap junction channel determined by cryo-EM. A. Oshima, K. Tani and Y. Fujiyoshi. *Nature Commun*, 7, 13681 (2016).

112. Cryo-electron microscopy for structure analysis of membrane proteins in the lipid bilayer. K. Abe and Y. Fujiyoshi. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 39, 71-78 (2016).

113. Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. H. Suzuki, K. Tani and Y. Fujiyoshi. *Annals of the New York Academy of Sciences*. in press (16-Feb) (2017).

114. The cryo-EM structure of gastric H⁺,K⁺-ATPase with bound BYK99, a high-affinity member of K⁺-competitive, imidazo[1,2-a]pyridine inhibitors. K. Abe, J. Shimokawa, M. Naito, K. Munson, G. Sachs, H. Suzuki, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *Scientific reports*, 7, 6632 (2017).
115. X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog. W. Shihoya, T. Nishizawa, K. Yamashita, A. Inoue, K. Hirata, FMN. Kadji, A. Okuta, K. Tani, J. Aoki, Y. Fujiyoshi, T. Doi, O. Nureki. *Nature Structure & Molecular Biology*, 24, 758-764 (2017).
116. Crystal Structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. H. Suzuki, K. Tani, Y. Fujiyoshi. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 13371, 1-10 (2017).
117. Optimized expression and purification of NavAb provides the structural insight into the voltage dependence. K. Irie, Y. Haga, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi. *FEBS Letters*, 592,274-283 (2018).
118. Thermostability enhancement of mouse claudin-3 in complex with the carboxyl-terminal region of clostridium perfringens enterotoxin improves crystal quality. S. Nakamura, Y. Fujiyoshi and K. Irie. *Acta Crystallographica*, F74, 150-155 (2018).
119. Crystal structures of the gastric proton pump. K. Abe, K. Irie, H. Nakanishi, H. Suzuki and Y. Fujiyoshi. *Nature*, 556, 214–218 (2018).
120. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Akamatsu W, Oyama M, Okano H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. *PLoS ONE*, 8:e66729(2013).
121. Olig1 is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . Motizuki M, Isogaya K, Miyake K, Ikushima H, Kubota T, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K. *J. Biol. Chem.*, 288, 18911-18922 (2013).
122. Three novel ZBTB24 mutations identified in Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. Nitta H, Unoki M, Ichyanagi K, Kosho T, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Franscastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. *J Hum Genet*, 58, 455-460(2013).
123. Sequence-specific microscopic visualization of DNA methylation status at satellite repeats in individual cell nuclei and chromosomes. Li Y, Miyanari Y, Shirane K, Nitta H, Kubota T, Ohashi H, Okamoto A, Sasaki H. *Nucleic Acids Res*, 41, e186 (2013).
124. Epigenomics comes of age with expanding roles in biological understanding and clinical application. Kubota T, Hata K. *J Hum Genet*, 5, 395(2013).
125. Epigenetics in neurodevelopmental and mental disorders. Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. *Med Epigenet*, 1, 52-59 (2013).
126. The role of epigenetics in Rett syndrome. Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. *Epigenomics*, 5, 583-592 (2013).
127. Genetic and clinical factors associated with reticular pseudodrusen in exudative age related macular degeneration. Yoneyama S, Sakurada Y, Mabuchi E, Imasawa M, Sugiyama A, Kubota T, Iijima H. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 252, 1435-1441 (2014).
128. Genetic variants in the SKIV2L gene in exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. Yoneyama S, Sakurada Y, Mabuchi E, Sugiyama A, Kubota T, Iijima H. *Ophthalmic Genetics*, 35, 151-155 (2014).
129. Epigenetics as a basis for diagnosis of neurodevelopmental disorders: challenges and opportunities. Kubota T, Miyake K, Hariya M, Mochizuki K. *Expert Rev Mol Diagn* 14, 685-697(2014).

130. Aqueous humor cytokine levels in patients with oypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration. Sakurada Y, Nakamura Y, Yoneyama S, Mbuchi F, Gotoh T, Tateno Y, Sugiyama A, Kubota T, Iijima H. *Ophthalmic Res*, 53, 2-7 (2015).
131. Long-term imipramine treatment increases N-methyl-D-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms. Nghia NA, Hirasawa T, Kasai H, Obata C, Moriishi K, Mochizuki K, Koizumi S, Kubota T. *Eur J Pharmacol* 752C, 69-77 (2015).
132. A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele. Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitsu T, Ikeda Y, Yasumi T, Yoshida K, Wada T, Miyake K, Kubota T, Okuno Y, Muramatsu H, Adachi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. *J Clin Immunol*, 35, 244-248(2015).
133. Putative PPAR target genes express highly in skeletal muscle of insulin-resistant MetS model SHR/NDmc-cp rats. Hariya N, Miyake K, Kubota T, Goda T, Mochizuki K. *J Nutr Sci Vitaminol* 68:28-36 (2015).
134. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. *J Dev Orig Health Dis* (2015):1-9.
135. Maternal restraint stress during pregnancy in mice induces 11 β -HSD1-associated metabolic changes in the livers of the offspring. Maeyama H, Hirasawa T, Tahara Y, Obata C, Kasai H, Moriishi K, Mochizuki K, Kubota T. *J Dev Orig Health Dis* (2015):1-10.
136. Epigenomic-basis of preemptive medicine for neurodevelopmental disorders. Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. *Current Genet* (in press)
137. Risk factors for second eye involvement in eyes with unilateral polypoidal choroidal vasculopathy. Tateno Y, Sakurada Y, Yoneyama Y, Kikushima W, Mabuchi F, Sugiyama A, Tanabe N, Kubota T, Iijima H. *Ophthalmic Genetics* (in press).
138. Epigenomic-basis of Preemptive Medicine for Neurodevelopmental Disorders. Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. *Curr Genomics*16:175-182(2015).
139. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. *J Dev Orig Health Dis* 6:96-104(2015).
140. Maternal restraint stress during pregnancy in mice induces 11 β -HSD1-associated metabolic changes in the livers of the offspring. Maeyama H, Hirasawa T, Tahara Y, Obata C, Kasai H, Moriishi K, Mochizuki K, Kubota T. *J Dev Orig Health Dis* 6:105-114(2015).
141. Aqueous humor cytokine levels in patients with oypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration. Sakurada Y, Nakamura Y, Yoneyama S, Mbuchi F, Gotoh T, Tateno Y, Sugiyama A, Kubota T, Iijima H. *Ophthalmic Res* 53, 2-7(2015).
142. Long-term imipramine treatment increases N-methyl-D-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms. Nghia NA, Hirasawa T, Kasai H, Obata C, Moriishi K, Mochizuki K, Koizumi S, Kubota T. *Eur J Pharmacol* 752:69-77(2015).
143. A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele. Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitsu T, Ikeda Y, Yasumi T, Yoshida K, Wada T, Miyake K, Kubota T, Okuno Y, Muramatsu H, Adachi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. *J Clin Immunol* 35:244-248 (2015).
144. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Matsumoto T, Yamaguchi R,

Sanosaka T, Okada Y, Kobayashi T, Ohyama M, Nakashima K, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Mol Brain 8:31(2015).

145. Multicentric occurrence of multiple papillary thyroid carcinomas -HUMARA and BRAF mutation analysis. Nakazawa T, Kondo T, Tahara I, Kasai K, Inoue T, Oishi N, Mochizuki K, Kubota T, Katoh R. Cancer Med 2015 Apr 17. doi: 10.1002/cam4.466.

146. Willingness of Japanese patients with breast cancer to have genetic testing of BRCA without burden of expenses. Nakagomi H, Sakamoto I, Hirotsu Y, Amemiya K, Mochizuki H, Inoue M, Nakagomi S, Kubota T, Omata M. Breast Cancer 2016 Jul;23(4):649-53.

147. Mutations in CDCA7 and HELLS cause Immunodeficiency, Centromeric Instability and Facial Anomalies Syndrome. Thijssen P, Ito Y, Grillo G, Wang J, Velasco G, Nitta H, Unoki M, Yoshihara M, Suyama M, Sun Y, Lemmers RJLF, de Greef JC, Gennery A, Picco P, Kloeckener-Gruissem B, Gungör T, Reisli I, Picard C, Kebaili K, Roquelaure B, Iwai T, Kondo I, Kubota T, van Ostaijen-Ten Dam MM, van Tol MJD, Weemaes C, Francastel C, van der Maarel SM, Sasaki H. Nat Commun 2015 Jul 28;6:7870. doi: 10.1038/ncomms8870.

148. Risk factors for second eye involvement in eyes with unilateral polypoidal choroidal vasculopathy. Tateno Y, Sakurada Y, Yoneyama Y, Kikushima W, Mabuchi F, Sugiyama A, Tanabe N, Kubota T, Iijima H. Ophthalmic Genet 2016 Jun;37(2):177-82.

149. ChREBP binding and histone modifications modulate hepatic expression of the Fasn gene in a metabolic syndrome rat model. Suzuki T, Muramatsu T, Morioka K, Goda T, Mochizuki K. Nutrition 31:877-83 (2015).

3. 当省(国)が実施することの必要性

第1章 I. 3. 「当省(国)が実施することの必要性」の記載を参照されたい。

本プロジェクトは、微生物由来の天然化合物の効率的な生産に資する技術や未利用遺伝資源の活用に関する技術、ITを活用した創薬効率の向上に資する技術等、広く製薬業界に普及可能な基盤技術の開発を目指すものであり、合成や構造解析、インフォマティクス等、多種多様な専門家が結集して研究を進める必要がある。基礎研究の要素が強い部分もあり、個々の企業が独自に投資するのは困難な内容であるため、国の委託事業として研究開発を実施し、開発成果を製薬企業やアカデミアへ導出・普及させていくことを目指すのが適切である。

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

アウトカム指標として数値目標を設定しているのは、ITに関する課題で開発された「シミュレーションソフトウェアの利用件数」だが、天然化合物、ITに関する両課題とも、最終的には開発成果を製薬企業等へ導出し、社会実装することを目標としている。下図 2-B-1 のとおり、天然化合物の生産技術開発課題においては、本課題の核となる 200kb を超える放線菌の巨大生合成遺伝子クラスターを遺伝子組換えにより生産株に異種発現させる技術の開発や化合物生産のメカニズム解析を実施しつつ、開発された技術を活用して未利用遺伝資源へと展開するなど、有用天然化合物の多様性を広げるための技術開発へと広げていくことで、技術の完成度を高めた。ITを活用した医薬品創出基盤技術開発においては、下図 2-B-2 のとおりタンパク質の精密な構造解析とシミュレーションソフトの開発を並行して進めつつ、実証研究において、その有用性を確認していくというスキームとした。これにより、天然化合物の高度製造技術、及びシミュレーション/スクリーニング用ソフトウェア(myPresto)が完成し、次世代天然物化学技術研究組合の組合員企業を中心に社会実装を進めているところである。

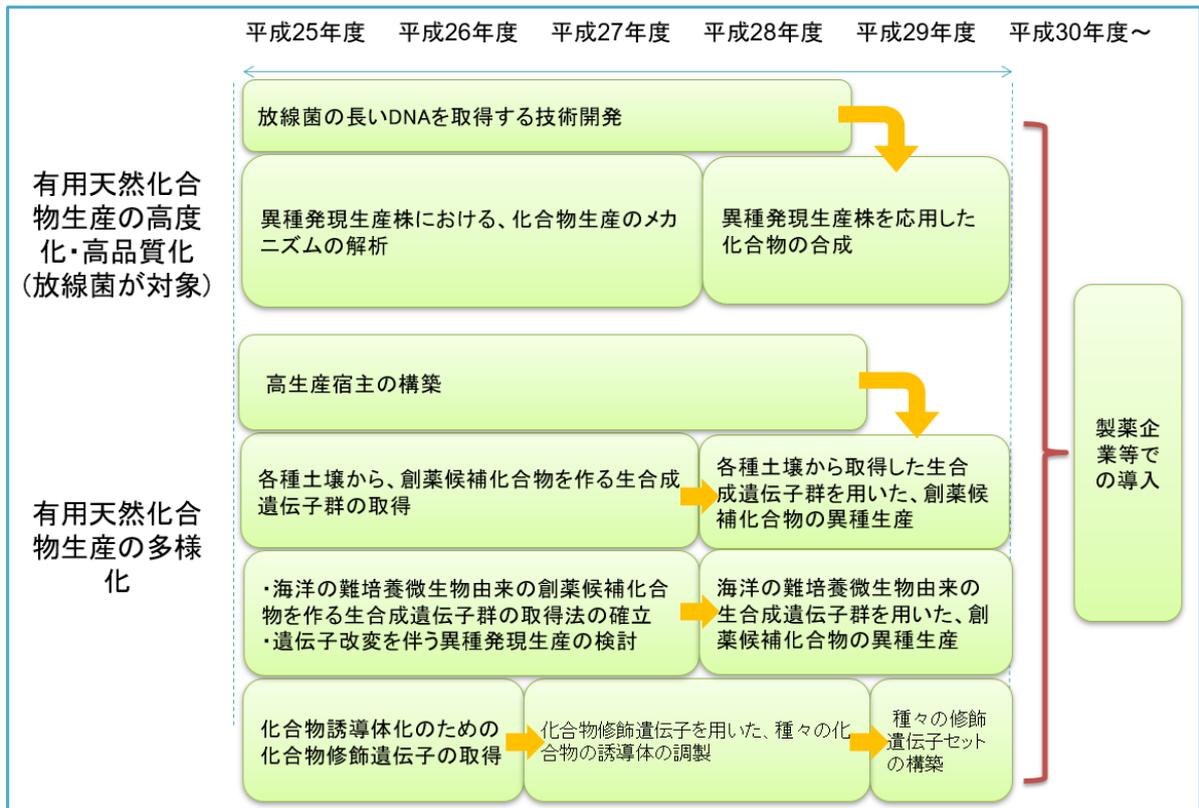


図 2-B-1. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ
(①次世代型有用天然化合物の生産技術開発)

