

認)。次年度より、実際に患者からの試料の採取を行い、プロテオーム解析を行う予定である。

I)-② 組織・細胞などからのたんぱく質の分離・抽出を行うための条件検討

プロテオミクスは言うまでもなく、細胞・組織等で発現している全たんぱく質について、その発現様式を網羅的に解析し、病態を含めた生命イベントを包括的に理解しようとするものである。しかし現状では、生体試料由来の全たんぱく質の時空間的、質的、量的な発現様式や、その通常時(正常・健常状態を含む)と刺激時(疾患状態を含む)における変動について、一挙かつ有効に解析・評価できる方法はない。そのため現時点では、このプロテオミクスを効果的かつ効率的に進めていくために、例えば生体試料由来のたんぱく質を十分なプロテアーゼインヒビターなどで前処理しておき、その時間的変化・質的变化を予め制御しておくことや、細胞膜・核小体・ミトコンドリアなどのような特定の細胞内小器官に予め分画し、空間的制御のもとにプロテオーム解析すること、翻訳後修飾やたんぱく質間相互作用などを指標に予め選択的濃縮したたんぱく質を調整しておくことなど、前処理方法の確立・最適化が必須となっている。即ちプロテオーム解析を行ううえでの大きな課題は依然として、日進月歩で改良され続けている質量分析機器を用いたたんぱく質の同定方法にあるのではなく、むしろ効率的に純粋な材料を調整する方法の開発をはじめとする前処理技術の確立と言える。そこで本研究ではまず、組織・細胞などからのたんぱく質の分離・抽出を行うための条件検討を開始することにした(図 6)。

組織・細胞などからたんぱく質を分離・抽出する代表的な方法として、現在、細胞を破碎することで得られたホモジネートを、顆粒の大きさの違い(沈降速度の差)を利用して超遠心器にて細分化する分画遠心法と、顆粒の密度の違いを利用した密度勾配遠心法がある。分画遠心法は、比較的簡便に大量の細胞内小器官(オルガネラ)成分を分取することが出来るのに対して、密度勾配遠心法は、手技がやや煩雑ではあるが、純度の高いオルガネラ成分の精製が可能である。上記の方法は、それぞれ利点・欠点を有しており、目的によりこ

れらの方法を使い分ける必要がある。現在、簡便にオルガネラ成分を分画出来る超遠心法と、分離能が高いとされる密度勾配遠心法との比較検討を行っており、高度に分離された生体試料の調整を行っている。また、密度勾配遠心法を用いる場合には、その煩雑性や再現性の面からも、各社から販売されているキット(PIERCE 社製、MERCK 社製など)を用いて、これらの比較検討を行っており、効果的かつ効率的にプロテオーム解析に次年度以降展開していく予定である。

I)-③ 2DLC 及び 2DGE によるたんぱく質の分離・精製システムの立ち上げ

最終的に質量分析機器によりたんぱく質を効果的に同定するためには、前述の I)-②などで得られたたんぱく質サンプルを 2 次元液体クロマトグラフィー(2DLC)や 2 次元ゲル電気泳動(2DGE)によりたんぱく質を分離・精製するステップが必要不可欠となる。このうち 2DGE は、たんぱく質を等電点と分子量の差に基づいて 1 枚のゲル上に 2,000~10,000 個のスポットに分離し、これらを可視化、ならびにたんぱく質の直接的な定量が可能である。従来、たんぱく質を可視化するための染色法としては、クマシーブルーや銀染色法が用いられた。しかし最近、2 つの異なった生体試料をたんぱく質の等電点や分子量に相対的な変化を与えない 2 種類の蛍光試薬で別々に標識し、それらを混合して同一ゲル上で分離した後、異なる励起光で励起して可視化した蛍光スポットを多重検出する方法(DIGE; differential gel electrophoresis)が開発された。この方法では同一たんぱく質はゲル上で同じ位置に泳動されるため、試料間のたんぱく質の量的変動を容易に測定できる。電気泳動法は、たんぱく質分子を全体として識別できるという意味ではトップダウン方式といえる決定的な利点を有した分析法で、目的のたんぱく質がゲル上でスポットとして検出できる場合には、そのたんぱく質の翻訳後修飾の状態などの変動解析にも有効である(図 7)。また我々は、2DGE 後の数千スポットを一挙にメンブラントランスファーし、後述する cDNA フェージライブラリを用いてたんぱく質間相互作用解析を行うこと、さらに後述するナイーブ抗体ライブラリを用いて疾患関連細胞で発現しているたんぱく質に対

する抗体を一挙作製することを計画しており、現在白血病細胞を用いて 2DGE を行うと共に、上記ライブラリの利用準備を進めている。

また、たんぱく質やペプチドの分離技術として 2DLC のセットアップも急いでいるところである。2DGE は、分析に時間がかかり、マニュアル操作が多くて自動化が困難なこと、ゲル上で検出できるたんぱく質の分子量や等電点の範囲が限られていること、分析のダイナミックレンジが小さく発現量が少ないたんぱく質の検出が困難なことなどが問題点として指摘されている。一方 2DLC は、たんぱく質混合物を予めプロテアーゼ処理し、消化ペプチドを質量分析するボトムアップ方式に汎用されており、「ショットガン(shotgun)法」とも呼ばれる。この 2DLC は、2DGE に比べて検出できるたんぱく質の量的なダイナミックレンジが広く、また、適用できるたんぱく質の分子量や等電点、水に対する溶解度などに制約が少ないため、生体試料に含まれるたんぱく質の同定数を大幅に向上できる。今後、先述した 2DLC の利点を最大限に利用していくため、膨大な数のペプチドを精細分離することを目的に、カラムの選択(材質、カラム径など)やバッファー組成・流速の最適化などに着手している。さらに、2DGE のディファレンシャル解析と同様に、2DLC でも発現の差異解析を行おうとした場合、同位体コード・アフィニティー・タグ法(ICAT 法)などによるラベル化が必須となるものの、現在のラベル化試薬には修飾部位、修飾効率などの点で懸念や問題を抱えている。本観点から現在、たんぱく質の発現解析をハイスループットで行うための新規ラベル化試薬の設計などを種々領域の研究者と協議中である。

I)-④ 疾患関連たんぱく質ライブラリの構築

プロテオーム解析により探索されてくる数多くの疾患関連たんぱく質について、たんぱく質間相互作用や立体構造、生物機能等を迅速かつ網羅的に明らかとしていくことは、医薬品シーズや創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込み・同定とその創薬への有効活用の観点で最も重要な検討課題と位置づけられる。この点、疾患関連細胞で発現しているたんぱく質を網羅的に手にすること、即ちライブラリ化しておくことは、上記研究分野での圧倒的な競争力を発揮できることになる。本観点から

我々は、cDNA フェージディスプレイライブラリを用いることによる、疾患関連たんぱく質のライブラリ構築を進めている。このフェージディスプレイライブラリを用いれば、目的たんぱく質に相互作用する分子をパンニング法によって迅速かつ網羅的に探索することが可能となる(図 8)。なおフェージディスプレイライブラリとして、繊維状フェージ M13 とラムダフェージ T7 を用いている。M13 フェージベクターでは、コートたんぱく質 g3p の N 末側に外来たんぱく質が融合して提示され、T7 フェージベクターではキャプシドたんぱく質 10B の C 末側に外来たんぱく質が融合して提示される。また、M13 フェージは分子量 6 万以上の高分子たんぱく質の提示効率は、たんぱく質の分子量の増大と共に低下してしまうものの、大きなレパートリーを有するライブラリを構築可能である。一方、T7 フェージでは大きなレパートリーを有するライブラリの構築は困難であるものの、比較的高分子量のたんぱく質をも効率よく提示することが可能である。また、ライブラリ作製に用いる cDNA として、細胞で発現している mRNA から単に合成した場合、発現レベルの低い遺伝子が得られない(発現量の多いたんぱく質の cDNA が大部分を占めてしまう)可能性がある。そこで、発現レベルの違いの影響を小さくすることが可能な均質化ライブラリ、あるいは対照となる細胞と疾患関連細胞において発現量が異なる遺伝子の cDNA を調製し得る subtraction ライブラリ等の技術を新たに適用しているところである。これらの技術を用いた疾患関連細胞 cDNA フェージディスプレイライブラリは次年度以降、たんぱく質の相互作用解析や疾患との関わり方の解明などに極めて有用なツールになるものと考えられる。

II)-① 種々たんぱく質に対する抗体を迅速かつ簡便に作製できる基盤技術の確立

プロテオーム解析により探索されてくる数多くの疾患関連たんぱく質について、その体内・細胞内での局在化解析や生物機能解析を行ううえで、抗体は必須のツールとなる。この疾患関連たんぱく質に対する抗体は、時空間的、質的、量的なたんぱく質の発現変動解析のみならず、抗体医薬や診断薬としても利用可能となる。しかしながら現在、ハイブリドーマ法を利用して疾患関連たんぱく質に対する

