

薬物の細胞内トラフィックや生体内挙動を制御できる ペプチド性DDSキャリアの創製システムの開発とその 評価

所属 国立医薬品食品衛生研究所
研究者 堤 康央

研究要旨 本研究ではファージ表面提示法を基盤として、蛋白性薬物を安全かつ効果的に細胞内送達できる新規キャリアペプチド (PTD)を迅速探索できるシステムの開発を目指した。その結果、既存の PTD よりも細胞内移行性に優れた新規ペプチドを複数同定できた。

A. 研究目的

ゲノム研究は収穫期を迎え、ライフサイエンス研究は、疾患の発症や悪化・治癒、さらには発生・分化といった様々な生命イベントで生じる蛋白質の時空間、質的・量的な変動を包括的に解明しようとするプロテオミクス、蛋白質の立体構造や蛋白間相互作用と生命現象との連関を理解しようとする構造ゲノミクスなどへと集約されつつある。そのため今後、「疾病治療に有望な医薬品シーズとしての蛋白質」を探索・創製しようとするプロテオーム創薬がさらに加速度を増して進展するものと期待されている。しかしながら、過去の数多くの事例が示すように、蛋白質は一般に微量で多様な *in vivo* 作用を有するため、臨床応用の際には目的とする治療作用のみならず、重篤な副作用の原因となる他の作用までも同時に発揮してしまう。そのため、このプロテオーム創薬を推進するためには、安全かつ効率よく①蛋白質を病態組織へターゲティングしたうえで、②標的細胞の表面レセプターや細胞内、さらには特定オルガネラへデリバリーできる Drug Delivery System (DDS) の開発が、依然として必要不可欠となっている。特に転写因子など、現在次々と機能解明されている細胞内蛋白質を疾病治療に有効な医薬品として開発しようとした場合、上述の①と②を充たす DDS を開発しない限り、その薬効は全く期待できない。本観点から従来より、多種多様な DDS が考案されてきたものの、周知のように上述の①と②を十分に満足させ得た例は殆ど無い。一方で最近、HIV 由来の TAT ペプチドといった PTD (Protein Transduction Domain) と蛋白質との複合体・融合体が、BBB バリア (血液-脳関門) を通過し、血中から脳内へ移行できること、細胞外から細胞内へ侵入できることなどが判明し、PTD をペプチド性

DDS キャリアとして適用しようとする試みが注目されている。しかし現状では、いずれの PTD も、組織・細胞への選択性 (特異性) や細胞内への蛋白質導入効率の乏しさ、細胞毒性などの点で多くの問題を抱えており、既存の PTD の改良や新たな PTD の開発が待望されている。以上の背景から本年度研究ではまず①に着目し、ファージ表面提示法を基盤として、安全かつ効果的に蛋白性薬物を細胞内送達できる新規 PTD の探索・同定システムの開発を図った。

B. 研究方法

<18merのランダムペプチドをコードした遺伝子ライブラリ及びファージライブラリの作製>

2 種類のオリゴ 5'-GATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3'及び 5'-CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNGGCATGGCCGGCTGGGCGCATAGAA-3' 【注 : N=A/T/G/C, S=G/C】を分子生物学実験グレードの蒸留水 (D.W.) で 25 μ M に希釈したものを各々 2 μ L と、10 \times klenow Buffer (0.5 M Tris-HCl, 0.1M MgCl₂, 1 mM DTT, 500 μ g/mL BSA) 4 μ L, D.W. を加えて総量 40 μ L にし、96°C 10 分間、70°C 5 分間、37°C 10 分間、16°C 10 分間で反応させ、2 種類のオリゴをアニーリングさせた。この反応液に Klenow Fragment 1 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L, 10 \times klenow Buffer 1 μ L, D.W. 7 μ L を続いて添加し、37°C で 1 時間反応させた。得られたサ