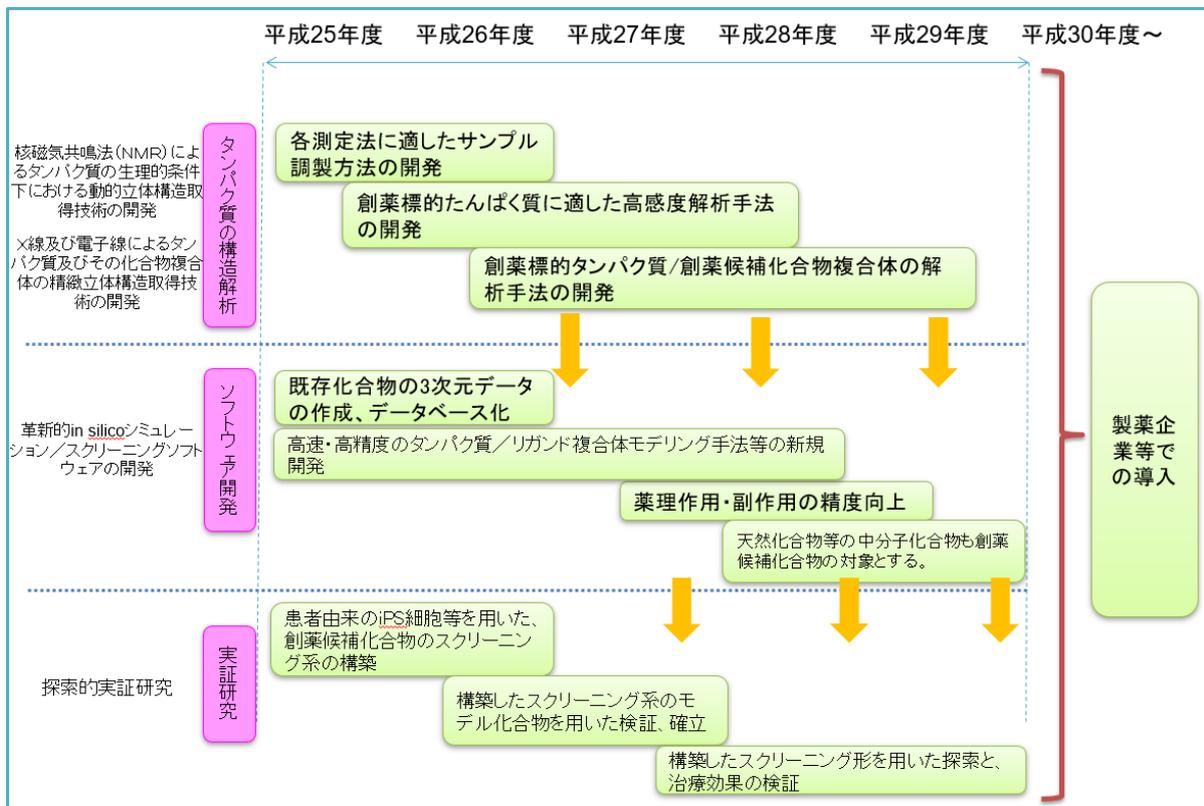


図 2-B-2. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ
(②ITを活用した革新的医薬品創出基盤技術開発)

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

下図のとおり、本プロジェクトでは課題①（天然化合物）と課題②（IT）にそれぞれ研究開発代表者を置く体制とした。課題①については天然物化学の分野で著名な専門家である新家一男氏（次世代天然物化学研究組合／産業技術総合研究所）を、課題②については NMR による構造解析の分野で著名な専門家である嶋田一夫氏（次世代天然物化学技術研究組合／東京大学）をプロジェクトリーダーとし、再委託先として国内の大学、国立研究開発法人等の研究者も参画して一体的な研究を行った。また、両プロジェクトリーダーが所属する次世代天然物化学技術研究組合には、組合員として 32 企業（主に製薬）が所属している。これらの企業を成果の想定導出先として、ユーザーニーズを吸い上げつつ事業を進めることで、社会実装を見据えた開発が可能となっている。

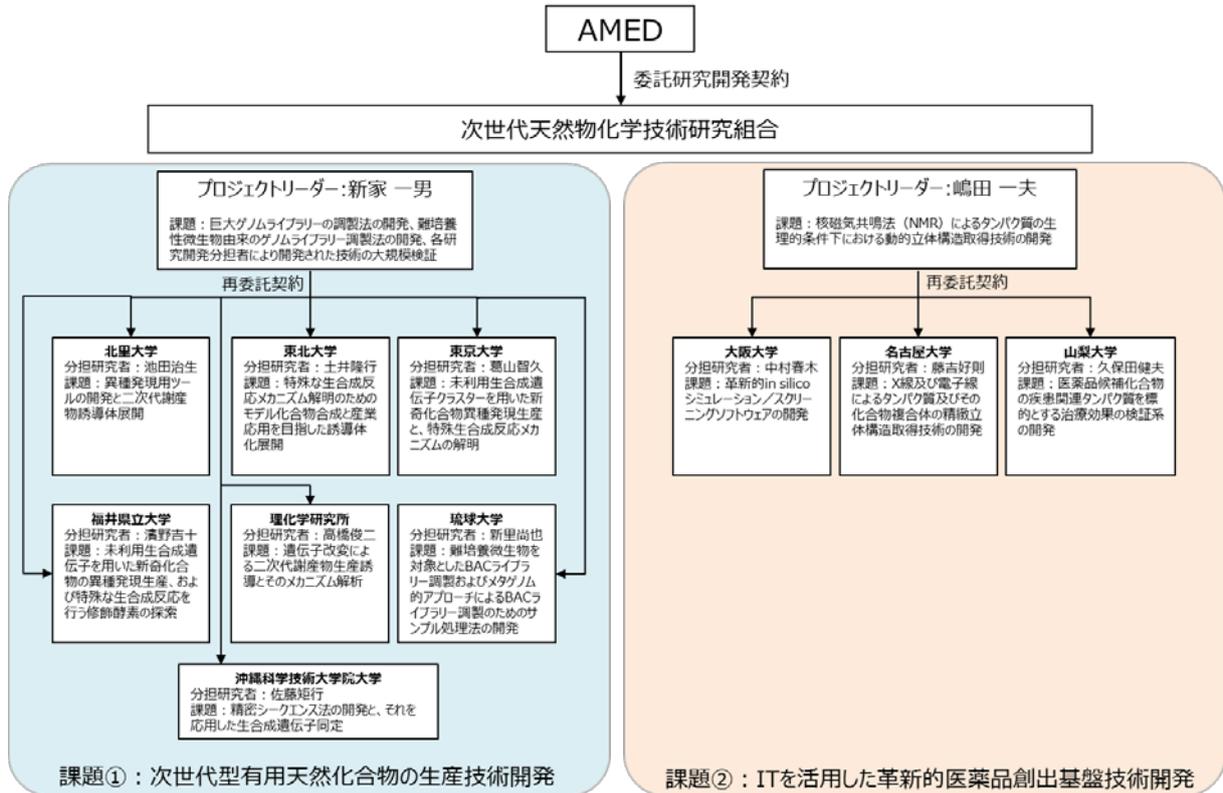


図 2-B-3. 事業実施体制図

なお、本プロジェクトについては、AMED の課題評価委員会にて下記のように事後評価が行われている。

研究課題① 次世代型有用天然化合物の生産技術開発

<委員>

	氏名	所属、役職（評価当時）
	伊藤 美千穂	京都大学大学院 薬学研究科 准教授
	井上 将行	東京大学大学院 薬学系研究科 教授
委員長	上村 大輔	神奈川大学 特別招聘教授
	江口 正	東京工業大学 理学院 教授
	永次 史	東北大学 多元物質科学研究所 教授
	藤本 ゆかり	慶應義塾大学 理工学部化学科 教授
	脇本 敏幸	北海道大学大学院 薬学研究院 教授

<評価結果（AMED 事後評価報告書から引用）>

【評価結果】

特に優れている

【評価コメント】

創薬に用いるための複雑な天然化合物生産において、これまで生合成遺伝子を用いた異種発現生産を用いるための課題であった巨大生合成遺伝子クラスター取得および導入技術の開発については、当初の目的をほぼ達成したと判断する。これにより、これまで実用的でないと考えられてきた天然化合物の異種発現技術を実用的なレベルに引き上げることができた。今後は、天然化合物をベースとした医薬品開発の可能性を広げるために、異種発現技術を用いた新規化合物の創出等を考える必要がある。

研究課題② IT を活用した革新的医薬品創出基盤技術開発

<委員>

	氏名	所属、役職（評価当時）
	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所 創薬化学研究所 上席研究員
	七田 芳則	立命館大学 総合科学技術研究機構 客員教授
	杉尾 成俊	東京工業大学 科学技術創成研究院 特任教授
	泰地 真弘人	理化学研究所生命システム研究センター 計算分子設計研究グループ グループディレクター
	月原 富武	兵庫県立大学 生命理学研究科 特任教授
委員長	西村 善文	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 特任教授
	水口 賢司	医薬基盤・健康・栄養研究所バイオインフォマティクスプロ ジェクト プロジェクトリーダー

<評価結果（AMED 事後評価報告書から引用）>

<p>【評価結果】 優れている</p> <p>【評価コメント】 革新的 <i>in silico</i> シミュレーション/スクリーニング技術開発では、蛋白質の動的構造変化を考慮したモデリング手法を開発し、複数の例で活性化化合物を見出すことができた。また、蛋白質構造解析技術では、クライオ電顕による単粒子解析法、高感度 NMR 測定法等により、創薬標的となりうる複数の膜蛋白質の立体構造決定に成功した。いずれの研究項目も当初の目的を達成したと判断する。今後は、各要素技術を連携させた創薬基盤技術パッケージとしての提示およびその検証を考える必要がある。</p>

6. 費用対効果

医薬品の開発成功率は低下を続けており、創薬の効率化が喫緊の課題となっている。本プロジェクトでは、日本が古くから得意としている天然物創薬において課題となっている「物質生産に関与する遺伝子が存在するにも関わらず発現させられない（活用しきれない）」、「有望な化合物を作る微生物を見出しても生産量が少なすぎて実用化できない」といった問題点を解決する研究開発を実施した。これにより天然化合物の裾野を広げるとともに、製造における弱点を克服できれば、天然物創薬の巻き返しが期待される。また、IT を活用した医薬品創出基盤技術開発課題において、*in silico* シミュレーション/スクリーニングソフトウェアを開発することにより、創薬プロセスを合理化・最適化し、従来の低分子化合物スクリーニングのみからでは得られない構造的多様性を有する医薬品候補化合物の設計が可能となる。これによる、日本発の医薬品割合を引き上げることができれば、大きな経済効果が期待される。

C. 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

プロジェクト名	体液中マイクロRNA測定技術基盤開発																							
行政事業レビューとの関係	平成31年度行政事業レビューシート（事業番号0031）																							
上位施策名	<ul style="list-style-type: none"> ○健康・医療戦略（平成26年7月22日閣議決定） ○医療分野研究開発推進計画（平成26年7月22日健康・医療戦略推進本部決定、平成29年2月17日一部変更） ○第5期科学技術基本計画（平成28年1月22日閣議決定） ○未来投資戦略2017（平成29年6月9日閣議決定） 																							
担当課室	生物化学産業課																							
<p>プロジェクトの目的・概要</p> <p>高齢化に伴いがんや認知症の患者は増加を続けており、低侵襲な早期診断技術の確立が強く望まれている。したがって、採血という簡便かつ低侵襲の手法により、13種類のがんや認知症を特定する診断技術を開発することで、先制医療を実現し患者のQuality of Lifeの向上と医療費の増加を抑制することを目的とする。</p> <p>具体的には、末梢血中に存在する、がん細胞等が分泌するエクソソームに含まれるmiRNA（マイクロRNA）に着目し、国立がん研究センター及び国立長寿医療研究センターが蓄積している臨床情報と血液サンプルを利用して、miRNAを大規模に解析し、各種疾患の患者において特徴的なmiRNAのパターンを見出すとともに、データベースを構築する。また、採血した少量の血液から簡便に測定可能な診断システムを併せて開発する。</p>																								
<p>予算額等（委託） （単位：百万円）</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>開始年度</th> <th>終了年度</th> <th>中間評価時期</th> <th>終了時評価時期</th> <th>事業実施主体</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>平成26年度</td> <td>平成30年度</td> <td>平成28年度</td> <td>平成30年度</td> <td>国立がん研究センター、東レ等</td> </tr> <tr> <td>H28FY 執行額</td> <td>H29FY 執行額</td> <td>H30FY 執行額</td> <td>総執行額</td> <td>総予算額</td> </tr> <tr> <td>1,585</td> <td>1,437</td> <td>1,552</td> <td>7,898</td> <td>7,899</td> </tr> </tbody> </table>					開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体	平成26年度	平成30年度	平成28年度	平成30年度	国立がん研究センター、東レ等	H28FY 執行額	H29FY 執行額	H30FY 執行額	総執行額	総予算額	1,585	1,437	1,552	7,898	7,899
開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体																				
平成26年度	平成30年度	平成28年度	平成30年度	国立がん研究センター、東レ等																				
H28FY 執行額	H29FY 執行額	H30FY 執行額	総執行額	総予算額																				
1,585	1,437	1,552	7,898	7,899																				

1. 事業アウトカム

事業アウトカム指標		
「開発成果による製品の数」 開発したデータベース及び miRNA 測定技術を利用した製品の上市数		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成 26 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成 28 年度）	計画：0	実績：0
終了時評価時（平成 31 年度）	計画：0	実績：0
目標最終年度（令和 5 年度予定）	計画：5	

本プロジェクトでは、開発成果の社会実装を担うべく、東レ株式会社、株式会社東芝、アークレイ株式会社及びプレジジョン・システム・サイエンス株式会社の4社が参画し、それぞれ研究開発を行った。また、実施者とは別に、診断薬企業及び診断機器企業等からなるユーザーフォーラムを設置し、開発成果の橋渡しを進めた。そのため、事業アウトカム指標においては、プロジェクト内で研究開発を行った4社と、ユーザーフォーラム内の1社とから、それぞれ1製品ずつ、計5製品が上市されることを目標値とした。また、例えば開発成果を医療用診断薬として上市するためには、体外診断用医薬品としてPMDAの承認を受ける必要があり、製品の上市までに数年間程度を要すると考えられることから、目標最終年度をプロジェクト終了後5年後である令和5年度に設定している。

現時点では、東レ株式会社が開発成果を利用した製品（がん検査キット）について4月8日に厚生労働省から先駆け審査指定を受けており、早期に承認・上市される可能性が高い。また、株式会社東芝は2020年から開発成果の実証試験を予定している。他社においても、継続した研究開発が進められていると考えられ、目標最終年度までに種々の製品が上市されることが期待される。

例えばがんにおいては、診断されてから5年間生存できる方の割合は着実に向上しているものの、今後生存率を更に改善するためには、がんを早期に発見し、患者個人の病状を的確に把握し、それに応じた早期治療に結びつける必要がある。miRNAを用いた診断技術は、早期の診断に有用性を発揮すると考えられ、各社の製品が上市されれば、がん等の早期診断における我が国の国際競争力が大きく向上するとともに、早期治療により人々の健康寿命を大きく伸ばすことも期待される。

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

(1) 研究開発内容

研究開発項目	参画機関
① 患者体液中 miRNA の網羅的解析	国立がん研究センター、国立長寿医療研究センター、東レ、JMAC※、JBIC※
② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築	国立がん研究センター、国立長寿医療研究センター、東レ、JMAC、JBIC
③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発	国立がん研究センター、国立長寿医療研究センター、東レ、JBIC
④ 臨床現場での使用に向けた検査システムの開発	東レ、東芝、アークレイ、京都工繊大、PSS※、JBIC