抗体を作製しようとした場合、少なくとも3ヶ月以上の期間を要してしまうため、数多くの疾患関連たんぱく質に対する抗体を一挙かつ短時間に作製できる基盤技術の開発が必須となっている。この点、昨今の抗体工学の発展に伴い、抗体中の抗原認識部位である重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)をグリシン残基4つとセリン残基1つで構成されるペプチドリンカー(G4S リンカー)によって連結した1本鎖抗体(scFv)が考案されてきた。従来までのハイブリドーマ法を用いた抗体の生産と比較して、このscFvは、1)簡便かつ短時間で、リコンビナント scFv を安価かつ大量に大腸菌で生産できること、2)遺伝子工学的手法により、抗原への結合親和性の改良や他のたんぱく質との融合体作製などを容易に行えることなどのメリットを有している。scFv は、そのN末端よりVL、G4S リンカー、VHの順からなるVLVH型とVLとVHを入れ換えたVHVL型の2種類の形状を取り得る。その抗原への結合親和性(アフィニティ)に関しては、個々の抗体に大きく依存しており、VLVH型とVHVL型で優劣は付け得ないものの、大腸菌における生産効率や後述するファージ表面への提示効率は一般にVLVH型が勝っているものと考えられている。本観点から我々は、多様性に富んだナীব抗体ファージライブラリを作製するため、VLVH型のscFvを選択した。

現在までに報告されている抗体ファージライブラリは大きく二つに分類される。ナীব抗体ファージライブラリは、抗原感作されていないBリンパ球から、抗体遺伝子を取り出して作製される。一方免疫ファージライブラリは、予め標的抗原で免疫した個体のBリンパ球から抗体遺伝子を回収し、作製される。この免疫ファージライブラリによる抗体作製は、抗体の遺伝子を単離し、大腸菌などにてリコンビナント抗体(scFv)を得るという点を除いては、抗原感作したB細胞とミエロマとの細胞融合によってハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を得るという従来までの方法と殆ど同様である。そのため、抗原が既に判明している場合には簡便かつ短期間に、目的とする標的抗原に対する多種多様な抗体(scFv)が得られるというメリットを有しているものの、我々が本研究で目的としている「疾患関連たんぱく質に対する抗体を網羅的かつ迅速作製し、疾患関連たん

ぱく質の時空間的、質的、量的、機能的解明に応用することで医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を迅速に絞り込む」ためには適さない。一方でナীব抗体ファージライブラリは、理論上あらゆる抗原に対するモノクローナル抗体(scFv)を単離可能なことから、その汎用性、有用性が大いに期待されつつも、未だ世界的に見ても数グループでしか開発されていない。このナীব抗体ファージライブラリの質は、独立クローンからなるライブラリサイズ(モノクローナル抗体の多様性)により決定されるため、如何にライブラリサイズを高めていくかが最も重要な課題となる。しかし上述した既存のナীব抗体ライブラリの作製方法は、B細胞などからVL遺伝子やVH遺伝子を回収してくるためのプライマーの多様性が乏しいことやこれら抗体遺伝子を増幅するためのPCR条件の設定が非常に難しいこと、またPCRによってVH遺伝子とVL遺伝子を、G4Sリンカーをコードした遺伝子(一般にG4Sが3回繰り返されたペプチドでVHとVLを連結する)で連結する際、フレームシフトやミスマッチが頻繁に生じてしまうことなどの点で課題を残しており、ナীব抗体ファージライブラリの質的向上およびその手法の確立が必須課題となっている。そこで本研究では、多様性を十分に持たせ、かつ、リンカー部位において正確なプライミングをする工夫を施したプライマーを設計することによって、上述の課題を充たす膨大な多様性を有する新たなナীব抗体ファージライブラリの構築を試みた。

マウス cDNA より、VL 遺伝子断片、VH 遺伝子断片を表 1 に記載したプライマーを用いPCRにより増幅した。増幅したPCR産物は、約400bp付近と約350bp付近に位置し、目的のVL遺伝子断片とVH遺伝子断片が得られたことを確認した(図9)。この両遺伝子をアッセンブルPCRにて連結し、次いでこのPCR産物をテンプレートとしてscFv遺伝子を増幅した。なお、増幅されたscFv遺伝子は、約900bpであり、一般的なscFv遺伝子サイズ(700~800bp)よりも長くなっている。これは、scFv遺伝子(インサート)をファージミドベクター(pY02)へ一方向性でライゲーションするため、scFv遺伝子の5'末端側に制限酵素SfiIサイトを、3'末端側に制限酵素NotIサイトを付加したこと、またこれら両制限酵素による消化効

率を高めるため(結果的にインサートのベクターへのライゲーション効率が高まる)、十分な付加配列を Sfi I サイトの上流、Not I サイトの下流に導入したためである。

得られた scFv の遺伝子ライブラリを pY02 にライゲーションした後、ライゲーション産物(遺伝子ライブラリが挿入されたファージミドベクター)を大腸菌 TG1 へエレクトロポレーションすることで形質転換した。ライブラリサイズを算出したところ、 5×10^8 種類という大きな多様性を有する大腸菌ライブラリを作製し得た【ひとつの大腸菌には、1 種類の scFv をコードしたファージミドベクターしか存在できない。従って、各大腸菌モノクローン中のファージミドベクターを回収し、各大腸菌由来の scFv 遺伝子の塩基配列が独立的であれば、大腸菌の数(多様性)=ファージの多様性=抗体の多様性となる。下記の知見を考慮し、本結果を考えた場合、 5×10^8 種類もの多様性を有した scFv を表面提示したファージライブラリが作製可能なことを示している。】(図 10)。この大腸菌ライブラリ(ファージライブラリ)の質的評価を目的に、ランダムに 21 クロウンをピックアップし、Direct PCR によって個々の大腸菌に含まれるファージミドベクター中に scFv 遺伝子が存在していることを確認したところ、全ての大腸菌クロウンが scFv 遺伝子を保持していることを認めた。さらに得られた scFv 遺伝子を BstN I し、フィンガープリント解析した結果、21 クロウンが異なった scFv 遺伝子をコードしていることが判明した(図 11)。またデータには示していないものの、これら 21 クロウン由来の scFv 遺伝子をシーケンス解析したところ、scFv の抗原認識部位(相補性決定領域; complementarily determining region; CDR)のみならずフレームワーク領域も異なる配列を有していた。以上の事実は、本研究で設計したプライマーセットを用いることで、多様性に富んだナীব抗体ファージライブラリが創出できることを強く示しているものと考えられた。

ナীব抗体ファージライブラリの決定的な利点、即ち疾患プロテオーム研究にナীব抗体ファージライブラリを利用・活用する意義は、理論上、いかなる抗原に対しても、特異的なモノクローナル抗体(scFv)を迅速かつ簡便に単離可能なことにある。そこで次に、本研究で作製したナীব抗体ファージライブラリ

の有用性評価を目的に、種々抗原に対する scFv の単離を試みた。特定抗原に対する scFv の単離は、パンニングにより行った。パンニングは図 12 に示したように、

- 1) 標的抗原に結合しない scFv 提示ファージなどを取り除き、標的抗原と強い結合力を有する scFv を提示したファージクローンのみを回収すること
- 2) 回収した scFv 提示ファージクローンを再び大腸菌に感染させることで、ファージを増幅し、再度上記 1)を行うこと

で、標的抗原に選択的な scFv 提示ファージを濃縮・選択しようとするものである。そこでこのパンニングを利用し、モデル抗原としてのルシフェラーゼに対する scFv の単離を試みることで、パンニング条件の最適化を図った。

はじめに、ナীব抗体ファージライブラリを抗原に添加した後の洗浄条件(抗原に結合しないファージクローンなどの除去条件)を検討した。プロトコル 1 は、PBS で 10 回洗浄、プロトコル 2 は、PBST で 3 回、PBS で 7 回洗浄、プロトコル 3 では、PBST で 10 回、PBS で 10 回洗浄を行った。インプットファージタイター(抗原に添加したファージ粒子数)とアウトプットファージタイター(洗浄後、溶出されてきたファージ粒子数)との比をパンニングラウンドごとに算出したところ、プロトコル 1 では 1 回目、2 回目のパンニングで大きな変化は認められなかったばかりか、3 回目のパンニング後でインプット/アウトプット比が逆に低下してしまった。一方プロトコル 2 及びプロトコル 3 では、パンニングを重ねるに連れて顕著にインプット/アウトプット比が上昇した。以上の結果は、プロトコル 2 及びプロトコル 3 を用いたパンニングにより、ルシフェラーゼに結合する scFv 提示ファージが濃縮されたことを示している(図 13)。特に最も過酷な洗浄条件を適用したプロトコル 3 において、3 回目のパンニング後に得られたファージクローンは、ルシフェラーゼに対して優れた選択性と結合性をあわせもった scFv を表面提示しているものと考えられた。そこでプロトコル 3 の各パンニング後に得られたファージをバルクで TG1 に感染させた後、生じたコロニーをランダムにピックアップし、モノクローナルなファージを産出させた(大腸菌・ファージのモノクローン化)。続いて、モノクローン化したファージの表面に提示された scFv のルシフェラーゼに対す

る結合性をファージ ELISA にて検討した(図 14)。その結果、3 回目のパンニング後に得られたクローンにおいて、90 クローン中、31 クローンがルシフェラーゼに対して強い結合力を有していた。その結合特異性を評価するため、OVA に対する結合性も同様に検討したところ、これら 31 クローンは OVA に結合しないことが判明した。これらの 31 クローンの scFv についてより詳細に評価するため、BstN I を用いたフィンガープリント解析を行ったところ、少なくとも 18 種の scFv が存在していることが示唆された(図 15)。さらに、4 クローンについては DNA シークエンス解析を試みた結果、異なった scFv であることが確認された(表 2)。以上の結果から、本研究で構築したナイーブ scFv ファージライブラリを用い、抗原パンニングすることで、2 週間以内にルシフェラーゼに対する種々モノクローナル scFv が単離、同定できることが明らかとなった。