ンプルは、QIAquick PCR Purification Kitで精製し、アガロース電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit で目的の遺伝子断片 (8merのランダムペプチドをコードした遺伝子ライブラリ) をD.W.で抽出した。抽出後の遺伝子断片溶液 (0.5 μ L) をテンプレートとし、5'-GGAAACAGCTA TGACCATGATTACGCCAAG-3' および 5'-GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') をプライマーとして用い、96°C 1分間、65°C 1分間、68°C 1分間で 35 サイクルのPCRをKOD酵素を用いて行い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子ライブラリを増幅した。この遺伝子ライブラリをHind III、Not Iによって制限酵素処理し、T4 ligaseを用いてファージミドベクター (pY03'-FLAG) に 16°Cで 16時間ライゲーションした。なおこのpY03'-FLAGは、ファージ外殻蛋白質g3pと挿入遺伝子の産物 (本研究では、18 アミノ酸からなるランダムペプチド)、タグペプチドとしてのFLAGとの融合蛋白質を大腸菌に発現させるためのベクターである。ライゲーション産物をPCR purification kitで精製した後、大腸菌 (TG1) へエレクトロポレーションした。プレインキュベーション後、50 μ g/mLアンピシリン、2%グルコース含有 2YT培地でOD600=0.4 まで大腸菌を培養し、ファージ産生のため、M13KO7 ヘルパーファージを適量添加した。110 rpm 30分間、250 rpm 30分間培養後、3,000 rpm 10分遠心し、得られたペレットに 50 μ g/mLアンピシリン、50 μ g/mLカナマイシン 含有 2YT培地を添加し、6時間培養することで、ファージを培養上清中に誘導した。この培養上清を氷冷し、3,000 rpm 10分間および 12,000 rpm 10分間遠心することで、不溶物を除去し、上清を再回収した。回収した上清に氷冷した 20%PEG8,000、2.5 M NaClを1/5 volumeで加え、1時間静置後、12,000 rpm 15分間遠心した。得られたファージペレットをNTE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 μ mのフィルターを通し、18 アミノ酸からなるランダムペプチドをg3p蛋白質との融合体として表面提示した精製ファージライブラリ溶液とした。

<Cell panning>

ヒト扁平上皮がんA431細胞は 10%ウシ胎仔血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。6 wellプレートに 1.0×10^6 cells/2 mL/wellで細胞を播種し、24時間培養した。PBSで 3回洗浄した後、細胞とファージの非特異的結合を回避するための 2%BSAを含んだ Opti-MEM I Reduced-Serum Medium,

Liquid (Opti-MEM)を 2 mL/well加え、37°Cで 2時間培養することでブロッキングを行った。Mediumを除去し、予め細胞とファージの非特異的結合を回避するために 2%BSAを含むOpti-MEMでブロッキングを行った [18 アミノ酸からなるランダムペプチドを表面提示した精製ファージライブラリ] をインプット (input) ファージ溶液として、6 wellプレート上のA431細胞に 2 mL添加し、37°Cで2時間培養した。その間、15分おきにプレートを振とうした。プレートをPBSで 20回洗浄することで、A431細胞に結合していないファージ等を取り除いた。次に 100 mM HClを1mL添加し、4°C、10分間静置後、上清を回収することでA431細胞に結合したファージを回収し、これに 500 μ LのTris-HCl Buffer pH8.0を加え、アウトプット (output) ファージ溶液とした。以上のパニング操作を複数回繰り返すことで、A431細胞へ選択的に結合する、もしくはA431細胞に侵入したファージクローンを選択・濃縮した。ファージライブラリ中より選別されたファージは、大腸菌TG1に感染させ、この大腸菌をAmp⁺ LB plateに播種・培養した。生じたコロニーをバルクで回収し、QIAprep Miniprep Kitを用いてプラスミドをバルク回収した後、ペプチドをコードした遺伝子部分だけを制限酵素処理によって切り出した。このバルクのペプチド遺伝子をPSIF (蛋白質合成阻害因子) をコードしたファージミドベクターにライゲーションした後、再度大腸菌にエレクトロポレーションし、Amp⁺ LB plateに播種・培養した。なおこのファージミドベクターは、ペプチドとPSIFの融合体を大腸菌培養上清中に発現させるものである。PSIFは単独では、細胞外から細胞内へ移行できないため、細胞に何ら作用を示さないが、細胞内に導入されれば効率よく蛋白質合成阻害活性を発揮できる。最終的に、ペプチドPSIFの融合蛋白質をコードしたファージミドベクターを有する大腸菌を個々回収し、96穴プレートで培養することで、大腸菌 (ペプチドPSIFをコードしたファージミドベクター) をモノクローン化した。

<PTDのスクリーニング>

96穴プレートにピックアップした各々の大腸菌モノクローンが OD600=0.3~0.6に達するまで培養した後、2000 rpmで15分間遠心し、上清を除去した。100 μ g/mL アンピシリン、1 mM IPTG 含有 2YT培地を 100 μ L/wellで添加し、37°C、250 rpmで18時間培養することで、培養上清中にモノクローン化されたペプチドPSIF融合蛋白質を誘導した。2000rpmで15分間遠心後、回収された上清をモノクローン化されたペプチドPSIF融合蛋白質サンプルとした。A431細胞を播種・培養した 96穴

プレートに各サンプルを5 μ L/well で添加し、24 時間培養した。最終的に MTT 法により 各モノクローン化されたペプチドPSIF 融合蛋白質の蛋白質合成阻害活性 (細胞傷害性) を指標に、PTD 活性 (細胞外から細胞内への侵入活性) を評価した。

倫理面への配慮)