※JMAC：特定非営利活動法人バイオ計測技術コンソーシアム

JBIC：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

PSS：プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

研究開発項目① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

国立がん研究センター（NCC）、国立長寿医療研究センター（NCGG）のバイオバンクに保存されている血清、および連携8大学等で収集した検体について高感度DNAチップを用いた網羅的なmiRNA解析を完了した。具体的には、15種のがん（胃がん、大腸がん、食道がん、膵臓がん、肝がん、胆

道がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膀胱がん、神経膠腫、肉腫、および眼腫瘍、子宮肉腫を期中追加)、アルツハイマー病等の認知症患者検体等を計 53,463 検体解析した。また、これらの検体に対応する臨床情報を取得した。なお、これらの検体には早期がん検出用マーカーの選定用の評価に加えて、薬効予測、予後予測などの臨床上有用な評価を実施するためのマーカー選定のための検体を含む。

さらに NCC においてがんマーカーの検証を実施するための前向き研究を実行し、13 種のがん患者由来血清、1908 症例分を収集し解析を行った。一方、これらの検体の臨床情報については、がん検体については「院内がん登録情報」「診療科データベース」、認知症検体については NCGG バイオバンクの情報に基づいて収集した。解析数は約 5,3000 例に上った。

また、miRNA プロファイル測定に際し、結果の相互比較、測定系の精度、再現性の評価のため、共同研究体制内での内部標準の選定、miRNA 標準物質の開発、マイクロアレイを用いた精度管理手法開発、短鎖核酸の定量的評価技術開発、標準血清の選定と配布を行った。

研究開発項目② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

本プロジェクトのデータベース運用については、事業参加機関による「データベース開発進捗会議」において、医薬品の開発データを保管するためのデータベースの要件および国際標準の動向を考慮し、生データの保全を最も重要な要件とすることを開発の方針とした。この方針に基づき、データベース要件定義書を調べ、開発したデータベースに NCC、NCGG はじめ本プロジェクトに提供された検体の miRNA 発現プロファイル、および臨床情報を登録し、データ格納・解析用フロントエンドのユーザー・インターフェースにより必要なデータを登録、取得できるシステムを構築、運用した。なお、本システムは NCC 内にスタンドアローンの系として構築し、情報の機密性を保持した。

このシステムには、実施課題①で収集した臨床情報および高感度 DNA チップによるマイクロ RNA 解析データを統合的に収容した。また、臨床情報や実験の設定に対応した横断的検索システムを設計し、実施課題③で実施したマーカー選定・検証に必要な情報を提供した。

また、本事業ではユーザーフォーラムを設置した。会員を募集し、ユーザーフォーラム報告会を平成 27 年度より各年 2 回開催し、プロジェクト開発の進捗状況、前向き臨床研究の実施概要、miRNA を用いた診断法の開発や新規診断マーカーの開発、及び統計解析手法についてフォーラム会員向けの報告を行った。

研究開発項目③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

乳がん、大腸がん、胃がん、食道がん、肝臓がん、膵臓がん、胆道がん、肺がん、卵巣がん、神経膠腫、膀胱がん、前立腺がん、骨軟部腫瘍について診断マーカーの同定を行い、それぞれ感度・特異度が 90% を超える結果を得た。また、アルツハイマー病、血管性認知症、レビー小体型認知症について、それぞれ健康人と判別する結果を得た。さらに deep learning の手法により、13 種のがんを同時に判別する手法を考案し、各種がんの判別を得た。これらの結果に基づき、新規に採取する検体による前向き検証評価を実施した。

さらに、各がんのサブタイプ分類や薬剤感受性などの治療方針決定に寄与する形質等との関連性を臨床医のニーズに応じて解析し、乳がんにおいて臨床的に有用な形質を判別するアルゴリズムを開発した。

研究開発項目④ 臨床現場での使用に向けた検査システムの開発

参画企業が主体となって、「DNA チップ技術を基とした検査用試薬類・機器・プロトコル・標準物質ならびに検査システムの開発とこれらの検証」、「簡便、短時間に RNA を抽出、精製する技術、miRNA を増幅する技術、および全自動で miRNA を検出する技術の開発」、「RNA に特異的な核酸プローブを用いた miRNA 測定システムの開発」、及び「疾患組織由来エクソソーム中 miRNA の抽出・精製および miRNA 解析を行う全自動検査システムの開発」を行った。

(2) 事業アウトプット

事業アウトプット指標		
がんやアルツハイマーを特定するための診断アルゴリズム数		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成 26 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成 28 年度）	計画：5	実績：5（達成）
終了時評価時（平成 31 年度）	計画：15	実績：20（達成）

上記アルゴリズムは、乳がん、大腸がん、胃がん、食道がん、肝臓がん、膵臓がん、胆道がん、肺がん、卵巣がん、神経膠腫、膀胱がん、前立腺がん、骨軟部腫瘍といったがんのほか、アルツハイマー病、血管性認知症、レビー小体型認知症についてのものであり、各診断アルゴリズムを用いた検出キット等について、既に特許出願を行っている。

<共通指標実績>

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプの作成
82	－	51	－	－	－	－

本プロジェクトの成果について、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膀胱がん、骨軟部腫瘍、認知症のマーカの同定に関する論文を含めた論文 82 件、学会等の公表 204 件で公開するとともに、1 回の国際シンポジウム、3 回の国内シンポジウムを主催して公表した。また、マーカー及び検出キット等に関する国内外の特許 51 件を出願した。

(学会誌、雑誌等による発表論文一覧)

1. Large-scale circulating microRNA profiling for the liquid biopsy of prostate cancer. Urabe F, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Kimura T, Hara T, Ichikawa M, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Sakamoto H, Kato K, Egawa S, Fujimoto, Ochiya T. Clin Cancer Res 2019
2. Circulating miRNA Panels for Specific and Early Detection in Bladder Cancer. Usaba W, Urabe F, Yamamoto Y, Matsuzaki J, Sasaki H, Ichikawa M, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Kato K, Egawa S, Chikaraishi T, Fujimoto H, Ochiya T. Cancer Sci. 2018
3. The development of a prediction model using serum microRNAs for evaluating axillary lymph node metastasis in breast cancer. Shiino S, Matsuzaki J, Shimomura A, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Aoki Y, Yoshida M, Tamura K, Kinoshita T, Kitagawa Y, Ochiya T. Clin Cancer Res (in press)
4. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. Yokoi A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yoneoka Y, Takahashi K, Shimizu H, Uehara T, Ishikawa M, Ikeda SI, Sonoda T, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Sakamoto H, Kato K, Kato T, Ochiya T. Nat Commun. 2018
5. Extracellular vesicles and encapsulated miRNAs as emerging cancer biomarkers for novel liquid biopsy. Yoshioka Y, Katsuda T, Ochiya T. Jpn J Clin Oncol. 2018
6. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. Sanchez Galle A, Kawamura Y, Yamamoto Y, Takeshita F, Ochiya T. Cancer Sci. 2018
7. Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires.

Yasui T, Yanagida T, Ito S, Konakade Y, Takeshita D, Naganawa T, Nagashima K, Shimada T, Kaji N, Nakamura Y, Thiodorus IA, He Y, Rahong S, Kanai M, Yukawa H, Ochiya T, Kawai T, Baba Y. *Sci Adv.* 2017

8. The small vesicular culprits: the investigation of extracellular vesicles as new targets for cancer treatment.

Urabe F, Kosaka N, Yoshioka Y, Egawa S, Ochiya T. *Clin Transl Med.* 2017

9. Extracellular vesicle-encapsulated microRNA-761 enhances pazopanib resistance in synovial sarcoma. Shiozawa K, Shuting J, Yoshioka Y, Ochiya T, Kondo T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018

10. A combination of circulating miRNAs for the early detection of ovarian cancer. Yokoi A, Yoshioka Y, Hirakawa A, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Niimi K, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. *Oncotarget.* 2017

11. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. *Mol Aspects Med.* 2018

12. A tissue microRNA signature that predicts the prognosis of breast cancer in young women. Hironaka-Mitsunashi A, Matsuzaki J, Takahashi RU, Yoshida M, Nezu Y, Yamamoto Y, Shiino S, Kinoshita T, Ushijima T, Hiraoka N, Shimizu C, Tamura K, Ochiya T. *PLoS One.* 2017

13. Circulating MicroRNA-92b-3p as a Novel Biomarker for Monitoring of Synovial Sarcoma. Uotani K, Fujiwara T, Yoshida A, Iwata S, Morita T, Kiyono M, Yokoo S, Kunisada T, Takeda K, Hasei J, Numoto K, Nezu Y, Yonemoto T, Ishii T, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T. *Sci Rep.* 2017

14. Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. Takano Y, Masuda T, Iinuma H, Yamaguchi R, Sato K, Tobo T, Hirata H, Kuroda Y, Nambara S, Hayashi N, Iguchi T, Ito S, Eguchi H, Ochiya T, Yanaga K, Miyano S, Mimori K. *Oncotarget.* 2017

15. MicroRNA-125b expression and intrahepatic metastasis are predictors for early recurrence after hepatocellular carcinoma resection. Shimagaki T, Yoshizumi T, Harimoto N, Yoshio S, Naito Y, Yamamoto Y, Ochiya T, Yoshida Y, Kanto T, Maehara Y. *Hepatol Res.* 2018

16. Identification of the novel 3' UTR sequences of human IL-21 mRNA as potential targets of miRNAs. Enomoto Y, Takagi R, Naito Y, Kiniwa T, Tanaka Y, Hamada-Tsutsumi S, Kawano M, Matsushita S, Ochiya T, Miyajima A. *Sci Rep.* 2017

17. Maintaining good miRNAs in the body keeps the doctor away?: Perspectives on the relationship between food-derived natural products and microRNAs in relation to exosomes/extracellular vesicles. Otsuka K, Yamamoto Y, Matsuoka R, Ochiya T. 2018

18. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. Fujiwara T, Uotani K, Yoshida A, Morita T, Nezu Y, Kobayashi E, Yoshida A, Uehara T, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Takeda K, Kunisada T, Kawamura M, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T. *Oncotarget.* 2017

19. Exosomes: toward clinical application. Kadota T, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. *Nihon*

Yakurigaku Zasshi. 2017

20. Extracellular vesicles as trans-genomic agents: Emerging roles in disease and evolution. Kawamura Y, Yamamoto Y, Sato TA, Ochiya T. *Cancer Sci.* 2017
21. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review. Matsuzaki J, Ochiya T. *Int J Clin Oncol.* 2017
22. The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. Takahashi RU, Prieto-Vila M, Hironaka A, Ochiya T. *Clin Chem Lab Med.* 2017
23. Extracellular vesicles: Toward a clinical application in urological cancer treatment. Urabe F, Kosaka N, Kimura T, Egawa S, Ochiya T. *Int J Urol.* 2018
24. Imaging of angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by uptake of exosomes secreted from hepatocellular carcinoma cells. Yukawa H, Suzuki K, Aoki K, Arimoto T, Yasui T, Kaji N, Ishikawa T, Ochiya T, Baba Y. *Sci Rep.* 2018
25. A Challenge to Aging Society by microRNA in Extracellular Vesicles: microRNA in Extracellular Vesicles as Promising Biomarkers and Novel Therapeutic Targets in Multiple Myeloma. Yamamoto T, Kosaka N, Hattori Y, Ochiya T. *J Clin Med.* 2018
26. Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. Somiya M, Yoshioka Y, Ochiya T. *J Extracell Vesicles.* 2018
27. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A. Hashimoto K, Ochi H, Sunamura S, Kosaka N, Mabuchi Y, Fukuda T, Yao K, Kanda H, Ae K, Okawa A, Akazawa C, Ochiya T, Futakuchi M, Takeda S, Sato S. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018
28. The Sox2 promoter-driven CD63-GFP transgenic rat model allows tracking of neural stem cell-derived extracellular vesicles. Yoshimura A, Adachi N, Matsuno H, Kawamata M, Yoshioka Y, Kikuchi H, Odaka H, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. *Dis Model Mech.* 2018
29. Extracellular Vesicles: New Players in Lung Immunity. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018
30. Extracellular microRNAs and oxidative stress in liver injury: a systematic mini review. Matsuzaki J, Ochiya T. *J Clin Biochem Nutr* 2018
31. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review. Matsuzaki J, Ochiya T. *Int J Clin Oncol* 2017
32. Multilateral Strategies Utilizing Exosomes for Cancer Therapy. Nishida-Aoki N, Ochiya T. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2017
33. The biological role of exosomes in bone remodeling and bone diseases. Urabe F, Yoshioka Y, Ochiya T. *Clin Calcium.* 2018
34. がん臨床現場でのマーカー意義と miRNA マーカーへの期待 加藤健 miRNA の最新知識 ~基礎領域から診断・治療応用まで~ 落谷孝広編 2017

35. 癌のリキッドバイオプシーによるプレジジョンメディシン 松崎潤太郎, 落谷孝広. *The Lipid* 2018
36. 血中マイクロ RNA 測定による膵がん・胆道がんの早期診断 松崎潤太郎, 落谷孝広. *胆と膵* 2018
37. がん早期診断に変革をもたらす新技術の可能性と課題 松崎潤太郎, 落谷孝広. *公衆衛生* 2018
38. マイクロRNAを用いたがん診断の進歩と現状 松崎潤太郎, 落谷孝広. *東京小児科医会報* 2017
39. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. *Cancer Sci.* 2016
40. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. J Clin Invest. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. 2016
41. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016
42. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. *Sci Rep.* 2016
43. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. *Cell Mol Life Sci.* 2017
44. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. *Int J Mol Sci.* 2016
45. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. *Clin Genitourin Cancer.* 2016
46. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. *Oncogene.* 2016
47. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. Shimomura A, Shiino S, Kawauchi K, Takizawa S, Sakamoto H, Matsuzaki J, Ono M, Takeshita F, Niida S, Shimizu C, Fujiwara Y, Kinoshita T, Tamura K, Ochiya T, *Cancer Science.* 2016
48. 血液中のマイクロ RNA 検出によるバイオマーカー探索の可能性. 市川真紀子, 滝澤聡子, 落谷孝広, 2015
49. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, et al. *Nature communications.* 2014

50. Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy. Kosaka N, Yoshioka Y, Tominaga N, Hagiwara K, Katsuda T, Ochiya T. *Future oncology*. 2014
51. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, et al. *Science signaling*. 2014
52. Interactions between cancer cells and normal cells via miRNAs in extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences* Nishida-Aoki N, Ochiya T.: CMLS. 2015
53. miRNA が拓く新たな地平. 落谷孝広 *医薬ジャーナル* 2014
54. エクソソーム研究が切り開く新規疾患診断法. 吉岡祐亮, 落谷孝広 *BIO Clinica* 2014
55. miRNA を用いたがん診断の現状と展望. 吉岡祐亮, 落谷孝広 *医薬ジャーナル* 2014
56. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S., *Biomarker Research*. 2016
57. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K., *Experimental Animals*. 2016
58. γ -Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S., *Scientific Reports*. 2016
59. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T., *Current Alzheimer Research*. 2016
60. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M., *PLOS ONE*. 2017
61. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T., *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017
62. Sarcopenia is associated with impairment of activities of daily living in Japanese patients with early-stage Alzheimer disease. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T., *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2017
63. PTPRQ as a potential biomarker for idiopathic normal pressure hydrocephalus. Nagata Y, Bundo M, Sugiura S, Kamita M, Ono M, Hattori K, Yoshida S, Goto Y, Urakami K, Niida S., *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 2017
64. Basal autophagy prevents autoactivation or enhancement of inflammatory signals by

targeting monomeric MyD88. Into T, Horie T, Inomata M, Inoue J-I, Murakami Y, Niida S., *Sci Rep.* 2017