次にナイーブ scFv ファージライブラリの有用性をさらに評価するため、血管内皮増殖因子受容体 2 型、血管内皮増殖因子、TNF- α 及び緑濃菌の菌体外毒素フラグメント(単独では毒性を全く発揮しない断片化体)に対してパンニングを行った。その結果、パンニングラウンドが進むに連れて、いずれの抗原に対してもインプット/アウトプット比が上昇していたことから、各抗原に対して特異的に結合する scFv が単離出来得るものと考えられた(図 16)。

scFv ファージライブラリは、モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に単離、同定が可能なシステムとして広く認識されつつある。特に、ナイーブ scFv ファージライブラリは、理論上、あらゆる抗原を認識するモノクローナル抗体を作製可能とさえ言われており、大きな期待が寄せられてはいるものの、有効なナイーブ抗体ライブラリを構築できた例は極めて少ない。その原因として、抗体遺伝子を増幅するためのプライマーセットの問題で VL 遺伝子や VH 遺伝子が有する多様性を再現できないこと、G4S リンカーをコードした塩基配列を利用し、VL 遺伝子と VH 遺伝子を連結するために行うアッセンブル PCR によって、フレームシフトなどが生じてしまうことなどが挙げられる。本研究では、これらの問題点を改善できるプライマーセットを設計することで、ナイーブ scFv ファージライブラリを構築し、その有用性を認めた。

次年度以降は、本年度作製したナイーブ scFv ファージライブラリの改良と疾患プロテオーム研究への展開を図り、例えば疾患関連たんぱく質に対するモノクローナル scFv の網羅的創出を通じ、疾患関連たんぱく質の機能解析、時空間的、質的、量的な観点での発現様式の検索、たんぱく質相互作用の解析に順次展開していく予定である。

II)-② たんぱく質の構造-活性相関を高速解析するための基盤技術の開発

疾患プロテオミクスにより絞り込まれてきた「医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質」を有効活用していく一つのアプローチとして、ファージ表面提示法を利用し、「たんぱく質の構造-活性相関」を高速解析することで、たんぱく質の活性中心や機能ドメインを検索していくことが挙げられる。このなかで最も重要となるポイントは、①たんぱく質中の複数のアミノ酸残基を、一挙に全 20 種類のアミノ酸へと置換した構造変異体(アミノ酸置換体)ライブラリの網羅性(質とサイズ)を如何に高めるか、②膨大な構造変異体ライブラリの諸機能を如何に高速評価していくのか、③この中から例えば、レセプターへの親和性や選択性に優れた変異体や特徴的な生物活性を有する変異体を見つけ出し、その構造-機能(レセプターへの結合様式や生物活性)との連関を追求していくかということである。このうち①に関しては、PCR 条件の設定やファージミドベクターの改良、大腸菌への遺伝子ライブラリの導入法を初めとするファージ産生プロトコルの改善を図った。一方で②と③に関しては、構造変異体を網羅的に表面提示したファージライブラリの中から種々機能特性(レセプター親和性、選択性、生物活性など)を有する構造変異たんぱく質を提示したファージ集団を効率よく選別するため、個々構造変異体の特定ターゲットへの結合親和性の相違などを利用し、BIAcore を活用したソーティングを試みてきた(パンニング)。BIAcore は表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)を利用したバイオセンサーであり、相互作用する分子のうち一方をセンサーチップ表面上に固定化し、他方を含む試料をマイクロ流路系を介して添加し、センサー表面上で起こる分子の結合、解離によって生じる微量な質量変化を、

SPR シグナルの変化としてリアルタイムにモニターする。この BIAcore を用いたパンニングの最大の利点は、例えばレセプターや抗体といったターゲットを極微量調製するだけで、特定ターゲットに対する結合親和性や選択性に基づいた選別が可能となること、またこれら情報をモニタリングできることにある。しかし現状では、これら BIAcore を用いたパンニングの決定的利点は全く生かされておらず、用いるセンサーチップの種類、流速など、種々条件の最適化に関する情報に乏しかった。そこで、BIAcore を用いたパンニングの最適化を図るため、用いるセンサーチップの種類や流速など種々条件を検討した。

BIAcore によるパンニングの最適化を図るため、センサーチップに固相化したレセプターに、ファージのような巨大粒子が結合可能であるか、TNFR1 (TNF レセプター-1) を固相化したバイオセンサーに wild-type TNF- α (wtTNF- α) 発現ファージを添加することにより評価した。一般にたんぱく質分子の結合反応を解析する際、センサーチップとして CM5 が用いられている。しかし、ファージ粒子を適用した場合、ファージ粒子 (直径約 10nm、長さ約 1 μ m) の大きさゆえに CM5 では良好な結果が得られなかった。そこで、CM5 より短いデキストラ鎖をもつ F1 センサーチップを用いて検討した。その結果、ネガティブコントロールとして用いた CD22 に対する一本鎖抗体 (scFv) を表面提示したファージは全くレスポンスが確認されないにも関わらず、wtTNF- α 発現ファージはファージ粒子数の増加と共に、依存的に TNFR1 への結合量も増大することが示された (図 17)。また、一般にたんぱく質分子の結合反応を解析する際、試料は 10 ~ 20 μ l/min の流速で添加するが、ファージ粒子の場合このような早い流速では良好な結果が得られなかった。そのため、種々条件検討したところ、3 μ l/min の流速でファージを添加することにより最良の結果を得た。次に、BIAcore を用いたパンニング効率を検討するため、CD22 に対する scFv 発現ファージに対し 10% の割合で wtTNF- α 発現ファージを加えたものをインプトライブラリとして、TNFR1 を用いたパンニングを行い、回収されたファージ中の wtTNF- α 発現ファージの割合を PCR にて検出した。その結果、わずか 1 回のパンニングにより TNF- α

発現ファージの割合が飛躍的に増大し、BIAcore を用いたパンニングによって、wtTNF- α 発現ファージが選択、濃縮されることが確認された (図 18)

上記の結果は、TNF- α のような高分子たんぱく質を、ファージの外殻たんぱく質上に融合たんぱく質として発現させることが可能であり、さらに発現したたんぱく質が、結合活性を保持した状態で発現していることを示唆するものである。現在までのところ、ファージディスプレイ法を用いて、サイトカインなどの機能性たんぱく質をファージ表面へ発現させ得た例は我々がはじめてで、他には皆無である。本ファージディスプレイ法を用いることで、種々ターゲットへの (Biacore) パンニングなどが可能となったことから、今後種々疾患関連たんぱく質の活性・機能の解析が強力に推進出来るものと期待される。

さて TNF- α は、BCG 感作マウスにリポ多糖を投与した際に血液中に検出され、さらに Meth-A 繊維芽肉腫の出血壊死を惹起する生理活性物質として見いだされたが、*in vitro* において腫瘍細胞に対しては細胞傷害性を示すものの、正常組織細胞に対しては細胞傷害性を示さないことから、夢の抗がん剤として期待されつつも、臨床応用が断念された。これは、体内安定性の乏しさから大量頻回投与を余儀なくされ、全身投与において発熱、悪心、嘔吐、血圧低下、消化管障害、エンドキシン様ショックなどの副作用を引き起こしてしまうため、その投与量は抗腫瘍効果に必要な量の 1/5~1/25 にまで減量せねばならず、期待通りの抗腫瘍効果が得られなかったためであり、その医薬品化は殆ど断念されかけていた。しかし、局所投与、組織灌流による投与では顕著な抗腫瘍効果が認められ、特に欧州ではその医薬品開発が再進行中であり、TNF- α の全身投与を可能とする創薬技術 (薬物動態制御技術) の確立が待望されている。一方で TNF- α は、炎症メディエーターの一つとして、慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎といった自己免疫疾患などの発症、悪化と密接に関わっていることが示されており、「がんに対する医薬品シーズ」としてばかりでなく、「炎症性疾患に対する創薬ターゲット」としても注目されている。そこで本研究では、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の機能解析基盤を確立

しようとする観点から、モデルたんぱく質として TNF- α を選択し、ファージ表面提示法を利用することで、まず TNF- α の構造変異体(アミノ酸置換体)ライブラリの作製を図った。すなわち、本検討では、II)-③で後述するように、医薬品シーズとしてのたんぱく質の安全性と有効性を確保できる基盤技術(体内におけるたんぱく質動態制御技術)の開発を念頭に(N末端アミノ基を標的としたたんぱく質の PEGylation 方法の開発)、TNF- α 中に含まれる全 6 個のリジン残基を他のアミノ酸へ網羅的に置換した構造変異体ライブラリを作製した。

