

200735047A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

質量分析、分子イメージング、リンパ組織構築等を有効活用した
機能性人工タンパク質製剤の高感度な安定性評価法、抗原性試験法の確立

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堤 康央

平成 20 年 4 月

目次

I. 総括研究報告	1
質量分析、分子イメージング、リンパ組織構築等を有効活用した 機能性人工タンパク質製剤の高感度な安定性評価法、抗原性試験法の確立 堤 康央	1
II. 分担研究報告	27
1. 人工リンパ組織の構築に向けたリンパ管再生に関する検討 角田 慎一	27
2. アデノウイルス等を用いたサイトカイン産生システムの開発 水口 裕之	41
3. 効率的な人工リンパ組織構築法の開発に関する研究 末松 佐知子	47
4. 各種 HLA の精製と抗原評価システムの開発 鎌田 春彦	51
5. 人工リンパ組織等の抗原性評価システムを用いた タンパク質の抗原性評価に関する研究 吉岡 靖雄	61
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物・別冊	71

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
「質量分析、分子イメージング、リンパ組織構築等を有効活用した
機能性人工タンパク質製剤の高感度な安定性評価法、抗原性試験法の確立」
総括研究報告書

質量分析、分子イメージング、リンパ組織構築等を有効活用した 機能性人工タンパク質製剤の高感度な安定性評価法、抗原性試験法の確立

主任研究者 堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部

研究要旨

現在、生物学的あるいは化学的アプローチにて、疾病治療効果や安定性に優れた“機能性人工タンパク質”を創出しようとする試みが注目されており、タンパク質のアミノ酸配列改変体や各種融合タンパク質、ポリエチレングリコール（PEG）もしくは糖鎖修飾タンパク質などが開発されている。しかし例えばPEG化タンパク質の場合、PEGを蛋白質に結合させる際に、PEGがランダムに結合してしまうため、結合分子数・部位の違いはバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性をもたらす結果となるなど、品質に問題を残している。さらに、アミノ酸置換体や融合タンパク質、糖鎖改変タンパク質は、抗原性という新たな問題を生み出してしまふ。本プロジェクトは、機能性人工タンパク質製剤のレギュレーションに必至な安定性、抗原性の新規評価を確立しようとするものである。本年度は、タンパク質製剤の抗原性評価方法の確立に向けて必要となる要素技術として、タンパク質の細胞内導入技術、変性蛋白質の質量分析法を用いた評価系の基礎検討、サイトカイン産生法としてのアデノウイルスベクター開発、人工リンパ組織構築法の検討、リンパ管内皮細胞の特性解析およびHLAアレイ構築に向けた基礎検討を行い、有用な知見を得た。

分担研究者

角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所
鎌田 春彦 独立行政法人医薬基盤研究所
水口 裕之 独立行政法人医薬基盤研究所
未松 佐知子 独立行政法人医薬基盤研究所
吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学

研究教育センター

例えば PEG 化タンパク質製剤や糖鎖改変型タンパク質製剤の場合、分子的に不均一な PEG や質的に不均一な糖鎖をタンパク質中のアミノ酸をランダムに化学的修飾した“ブロードなもの（タンパク質への PEG や糖鎖の導入部位や導入個数は、個々のタンパク質を見た場合、バラバラであり、物理化学的に[構造的にも機能的にも]不均一なもの”であり、また融合タンパク質製剤や構造変異タンパク質製剤、糖鎖改変型タンパク質製剤の場合、新たに抗原性を呈するようになる等の致命的欠陥を有している。従って第三世代の機能性人工タンパク質製剤に関しては、従来までの野生型タンパク質製剤の承認審査や指針等で要求されてきた製造・保管過程における同等性/同質性試験や安定性試験といった品質評価のみでは不十分であり、PEG や糖鎖の結合部位・結合数・結合安定性の評価、修飾剤としての PEG や糖鎖の不均一性やこれら修飾剤を用いて作製