65. A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo B-N, Kita S, O'Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano K, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M., *Scientific Reports.* 2017

66. Decreased glucose metabolism in medial prefrontal areas is associated with nutritional status in patients with prodromal and early Alzheimer's disease. Sugimoto T, Nakamura A, Kato K, Iwata K, Saji N, Arahata Y, Hattori H, Bundo M, Ito K, Niida S, Sakurai T, MULNIAD study group., *J Alzheimers Dis.* 2017

67. MicroRNA transcriptome analysis on hypertrophy of the ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. Mori T, Sakai Y, Kayano M, Matsuda A, Oboki K, Matsumoto K, Harada A, Niida S, Watanabe K., *Spine Surgery and Related Research.* 2017

68. Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma. Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Chanbora C, Mikuriya A, Nguyen PT, Furusho H, Ayuningtyas NF, Fujita M, Toratani S, Takechi M, Niida S, Takata T., *PLoS ONE.* 2017

69. Comparative analysis of cerebrospinal fluid metabolites in Alzheimer's disease and idiopathic normal pressure hydrocephalus in a Japanese cohort. Nagata Y, Hirayama A, Ikeda S, Shirahata A, Shoji F, Maruyama M, Kayano M, Bundo M, Hattori K, Yoshida S, Goto Y, Urakami K, Soga T, Ozaki K, Niida S., *Bio Res.* 2018

70. Epidemiological and clinical significance of cognitive frailty: A mini review. Sugimoto T, Sakurai T, Ono R, Kimura A, Saji N, Niida S, Toba K, Chenf L-K, Arai H., *Ageing Res. Rev.* 2018

71. IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis. Shigemizu D, Miya F, Akiyama S, Okuda S, Boroevich K, Fujimoto A, Nakagawa H, Ozaki K, Niida S, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Kato M, Yamasaki M, Matsunaga T, Mutai H, Kosaki K, Tsunoda T., *Sci. Rep.* 2018

72. Defensive effect of microRNA-200b/c against amyloid-beta peptide-induced toxicity in Alzheimer's disease models. Higaki S, Muramatsu M, Matsuda A, Matsumoto K, Satoh J-i, Michikawa M, Niida S., *PLoS ONE.* 2018

73. Postprandial hyperglycemia is associated with white matter hyperintensity and brain atrophy in older patients with type 2 diabetes mellitus. Ogama N, Sakurai T, Kawashima S, Tanikawa T, Tokuda H, Satake S, Miura H, Shimizu A, Kokubo M, Niida S, Toda K, Umegaki H, Kuzuya M., *Front. Aging Neurosci.* 2018

74. Protective effects of oral anticoagulants on cerebrovascular diseases and cognitive impairment in patients with atrial fibrillation: protocol for a multicentre, prospective, observational, longitudinal cohort study (Strawberry study). Saji N, Sakurai T, Ito K, Tomimoto H, Kitagawa K, Miwa K, Tanaka Y, Kozaki K, Kario K, Eto M, Suzuki K, Shimizu A, Niida S, Hirakawa A, Toba K., *BMJ Open* 2018

75. Physical frailty correlates with behavioral and psychological symptoms of dementia and caregiver burden in Alzheimer' s disease. Sugimoto T, Ono R, Kimura A, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T., J. Clin. Psychiatry 2018
76. MyD88 signaling causes autoimmune sialadenitis through formation of high endothelial venules and upregulation of LT β receptor-mediated signaling. Into T, Niida S, Shibata KI., Sci. Rep. 2018
77. Association between Appetite and Sarcopenia in Patients with Mild Cognitive Impairment and Early-stage Alzheimer' s Disease: A Case-Control Study. Kimura A, Sugimoto T, Niida S, Toba K, Sakurai T., Front. Nutr. 2018
78. A novel voltammetric approach for real-time electrochemical detection of targeted nucleic acid sequences using LAMP. Hashimoto K, Ito K, Inada M. Analytical Biochemistry. 2017
79. Preliminary evaluation for a novel voltammetric analysis of targeted nucleic acid by combining electrochemical DNA chip and digital loop-mediated isothermal amplification. Hashimoto K, Ito K, Inada M. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2017
80. Kobori, A. Arai, T. Sakata, Y. Sugita, T. Yamayoshi, A. Murakami, A. Photochromic DNA having fluorescent protein-inspired nucleosides. Tetrahedron lett. 2018
81. Cytoskeleton-Associated Protein 4 Is a Novel Serodiagnostic Marker for Lung Cancer. Yanagita K, Nagashio R, Jiang SX, Kuchitsu Y, Hachimura K, Ichinoe M, Igawa S, Fukuda E, Goshima N, Satoh Y, Murakumo Y, Saegusa M, Sato Y. Am J Pathol. 2018
82. Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor. Kawakami T, Ogawa K, Hatta T, Goshima N, Natsume T. ACS Chem Biol. 2016

3. 当省(国)が実施することの必要性

第1章 I. 3. 「当省(国)が実施することの必要性」の記載を参照されたい。

特に、本プロジェクトにおいて、miRNA を利用した診断薬等を開発するに際しては、良質の臨床データに基づいた疫学研究に裏付けられた研究が必要不可欠である。具体的には、複数の臨床現場が所有する膨大な臨床サンプルを利用した大規模な解析や、国際標準を意識した開発データのデータベース整備等は、特定のアカデミアや企業が単独で実施することは極めて難しく、公共性と医療倫理の観点から、本プロジェクトは国が実施する必要がある。

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

下図に示したとおり、プロジェクト4・5年目には、プロジェクト参画企業各社が各疾患の診断マーカーの実証研究を行うとともに、各診断マーカーに適したマイクロ RNA 検出機器の開発を行うようロードマップを設定し、プロジェクト終了後の円滑な製品化、アウトカム達成を念頭に置いたプロジェクト運営を行った。

また、プロジェクト1年目に参画機関間で知財合意書を締結し、プロジェクト開始前から有する知財、及びプロジェクト期間中に得られた知財について、適切な管理に努めた。

さらに、本プロジェクトのデータベース運用については、参画機関による「データベース開発進捗会議」において、医薬品の開発データを保管するためのデータベースの要件および国際標準の動向を考慮し、生データの保全を最も重要な要件とすることを開発の方針とした。この方針に基づき、

提供された検体の miRNA 発現プロファイル、および臨床情報を登録し、データ格納・解析用フロントエンドのユーザー・インターフェースにより必要なデータを登録、取得できるシステムを構築、運用した。

加えて、本プロジェクトではユーザーフォーラムを設置し、ユーザーフォーラム報告会を平成 27 年度より各年 2 回開催することにより、プロジェクト開発の進捗状況、前向き臨床研究の実施概要、miRNA を用いた診断法の開発や新規診断マーカーの開発、及び統計解析手法について報告を行うとともに、プロジェクト終了後の製品化を見据えて議論を重ねた。

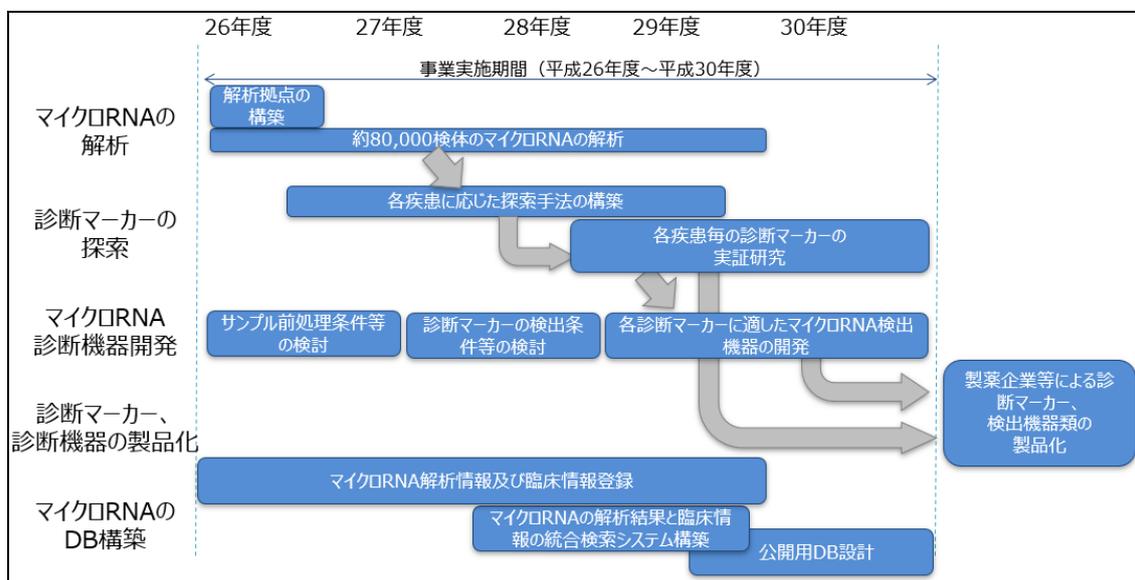


図 2-C-1. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

下図に示したとおり、miRNA の研究において日本有数の専門性を有する国立がん研究センターの落谷孝広氏を研究開発責任者とし、国立がん研究センター等の臨床現場に近い機関と、東レ株式会社等の製品化を担う企業等とでコンソーシアムを組織し、一体的に研究開発を行う体制を構築した。また、診断薬企業及び診断機器企業等からなるユーザーフォーラムを設置し、研究開発の進め方等についての意見交換を実施したほか、開発成果の橋渡しを進めた。さらに、発明推進協会に知的財産プロデューサーの派遣を依頼し、知的財産プロデューサーの佐藤浩氏のもと、プロジェクトに関連する知財について、コンソーシアム全体で戦略的な管理を行った。

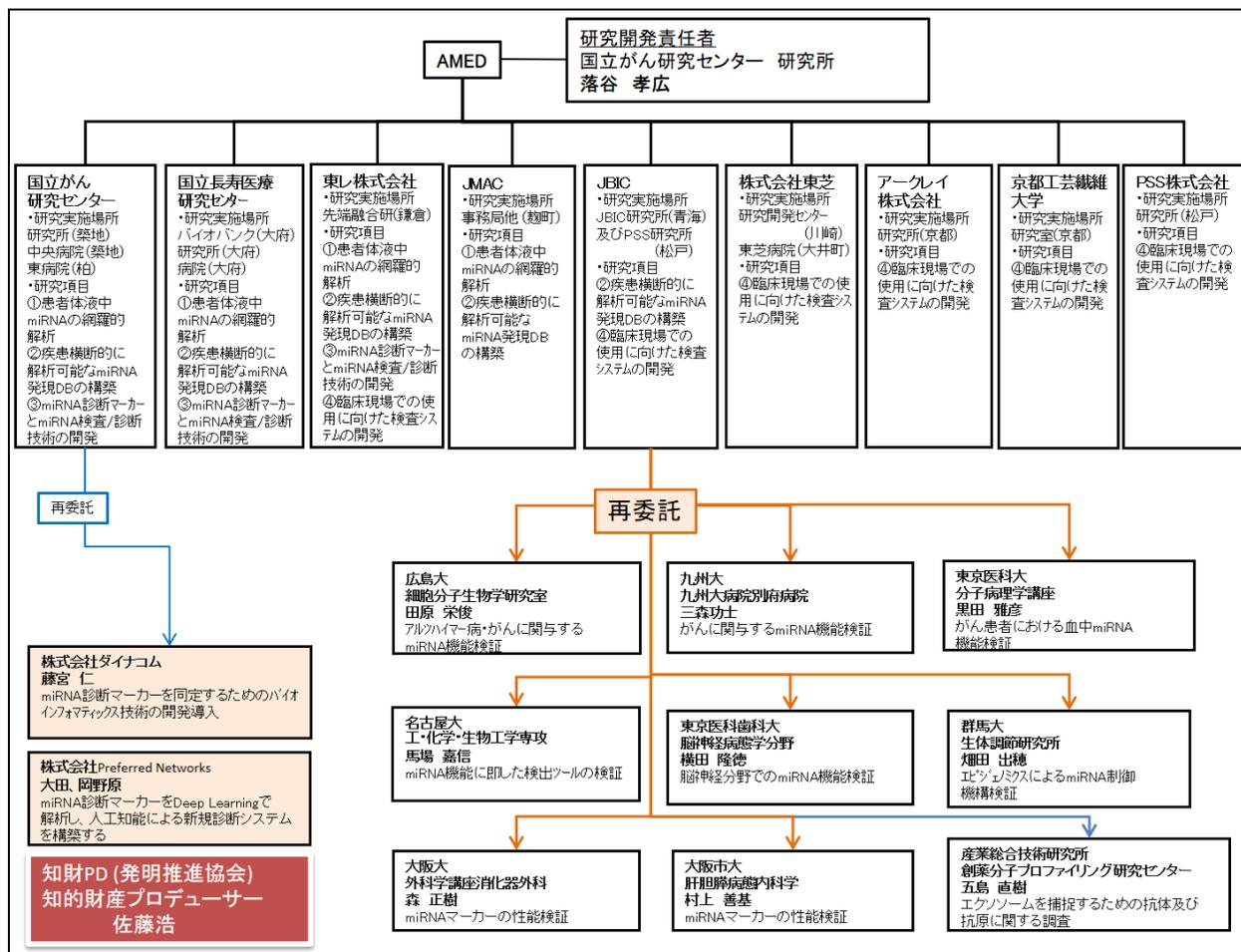


図 2-C-2. 事業実施体制図

なお、本プロジェクトについては、AMED の課題評価委員会にて、下記のように事後評価が行われている。

<委員>

	氏名	所属、役職（評価当時）
	今井 浩三	東京大学医科学研究所 学術研究基盤支援室 室長 客員教授／P O
	加藤 紘	山口大学 名誉教授／P S・P O
(委員長)	鈴木 和博	日本医薬情報センター 嘱託職員 松原 謙一 大阪大学 名誉教授
	西村 善文	横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 特任教授
	本多 裕之	名古屋大学 予防早期医療創成センター 教授
	松原 謙一	大阪大学 名誉教授

<評価結果（AMED 事後評価報告書から引用）>

【評価結果】

優れている

【評価コメント】

患者体液中の miRNA の網羅的解析に関して、国立がん研究センターを中心とした研究開発体制が適切に組織され、大規模なプロジェクトをまとめ上げたことは評価できる。中核となる一社が保有する技術である PCR (Polymerase Chain Reaction) 不要の 3D-Gene® を利用した miRNA (microRNA) 測定機器並びに検査用試薬による解析システムを運用し、わずかな血清からの数万検体に及ぶ miRNA 測定の定期的解析を可能にした。