図 4 に示す方法で、ヒト wtTNF- α の全リジン残基を 20 種類のアミノ酸へ網羅的に一挙置換した構造変異 TNF- α をファージ g3p 先端に提示したライブラリを作製した。まず、第一回目の PCR により、Lys65、Lys90、Lys98 をコードしたコドンを、全てのアミノ酸をコードする NNS 配列(N=A/T/G/C、S=G/C)に置換した 162bp の PCR 断片を作製した。この PCR 断片を用いた第二回目の PCR によって Lys112、Lys128 のコドンも NNS 配列に置換された 251bp の PCR 断片を得た。さらに、この断片をプライマーとして用い、ヒト wtTNF- α 遺伝子をテンプレートとして用いた第三回目の PCR により、TNF- α の 6 個のリジン残基が全て NNS 配列に置換された 463bp の PCR 断片を得た。この構造変異 TNF- α をコードした PCR ライブラリを、ファージミドベクターに組み込むことにより、全リジン残基がランダムなアミノ酸に置換された構造変異 TNF- α を発現するファージライブラリを作製した。その後、最適条件で大腸菌への形質導入、ファージ作製を行うことで、理論的ライブラリサイズ(20⁶種類=約 6000 万種類)に匹敵した質の高い構造変異体ライブラリの作製に成功した。このファージライブラリを用い、上述の最適化されたパンニングや BIAcore 解析を行ったところ、興味深いことに TNF- α 中に含まれる全 6 個のリジン残基が他のアミノ酸に置換されているにもかかわらず、wtTNF- α と同等以上の生物活性やレセプター親和性を保持した 2 種類のリジン欠損 TNF- α を見出した(表 3)。以後、この 2 種類のリジン欠損体を mTNF- α -K90R、mTNF- α -K90P と記す。これら両リジン欠損 TNF- α の pI 値は wtTNF- α と比較し大幅に減少しており、さらにたんぱく質表面電荷を GRASP 法により確認

したところ、その表面電荷は明らかに負電荷を帯びていることが示唆された(図 19)。また TNF- α 特有の生物活性を評価するため、可溶性の mTNF- α -K90R もしくは mTNF- α -K90P を含んだファージ上清を用いマウス LM 細胞に対する細胞傷害性を検討したところ、いずれも TNF- α としての生物活性を十分に保持していることが示唆された。次に、mTNF- α -K90R、mTNF- α -K90P を、T7 プロモーター下に発現するベクターを構築し、大腸菌 BL21 株に導入することにより、2 種類のリジン欠損 TNF- α を作製した。これら両リジン欠損 TNF- α の 1 級アミン量をフルオレスカミン法によって測定した結果、wtTNF- α (6 個のリジン残基+1 個の N 末端アミノ基で計 7 個の 1 級アミノ基を有している)と比較して、いずれも理論値通り約 1/7 に減少していたことから、確かに wtTNF- α 中の全 6 個のリジン残基(三量体としては 18 個)が他のアミノ酸に置換されていることが確認された(図 20)。また SDS-PAGE 解析したところ、wtTNF- α と同様にいずれも 17 kDa の単一のバンドとして観察された(図 21A)。さらにゲル濾過 HPLC により解析した結果、いずれのリジン欠損 TNF- α も wtTNF- α と同一の位置に溶出ピークを示した(図 21B)。以上の事実は、これら両リジン欠損 TNF- α では、これまでの点突然変異解析からホモ三量体形成に重要といわれてきた Lys11 が他のアミノ酸に置換されているにもかかわらず、ホモ三量体形成していることを強く示唆している。次に、比活性を算出するため、マウス TNFR1 を介した *in vitro* における生物活性を、国際的な共通プロトコルであるマウス LM 細胞(L929 細胞の無血清培養株)に対する細胞傷害性試験により評価したところ(図 22A)、mTNF- α -K90P は wtTNF- α と同等の比活性を有することが明らかとなった。一方、mTNF- α -K90R は、wtTNF- α の 5.6 倍もの強い比活性を有していた。これらの LM 細胞に対する傷害活性は、TNF- α の TNFR1 を介した活性発現を選択的に阻害できる抗 TNFR1 抗体で阻害されたことから、これら両リジン欠損 TNF- α が TNF- α 固有の生物活性を保持していることが示された。次に、これら両リジン欠損 TNF- α のヒト TNFR1 に対する生物活性をヒト Hep2 細胞に対する細胞傷害性試験を用いて評価した(図 22B)。その結果、mTNF- α -K90P は wtTNF- α と同等の比活性

を、mTNF- α -K90R は wtTNF- α の約 10 倍という優れた生物活性を有することが判明した。なお、この mTNF- α -K90R は現存する人工 TNF- α の中で最強の比活性を有するものである。更に、TNFR2 を介した生物活性を、TNFR2を強制発現させた PC60 細胞を用い、その GM-CSF 産生を指標に評価した(図 23)。その結果、両リジン欠損 TNF- α は共に、wtTNF- α と比較して、約 2 倍の生物活性を保持していることが明らかとなった。そこで BIAcore を用いて、両リジン欠損 TNF- α のヒト TNFR1、TNFR2 に対する解離定数を検討した(表 4 及び表 5)。その結果、TNFR1 に対しての解離定数はいずれも、wtTNF- α の約 70% に低下していたことから、TNFR1 に対する結合力が增大していることが示された。また、TNFR2 に対しては、wtTNF- α と比較して mTNF- α -K90R は約 50%、mTNF- α -K90P は約 60%にまで解離定数が低下しており、TNFR2 に対しても結合力が增大していることが示唆された。以上の事実は、これまでの点突然変異解析からレセプター結合に重要といわれてきた Lys65、Lys90 が他のアミノ酸に置換された両リジン欠損 TNF- α が、wtTNF- α 以上のレセプター結合能を有していることを示した興味深い知見である。

次に、wtTNF- α とヒト TNFR1 の結合モデルを構築し、mTNF- α -K90R、mTNF- α -K90P のレセプター結合力増大機構について考察した(図 24)。wtTNF- α では Lys90 は Glu135 と水素結合し、レセプター結合領域と考えられるアミノ酸 84 番目から 89 番目のループ構造を安定化していると考えられる。mTNF- α -K90R では、Lys90 がアルギニンに置換されることでリジンと同様に Glu135 と水素結合し、ループ構造安定化に寄与していると考えられた。mTNF- α -K90P では Pro90 が Iso83 と疎水結合することで、ループ構造安定化に寄与していると考えられた。さらに、wtTNF- α の Lys65 は、TNFR の Lys78 と電気的、立体的に反発していると考えられる。両リジン欠損 TNF- α ともセリンに置換されることで、電気的、立体的反発が減少し結合力が上昇したと考えられる。現在、これらを実証するため両変異体の構造解析を X 線結晶構造解析法や NMR、電子顕微鏡などを利用して推進している。

疾患プロテオーム情報を利用し、医薬品

シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を創薬領域で有効活用していくためには、①医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の生理的な機能を解明し、②医薬品として応用するための、治療目的に応じたたんぱく質の分子設計の最適化を行う必要がある。すなわち、多種多様なたんぱく質について、その構造変異体を網羅的に作製し、これらのレセプター・リガンド結合の様式・強度などをも含めた機能情報をハイスループットに評価可能な方法論の構築と、その立体構造との連関を網羅的に評価することが大きな研究課題となっている。この点、「ファージ表面提示法を駆使した構造変異たんぱく質の網羅的作製とその機能解析」は、有望なツールになり得ることが明らかとなった。本研究成果は、得られた数多くの構造変異たんぱく質の立体構造と機能特性との連関評価を通じて、「機能→構造」に関する知見の集積が可能となり、将来的に機能性人工たんぱく質を合理的設計し得るファーマコ・バイオインフォマティクスの構築にも貢献し得るものと期待している。

II)-③ たんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤技術の創出

たんぱく療法の最適化に向け、従来から産官学の多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた機能性人工たんぱく質などを創製するため、Kunkel 法といった点突然変異法を用いた構造変異たんぱく質(アミノ酸置換体)の作製を精力的に試みている。しかし点突然変異法では、まず構造変異たんぱく質の立体構造や機能をシミュレーションし、トライ・アンド・エラーで生理活性たんぱく質の構成アミノ酸を一つずつ別の特定アミノ酸に改変することにより、個々の構造変異たんぱく質を作製せねばならない。そのうえで目的とする機能性人工たんぱく質を探索・同定するため、作製した構造変異たんぱく質の諸機能を個別に評価する必要がある。そのため従来法では、時間ばかりが消費され、かつ作製し得る構造変異たんぱく質の多様性(種類)にも限界があるなど、期待通りの成果は得られていない。そのため、効率良く目的作用を有する機能性人工たんぱく質を創製できるテクノロジーの開発が望まれている。

一方で、上述した人工たんぱく質の創製

にあたり、その候補たんぱく質として受容体を介したシグナル伝達により、生体内の恒常性を保つサイトカインが考えられる。サイトカインは、血球細胞や血管内皮細胞、また組織の実質細胞より分泌され、個体の発生・分化及び免疫反応など多彩な生理作用を有している。このサイトカインを利用することで、疾患の治療を実施しようとする試みが全世界的に行われているものの、未だ臨床応用されたものは数えるほどしかない。中でも、TNF- α は、それ自身の持つ抗腫瘍効果により、がん治療への応用が20世紀後半に期待されたものの、その副作用により臨床応用は叶わなかったサイトカインとして知られている。このTNF- α は、17 kDaの単量体あたり6個のリジン残基を有しており、ホモ三量体形成することで初めて活性型となる(三量体として18個のリジン残基を有する)。このTNF- α の抗腫瘍メカニズムは、1)直接的な腫瘍細胞傷害、2)血中の抗腫瘍エフェクター免疫細胞の活性化、3)腫瘍血管の特異的傷害により引き起こされることが知られている。TNF- α 投与によって腫瘍血管特異的に血管透過性が亢進されることを我々は既に認めているので、TNF- α の血中滞留性を向上させれば、これら全ての作用を効率よく増強することが可能になるものと予想される。また、その副作用は肝臓、脾臓、小腸などの正常組織への移行により引き起こされてしまうため、TNF- α の血中滞留性を高めることができれば、副作用発現組織への移行を低減し、副作用軽減に直結することにもなる。従って、もしwtTNF- α よりも高い比活性を有し、かつ全リジン残基が他のアミノ酸に置換されたリジン欠損TNF- α が作製できれば、Lowering pI 効果に起因する血中滞留性向上効果によって、その抗腫瘍作用を選択的に増強できるものと期待される。そこで前述した2種類のリジン欠損TNF- α のうち、生物活性が10倍に増強したmTNF- α -K90Rについて、*in vivo*抗腫瘍効果や毒性をMeth-A 担がんマウスにおける出血壊死作用などを指標に評価し、さらにその血中動態について検討した。

mTNF- α -K90Rの*in vivo*における抗腫瘍効果は、Meth-A 担がんマウスに単回尾静脈内投与し、その24時間後の腫瘍出血壊死作用を指標に評価した(図25)。wtTNF- α 投与群では、3 μ g 投与でさえ十分な腫瘍出血壊