A. 研究目的

第三世代のタンパク質製剤（機能性人工タンパク質製剤）の開発競争は現在、国内外のバイオ製薬産業等により熾烈を極めていますが、その医薬品としての承認審査、臨床治験の推進、安全性対策といった点で必要とされる“高度な品質保証”を可能とする安定性試験、抗原性試験、およびこれらをもとにしたレギュレーションの整備は立ち後れている。従って機能性人工タンパク質に関する基礎研究の成果を実用化するためには、上記問題点の克服、即ち科学的かつ適正な承認審査の指針等を確立しなければならず、これは厚生労働行政の最重要課題と言える。上記項目 7 に示した機能性人工タンパク質は、これまでの物理化学的に均一な低分子薬物とは異なり、

した機能性人工タンパク質の不均一性と活性との関連評価、天然型および遺伝子組換え型タンパク質（生体に存在するタンパク質およびその模倣体）との体内安定性（体内挙動特性）、生物学的安定性（生物活性）、物理化学的安定性（構造・組成）の評価、

さらに重要なことに抗原性の評価が承認審査や臨床試験に不可欠となる。この点本申請研究は、実際に臨床に供されている腫瘍壊死因子 (TNF) や IFN 等の機能性人工タンパク質を用い、3 ヶ年研究の後半で 2 次元電気泳動・クロマトグラフィー、構造解析、質量分析、分子イメージングを融合した高感度な安定性評価法を新規確立しようとすると共に、前半では特に人工リンパ組織や HLA-抗原ペプチド相互作用解析システムを用いた機能性人工タンパク質の抗原性評価法の新規開発を試みるものである。

B. 研究方法

B-1. リンパ管管腔形成のプロテオーム解析

リンパ管内皮細胞の in vitro 管腔形成

ヒト肺由来正常リンパ管内皮細胞 (HMVE-LLy, Cambrex) を 15ml の matrigel basement matrix (BD Biosciences) でゲル層を形成させた 150φ 培養ディッシュ上に 5×10^6 cells 播種し、EGM2-MV 培地 (Cambrex) 中で培養した。一方で、matrigel が無いディッシュ上でも培養した。5 時間後、matrigel 上で管腔ネットワークが形成されたリンパ管内皮細胞は、セルスクレイパーでゲルとともに遠心管に移し、Cell Recovery Solution (BD Bioscience) を加えてゲルを分解することで細胞を回収した。一方、matrigel を用いないで培養した細胞も同様の操作で細胞を回収した。

二次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE)

細胞溶解液に懸濁、さらに超音波処理を行うことで蛋白質を抽出した。2D-Quant Kit により蛋白質量を定量し、2 次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE) 解析 (pI レンジ 3-10, 12.5%SDS) によりプロテオームの変動を比較した。

B-2. ファージペプチドライブラリによる改良型 PTD の創出

Tat 改変体ライブラリ-1 の構築

PCR 法を用い、アルギニン以外のアミノ酸をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードするランダムな塩基配列 (NNS 配列; N = A/T/G/C、

S = G/C) に置換した遺伝子ライブラリを調製した。pY03'mTNF FLAG をテンプレートに、PCR プライマー: Y-oligo22 3'ex と Tat11 (47-57) R を用い (表 1)、PCR (95°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル) により Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hin d III (Toyobo. Co., Ltd.) 及び Not I (Toyobo. Co., Ltd.) によって処理した。あらかじめ Hin d III、Not I で処理したファージミドベクター pY03'FLAG へ、T4 ligase (Roche Diagnostics) を用いて 16°C、16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を Eco 81 I 及び Alkaline phosphatase (Toyobo. Co., Ltd.) で処理し、QIAquick PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μl を添加し、Gene purser II (Bio-Rad) を用い、2.5 kV、0.25 μF、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μg/ml アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスク (TAKARA BIO. Inc.) に播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

Tat 改変体ライブラリ-2 の構築

PCR 法を用い、Tat 配列中の 10 個のアミノ酸 (下線部が変異アミノ酸: GRKKRRQRRRPPQ) をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードする NNS 配列に置換した遺伝子ライブラリを調製した。プライマー: P-oligo1 と P-oligo2 (表 1) をアニーリング (96°C, 10 min → 72°C, 5 min → 68°C, 5 min → 37°C, 5 min、各段階を 0.01 °C/sec) させた。この反応液に Klenow Fragment (Toyobo. Co., Ltd.) 1 μl、10 mM dNTP (Sigma-Aldrich, Inc) 1 μl、10 × klenow Buffer 1 μl、DW 7 μl を添加し、37°C で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN

GmbH) で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μ l をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR (96 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 65 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 1 min, 35 サイクル) により、Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hin d III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hin d III、Not I で処理したファージミドベクター pY03'FLAG へ、T4 ligase を用いて 16 $^{\circ}$ C、16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μ F、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

ランダム 18 mer ペプチド発現ファージライブラリの作製

PCR 法を用い、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調製した。プライマー：P-oligo1 と P-oligo4 (表 1) をアニーリング (96 $^{\circ}$ C, 10 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 5 min \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 5 min \rightarrow 37 $^{\circ}$ C, 5 min, 各段階を 0.01 $^{\circ}$ C/sec) 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、DW 7 μ l を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μ l をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR (96 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 65 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 1 min, 35 サイクル) により、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hin d III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hin d III、Not I で処理したファージミドベクター pY03'FLAG へ、T4 ligase

を用いて 16 $^{\circ}$ C、16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μ F、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

シークエンス解析

得られたコロニーから任意に選択した各クローンのプラスミドを QIAprep Miniprep kit (QIAGEN GmbH) を用いて回収し、DNA sequencing Kit (Applied Biosystems) 及び 5 \times Sequencing Buffer (Applied Biosystems) を用いてシークエンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge (Edge Bio Systems) を用いて精製し、減圧加熱により乾燥させた。シークエンス解析は ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) により行った。

ファージの作製

作製したライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TG1 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 LB プレートに播種し、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を加えてコロニーをすべて回収し、OD600 = 0.3 まで振盪培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37 $^{\circ}$ C で 30 分間、250 rpm、37 $^{\circ}$ C で 30 分間培養した後、4 $^{\circ}$ C、2000 rpm、10 分間遠心し、得られたペレットに対して 50 μ g/ml アンピシリン、100 μ g/ml カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養することで、Tat のアミノ酸置換体を表面提示したファージを調製した。

ファージの精製

ファージ粒子を含む TG1 培養液を 4℃、2000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 4℃、10000 rpm、15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-8000 (Wako Pure Chemicals)、2.5 M NaCl (Wako Pure Chemicals) を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。続いて 4℃、15000 rpm、10 分間遠心して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 μm の Millex-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過して精製ファージ溶液とした。

Cell panning

24 穴プレート (Nalge NUNC International) に HaCaT 細胞を 5×10^5 cells/well で播種し、37℃、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、Opti-MEM I で希釈した 2%ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて 37℃で 2 時間ブロッキングした。精製したファージについても等量の 2%BSA を用いて 4℃で 1 時間ブロッキングした。ブロッキングが終了したファージを HaCaT 細胞に加え、15 分ごとに振とうしながら 37℃で 2 時間培養した。この細胞を PBS で 20 回洗浄した後、50 mM HCl 1 ml を加えて 4℃で 10 分間培養した。このファージ溶出液を回収し、1 M Tris-HCl pH 8.0 500 μl を添加し、その 50 μl を用いて下記の方法に従いタイターを測定した。残りのファージ溶液は 2%グルコース含有 2YT 培地を 4.5 ml 加えて再度 TG1 に感染させ、増幅させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニングとした。

タイターの測定

2%グルコース含有 2YT 培地で OD600 = 0.3 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37℃で 1 時間培養した。培養液の一部に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、クローンディスクに播種し一晚培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

PSIF 発現ベクターへの組換え

作製したライブラリ及び 3rd パンニング後のライブラリから回収したプラスミドを Nco I 及び Not I で処理した。あらかじめ Nco I 及び Not I で処理した PSIF 発現ベクター pY7 (pCANTAB5E に PSIF 発現コドンを組み込んだもの) にライゲーションキット Ver.2 を用いて組み込むことで、ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを構築した。

ペプチドと PSIF との融合体を含む培養上清の調整

ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを TG1 にエレクトロポレーションにより導入し、得られたコロニーを 96 穴プレートヘラダムにピックアップして一晚培養した。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地 100 μl を新たに添加したプレートに、一晚培養した培養液 10 μl を添加し、OD600 = 0.4-0.5 まで培養した。4℃、3000 rpm、20 分間遠心した後、上清を除き 1 mM IPTG、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含有 2YT 培地 200 μl を添加し、37℃で 12 時間培養した。再び 4℃、3000 rpm、20 分間遠心し、上清を回収して以降のスクリーニングに供した。