本測定技術を活用し、50,000 を超える血清検体について網羅的 miRNA 発現データを取得し、解析結果と臨床検体情報をリンクさせたデータベースを構築した。

がん疾患については、約 2700 種類の miRNA から各種がんと相関する miRNA を抽出し 13 種のがんを判別可能な検出用マーカーを選定した。また、アルツハイマー病の 3 種の原因病態の鑑別や発症予測に有用な検出用マーカーを選定した。これらは、早期がんから進行がんまで検出することができる、世界初の性能を持つ診断用マーカーである。さらに、精度管理のための内部標準の選定と miRNA 標準物質の開発を実施したこと、前向きコホート研究を実施するなど、これらの診断マーカーの検証を行っていることは評価できる。本プロジェクトにおいてがん等の診断マーカーと測定技術・キットに関する特許を 45 件出願したことは高く評価できる。一方、選択された miRNA 診断マーカーの科学的根拠が不明確な部分もあり機能の解明と共に多群判別に関する考察が必要である。診断薬承認には科学的根拠が重要であることから、今後の miRNA のメカニズム解析が期待される。また、診断法のみにとどまらず、miRNA を標的とした治療方法が世界的に開発されていることから治療方法の開発は行われるべきであろう。

今後は、開発した診断マーカーの前向きコホート研究による検証を急ぐとともに、miRNA によるがん診断コンセプトを医療業界、製薬業界、検査業界に認知させる努力と血中 miRNA 検査による体外診断用医薬品の承認申請・開発による社会実装が期待される。

6. 費用対効果

miRNA を用いたがんの早期診断技術は、血液 1 滴で行える低侵襲性と、感度・特異度等の指標で示される有用性で世界的にも他に類を見ないものである。治療効果予測、がんの性質判別等まで行える診断技術となれば、さらに国際競争力を有するものとなる。2030 年には、世界で新たにがんと診断される人数は現在の約 1.7 倍にまで増加すると予測されている。さらに、「次世代検査・診断」の関連市場は、2025 年には世界全体で現在の約 3 倍まで成長するという予測もある。次世代がん診断の世界市場規模は、現時点で 16 億ドル（約 1760 億円）を超える規模と推計されているものの、上記の予測を考慮すれば、その規模は今後大きく成長していくものと考えられる。

したがって、本プロジェクトには約 79 億円が投じられているが、参画企業等により成果を利用した診断薬・診断機器等の製品化が進めば、我が国におけるがんに対する先制医療の実現に大きく貢献するとともに、参画企業をはじめとした我が国企業が、成長する世界市場のシェアを獲得することが見込まれ、将来的には、当該企業から多くの税収も期待されると考えられる。

D. 糖鎖利用による革新的創薬技術開発

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

プロジェクト名	糖鎖利用による革新的創薬技術開発			
行政事業レビューとの関係	平成31年度行政事業レビューシート（事業番号0031）			
上位施策名	○健康・医療戦略（平成26年7月22日閣議決定） ○医療分野研究開発推進計画（平成26年7月22日健康・医療戦略推進本部決定、平成29年2月17日一部変更） ○バイオ戦略 2019（令和元年6月11日閣議決定） ○統合イノベーション戦略 2019（令和元年6月21日閣議決定）			
担当課室	生物化学産業課			
<p>プロジェクトの目的・概要</p> <p>分子標的薬の開発では創薬標的の枯渇が深刻な問題となっており、創薬標的として糖鎖又は糖タンパク質の可能性に期待は高まっている。従来の分子標的薬は、創薬ターゲットとなるタンパク質が、がん細胞などの疾患細胞のみならず、正常細胞にも少なからず存在し、副作用が課題であった。今回の研究開発は、タンパク質だけでなく、個々のタンパク質が有する「糖鎖」に着目し、創薬標的を増やすとともに、副作用の可能性を低減することで、バイオ医薬品の新薬開発を可能にする。</p> <p>具体的には、創薬標的になりうる糖タンパク質等（糖鎖標的）を同定し、創薬標的としての意義を解明するため、「極微量の糖鎖標的の検出・検証」、「糖鎖標的の精密な構造解析」、「糖鎖標的の製造」、「糖鎖標的に対する捕捉分子作成」及び「発見された糖鎖標的の創薬意義解明」といった研究開発課題項目を設定。それらを有機的に統合し、創薬標的探索のための技術基盤開発を行うことにより、企業が求める、糖鎖を標的とした創薬を推進するための技術基盤を確立する。</p>				
<p>予算額等（委託）</p> <p style="text-align: right;">（単位：百万円）</p>				
開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成28年度	令和2年度	平成30年度	令和2年度 （予定）	慶應義塾大学、 産業技術総合研 究所等
H28FY 執行額	H29FY 執行額	H30FY 執行額	総執行額 (H28-30FY)	総予算額 (H28-30FY)
812	805	1,046	2,663	2,675

1. 事業アウトカム

事業アウトカム指標		
「各要素技術の開発成果等の利用実績」 確認した糖鎖ターゲット及び構造設計図の治療薬、診断薬開発への利用件数ならびに糖鎖解析装置の導出や受託解析件数		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成28年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（平成30年度）	計画：2	実績：1（未達成）
終了時評価時（令和2年度予定）	計画：－	
目標最終年度（令和7年度）	計画：125	

本プロジェクトでは、「極微量の糖鎖標的の検出・検証」、「糖鎖標的の精密な構造解析」、「糖鎖標的の製造」、「糖鎖標的に対する捕捉分子作成」及び「発見された糖鎖標的の創薬意義解明」といった研究開発を実施することにより、創薬標的探索のための技術基盤開発を通じて、疾患に関連する糖鎖ターゲットの同定や、糖鎖構造の設計図作成を行っている。確認された糖鎖ターゲット及び設計図は、具体的な治療薬または診断薬のターゲットとして利用されるほか、糖鎖解析装置の開発及び受託解析等に利用される形で我が国の製薬業界に貢献するものと考えられ、それら利用件数をアウトカム指標としている。

プロジェクト前半3年間は、要素技術開発を重点的に行うため、目標値は少数に設定しているが、後半2年間は、治療薬及び診断薬開発企業、並びに関連装置開発企業等への導出を強く意識した研究開発を進める予定であり、令和7年度までに125件の利用を目標としている。これまでの実績としては、平成30年度末時点で目標値は2件であるところ、治療薬または診断薬に関する企業側へのライセンス導出契約は1件であるものの、そのほか数件について、秘密保持契約等を締結し、導出にむけた検討が進められている状況である。

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

(1) 研究開発内容

本プロジェクトでは、研究開発全体を以下の5つの領域（研究開発項目）に細分化し、それぞれを有機的に統合した革新的な創薬技術基盤の開発を行った。

- ・研究開発項目[1] 極微量の糖鎖標的を検出、検証するための技術開発
- ・研究開発項目[2] 糖鎖標的を精密に構造解析するための技術開発
- ・研究開発項目[3] 糖鎖標的を製造するための技術開発
- ・研究開発項目[4] 糖鎖標的に対する捕捉分子作成のための技術開発
- ・研究開発項目[5] 発見された糖鎖標的の創薬意義の解明

実際の採択課題は、以下のとおり。

なお、課題A及びBは、各研究開発項目に関わる要素技術開発を担当している。

課題名	研究開発代表者
① 我が国の技術の強みと密接な医工連携体制を活かした標的分子探索・検証のための多角的糖鎖解析システムの構築 (研究開発項目[1]及び[2]を担当)	慶應義塾大学 坂元 亨宇
② 多様なグライコプロテオームおよび捕捉分子作製技術開発とその創薬への応用 (研究開発項目[3]、[4]及び[5]を担当)	順天堂大学 入村 達郎
A 糖鎖分子による自然免疫受容体制御を介した免疫・骨代謝異常治療法の開発(研究開発項目[5]に関係)	東京理科大学 岩倉 洋一郎

A	Erexim 法と超臨界流体クロマトグラフ質量分析による高速高分解能糖鎖構造一斉定量法の開発（研究開発項目 [2] に関係）	がん研究会 植田 幸嗣
	糖鎖構造の可変を可能にする糖タンパク質の精密半化学合成とその品質分析技術の開発（研究開発項目 [3] に関係）	大阪大学大学院 梶原 康宏
	世界初の抗糖鎖抗体医薬の開発に向けた革新的抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術の確立（研究開発項目 [4] 及び [5] に関係）	千葉大学大学院 川島 博人
	認知症の増悪に関わる脳アミロイドアンギオパチー：モデル動物を駆使した糖鎖標的の創薬意義の解明（研究開発項目 [2]、[3] 及び [5] に関係）	理化学研究所 北爪 しのぶ
	高感度・高特異性改変レクチン開発による GAG 鎖および O-GlcNAc 修飾を標的とした創薬探索技術の確立（研究開発項目 [1] 及び [4] に関係）	東京大学大学院 山本 一夫
B	超高効率濃縮法に基づく CE-LIF-MS 微量糖鎖分析システムの開発（研究開発項目 [2] に関係）	理化学研究所 川井 隆之
	糖鎖の超高感度検出を目的とした新規糖アナログの開発（研究開発項目 [1] 及び [4] に関係）	理化学研究所 木塚 康彦
	高感受性フコシル化 TRAIL 受容体を標的とした新たな癌治療戦略の開発（研究開発項目 [5] に関係）	大阪大学大学院 森脇 健太
	NMR と計算科学の統合による糖鎖の 3 次元構造ダイナミクスの体系的評価法の開発（研究開発項目 [2] に関係）	名古屋市立大学大学院 矢木 宏和

課題① 我が国の技術の強みと密接な医工連携体制を活かした標的分子探索・検証のための多角的糖鎖解析システムの構築

細胞表面に存在するタンパク質の多くは糖鎖を有し、その構造は細胞の状態に伴って変化する。従来の疾患細胞特異的タンパク質でなく、疾患細胞特異的な糖鎖をもつタンパク質を新たな創薬標的の設計図とすると、その疾患細胞特異性は格段に向上するため、これまで副作用等により開発途中で脱落してきた分子も、再び創薬標的となり、現在問題となっている創薬標的の枯渇を解消できると期待される。このような観点から、欧米、中国などの諸外国でも糖鎖研究者を中心とした糖鎖創薬プロジェクトが立ち上がってきているが、糖鎖標的探索に有用な複数の技術要素をプラットフォーム化し、実証した例はない。本提案では、糖鎖標的の探索、検証に資する新しい糖鎖標的探索開発プラットフォームを 3 年以内に構築し、プロジェクト内で積極的に活用し、より多くの糖鎖標的的成果物を提供することでプラットフォーム実効性を証明することを目的とする。

これまでの研究にて、極微量組織からの糖鎖変化検出、精密糖鎖構造解析技術については、糖鎖標的の設計図作成に必要と考えられる要素技術が並行して開発されており、目標とされる技術レベルと現状レベルをモニタリングしながら進められている。結果、ほぼすべての要素技術について遅延なく計画が進んでいる。集中研の整備、臨床拠点における課題設定・倫理審査等が初年度から精力的に進められ、7 疾患のクルード試料からの病変関連糖鎖変化探索が実施され、うち 1 つは大規模解析/リスト化された。特定分子では、レクチンアレイによる比較解析により、22 分子で検証を終え、7 分子で疾患特異的糖鎖変化が認められた。質量分析による精密解析では、15 分子で解析が実施され、うち 4 種はこれを設計図として糖ペプチドが合成され、免疫、抗体生産細胞のスクリーニングに使用された。

課題② 多様なグライコプロテオームおよび捕捉分子作製技術開発とその創薬への応用

本提案では、医薬品として役立つ糖鎖標的を製造するための技術開発、捕捉分子作製のための技

術開発、及び、捕捉分子の医薬としての重要性の評価を達成することを目的として、開発を進める。またこれらの要素技術を組み合わせ、糖鎖標的捕捉分子開発のためのプラットフォームを構築する。

これまでの研究にて、糖ペプチド合成では、O-型糖アミノ酸を中心に合成する技術を確立、糖鎖関連酵素 34 種を発見した。O-型糖鎖修飾を前提とした糖水酸基を脱保護した糖アミノ酸を用いた合成の条件検討、およびマイクロ波照射下で温和な温度での反応の検討が進められ、糖ペプチド合成の実用化に先鞭をつける開発を実施した。糖鎖標的を認識する抗体の取得については、ラットや糖転移酵素ノックアウトマウス利用、合成糖ペプチドと細胞で発現した標的糖タンパク質を連続的に免疫し、両材料を使ったスクリーニングする技術の開発により、O-型糖鎖を含む標的に対する抗体取得が可能となってきた。創薬意義の解明においては、既存の抗体医薬における副作用の実態を臨床研究によって解明した。また糖鎖標的認識抗体群を認識される糖鎖の構造や結合位置等によってグルーピングし、トリプルネガティブ乳がんの再発例で、臨床病理標本に対して特定の抗体の強い結合性を確認した。臨床病理標本を用いた解析により上皮型中皮腫における標的糖鎖の差異を見出し、肉腫型中皮腫の表面糖鎖の網羅的な解析により、特徴を明らかにした。

課題 A-1 糖鎖分子による自然免疫受容体制御を介した免疫・骨代謝異常治療法の開発

DCIR はミエロイド C 型レクチン受容体の一つで、細胞外に糖鎖認識部位を持ち、細胞質内に抑制性のシグナル伝達配列を持つ。DCIR 遺伝子には関節リウマチなど自己免疫疾患に関連した SNP が報告されており、疾患との関連性が予想された。そこで、この遺伝子を欠損させたマウスを作製したところ、自己免疫疾患を発症する他、骨代謝が亢進し、骨量が増加することがわかった。これは DCIR が樹状細胞や破骨細胞分化を抑制するためであることがわかった。また、リガンドが NA2 と呼ばれる糖鎖分子であることを同定し、DCIR の抑制活性は NA2 刺激によって調節されていることを示した。このように DCIR は免疫系、骨代謝系で重要な役割を果たしており、自己免疫疾患やアレルギー疾患、骨代謝異常症などの治療標的となり得ることが示された。本研究では DCIR を標的とした治療法を開発するために、NA2 に対する抗体や DCIR に対する抗体を作製するとともに、リガンド投与、あるいはリガンド糖鎖分子の修飾による免疫、骨代謝疾患の治療を試みる。

これまでの研究にて、DCIR の NA2 キャリア蛋白質候補の同定に成功し、詳細を解析中である。また、DCIR 機能の阻害、あるいは促進効果を持つ抗体は治療効果が期待できるため、DCIR 及び NA2 に対する抗体作製を試み、これらの分子に結合するモノクローナル抗体クローンを多数得た。今後これら抗体の機能を解析する。さらに、NA2 修飾酵素を自己免疫や骨代謝疾患の動物モデルに投与したところ、重症度が有意に減少し、炎症性サイトカインの産生量も低下することが分かった。この結果は、NA2 の修飾剤がこれら疾患の治療薬として有効であることを示しており、特許を申請するとともに、論文を投稿した。