死作用を発現できないうえ、実験に供したマウスの10%に突然死が見られるなど、強烈的な副作用が認められた。一方、mTNF- α -K90R 投与群では0.3 μ g 投与においてwtTNF- α 3 μ g 投与群と同等以上の出血壊死作用が認められ、3 μ g 投与により多くの完全治癒例も認められた。さらに、副作用の指標としてのLD50値を求めた結果、wtTNF- α では390 μ g/kgであったのに対し、mTNF- α -K90Rでは510 μ g/kgであり、その毒性は顕著に低下していた。従って、mTNF- α -K90Rは、wtTNF- α と比較して、*in vivo*における抗腫瘍作用が10倍に、LD50値は1.3倍となり、その治療域はwtTNF- α の13倍に向上していることが判明した。次に静脈内投与後の血中動態を検討した(図26及び表6)。その結果、wtTNF- α と比較して顕著な血中滞留性の向上が認められ、mTNF- α -K90Rの血中半減期、AUCはともに約2倍に増大していた。この、血中滞留性の向上は、カチオン性リジン残基を他のアミノ酸へ置換したことによるLowering pI効果に起因したものであり、抗腫瘍作用増大、副作用軽減に寄与したものと考えられた。

本研究では、ファージ表面提示法を独自に改良することにより、たんぱく質中の多数のアミノ酸を各々20種類のアミノ酸へ一挙に置換することで、 10^8 種類以上もの多様性を有した構造変異たんぱく質をCombinatorial Biosynthesisし、この中からレセプター親和性・特異性などの高い「医薬価値に優れた機能性人工たんぱく質」を効率良く同定できる基盤技術を確立した。例えばアラニン・スキャンといった従来の特異変異法を用いた構造-活性相関研究により、TNF- α のLys11やLys65、Lys90はその立体構造(三量体)形成やレセプター結合に必須の役割を担っているものと考えられていた。これはTNF- α に限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性たんぱく質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうものと考えられていた。事実、これまで活性を完全に保持させたまま、たんぱく質中のリジン残基全てを欠損させ得た例(機能性リジン欠損体)は無い。しかし本研究では、TNF- α 中の全6個のリジン残基を一挙に他のアミノ酸へ置換しても、wtTNF- α と同等以上ものレセプタ

一親和性や生物活性を有するリジン欠損 TNF- α を創製することに初めて成功した。この wtTNF- α と同等以上の生物活性を有するリジン欠損 TNF- α は、wtTNF- α よりも血中滞留性に優れていること、その in vivo 抗腫瘍効果は、Lowering pl 効果により、wtTNF- α と比較して有意に向上しているうえ、その毒性は顕著に低下しており、その治療域は wtTNF- α の十数倍以上にも向上していることが明らかとなった。以上の事実は、ファージ表面提示法を駆使した基盤技術を利用することで、医薬品シーズとなるたんぱく質から、安全性と有効性に優れた人工たんぱく質を産み出し得ることを強く示しており、他を圧倒する創薬的競争力を提供する可能性を示すものと期待している。

たんぱく質に水溶性高分子を結合させる高分子バイオコンジュゲーションは、たんぱく質の生体内挙動を制御でき、医薬品としてのたんぱく質に高い安全性と有効性を付与できる基盤技術として認識されている。この高分子バイオコンジュゲーションの中で、ポリエチレングリコール(PEG)を修飾高分子として用いた場合、PEGylation(ペギレーション; PEG化)と呼ばれている。このたんぱく質のバイオコンジュゲーションは、たんぱく質の分子量が増大することによる腎排泄速度の減少をもたらすだけでなく、バイオコンジュゲーションに用いた修飾高分子によりたんぱく質の分子表面が覆われ、プロテアーゼからの攻撃が立体障害的にブロックされることなどにより、たんぱく質の生体内半減期を延長させることが可能である。同様の立体障害効果によって、免疫応答においても抗原性が低下し、体内滞留性の延長に結びつく。以上に述べた総合的な体内安定性向上効果により、最終的にたんぱく質の投与量・投与回数の削減が可能となる。しかしながら、高分子バイオコンジュゲーションによるたんぱく性医薬品の実用化は、IFN- α などの例外を除き、アデニン・デアミナーゼ、L-アスパラギナーゼ、スーパーオキシド・ディスムターゼなど主に低分子物質を基質とする酵素たんぱく質に限られている。この最大の原因は、活性発現部位への高分子導入による致命的な比活性低下とバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性にある。これは、現在汎用されているバイオコンジュゲーション法が、たんぱく質のリジン ϵ アミノ基や N 末端 α アミノ基へ、ランダム

に高分子導入するものであることに起因している。従って、バイオコンジュゲーションを既知のたんぱく質に限らず、今後の疾患プロテオーム解析などによって見いだされる「医薬品シーズとなるたんぱく質」へも適用していくためには、これら問題点を克服できる新たなバイオコンジュゲーション法の開発が必要不可欠である。

これまで、高分子の修飾部位を制御することでたんぱく質の比活性低下を回避する試みは世界的に行われてきた。特に、遺伝子工学的に活性発現に無関係な部位に人為的にシステイン残基を導入した変異たんぱく質を作製し、遊離のチオール基をターゲットとした部位特異的バイオコンジュゲーション法に期待が寄せられている。そこでまず、TNF- α が分子内に遊離のチオール基を持たないことと、活性発現に N 末端側は関与していないことより、活性発現に重要でない N 末端側に新たなシステイン残基を導入し、そのチオール基をターゲットとすることで部位特異的バイオコンジュゲーションを試み、その有用性・汎用性を検討した。

N 末端にシステイン残基を導入するため、システイン残基をコードする TCG 配列を組み込んだプライマーを用いて、wtTNF- α 遺伝子をクローニングした。次に、T7 プロモーター下にてたんぱく発現するベクターを構築し、大腸菌 BL21 株に導入することにより、リコンビナントたんぱく質を作製した。IPTG で TNF- α の発現を誘導後、インクルージョンボディから産出されたたんぱく質を回収し、可溶化、refolding 操作を行った後、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーによって精製を行った。精製したたんぱく質の比活性を LM 細胞に対する細胞傷害性試験により検討した結果、N-cys-TNF- α (wtTNF- α の N 末端にシステイン残基を導入した変異体)の比活性は wtTNF- α と比較して、著しく低かった。これは、導入したシステイン残基のチオール基を介した様々な分子間、または分子内ジスルフィド結合が形成され、異常なフォールディングをきたしてしまったためと考えられた。以上の結果から、たんぱく質の精製条件や、システイン残基の導入部位の決定には詳細な検討が必要であることが示唆された。また、これら精製条件や導入部位の検討には各々のたんぱく質についてその都度個々に行っていくことが必須と考えられた。そのうえ、活性を保持したシステイン残

基導入変異たんぱく質が作製でき、部位特異的バイオコンジュゲーションが可能となった場合においても、チオール基への高分子導入効率の低さから、十分な収率でバイオコンジュゲート体が得られないという問題を抱えている。そこで次に収率に優れた「アミノ基をターゲットとしたバイオコンジュゲーション」を活用し、修飾部位を制御できる方法の確立を目指した。即ちリジン欠損体である mTNF- α -K90R に対する N 末端アミノ基への部位特異的バイオコンジュゲーションを試みることに、従来までのアミノ基を標的としたランダムバイオコンジュゲーションの問題(比活性低下と分子的不均一性)を一挙に解決し得るものと考えた。

wtTNF- α 及び mTNF- α -K90R のバイオコンジュゲーションは、最も汎用されている直鎖状で分子量 5,000 の活性化 PEG を用い、アミノ基を標的とした PEGylation を行った。各 PEGylation 産物を SDS-PAGE 解析したところ、wtTNF- α のリジン ϵ アミノ基・N 末端 α アミノ基に対してランダムに PEGylation した場合には、高分子側にシフトした複数のバンドが確認され、ヘテロな分子集団となってしまうことが判明した(図 27)。一方 mTNF- α -K90R の PEGylation では、TNF- α モノマーに対して PEG が 1 分子だけ導入されたバンドしか観察されなかった。以上の事実は、N 末端のアミノ基のみへ選択的に PEG 導入されていることを強く示唆するものである。次に N 末端アミノ基を標的とした部位特異的 PEGylation の有用性を評価するために、TNF- α 三量体あたり 1 分子の PEG だけが結合したモノ PEG 化 TNF- α をゲルろ過 HPLC などによって分取精製した。以後、mTNF- α -K90R の部位特異的モノ PEG 化体を sp-PEG-mTNF- α -K90R、wtTNF- α のランダム・モノ PEG 化体を ran-PEG-wtTNF- α と記す。これら両モノ PEG 化 TNF- α のマウス TNFR1 を介した比活性を LM 細胞に対する細胞傷害性を指標に検討した結果、ran-PEG-wtTNF- α では僅か 1 分子の PEG をランダム導入するだけで、未修飾 wtTNF- α の約 6%にまで比活性が低下していた(図 28)。一方、sp-PEG-mTNF- α -K90R では未修飾 mTNF- α -K90R の約 60%もの強い比活性を有していること、さらに未修飾 wtTNF- α よりも 3 倍以上強い比活性を保持していることが判明した。