ペプチドの細胞内移行能の評価

96 穴プレートに Opti-MEM で 1.5×10^4 cells/well に希釈した HaCaT 細胞を播種し、終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにシクロヘキシミド (Wako Pure Chemicals) を添加した。続いて、上記の方法に従って調整した培養上清をそれぞれ 50 μl ずつ加え、37℃、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。その後、5 mg/ml の MTT (Wako Pure Chemicals) 溶液を 10 μl 加え、さらに 37℃で 4 時間培養した。20% SDS/0.01 N HCl を 100 μl 加え暗所で 4 時間静置することで、生成したホルマザンを溶解し、Benchmark Plus マイクロプレートリーダーで吸光度を測定 (Test wave length; 595 nm / Reference wave length; 655 nm) し、PSIF による細胞傷害性を指標にペプチドの細胞内移行能を評価した。また、viability は PSIF を発現しない TG1 の培養上清を加えた群を 100%、終濃度 1 mg/ml のシクロヘキシミドを加えた群を 0%として

算出した。

B-3. gutted アデノウイルスベクター産生系の確立

gutted アデノウイルスベクターの作製

Green Fluorescent Protein (GFP) 発現カセットを gutted アデノウイルスベクター作製のためのベクタープラスミド pSTK129 に挿入した。生じたプラスミドを、ITR 配列の両末端に存在する制限酵素認識部位 PmeI を切断することにより線状にし、lipofectamine 2000 を用いて、60 mm 培養 dish に播種した cre 発現 293 細胞(116 細胞)にトランスフェクションした。翌日ヘルパーウイルスを感染させ、約 3~4 日後に gutted アデノウイルスベクターを得た。

各ベクターは感染した 116 細胞の核内に大部分が存在しているため、細胞を回収し、凍結融解を 4 回繰り返すことで破壊した。2000 rpm、10 分遠心し、gutted アデノウイルスベクターを含む上清をヘルパーウイルスと同時に新しい 116 細胞に感染させた。この操作を数回繰り返すことにより gutted アデノウイルスベクターを調製した。150 mm 培養ディッシュ 10 枚の 116 細胞に gutted アデノウイルスベクターとヘルパーウイルスを加え、3~4 日後 116 細胞を回収し、150 mm 培養ディッシュ 1 枚あたり 1 ml の PBS を加え超音波にて細胞を破壊した。これを 2000 rpm、10 分遠心し、上清 (gutted アデノウイルスベクター懸濁液) を回収した。gutted アデノウイルスベクター懸濁液に MgCl₂ (最終濃度 10 mM)、RNaseA (最終濃度 0.2 mg/ml)、DNaseI (最終濃度 0.2 mg/ml) を加え 37 °C、30 分反応させた。反応後、gutted アデノウイルスベクター懸濁液を塩化セシウムの密度勾配遠心を 2 回繰り返して精製した。1 次遠心では、比重 1.5 g/cm³、1.32 g/cm³、1.25 g/cm³ の塩化セシウムを順に 0.5 ml、2.5 ml、4 ml 重層し、その上に gutted アデノウイルスベクター懸濁液を 5 ml 加え、35000 rpm、14 °C、2 時間遠心した。1 次遠心後、gutted アデノウイルスベクターのバンドを回収し、比重 1.35 g/cm³ の塩化セシウムで 12 ml に懸濁し 35000 rpm、14 °C、12-14 時間遠心した。gutted アデノウイルスベクターのバンドを回収し、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10% glycerol からなる溶液で 4 °C、一晚透析した。

回収した溶液を gutted アデノウイルスベクター溶液として実験に用いた。

gutted アデノウイルスベクターのタイター測定

gutted アデノウイルスベクター溶液を SDS-TE 溶液にて最終 SDS 濃度が 0.1% になるように希釈した。5 分混合した後、15000 rpm で 5 分遠心、上清を回収し 260 nm の吸光度を測定した。求めた吸光度を以下の式に当てはめ virus particle (VP) titer を求めた。

$$\text{VP titer} = \text{吸光度} \times \text{希釈倍率} \times 1.1 \times 10^{12} \times 36 / \text{gutted アデノウイルスベクターの全長(kb)}$$