課題 A-2 Erexim 法と超臨界流体クロマトグラフ質量分析による高速高分解能糖鎖構造一斉定量法の開発

超臨界流体クロマトグラフィー質量分析計 (SFC-MS) と Erexim 法を使用した、標的糖タンパク質上糖鎖構造の高感度精密定量評価法を開発する。具体的には(1)微量多検体組織サンプルの Erexim 分析に特化した試料前処理法の至適化と自動化、(2)SFC-MS を用いた Erexim 分析による超高分離能糖鎖構造バリエーション解析法の構築、(3)開発した SFC-Erexim 質量分析システムによる肺癌組織 PD-L1 上糖鎖構造プロファイリング実証試験、を実施する。分担研究機関と共同で Erexim ソフトウェアの製作、糖鎖構造解析用 SFC-MS ハードウェアの至適化を進め、企業などによる創薬研究実装を目指す。また、開発技術を用いて新たな肺癌免疫学的治療法の開発に繋がる標的の同定、及び他課題から創出されたシーズ糖タンパク質上糖鎖の評価試験を実施する。

これまでの研究にて、遊離糖鎖の SFC-MS-Erexim 分析法開発について、糖鎖選択の高感度化を達成するための高効率な疎水化ラベル法を開発し、5 分間の分析で検出下限 5 atto mole の超高分感度糖鎖分析を実現した。これは従来技術である蛍光 HPLC 分析法と比較して 105 倍以上高い感度であり、大幅な技術革新が得られたと言える。実際に抗体医薬品 Bevacizumab に付加した糖鎖の定量プロファイルを実施したところ、126 種類もの糖鎖構造を精密に定量化することに成功した。また、糖ペプチドを試料とする LC-MS-Erexim 分析についても前処理法を含む技術改良を進め、前立腺癌患者血清中の PSA (4-10 ng/ml、100 μ l) 上糖鎖構造の定量プロファイリングを行ったところ、存在率 0.3% の大変含有量の少ない糖鎖構造を含む 67 構造が定量化された。過去の報告では PSA 濃度 18,000

ng/ml の血清 500 μ l から 24 構造を検出したものが最大であるため、本法は極めて高感度で多検体分析にも使用可能な各種スペックも持っている」と評価できた。

課題 A-3 糖鎖構造の可変を可能にする糖タンパク質の精密半化学合成とその品質分析技術の開発

均一な構造の高純度ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質製剤の実用的合成法を目指す。糖鎖は鶏卵より 100g 以上容易に得ることが可能になっている。そこで、糖鎖が結合している糖ペプチド部位は化学合成により調製し、糖鎖が結合していないところは大腸菌で発現し、化学的にその N 末端、C 末端を活性化する化学変換法を検討し、研究室レベルで数百ミリグラム程度の糖タンパク質が容易に合成できる方法の確立を目指す。また、均一な構造の高純度ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質製剤の品質管理法を確立することとして、質量分析装置をもちいたタンパク質部位の構造変化ならびに糖鎖構造の分解を追跡する方法を検討する。

これまでの研究にて、糖鎖アスパラギンをペプチドに組み込む新規法を確立することができ、従来高コストであった糖ペプチド固相合成法の問題点を大幅に解決することができた。また、発現した長鎖ペプチドの N 末端、C 末端を化学的、酵素的に処理することでペプチド同士を連結することを可能にした。現在、糖タンパク質製剤の全長の合成、フォールディング等の簡便な方法の開発に着手している。質量分析を利用する重水素置換法 (HDX) により、天然型、ミスフォールド型糖タンパク質の構造が区別できることを明らかにした。今後は合成した糖タンパク質製剤の品質管理に応用する検討を開始する。

課題 A-4 世界初の抗糖鎖抗体医薬の開発に向けた革新的抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術の確立

本研究において我々は、世界初の抗糖鎖抗体医薬の創成に向けた革新的な抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術を確立するとともに、医療分野の進展に資する抗糖鎖モノクローナル抗体を開発することを目標とする。はじめに、モノクローナル抗体作製の個々のステップの詳細をきめ細かく見直し、抗糖鎖モノクローナル抗体作製の最適なプロトコルの確立を行い、様々な特異性を有する新規抗糖鎖モノクローナル抗体の体系的な樹立を行う。得られた抗体の中から、病理組織学的検討により、病態を正確に反映する有用な抗糖鎖モノクローナル抗体を選別し、様々なマウス病態モデルを用いて同抗糖鎖モノクローナル抗体の疾患治療効果を多面的に検討することにより、その有用性を検証する。本研究は、独自技術に基づき確実に進展することの見込まれる基礎・応用融合型の研究課題であり、本研究の成果は糖鎖を標的とした世界初の抗体医薬創成の技術基盤の確立につながることを期待される。

これまでの研究にて、効率良く抗糖鎖モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製する条件を確立し、ユニークな特異性を有する新規抗糖鎖抗体を産生するハイブリドーマの樹立に成功した。また、抗糖鎖抗体を産生するハイブリドーマから抗体遺伝子を取得し、その配列決定を行った。その遺伝子配列情報を元に一本鎖抗体を作製し、糖鎖との特異的な結合を確認した。さらに、ある種の糖鎖に対する抗体が、マウス接触性皮膚炎モデルおよび特定の免疫疾患モデルにおいて、疾患を抑制する効果を発揮することを見出した。抗糖鎖抗体医薬の開発に繋がる可能性のある重要な成果と考えられる。

課題 A-5 認知症の増悪に関わる脳アミロイドアンギオパチー：モデル動物を駆使した糖鎖標的の創薬意義の解明

本研究は、申請者が独自開発した血管内皮型 APP770 発現マウスの生化学的および病理学的解析を行い、脳アミロイドアンギオパチー (CAA) のモデルマウスとしての妥当性を調べると共に、CAA 発症促進モデルの開発も同時に進める。また、GalNAcT 欠損マウスとの交配も行い、GalNAcT 酵素の阻害が実際に A β 産生を押さえ CAA の病態を緩和するか、すなわち APP770 の O 型糖鎖付加に関わる GalNAcT が糖鎖標的として有効かを検証する。また、GalNAcT 欠損マウスの表現型解析も行い、GalNAcT を阻害した場合の副作用の予測も行う。また、タウ凝集体には高リン酸化フォームが多く含まれること、リン酸化と O-GlcNAc 修飾が競合することが知られているものの、解析は不十分である。そこで、タウ研究者や糖鎖解析を行う分担者が結集しているチャンスを生かし、タウの糖鎖修飾についても解析を進める。

これまでの研究にて、申請者が開発した血管内皮型 APP770 発現マウスは高齢化に伴い大脳皮質内の血管に A β が沈着すること、一部で脳内出血が起きていることから、CAA モデルになることを示

した。生きたマウスで血中 sAPP770 β 濃度が定量可能であることから、A β 産生量を見積もることが出来ると思われる。アルツハイマーモデルマウス、GalNAcT 欠損マウス、ヒトアポE4 導入マウスとの交配も順調であり、本プロジェクト終了までに結果が得られる見込みである。GalNAcT ノックダウンで A β 産生が減少することを見出した。GalNAcT 欠損マウス自体は正常に生まれることから、GalNAcT 阻害剤に対する副作用は軽微であると考えられる。また、タウの新規 O 型糖鎖付加部位も明らかにした。

課題 A-6 高感度・高特異性改変レクチン開発による GAG 鎖および O-GlcNAc 修飾を標的とした創薬探索技術の確立

グリコサミノグリカン (GAG) 鎖は成長因子やケモカインの共受容体として機能し、細胞外微小環境を形成する。この微小環境を識別する複数の改変レクチンを作成し生存シグナルを理解することにより、さまざまな病態に関与する糖鎖創薬標的分子を明らかにすることを目標とする。一方、GAG 鎖を介したシグナルの下流で機能する転写因子等の O-GlcNAc 修飾を高感度かつ特異的に検出する手法を開発し、一連のシグナル伝達を明らかにすること、またこの修飾タンパク質の同定や糖鎖修飾の制御を調べ、創薬へ繋げることをもう一つの目標としている。

これまでの研究にて、PNA レクチンの糖結合ループを遺伝子工学的にランダムに改変をしたレクチンライブラリーの中から、GAG 鎖の一つヘパリンを特異的に認識するクローンを得た。このクローンの解析に基づき、より適切な改変レクチンライブラリーの作製、さらにはコンドロイチン硫酸に結合する WFA レクチン cDNA から改変レクチンライブラリーを作製し、新たなクローンを複数取得した。このヘパリン結合性改変レクチンの一つは高度に脱分化したと考えられる前立腺癌細胞 DU145 に強く結合した。また、GAG アレイを用いた解析から IdoA と GlcNAc3-O-S03-がその結合に必須であることがわかった。他に、いくつかの癌腫がこの GAG 結合改変レクチンによって強く染色され、GAG 鎖を介した増殖系が寄与していることが考えられた。一方、disaccharide-tag 法による O-GlcNAc 修飾タンパク質検出法に有用な組換え体レクチン-Fc を作製した。この手法を用いて膵管癌細胞を解析し、Spheroid 型から Tube 型へ誘導する転写因子の O-GlcNAc 修飾を特定した。また、O-GlcNAc 修飾アミノ酸を含む糖ペプチドを合成し、それに特異的な抗血清を作製した。

課題 B-1 超高効率濃縮法に基づく CE-LIF-MS 微量糖鎖分析システムの開発

がんなどの疾患組織に存在する微量病変細胞から糖タンパク質の糖鎖構造変化を検出することが糖鎖創薬の第一歩として必須である。しかし従来のプロテオーム解析は感度が低く通常一万細胞以上の大量の試料が必要であり、また十分量が確保できてもタンパク質発現量の変化ばかりが検出されてしまうことから、糖鎖構造変化を有する糖タンパク質を発見することが難しい。そこで超高効率試料濃縮 (LDIS: large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking) 法に注目した。この LDIS 濃縮法により糖鎖を 1000 倍以上濃縮し、キャピラリー電気泳動 (CE) によってサイズ分離した後、レーザー励起蛍光 (LIF) や質量分析 (MS) で検出することで、 2mol レベルの感度で糖鎖を定量・定性するシステムを開発できる。この CE-LIF-MS システムにより、まず糖鎖をタンパク質から遊離させて網羅的に構造解析することで標的糖鎖構造を推定し、その後レクチンなどで特異的に糖タンパク質を回収・プロテオーム解析することで創薬標的を発見する。

これまでの研究にて、数 μL 程度の溶液量で微量細胞を溶解・酵素処理・蛍光標識・精製などを行い、その後 LDIS 法で濃縮して CE-LIF 分析を行ったところ、100 細胞程度の微量試料であっても 30-40 程度の糖鎖ピークを検出することに成功した。糖鎖構造のオープンデータベース「GLYCOBASE」で検出時間から算出した Glucose Unit 値を検索することで、糖鎖構造を推定することが可能であった。これにより簡単に 100 細胞程度の微量試料から糖鎖構造を推定する分析システムを世界で初めて実現した。また CE-LIF-MS 分析用に新規に改造装置の開発を行い、LDIS 濃縮・CE 分離・高効率イオン化の全ての動作を制御できる新システムを構築し、約 30 検体/日程度のスループットで終日自動分析を行えるシステムを構築した。今後は計画通り微量グライコプロテオーム解析システムを開発するとともに、臨床検体を解析して標的探索を進めていく予定である。

課題 B-2 糖鎖の超高感度検出を目的とした新規糖アナログの開発

本課題では、有機合成によってアジドもしくはアルキンを有する新たな糖アナログをデザイン・合成し、*in vitro* の糖転移酵素アッセイと、クリックケミストリーを利用した細胞糖鎖のラベル化・

検出により、感度・毒性・特性を評価する。これにより高感度かつ高選択性を持った、新たなケミカルプローブを開発する。得られた糖アナログによる糖鎖合成阻害効果も合わせて検証し、阻害剤となりうる糖アナログも同時に探索する。またすでに従来品よりも高感度化に成功したフコースのアナログを用い、肺がん細胞から特異的に分泌されるフコシル化糖タンパク質を単離、同定する。得られた標的糖タンパク質を肺がん患者血清中で検出し、マーカーとしての有用性を評価する。

これまで、糖アナログを用いた糖鎖の検出には限界があり、検出できる糖鎖の種類が少なかった。この問題をクリアするため、これまでの研究では、新たに酵素を導入した細胞を樹立し、これまで本手法が適用できなかった糖による糖鎖検出が可能になる新手法を開発しつつある。また、6-アルキニルフコースと呼ばれるフコースのアナログが、内在性のフコシル化糖鎖の合成阻害剤として機能することを見出した。その作用が強力なこと、阻害メカニズムを解明し、肝がん細胞の浸潤を抑えることを見出した。

課題 B-3 高感受性フコシル化 TRAIL 受容体を標的とした新たな癌治療戦略の開発

細胞死を誘導するデス受容体ファミリーに属する TRAIL 受容体は、癌細胞に特異的に細胞死を誘導するため癌治療の分子標的として期待されている。しかし、十分な治療効果が確認されず臨床応用に至った例は未だなく、新たな戦略が必要とされている。臨床応用へ向けた大きな問題点として、効果を期待できる患者を選別するためのバイオマーカーがないことが挙げられている。癌細胞で糖鎖構造の特異的な変化が起こることはよく知られており、この糖鎖によるタンパク質の質的変化を加味した治療戦略が新たな癌治療のステージを切り開くと期待されている。本研究代表者は以前に、フコシル化糖鎖が癌細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスへの感受性を正に制御することを明らかとし、TRAIL による癌細胞死におけるフコシル化糖鎖の重要性を示した。そこで、本研究では、フコシル化糖鎖を指標とした TRAIL 治療の患者選別法の確立を目指すとともに、フコシル化を利用した新たな TRAIL 併用療法の開発を目指している。

これまでの研究にて、フコシル化糖鎖の中でも α 1-4 構造から形成される糖鎖構造が TRAIL 誘導性細胞死を制御していることを明らかにした。また、TRAIL 感受性を亢進させる化合物の同定のためのスクリーニングシステムを立ち上げた。

課題 B-4 NMR と計算科学の統合による糖鎖の 3 次元構造ダイナミクスの体系的評価法の開発

糖鎖認識系を標的とした創薬を実現するためには糖鎖の配列情報のみならず原子レベルの 3 次元構造情報が必要不可欠である。しかしながら、糖鎖の立体構造は水溶液中でダイナミックに揺らいでいるためにそれらを標的とする分子設計は容易ではない。糖鎖の 3 次元構造ダイナミクスはそれを認識する分子の特異性・親和性と密接に関係していることから、構造揺らぎを合理的に制御することができれば、特定の認識分子に高い親和性と特異性を示す分子を創生することが可能である。本研究開発は、実験と計算科学の統合を通じて糖鎖の 3 次元構造動態を揺らぎも含めて精密かつ迅速に解析するための技術の確立を目指す。