次に、sp-PEG-mTNF- α -K90R の静脈内投与後の血中濃度推移を評価した(図 29 及び表 7)。その結果、Lowering pl 効果と PEGylation 効果による相乗作用により、その血中半減期及び AUC は、未修飾 mTNF- α -K90R の約 2 倍、wtTNF- α の約 4 倍にも向上していることが明らかとなった。sp-PEG-mTNF- α -K90R の *in vivo* における抗腫瘍効果は、Meth-A 担がんマウスに対し、単回尾静脈内投与し、その 24 時間後の腫瘍出血壊死を指標に評価した(図 30)。未修飾 wtTNF- α 投与群では、3 μ g の投与でさえ十分な出血壊死を誘導できなかった。また wtTNF- α に対してランダムにモノ PEGylation した ran-PEG-wtTNF- α では、wtTNF- α と比較して僅かな抗腫瘍効果の増大を認めただけでなかった。一方、sp-PEG-mTNF- α -K90R 投与群では 1 μ g 投与において、mTNF- α -K90R 3 μ g 投与群より強い抗腫瘍効果が認められ、その抗腫瘍効果は未修飾 mTNF- α -K90R の 3 倍以上にも増強していた。前述したように mTNF- α -K90R は、wtTNF- α よりも 10 倍強い *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮することから、sp-PEG-mTNF- α -K90R は未修飾 wtTNF- α と比較して 30 倍も強い抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、副作用の指標としての LD50 値を検討した結果、wtTNF- α では 390 μ g/kg、mTNF- α -K90R では 510 μ g/kg、ran-PEG-wtTNF- α では 1290 μ g/kg、sp-PEG-mTNF- α -K90R では 780 μ g/kg であったことから、sp-PEG-mTNF- α -K90R の治療域は wtTNF- α の 60 倍に拡大していることが示唆された。次に腫瘍増殖抑制効果について検討した結果、sp-PEG-mTNF- α -K90R は mTNF- α -K90R より強い抗腫瘍効果が認められた(図 31)。

現在、数多くの製薬メーカーやバイオベンチャーが、たんぱく質の医薬品化を目指し、たんぱく質のバイオコンジュゲーションを試みている。しかし、臨床応用されたものは酵素などの低分子化合物を基質とするものが大半である。その原因は、活性部位への高分子導入による著しい比活性低下と、分子的・機能的不均一性にある。そのため、バイオコンジュゲーションにおける比活性低下、分子的不均一性を克服する方法論の開発が世界的に試みられているものの、未だ十分な基盤技術の開発

には至っていない。この点本研究で示したリジン欠損たんぱく質に対する部位特異的バイオコンジュゲーションは、従来までのランダムなバイオコンジュゲーションにおける様々な欠点を一挙に解決できること、Lowering pl 効果とバイオコンジュゲーション効果によって、たんぱく質の多様な *in vivo* 作用の中から目的とする治療作用を選択的に発現させ得ることを明らかとすると共に、sp-PEG-mTNF- α -K90R の新規抗がん剤としての有用性が示された。我々はこれまで、組織特異的移行能を有する高分子、PEGよりも血中滞留性に優れた高分子の開発にも成功しており、今後機能性人工たんぱく質の創製と部位特異的バイオコンジュゲーションとの融合システムを適用し、プロテオーム創薬のための動態制御技術のさらなる開発を目指す予定である。

II)-④ たんぱく質の細胞内局在性を解析するための基盤技術の検討

プロテオーム解析により疾患状態で発現量の変動しているたんぱく質が同定された後の解析段階として、そのたんぱく質が疾患に及ぼす影響を解析するために、当該たんぱく質の機能解明が必要不可欠になってくる。たんぱく質の機能を推定するうえで、顕微鏡イメージングによる細胞内での局在および挙動解析は最も有用な手法のひとつである。細胞が生存した状態で、標的たんぱく質の細胞内局在を観察するためには、蛍光標識などの手法を用いる必要があり、green fluorescence protein (GFP)等の蛍光たんぱく質と標的たんぱく質との融合蛋白として細胞で発現させる方法などが考えられる。生細胞における細胞内たんぱく質の挙動を観察するためには GFP 融合たんぱく質を発現させる必要があるが、これは効率よく融合たんぱく質を発現させるためのベクターを構築する必要があること、GFP との融合により当該たんぱく質の機能・活性を損なう可能性があること、発現量が生理的な状態とは異なる可能性があることなど種々の問題がある。一方、抗体やアフィニティ分子を介して標識する免疫染色法は、生細胞での標識が困難であること、たんぱく質に tag などのアフィニティペプチドを付加する、あるいは特異抗体を作製する必要があるなどの問題を有するが、たんぱく質本来の局在・量を可視化するこ

とができる。したがって、これらの手法を適宜組み合わせることにより、たんぱく質の局在・挙動の効率よい解析が可能になるものと考えられる。

蛍光イメージングにおいて最も重要な問題は、蛍光物質の感度である。現在、間接標識に用いられている FITC をはじめとする有機蛍光色素は、一般に不安定で褪色し易いため、少量しか存在しない分子の染色や長時間の観察が困難である。したがって安定性が高く、高い輝度有する蛍光物質が望まれている。このような中、最近、半導体量子ドット (quantumdot; QD) と呼ばれる新たな蛍光物質が開発された。QD は Cd-Se (カドミウムセレン) などの半導体物質からなる直径数ナノメートルの粒子であり、光を照射すると、ナノメートルサイズという大きさに起因する量子効果により、粒子径の違いによって青色から赤色にわたる種々の波長の蛍光を発する。さらに QD は高輝度で極めて光安定性が高いことなど、多くの優れた光学特性を有することから、バイオイメージングの領域への応用が期待されている。そこで、たんぱく質の細胞内局在・挙動解析に QD を用いた蛍光イメージングを適用することを目的に、QD を用いた免疫染色法の確立と、光学特性の評価を試みた。

まず、streptavidin 修飾された QD を用いて固定化細胞の細胞骨格 (tubulin) の染色を試みた。種々の染色条件検討の結果、十分な浸透化処理とブロッキングを行うことにより、Streptavidin 修飾された QD を用いることで、固定化培養細胞 (Hela, Hep3B) の細胞骨格を特異的に染色することができた (図 32)。さらに、QD と従来の有機蛍光色素の光安定性の比較を試みた。褪色防止剤を使用しない条件において、従来の蛍光色素の中では安定性が高いことで知られる Alexa や DAPI は、UV 連続照射により速やかに褪色し、1 分後にはほぼ消光した (図 33)。それに対して QD は 80 秒間の照射後でも全く蛍光強度の低下を示さず、極めて高い安定性を有することが判明した。これらの結果より、QD が蛍光トレーサーとして優れた性能を有することが明らかとなった。今後は、特異抗体と QD のコンジュゲート法の確立などを行うことにより、細胞内局在解析へ活用していく予定である。また一方、GFP 融合たんぱく質発現系を用いた生細胞でのたんぱく

質の挙動解析法の確立を行い、これらを統合的に利用することにより、たんぱく質の機能の解明に展開する予定である。

E. 結論

本年度の分担研究により、下記の結論を得た。

I) 効果的かつ効率的な疾患プロテオーム解析基盤を確立

①臨床検体の受入体制の確立し、疾患プロテオーム解析を行うにあたり、成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) 患者の試料確保および受入れ態勢を整えた。

②組織・細胞などからのたんぱく質の分離・抽出を行うための基礎検討を行った。現在、本検討手法と他の様々な手法との比較を行っており、より純度の高い細胞質内小器官由来のたんぱく質の抽出・精製法を確立する予定である。

③2DLC 及び 2DGE によるたんぱく質の分離・精製システムを立ち上げたため、まず 2DGE を用いたたんぱく質の分離を行い、細胞質由来たんぱく質のスポットを確認した。今後、2DGE 後のゲル内より、たんぱく質を精製し、これらのたんぱく質を同定していくために、分離・精製システムの最適化と共に、質量分析装置を用いた検討を行う予定である。

④疾患関連たんぱく質ライブラリの構築を目的に疾患関連細胞 cDNA フェージディスプレイライブラリについて検討を行った。今後、本ライブラリを活用し、たんぱく質の相互作用解析等を行う予定である。

II) たんぱく質の機能解析とその有効活用法の開発

①種々たんぱく質に対する抗体を迅速かつ簡便に作製できる基盤技術の確立を試み、従来までの問題点を改善したナイーブ抗体フェージライブラリを構築した。今後、ナイーブ抗体フェージライブラリのさらなる改良に加え、種々疾患関連たんぱく