本研究の遂行には、組換えDNA実験を避け得ないが、組換えDNA実験指針 (平成14年文部科学省告示第5号) などにに基づき、機関承認実験として承認を受けている (No.330、No.331、No.332、No.333、No.334)。

C. 研究結果・考察

現在、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来の Tat ペプチドに代表される 細胞外から細胞内へ移行できるキャリアペプチド (PTD) を、細胞内に導入されて初めて薬効を発揮できる蛋白質などの細胞内動態制御に適用しようとする試みが注目されている。しかし、PTD の細胞内への移行メカニズムや細胞内局在など、未だ解明されていない点が多く残されていることに加え、現存する PTD の導入効率では、細胞内の病態関連蛋白質や遺伝子などをターゲットとした疾病治療を行うためには不十分と考えられている。そのため、現存するPTDよりも細胞外から細胞内への蛋白質 (薬物) 導入効率に優れた新規 PTD を創製することが、重要課題となっている。しかしこれまで、PTD や種々機能性ペプチド、生理活性ペプチドの探索・同定に用いられてきた人工的なペプチド合成の手法を用いた従来法では、PTD 等の同定に多大な労力と時間を要してしまう。以上の観点から本研究では、細胞外から細胞内へ移行できるキャリアペプチド (PTD) の迅速探索・同定システムの開発を目指し、ファージ表面提示法と PSIF を有効活用した新たな方法論の構築を図った。

まず図1に示す方法で、ランダムな18アミノ酸で構成されたランダムペプチドをコードした遺伝子ライブラリを構築した。全てのアミノ酸をコードできる NNS 配列 (N=A/T/G/C、S=G/C) を 18 個含むオリゴと、これに一部相補的な配列をもつオリゴを用いて PCR を行い、18 アミノ酸からなるランダムペプチドをコードした遺伝子ライブラリを作製した。この cDNA 断片を pY03'FLAG にライゲーションし、大腸菌に形質転換することで、18 アミノ酸からなるランダムペプチドと g3p との融合蛋白質を産生する大腸菌ライブラリを作製した。形質転換後に得られたコロニー数より、ライブラリのサイズを評価したところ、 2.0×10^6 種類であることが示唆された。大腸菌ライ

ブラリの中からランダムに大腸菌モノクローンをピックアップし、ペプチドをコードした領域の遺伝子配列を解析したところ、全てのクローンが全く異なる 18 アミノ酸をコードした遺伝子を有していたことから、作製した大腸菌ライブラリが独立したクローンで構成されることが示唆された (表1)。この大腸菌ライブラリにヘルパーファージを感染させることで、最終的に 18 アミノ酸からなるランダムペプチドを表面提示したファージライブラリを得た。

PTD が細胞外から細胞内へ移行するためには、細胞膜との相互作用やアンカリングといった細胞膜 (セプター等も含めて) との結合・貫通が必須のステップとなるため、18アミノ酸からなるランダムペプチドを表面提示したファージライブラリを用い、A431細胞に対する結合力に基づいたパンニング (細胞に対する結合性を持ったファージクローンの選択・濃縮) を行った。その結果、パンニングの回数が増大と共に添加した input phage に対する output phage の割合が約 72 倍にまで上昇し、A431細胞に効率よく結合できるペプチドを提示したクローンが選別できていることが判明した (図2)。

本研究で使用したファージミドベクターは、大腸菌 (TG1) へ導入し、形質転換させた後、ヘルパーファージを添加することで、18アミノ酸からなるランダムペプチドと g3p との融合体を表面提示したファージライブラリを作製できる一方で、ヘルパーファージを添加しない場合には、18アミノ酸からなるランダムペプチドを可溶型として培養上清中に誘導できるという利点を有している。そこでパンニングによって選別されてきたファージ集団から、ペプチドをコードした遺伝子領域のみをバルクで回収し、ペプチド-g3p 融合体ではなく、ペプチドPSIF 融合体を発現できるファージミドベクターにバルクで組み替え、大腸菌を形質転換させた。得られた大腸菌コロニーを 96 穴プレートへと個々回収し、モノクローン化した。続いてモノクローン化した大腸菌を培養することで、可溶型としてペプチドPSIF を培養上清中に誘導し、別の A431細胞を培養している96穴プレートに各々添加した。即ち本アプローチは、可溶型として産生されたペプチドPSIF 融合体の蛋白質合成阻害活性を A431細胞の生存率を指標にスクリーニングすることで、ペプチドの PTD 活性をハイスループットに評価しようとするものである。現存する PTD の中で最も導入効率に優れている Tat ペプチドと PSIF との融合体を作用させた群の細胞生存率を 100% として評価したところ、1st output クローンと比較して、3rd output クローンでは、Tat ペプチドより強い細胞傷害性を有するクローンが急激に増加していた (図3)。次に全ての output クローンの中から Tat ペ