これまでの研究にて、これまで分子シミュレーションで扱うことの難しかった、金属に結合性を示す糖鎖、硫酸基を有する糖鎖を対象とした、糖鎖の分子シミュレーションのための計算プロトコルを整備することができた。また、糖鎖の立体構造ダイナミクスを制御することにより、レクチンに対する親和性や特異性を向上するような分子設計を示すことに成功し、動的構造の制御を可能とし、タンパク質の特異性を向上させた糖鎖改変体創出の道筋を示すことができた。

また、本プロジェクトでは、これまで発見された新たな糖鎖標的の創薬意義解明のための技術開発を目的として、平成 30 年度に二次公募を行い、以下の創薬シーズ 6 課題をさらに採択した。当該課題の研究を実施することにより、プロジェクト成果の最大化を目指し、さらに研究開発を加速させている（研究開発項目 [6] として設定）。

課題名	研究開発代表者
糖鎖抗原を創薬ターゲットとする病原性抗酸菌感染症予防および治療法の開発	順天堂大学 岩淵 和久
ポリシアル酸認識機構を基盤とする精神疾患と癌の診断・	名古屋大学

治療の技術革新研究	佐藤 ちひろ
ケラタン硫酸二糖とそのアナログによる COPD 治療効果に関する研究	大阪国際がんセンター 谷口 直之
新しい糖鎖創薬の標的・HEG1 に対する抗体医薬の開発	神奈川県立がんセンター 辻 祥太郎
ラミニン結合性機能糖鎖を応用した筋ジストロフィー治療薬の開発	東京都健康長寿医療センター 萬谷 博
IgSF 膜タンパク質の糖鎖の構造、機能解析と、がんにおける治療標的の確立	東京大学 村上 善則

(2) 事業アウトプット

事業アウトプット指標		
候補となる糖鎖ターゲット分子の解析数（糖鎖配列等）		
指標目標値（累積値）		
事業開始時（平成 28 年度）	計画：-	実績：-
中間評価時（平成 30 年度）	計画：10	実績：11（達成）
終了時評価時（令和 2 年度予定）	計画：25	

プロジェクト開始時より、薬剤の標的となる糖鎖の構造解析をすすめているところ、平成 30 年度末で 11 種の分子における解析が完了し、当該解析結果に基づく糖ペプチド合成等に利用されている。事前のヒアリング等を踏まえ、プロジェクト期間内で解析し得る数を検討したほか、プロジェクトの後半では各要素技術の向上により解析のスピードが向上することを想定し、最終的には 25 種の分子における解析を完了する計画としている。

< 共通指標実績 >

論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数	国際標準への寄与	プロトタイプ作成
47	-	5	-	-	-	-

本プロジェクトの成果について、様々な要素技術等に関する論文 47 件、学会等の公表 65 件で公開するとともに、国内外の特許 5 件を出願した。なお、本プロジェクトにより得られる糖鎖ターゲットの具体的な情報は、創薬シーズと密接な関わりがあることから、特許出願により公開することが適切ではないものも多く、特許出願数は少数となっている。

（学会誌、雑誌等による発表論文一覧）

1. A standardized method for lectin microarray-based tissue glycome mapping. Zou X*, Yoshida M*, Nagai-Okatani C*, Iwaki J, Matsuda A, Tan B, Hagiwara K, Sato T, Itakura Y, Noro E, Kaji H, Toyoda M, Zhang Y, Narimatsu H, Kuno A. Scientific Reports 7:43560, 2017
2. Assessment of tumor characteristics based on glycoform analysis of membrane-tethered MUC1. Matsuda A, Higashi M, Nakagawa T, Yokoyama S, Kuno A, Yonezawa S, Narimatsu H. Lab Invest. 97(9):1103-1113, 2017
3. Identification of poly-N-acetylactosamine-carrying glycoproteins from HL-60 human promyelocytic leukemia cells using a site-specific glycome analysis method, Glyco-RIDGE.

Togayachi A, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Noro E, Takakura D, Miyazaki M, Shikanai T, Narimatsu H, Kaji H. *J Am Soc Mass Spectrom* 29(6):1138–1152, 2018

4. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, Sato T. Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells. *Nature*. 545(7653):187–192, 2017

5. Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, Matano M, Shimokawa M, Nanki K, Date S, Nishikori S, Nakazato Y, Nakamura T, Kanai T, Sato T. Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo. *Cell Stem Cell*. 22(2):171–176, 2018

6. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, Ohta Y, Matano M, Nanki K, Kawasaki K, Takahashi S, Sugimoto S, Iwasaki E, Takagi J, Itoi T, Kitago M, Kitagawa Y, Kanai T, Sato T. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell*. 22(3):454–467, 2018

7. A Practical Guide to Using Glycomics Databases, GlycoGene Database (GGDB) on the Semantic Web. 成松久, 鈴木芳典, 木下フローラ聖子, 鹿内俊秀, 藤田典昭, 佐藤隆, 梶谷内晶, 横尾岳彦, 安形清彦, 久保田智巳, 野呂絵里花, Springer, 2016

8. パラフィン包埋標本を用いた比較組織グライコーム解析. 松田厚志, 岡谷千晶, 久野敦. *病理と臨床 特集「パラフィン包埋標本でできる分子病理解析 Up To Date」* (文光堂), 35(7), 628–634, 2017

9. 生体物質を分光学的に検出するための機能性材料の創製, 鈴木祥夫, 化学工業, 2017

10. 総タンパク質の定量法, 鈴木祥夫, ぶんせき, 2018

11. Yamada S, Itai S, Nakamura T, Chang YW, Harada H, Suzuki H, Kaneko MK, Kato Y. Establishment of H2Mab-119, an Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Monoclonal Antibody, Against Pancreatic Cancer. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(6):287–290, 2017

12. Chang YW, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y. Epitope Mapping of Monoclonal Antibody PMab-38 Against Dog Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(6):291–295, 2017

13. Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Harada H, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. Expression of cat podoplanin in feline squamous cell carcinomas. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(6):243–250

14. Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Chang YW, Harada, H, Kato Y. Establishment of EMap-134, a sensitive and specific anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for detecting squamous cell carcinoma cells of the oral cavity. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(6):272–281, 2017

15. Itai S, Fujii Y, Nakamura T, Chang YW, Yanaka M, Saidoh N, Handa S, Suzuki H, Harada H, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y. Establishment of CMab-43, a Sensitive and Specific Anti-CD133 Monoclonal Antibody, for Immunohistochemistry. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(5): 231–235, 2017

16. Itai S, Kaneko MK, Fujii Y, Yamada S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Handa S, Chang YW, Suzuki H, Harada H, Kato Y. Development of EMap-51, a Sensitive and Specific Anti-EGFR

Monoclonal Antibody in Western Blot and Immunohistochemistry. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(5): 214–219, 2017

17. Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Harada H, Kato Y. Immunohistochemical Analysis Using Anti-Podocalyxin Monoclonal Antibody PcMab-47 Demonstrates Podocalyxin Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(5): 220–223, 2017

18. Yamada S, Itai S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Chang YW, Handa S, Harada H, Kagawa Y, Ichii O, Konnai S, Kaneko MK, Kato Y. PMab-52: Specific and Sensitive Monoclonal Antibody against Cat Podoplanin for Immunohistochemistry. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(5): 224–230, 2017

19. Itai S, Fujii Y, Kaneko MK, Yamada S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Chang YW, Handa S, Takahashi M, Suzuki H, Harada H, Kato Y. H2Mab-77 is a sensitive and specific anti-HER2 monoclonal antibody against breast cancer. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(4): 143–148, 2017

20. Kaneko MK, Kunita A, Yamada S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Chang YW, Handa S, Ogasawara S, Ohishi T, Abe S, Itai S, Harada H, Kawada M, Nishioka Y, Fukayama M, Kato Y. Anti-Podocalyxin Antibody chPcMab-47 Exerts Antitumor Activity in Mouse Xenograft Models of Colorectal Adenocarcinomas. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(4):157–162, 2017

21. Kaneko MK, Nakamura T, Kunita A, Fukayama M, Abe S, Nishioka Y, Yamada S, Yanaka M, Saidoh N, Yoshida K, Fujii Y, Ogasawara S, Kato Y. ChLpMab-23: Cancer-specific Human-Mouse Chimeric Anti-podoplanin Antibody Exhibits Antitumor Activity via Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(3):104–112., 2017

22. Yamada S, Honma R, Kaneko MK, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Takagi M, Konnai S, Kato Y. Characterization of Anti-bovine Podoplanin Monoclonal Antibody PMab-44. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(3):129–134, 2017

23. Ogasawara S, Kaneko MK, Yamada S, Honma R, Nakamura T, Saidoh N, Yanaka M, Yoshida K, Fujii Y, Kato Y. PcMab-47: Novel Anti-human Podocalyxin Monoclonal Antibody for Immunohistochemistry. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(2): 50–56, 2017

24. Yamada S, Ogasawara S, Kaneko MK, Kato Y. LpMab-23: A Cancer-Specific Monoclonal Antibody against Human Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(2): 72–76, 2017

25. Yamada S, Kaneko MK, Nakamura T, Ichii O, Konnai S, Kato Y. Development of mPMab-1, a Mouse-Rat Chimeric Antibody against Mouse Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(2): 77–79, 2017

26. Kaneko MK, Yamada S, Nakamura T, Abe S, Nishioka Y, Kunita A, Fukayama M, Fujii Y, Ogasawara S, Kato Y. Antitumor activity of chLpMab-2, a human-mouse chimeric cancer-specific antihuman podoplanin antibody, via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Med.*, 6(4): 768–777, 2017

27. Kato Y, Kunita A, Fukayama M, Abe S, Nishioka Y, Uchida H, Tahara H, Yamada S, Yanaka M, Nakamura T, Saidoh N, Yoshida K, Fujii Y, Honma R, Takagi M, Ogasawara S, Murata T, Kaneko MK. Anti-Glycopeptide Mouse Monoclonal Antibody LpMab-21 Exerts Antitumor Activity Against

Human Podoplanin via Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-Dependent Cytotoxicity. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(1): 20-24, 2017

28. Kaneko MK, Abe S, Ogasawara S, Fujii Y, Yamada S, Murata T, Uchida H, Tahara H, Nishioka Y, Kato Y. Chimeric Anti-human Podoplanin Antibody NZ-12 of Lambda Light Chain Exerts Higher Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-dependent Cytotoxicity Compared with NZ-8 of Kappa Light Chain. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36(1): 25-29, 2017

29. 北爪しのぶ(2018) アルツハイマー病と糖鎖「臨床化学」

30. 北爪しのぶ(2018) グライコサイエンスロードマップ アルツハイマー病

31. 北爪しのぶ(2018) 認知症の中心分子から血管内皮障害の診断マーカーへ 「臨床化学」 47, 47-50

32. 北爪しのぶ、木塚康彦、谷口直之(2017) 糖鎖を標的としたアルツハイマー病の治療薬開発に向けて植田幸嗣, 久野 敦・企画「実験医学」35, 1440-1446

33. 北爪しのぶ (2016)急性冠症候群の早期診断薬に転身した認知症の中心分子 弥富 裕・編「生体の科学」67. p378-379

34. Niwa A, Ii Y, Shindo A, Matsuo K, Ishikawa H, Taniguchi A, Takase S, Maeda M, Sakuma H, Akatsu Y, Hashizume Y, Tomimoto H. Comparative analysis of cortical microinfarcts and microbleeds using 3.0-tesla postmortem magnetic resonance images and histopathology. *J Alzheimers Dis.* 2017;59(3):951-959

35. Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei K, Akatsu H, Hashizume Y, Akiyama H, Ayaki T, Maki T, Sawamoto N, Takahashi R, Oikawa S, Tomimoto H. Complement activation in capillary cerebral amyloid angiopathy *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2017;44(5-6):343-353.

36. 新堂晃大、富本秀和. 血管性認知症と脳アミロイド血栓症 内科 120 (2) : 257-261, 2017

37. Takayuki Kawai, Nobutoshi Ota, Akiko Imasato, Yoko Shirasaki, Koji Otsuka, Yo Tanaka, "Profiling of N-linked Glycans from 100 Cells by Capillary Electrophoresis with Large-volume Dual Preconcentration by Isotachopheresis and Stacking" *Journal of Chromatography A*, 2018, 1565, 138-144

38. Fumihiko Kitagawa, Saeko Kinami, Yuuki Takegawa, Isoshi Nukatsuka, Kenji Sueyoshi, Takayuki Kawai, Koji Otsuka, "On-line coupling of sample preconcentration by LVSEP with gel electrophoretic separation on T-channel chips" *Electrophoresis*, 2017, 38, 380-386.

39. Amit V. Patel, Takayuki Kawai, Liping Wang, Stanislav S. Rubakhin, Jonathan V. Sweedler, "Chiral Measurement of Aspartate and Glutamate in Single Neurons by Large-Volume Sample Stacking Capillary Electrophoresis" *Analytical Chemistry*, 2017, 89, 12375-12382.

40. Fumihiko Kitagawa, Tatsuya Ishiguro, Misaki Tateyama, Isoshi Nukatsuka, Kenji Sueyoshi, Takayuki Kawai, Koji Otsuka, "Combination of large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump with field-amplified sample injection on cross-channel chips", *Electrophoresis*, 2017, 38, 2075-2080.