質に対して抗体を作製し、その機能解析や局在解析、相互作用解析などに適用していく予定である。

②たんぱく質の構造-活性相関を高速解析するための基盤技術の開発を試み、フェージ表面提示法を活用することで、数千万種類以上もの構造変異体を 2 週間以内に作製し、その機能特性 (レセプター親和性、選択性、生物活性など) を評価できる基盤技術を構築した。今後、種々疾患関連たんぱく質の構造-機能相関研究や活性ドメインの検索、以下の③などへの応用と、当該基盤技術の改良を進める予定である。

③たんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤 (動態制御) 技術の創出を試み、N 末端アミノ基を標的とした部位特異的バイオコンジュゲーション法を構築し、従来法の問題点を一挙に解決し得た。今後、疾患プロテオミクスにより絞り込まれてきた医薬品シーズについて、本技術を適用していくなど、さらなる動態制御技術の開発を進める予定である。

④たんぱく質の細胞内局在性を解析するための基盤技術の検討を試み、たんぱく質の細胞内局在や挙動解析を行うためのツールとして、半導体量子ドットを用いた蛍光イメージング法の評価を行い、その有用性を明らかとした。

F. 健康危険情報 特記事項無し。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Ikemizu S., Yamamoto Y., Shibata H., Nishibata T., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Shimizu T., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S.,

- Yamagata Y., Mayumi T. : Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF-alpha improves its antitumor potency., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315(4): 808-814, 2004.
2. Kaneda Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. : The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs., *Biomaterials*, 25(16): 3259-3266, 2004.
 3. Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Kamada-Sato K., Okamoto T., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T. : Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic acid) as a novel renal targeting carrier., *J. Control. Release.*, 95(2): 229-237, 2004.
 4. Katayama K., Wada K., Miyoshi H., Ohashi K., Tachibana M., Furuki R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakajima A., Kadowaki T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kamisaki Y., Mayumi T. : RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA., *FEBS Letters*, 560(1-3): 178-182, 2004.
 5. Gao J.Q., Learth L. A., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors., *Pharmazie*, 59: 238-239, 2004.
 6. Kodaira H., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. : The targeting of anionized polyvinylpyrrolidone to the renal system., *Biomaterials.*, 25: 4309-4315, 2004.
 7. Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Kamada H., Kihira T., Tsunoda S., Yamamoto Y., Okamoto T., Shibata H., Mukai Y., Taniai M., Shimizu T., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Mayumi T. : Selective enhancer of tumor vascular permeability for optimization of cancer chemotherapy., *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 437-439, 2004.
 8. Okada N., Gao J.Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Anti-tumor activity of chemokine is affected by both the kinds of tumors and the activation state of host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317: 68-76, 2004.
 9. Kamada H., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. : Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy., *Clin. Cancer Res.*, 10(7): 2545-2550, 2004.
 10. Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Mukai Y., Shibata H., Okamoto T., Kaneda Y., Tsunoda S., Kamada H., Koizumi K., Yamamoto Y., Mu Y., Kodaira H., Kamada-Sato K., Nakagawa S., Mayumi T. : Effective accumulation of poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl laurate) into the spleen., *J. Biomed. Materials Res.*, 70A(2): 219-223, 2004.
 11. Eto Y., Gao J.Q., Sekiguchi F.,

- Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of methoxypolyethylene glycol succinimidyl propionate (MPEG-SPA)., *Biol Pharm Bull.*, 27(6): 936-938, 2004.
12. Gao J.Q., Inoue N., Tsukada Y., Katayama K., Eto Y., Kurachi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : High gene expression of mutant adenovirus vector both in vitro and in vivo with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber., *Pharmazie*, 59: 571-572, 2004.
 13. Okamoto T., Mukai Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kawamura M., Yamamoto Y., Nakagawa S., Kamada H., Hayakawa T., Mayumi T., Tsutsumi Y. : The Optimal Construction of Non-immune scFv phage display library from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs binding to antigens efficiently., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323(2):583-91, 2004.
 14. Yoshikawa T., Imazu S., Gao J.Q., Hayashi K., Tsuda Y., Shimokawa M., Sugita T., Niwa T., Oda A., Akashi M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Augmentation of antigen specific immune responses using DNA-fusogenic liposome vaccine., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325(2):500-505, 2004.
 15. Shibata H., Yoshioka Y., Ikemizu S., Kobayashi K., Yamamoto Y., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., Tsutsumi Y. : Functionalization of TNF-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window., *Clin. Cancer Res.*, 10(24): 8293-8300, 2004.
 16. Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T. : Recent progress on tumor missile therapy and tumor vascular targeting therapy as a new approach., *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2: 259-270, 2004.
 17. Okamoto T., Nakagawa S., Tsutsumi Y.: The optimal molecular design of polymeric drug carriers and its application for renal drug targeting., *Gene Ther. Mol. Biol.*, 8: 221-229, 2004.
 18. Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T., Tsutsumi Y.: Development of novel drug delivery system technologies for proteomic-based drug development., *Biol. Pharm. Bull.*, 27(10): 1483-1488, 2004.
 19. 堤 康央 : たんぱく療法の最適化に叶う DDS の開発を目指して., *薬剤学(生命とくすり)*, 64(3): 159-163, 2004.
 20. 柴田寛子, 真弓忠範, 堤 康央: たんぱく療法の最適化に叶う新たな薬物送達戦略., *医学のあゆみ*, Vol.210 (9): 730-736, 2004.
 21. 堤 康央 : プロテオーム創薬に叶う DDS 基盤技術の開発., *薬学雑誌*, 124(11): 769-780, 2004.
 22. 向 洋平, 真弓忠範, 堤 康央 : ファージ表面提示法を駆使した機能性人工たんぱく質の創製と DDS への応用., *Bioベンチャー*, 4(6): 65-68, 2004.
 23. Sugita T., Yoshikawa T., Gao J.Q., Shimokawa M., Oda A., Niwa T., Akashi M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. : Fusogenic liposome can be used as an effective vaccine carrier for peptide vaccination to induce CTL response., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(1): 192-193, 2005.
 24. Gao J.Q., Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Eto Y., Motomora Y.,

- Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S. : A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328: 1043-1050, 2005.
25. Shibata H., Shinsaku Nakagawa, Tsutsumi Y.: Optimization of protein therapies by polymer-conjugation as an effective DDS., *Molecules*, 10: 162-180, 2005.
- (2) 学会発表
1. 杉田敏樹, 高 建青, Alexandre Learth Soares, 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 中山隆志, 水口裕之, 早川堯夫, 義江 修, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : Cell Delivery System によるがん遺伝子治療の最適化., 遺伝子デリバリー研究会第4回シンポジウム, 京都, 2004年5月.
 2. 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 高 建青, 堤 康央, 水口裕之, 前田光子, 川崎 鮎一, 早川堯夫, 真弓忠範, 中川晋作 : 体内動態制御を目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製., 遺伝子デリバリー研究会第4回シンポジウム, 京都, 2004年5月.
 3. Tomoaki Yoshikawa, Norihiro Yamamoto, Toshiki Sugita, Tomoko Yamato, Takako Niwa, Naoko Kanagawa, Mariko Shimokawa, Kazuyoshi Kubo, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : Efficient delivery of encapsulated molecule to antigen presenting cells by Fusogenic-Liposome., 第2回世界薬学会議(PSWC), 京都, 2004年5月.
 4. Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : Enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor induced by the PEGylation., 第2回世界薬学会議(PSWC), 京都, 2004年5月.
 5. Jian-Qing Gao, Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : Enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor induced by the PEGylation., 第2回世界薬学会議(PSWC), 京都, 2004年5月.
 6. 堤 康央 : プロテオーム創薬に叶うDDS 基盤技術の開発., 理研セミナー, 筑波, 2004年6月.
 7. 堤 康央 : 生理活性たんぱく質の体内挙動を時空間的に制御できる高分子バイオコンジュゲーション法の確立., 製剤セミナー, 千葉, 2004年7月.
 8. 柴田寛子, 阿部康弘, 岡本貴行, 向洋平, 川村真紀, 大和友子, 中川晋作, 鎌田春彦, 堤 康央, 真弓忠範 : プロテオーム創薬にかなう機能性人工たんぱく質の迅速創出とそのバイオコンジュゲーションへの展開., 第20回DDS学会, 東京, 2004年7月.
 9. 阿部康弘, 柴田 寛子, 岡本 貴行, 向 洋平, 川村 真紀, 大和 友子, 中川晋作, 堤 康央, 真弓 忠範 : フェージ表面提示法を駆使した部位特異的バイオコンジュゲーションの最適化., 第20回DDS学会, 東京, 2004年7月.
 10. 川村真紀, 岡本貴行, 柴田寛子, 向洋平, 大和友子, 阿部康弘, 中川晋作, 堤 康央, 真弓忠範 : フェージ表面提示法を利用した新規細胞内移行