プチドと比較して、特に PTD 活性に優れていると予想された 7 クローンについてシーケンス解析を行い、7 つの新規 PTD を同定した(表 2)。

D. 結論

本研究で構築した PTD の探索・同定システムは、細胞外から細胞内への移行能を有したキャリアペプチドを迅速かつ網羅的に探索できることが示唆された。また既存の Tat ペプチドを上回る複数の PTD を見出すなど、平成 16 年度の研究計画を十二分に達成できた。現在、上述の PTD 探索システムのさらなる改良や別途観点からの新規システムの開発を進めるとともに、得られた新規 PTD の細胞特異性や組織特異性、安全性などの点についての詳細な解析と、疾病治療への有効活用を図っている。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.

- ④ 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.
- ⑤ Shibata H., Nakagawa S., Tsutsumi Y.: Optimization of protein therapies by polymer-conjugation as an effective DDS., *Molecules*, 10: 162-180, 2005.
- ⑥ 堤 康央 : 蛋白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.
- ⑦ 柴田寛子, 真弓忠範, 堤 康央: 蛋白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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 向 洋平, 真弓忠範, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使した機能性人工蛋白質の創製と DDS への応用., *Bioベンチャー*, 4(6): 65-68, 2004.

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 による癌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, 川崎敏一, 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, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi : PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides show high transduction efficiency and protection ability from neutralizing antibodies., 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 : 生理活性蛋白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蛋白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 : ファ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 : ファ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 : 新規腎ターゲットキャリアの開発と腎不全に対する蛋白療法の最適化., 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による癌免疫療法の最適化., 第3回ファーマ・バイオフィォーラム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に基づく癌免疫療法の最適化., 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ーナ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: 癌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: ファ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: ファ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, 堀 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, 堀 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, 堀 康央 : 次世代ターゲティング療法を旨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, 堀 康央 : 蛋白質断片化ペプチドライブラリを利用した蛋白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, 堀 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, 堀 康央 : 蛋白質断片化ペプチドライブラリを利用した蛋白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. 堀 康央 : 機能性人工蛋白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, 堀 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。

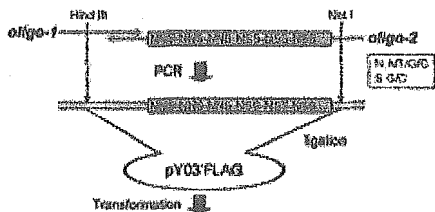


図1. 10merのランダムペプチドライブラリーを構築するためのファージクローニングの概略

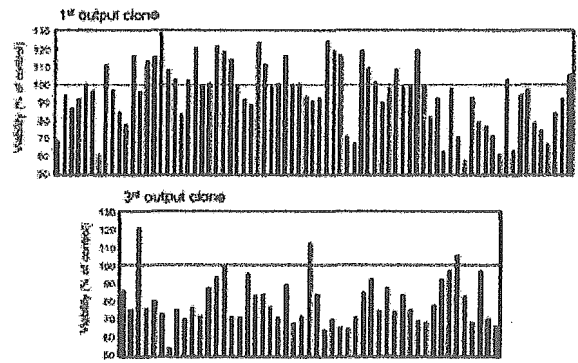


図3. 新規PTDのスクリーニング

表1. パンニング前のライブラリーに由来する10merのペプチド配列

Clone	Sequence
1	YAGYKITTASPGDVKTSN
2	TYAWQYCQRTGRALPNTK
3	RKHDAMDSTRRCWPHAPC
4	HNQRHVKNWPDGFORNWS
5	KEQKNPQKQFSSRGPAPN
6	YPRYKLGDTVQDRLRHRH
7	PKDAOASYPNNFNLSYT
8	MRQPKPDTSNYKDRVKS
9	MFKGAFTQYHSTHSTEN

表2. 新規に同定されたPTDのアミノ酸配列

Clone	Sequence
1	SGEHTNGPSKTSVRWVWD
2	SMTTMEFGHSMITPYKID
3	QDGGTWHLVAYCAKSHRY
4	MSDPNMNPGLGSSHILW
5	SPGNQSTGVIGTSPFSNH
6	SSGANYYFFNAIYDFLSNF
7	GTSRANSYDNLKSETLTO

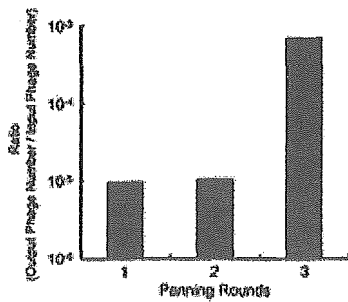


図2. A431に選択的に結合できるファージクローンのパンニングによる濃縮