41. An Alkynyl-Fucose Halts Hepatoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting

GDP-Fucose-Synthesizing Enzyme FX, TSTA3. Kizuka Y, Nakano M, Yamaguchi Y, Nakajima K, Oka R, Sato K, Ren CT, Hsu TL, Wong CH, Taniguchi N. Cell chemical biology, 24(12) 1467-1478. e5, 2017

42. Suzuki T., Kajino M., Yanaka S., Zhu T., Yagi H., Satoh T., Yamaguchi T., Kato K. Conformational analysis of a high-mannose-type oligosaccharide displaying glucosyl determinant recognized by molecular chaperones using NMR-validated molecular dynamics simulation. ChemBioChem. 18, 396-410 (2017)

43. Kato T., Kako N., Kikuta K., Miyazaki T., Kondo S., Yagi H., Kato K., Park E.Y. N-Glycan modification of a recombinant protein via coexpression of human glycosyltransferases in silkworm pupae. Sci. Rep., 7, Article number: 42257 (2017)

44. Yamaguchi Y., Yagi H., Kato K. Stable isotope labeling of glycoproteins for NMR study. NMR in Glycoscience and Glycotechnology (K. Kato and T. Peters ed.), RSC Publishing (Cambridge), 194-207 (2017)

45. Kato, K., Yagi, H. and Yamaguchi, T. NMR characterization of the dynamic conformations of oligosaccharides, Modern Magnetic Resonance, 2nd Edition (G.A. Webb ed.) Springer International Publishing, 1-18 (2018)

46. 山口拓実, 渡邊東紀男, 矢木宏和, 加藤晃一 分子動力学計算とNMR計測を用いた糖鎖の配座空間探査 J. Comput. Chem. Jpn., 17, 1-7 (2018)

47. 矢木宏和, 加藤晃一 常磁性 NMR 法と計算科学を組み合わせた糖鎖の動的コンホメーション解析 生化学, 90, 198-202 (2018)

3. 当省(国)が実施することの必要性

第1章 I. 3. 「当省(国)が実施することの必要性」の記載を参照されたい。

特に、本プロジェクトに関しては、これまでの抗体医薬等の標的分子の探索においてはタンパク質に焦点が当てられてきたところ、生体のタンパク質の50%以上は糖鎖を持つ糖タンパク質と言われており、その糖鎖は多様性に富んでいるとともに、生体の状態や疾患に応じて、鋭敏に反映して変化することが知られている。そのため、糖鎖を創薬標的とする可能性がかねてより指摘されていたものの、糖鎖を巡る技術的なハードルが高いことから、各製薬企業が単独で本格的に糖鎖を創薬標的とするのは難しいとされていた。一方、我が国はこれまでの糖鎖研究事業の成果として、レクチンアレイ技術や質量分析技術、糖タンパク質合成技術、糖鎖関連データベース、糖鎖遺伝子ノックアウトマウス技術など、世界レベルの基礎研究技術が開発されている。そこで、これまでの糖鎖研究により培った技術を結集し、創薬開発に資する基盤技術として磨き上げることにより、我が国の創薬産業の競争力を底上げできるものと考えられた。このような技術開発には、これまでの糖鎖研究をリードしてきたアカデミアのほか、疾患サンプルを安定して供給可能な臨床現場の参画が不可欠であり、製薬企業等が単独で実施できるものではない。そのため、複数のアカデミア等の知見を動員した医薬品産業全体に資する技術開発であるという観点から、国が実施する必要がある。

4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

下図に示したとおり、プロジェクト3年目までに、極微量の糖鎖を検出する技術、糖鎖の構造解析技術、標的となる糖ペプチドの合成技術、及び標的に対する抗体作成技術につき、基本的な技術開発を完了し、随時集中研への技術導入を行った。そして、集中研にて各要素技術を組み合わせることにより、慶応大から供給される臨床サンプルを利用し、疾患特異的な糖鎖変化の探索、ターゲットの同定、及び構造解析等を進め、最終的に25種の糖鎖標的の構造解析を目指す体制とした。また、プロジェクト3年目以降、糖鎖標的と疾患に関わるメカニズムの解析を実施し、各シーズの創

薬意義の検証を行うことで、円滑なシーズ導出を促進し、アウトカム達成を目指す体制となっている。また、プロジェクト1年目に参画機関間で知財合意書を締結し、プロジェクト開始前から有する知財、及びプロジェクト期間中に得られた知財について、適切な管理に努めた。さらに、本事業では製薬企業等を会員とするユーザーフォーラムを設置し、プロジェクトで解析された糖鎖標的の開発状況等について報告を行うとともに、ユーザーフォーラム会員企業への各シーズの導出を見据えた議論を行った。

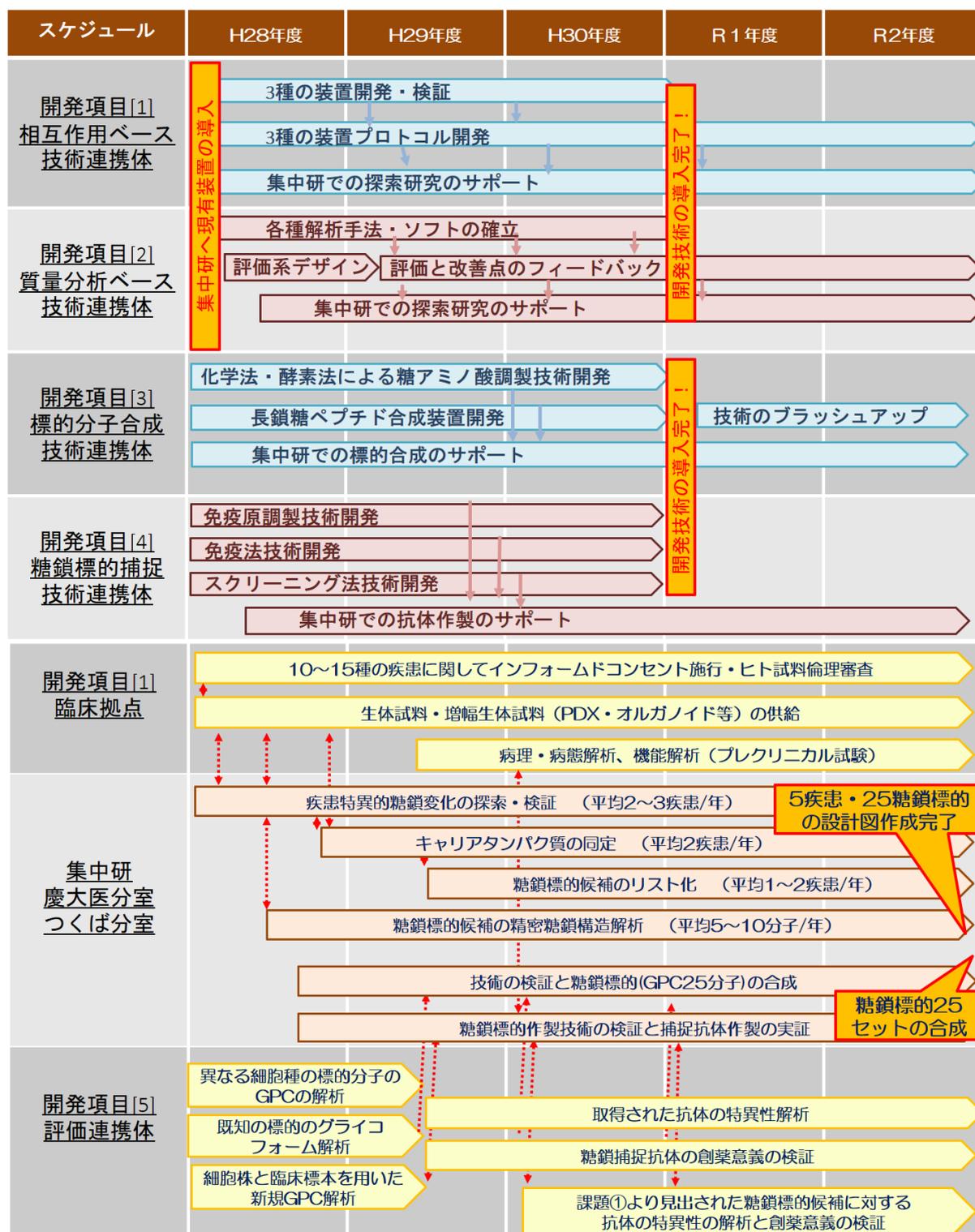


図 2-D-1. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

下図に示したとおり、病理学の分野で多大な功績を残しつつ、糖鎖についても造詣の深い慶応大学医学部の坂元亨宇氏を研究開発責任者とし、その下に研究開発の領域を大きく6つの項目に分け（項目6は、二次公募の課題）、それぞれにSPLを置く形で、研究コンソーシアムを組織した。また、各項目間の連携を促進するべく、項目1~2については久野敦氏、項目3~6については千葉靖典氏をテーマリーダーとし、プロジェクトのアウトカム達成を強く意識したコンソーシアム運営を行った。そして、製薬企業等を会員とするユーザーフォーラムを設置し、これまで計9回会合を開催することにより、各シーズの導出を念頭において定期的に議論を行った。なお、会合の際には、秘密保持契約前後での開示データを細かく特定することで、円滑なシーズ導出に配慮した。さらに、コンソーシアム全体における知財コーディネータとして、発明推進協会に知的財産プロデューサーの派遣を依頼し、プロジェクトに関連する知財について、知財委員会における先行技術調査及び方針策定（論文化すべきか、あるいは特許化すべきか、等）や知財戦略シート作成等を通して、コンソーシアム全体で戦略的な管理を行った。

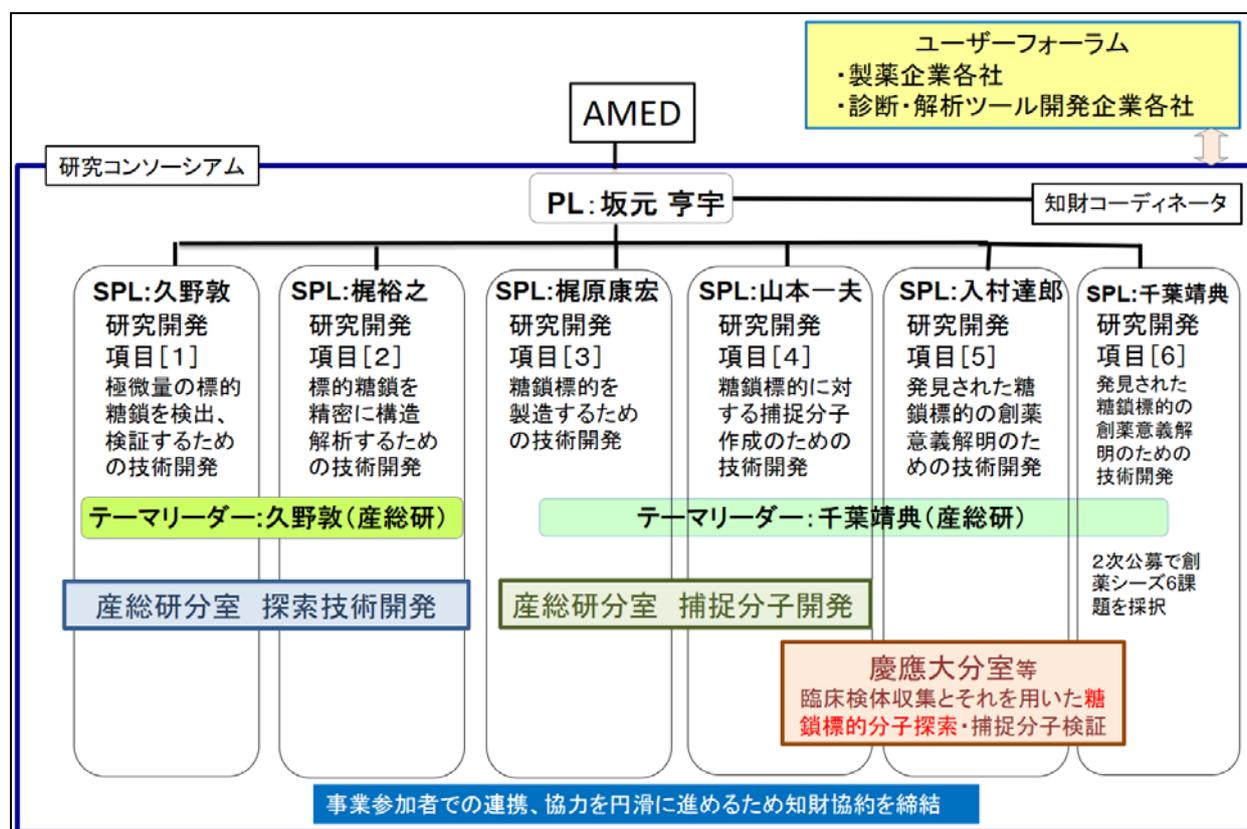


図 2-D-2. 事業実施体制

なお、本プロジェクトについては、AMED の課題評価委員会にて、下記のように中間評価が行われている。

<委員>

	氏名	所属、役職（評価当時）
	伊藤 幸成	国立研究開発法人理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室 主任研究員
	加藤 紘	国立大学法人山口大学 名誉教授
	鏑田 武志	国立大学法人東京医科歯科大学 難治疾患研究所 免疫疾患 分野 教授
(委員長)	中島 元夫	SBI ファーマ株式会社 取締役執行役員 CSO 医薬開発本 部長
	橋本 康宏	公立大学法人福島県立医科大学 医学部 生化学講座 教授
	三善 英知	国立大学法人大阪大学大学院 医学系研究科 機能診断科学 講座 教授
	山口 照英	学校法人金沢工業大学 加齢医工学先端技術研究所 所長 学校法人都築学園 日本薬科大学 客員教授

<評価結果（AMED 中間評価報告書から引用。規模が大きい課題①及び②のみ掲載。）>

①我が国の技術の強みと密接な医工連携体制を活かした標的分子探索・検証のための多角的糖鎖解析システムの構築（項目 [1] 及び [2]）

3. 総合評価

本研究開発課題の研究開発達成状況は特に優れている。

臨床家と基礎糖鎖科学研究者との密な連携により、国際競争力を有する複数の糖鎖解析技術で臨床サンプルを解析し、いくつかの薬物標的候補分子を具体的に挙げる事ができた。今後は、臨床ニーズを考慮した候補分子のスクリーニングを続けるとともに、創薬の観点（例：糖鎖構造の安定性、既存薬との差別化）から分子を絞り込み、ユーザーフォーラム等を介してより魅力のある薬物標的候補分子を製薬企業へ橋渡しすることを期待する。

②多様なグライコプロテオームおよび捕捉分子作製技術開発とその創薬への応用（項目 [3]、[4] 及び [5]）

3. 総合評価

本研究開発課題の研究開発達成状況は優れている。

同じキャリア蛋白でも認識する糖鎖の構造や結合部位が異なる複数の抗体を用いて乳がんの臨床病理標本の染色像に違いがあることを明らかにした。これらの結果は、今後の糖鎖創薬に期待を抱かせるものである。糖ペプチド合成に関しては、O型糖鎖修飾ペプチドの合成技術を確立し、世界に先駆けて全自動化装置の開発研究に着手しており、順調に進んでいる。糖蛋白質を認識する抗体作製に関しては、成功例はあるものの方法論の確立には至っていない。今後は、特にO型糖鎖を有する糖蛋白質を認識する抗体作製の方法論の確立が必要である。

6. 費用対効果

抗体医薬品の世界市場は2015年に約8.6兆円だが、2030年までに約28兆円まで伸びると予測されているところ、新薬開発という観点では、創薬標的の枯渇という問題点が指摘されていた。その点では、タンパク質に加えて糖鎖に着目するコンセプトは、標的が限られていた抗体医薬品の可能性を飛躍的に広げ得る画期的なものである。糖鎖関連技術は、レクチンを用いた構造解析等、日本の強みを有する分野であり、本プロジェクトにより、新薬開発促進に繋がる技術基盤を開発すれば、抗体医薬品のシーズ創出で日本は大きなアドバンテージを得られるものと解される。仮に、新たな標的の同定により、2030年の世界市場において、我が国発の抗体医薬が3%の市場を獲得すれば、約8,400億円/年の経済効果が見込まれる。

したがって、本プロジェクトには3年間で約27億円が投じられているが、プロジェクトで見出された各シーズがユーザーフォーラム会員企業等により製品化されれば、患者にとって副作用が少なく効果の高い抗体医薬品が生まれることとなり、今後も伸びる抗体医薬品市場において、我が国の製薬企業等がシェアを獲得し、将来的には、当該企業から多くの税収も期待されると考えられる。