- ペプチドの網羅的探索システムの構築., 第 20 回 DDS 学会, 東京, 2004 年 7 月.
11. 向 洋平, 大和友子, 岡本貴行, 柴田寛子, 川村真紀, 阿部康弘, 中川晋作, 鎌田春彦, 堤 康央, 真弓忠範 : 新規腎ターゲットイングキャリアの開発と腎不全に対するたんぱく療法の最適化., 第 20 回 DDS 学会, 東京, 2004 年 7 月.
 12. 大和友子, 向 洋平, 岡本貴行, 柴田寛子, 川村真紀, 阿部康弘, 中川晋作, 堤 康央, 真弓忠範 : 細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの特性評価に関する基礎検討., 第 20 回 DDS 学会, 東京, 2004 年 7 月.
 13. Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa : PEGylation of adenovirus vector enhances gene expression in tumor via systemic administration., 第 10 回日本遺伝子治療学会, 豊中, 2004 年 7 月
 14. 倉知慎之輔, 衛藤佑介, 高 建青, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範, 中川晋作 : 体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの in vivo 遺伝子発現特性に関する検討., 第 20 回 DDS 学会, 東京, 2004 年 7 月.
 15. 杉田敏樹, 高 建青, 金川尚子, 畑中豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : 抗腫瘍免疫細胞の体内動態を制御する Cell Delivery System によるがん免疫療法の最適化., 第 3 回ファーマ・バイオフォーラム 2004, 東京, 2004 年 11 月.
 16. 高 建青, 杉田敏樹, 金川尚子, 飯田恵介, 中山隆志, 水口裕之, 早川堯夫, 義江 修, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : Cell Delivery System に基くがん免疫療法の最適化., 第 54 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2004 年 11 月.
 17. 大川亜紀子, 向 洋平, 柴田寛子, 川村真紀, 大和友子, 阿部康弘, 今井直, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : 抗体療法の最適化を目指したリジン欠損一本鎖抗体の創製., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 18. 阿部康弘, 柴田寛子, 向 洋平, 川村真紀, 大和友子, 今井 直, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : サイトカイン療法の最適化を目指した新規部位特異的バイオコンジュゲーション法の開発とその評価., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 19. 今井 直, 向 洋平, 柴田寛子, 大和友子, 川村真紀, 阿部康弘, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : ファージ抗体ライブラリによる抗原特異的モノクロナール抗体の網羅的な迅速単離., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 20. 向 洋平, 柴田寛子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : 医薬価値に優れた機能性人工 TNF- α の創製とその疾病治療への展開., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 21. 柴田寛子, 向 洋平, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : がん免疫療法の最適化を目指した機能性サイトカインの創出システムの開発とその評価., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 22. 鎌田春彦, 角田慎一, 山本陽子, 真弓忠範, 早川堯夫, 堤 康央 : サイトカインの新規バイオコンジュゲーション法の開発とその有用性評価., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 23. 杉田敏樹, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫,

- 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : IL-12 及び CCL27 発現アデノウイルスベクターの併用投与による抗腫瘍効果と免疫系細胞の浸潤., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
24. 大和 友子, 向 洋平, 柴田寛子, 川村真紀, 阿部康弘, 今井 直, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : 細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの特性評価., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 25. 川村真紀, 柴田寛子, 向 洋平, 大和友子, 阿部康弘, 今井 直, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央 : フェージ表面提示法を利用したウイルス感染を担うペプチド探索法の構築., 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月.
 26. 衛藤佑介, 高 建青, 倉知慎之輔, 森重智弘, 櫻井文教, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : 体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討., 日本薬学会第 20 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 27. 大川亜紀子, 川村 真紀, 岡本貴行, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 向洋平, 大和 友子, 山名田夏枝, 今井直, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 角田慎一, 早川堯夫, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使した新規細胞内移行ペプチドの網羅的創出システムの確立., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 28. 金川尚子, 高 建青, 杉田敏樹, 飯田恵介, 本村吉章, 衛藤佑介, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : IL-12 発現アデノウイルスベクターを用いた IL-12 非奏功性腫瘍に対する治療効果に関する検討., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 29. 倉知慎之輔, 衛藤佑介, 高 建青, 森重智弘, 櫻井文教, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : Polyethylene Glycol 修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 30. 丹羽貴子, 吉川友章, 小田淳史, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 麻生定光, 太田成男, 真弓忠範, 中川晋作 : 変異型 Bcl-XL(FNK) 遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-1., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 31. 杉田敏樹, 高 建青, 金川尚子, 飯田恵介, 本村吉章, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作 : IL-12 と CCL27 の併用による抗腫瘍効果増強機構の解明., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 32. 大和友子, 向 洋平, 柴田寛子, 川村真紀, 山名田夏枝, 阿部康弘, 今井直, 大川亜紀子, 野村鉄也, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 角田慎一, 早川堯夫, 堤 康央 : 細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの特性評価., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 33. 向 洋平, 大和友子, 柴田寛子, 川村真紀, 山名田夏枝, 阿部康弘, 今井直, 大川亜紀子, 野村鉄也, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 角田慎一, 早川堯夫, 堤 康央 : 次世代ターゲティング療法を目指した新規細胞内移行ペプチドの創製., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 34. 柴田寛子, 川村真紀, 岡本貴行, 阿部康弘, 大川亜紀子, 野村鉄也, 向洋平, 大和友子, 山名田夏枝, 今井直, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 角田慎一, 早川堯夫, 堤 康央 : たんぱく質断片化ペプチドライブラリを利用したたんぱく質機能ドメインの新規探索システムの構築—その1., 日本薬学

- 会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
35. 吉川友章, 丹羽貴子, 小田淳史, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 麻生定光, 太田成男, 真弓忠範, 中川晋作 : 変異型 Bcl-XL(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-2., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 36. 阿部康弘, 川村真紀, 岡本貴行, 柴田寛子, 大川亜紀子, 向 洋平, 大和友子, 今井 直, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 角田慎一, 早川堯夫, 堤 康央 : たんぱく質断片化ペプチドライブラリを利用したたんぱく質機能ドメインの新規探索システムの構築—その2., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.
 37. 堤 康央 : 機能性人工たんぱく質の創製と疾病治療への応用., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2004 年 3 月.
 38. 海老原千晶, 近藤昌夫, 蓮池直輝, 原田東樹, 藤井まき子, 向 洋平, 堤 康央, 渡辺善照 : Claudin-4 指向性分子の創製., 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項無し。
2. 実用新案登録
特記事項無し。
3. その他
特記事項無し。

表1 マウス抗体(scFv)の遺伝子を増幅するためのオリゴプライマーセット

VL-5' Primers	5'-cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY ATT GTD HTV WCH CAG TC-3' 5'-cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY ATT NWK MTV AHD CAG TC-3' 5'-cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY RTY BWR MTS ACM CAR WC-3' 5'-cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY ATY SWG MTG ACN CAR BC-3' 5'-cct ttc tat gcG GCC CAG CCG GCC atg gcc GAY RYT GTK RTR MYY MRG DW-3'
VL-3' Primers	5'-acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc acc CCG TTY NAK YTC CAR CTT DG-3' 5'-acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc acc MCS TWB NAB HKY CAV YYT DG-3'
VH-5' Primers	5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc SAK GTB MAG CTB MAG SAS TC-3' 5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc SAG GTY CAR CTB CAR CAR TC-3' 5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc SAV GTS MWS BTG RWG SAR TC-3' 5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAK GTG MAV SKG RTG GAR TC-3' 5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc GAR GTR MAR STT SWB GAG TC-3' 5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc SAK GTB MMN YTV VWV SWR YS-3'
VH-3' Primers	5'-cgg cac cgg cgc acc tGC GGC CGC YGA RGA RAC DST GAS MRK RGT-3' 5'-cgg cac cgg cgc acc tGC GGC CGC YGA RGA RRM SKK KAS WGW GRT-3' 5'-cgg cac cgg cgc acc tGC GGC CGC YGA GGA GAC KGT GAS HGD GGH-3'

S=G/C, R=G/A, K=G/T, M=A/C, Y=C/T, W=A/T, H=A/C/T, B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T, N=A/T/G/C

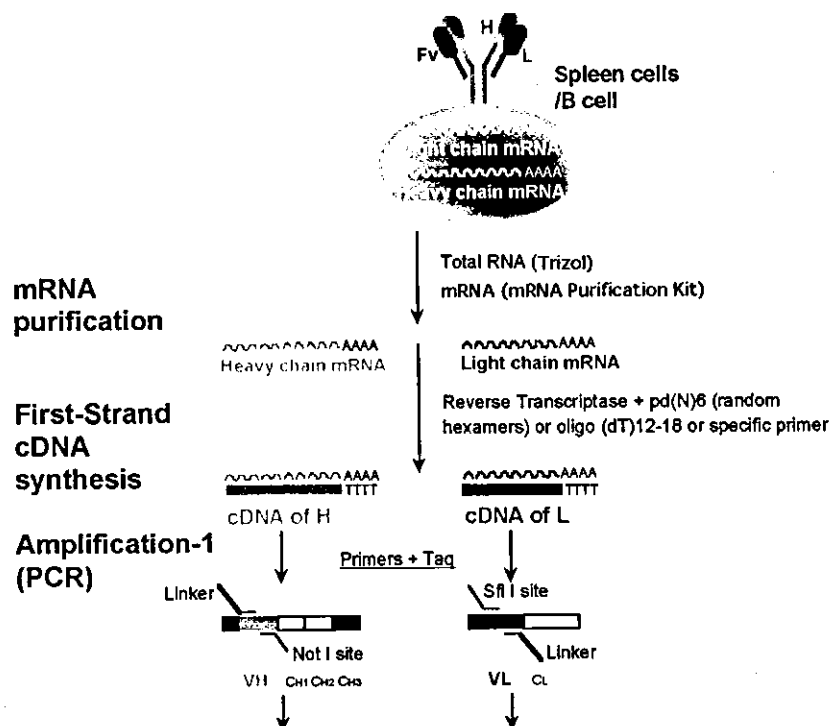


図1 マウス由来のナイーブVL遺伝子及びナイーブVH遺伝子の増幅