ヘルパーウイルスの混在率の評価

gutted アデノウイルスベクター溶液を SDS-TE 溶液により最終 SDS 濃度が 0.1% になるように希釈した。5 分混合した後、15000 rpm で 5 分遠心し、上清を回収した。回収したサンプルを用いて、gutted アデノウイルスベクターゲノム量とヘルパーウイルスゲノム量を定量的 PCR により測定することによって、ヘルパーウイルスの混在率の評価を行なった。

B-4. 人工リンパ組織の構築

(1) ストローマ細胞 (2) 骨髄由来活性化樹状細胞、及び (3) 生体適合性高分子材料の 3 要素を組み合わせてマウスの腎皮膜下に移植して人工リンパ組織を構築した。ストローマ細胞としては異なる組織由来の複数のストローマ細胞株を用いた。三週間後に人工リンパ組織を回収して免疫組織学的解析を行い、もっとも多数のリンパ球が集積するストローマ細胞株を選び出した。このストローマ細胞株を腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリー受容体を刺激することによって発現が誘導される分子について検索した。

B-5. タンパク質変性に伴う構造変化の検出

タンパク質変性

今回の測定にあたって、用いるタンパク質は医薬品として既に臨床応用されている TNFR2-Fc レセプターキメラである、エンブレルを用いた。タンパク質の変性は、熱による変性、および酸化による変性の

二種類を選択した。まず、熱による変性に関して、エンブレルを、95℃に加熱した湯浴内で加温し、0、3、10、30 および 60 分間加熱し、その後、氷上にて急冷したものをサンプルとして用いた。また、酸化による変性は、4 mM アスコルビン酸、40 μ M $MgCl_2$ 、1 mM EDTA を添加し、0、15、30、60、120、240 分間反応させることで、酸化による変性を行い、これをサンプルとした。なお、今回の検討では、サンプルの脱塩処理は行っていない。

UPLC を用いた変性タンパク質の分離

熱および酸化による変性を行ったタンパク質は、以下の条件で分離し、Synapt HDMS に導入した。まず、カラムとして、Symmetry300 C4, 2.1 \times 100mm, 3.5 μ m を用い、移動相には、A: 0.1%ギ酸 B: 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを用いたグラジエント分離を行った。グラジエントの条件は、表 6 に示す。UPLC の条件としては、流速を 0.3 ml/min に設定し、サンプルの注入量 5 μ l をアプライした。なお、カラムの温度は 65℃に設定した。

Synapt HDMS による変性タンパク質の性状変化評価

タンパク質のイオン化には、エレクトロスプレー法 (ESI) を用い、モードはポジティブモードを選択した。キャピラリーと電極との間の電圧は 3.5kV に設定し、コーン電圧を 60V に設定した。ソース温度を 80℃に設定し、イオン化後の脱溶媒として N_2 ガス (600L/Hr, 250℃) を使用した。またイオンモードの測定にはアルゴンガス (20 ml/min) を使用した。

B-6. 酸化処理による蛋白質の構造特性変化の評価

酸化処理; 10mM リン酸バッファー (pH7.2) で 1mg/ml に調製したエンブレル 400 μ l と、40mM アスコルビン酸ナトリウム 50 μ l、0.4 mM 塩化銅 50 μ l を混合し、25℃、2 時間反応させた。その後、100mM EDTA 5 μ l を加え反応を停止した。その後、10mM リン酸バッファー (pH7.2) で 4℃、24 時間透析した後、サンプルとして用いた。

チオフラビン T ; 65 μ M チオフラビン T 溶液 1.8ml と

サンプル 0.2ml を混合し、室温で 30 分遮光で反応させた。その後、Ext435nm、emi485nm を測定した。

IL-8 産生; 96 穴プレートにヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞 1×10^5 cells/well で播種し、サンプルを加えた。24 時間後、上清中の IL-8 量を ELISA で測定した。

C. 研究結果

C-1. リンパ管管腔形成のプロテオーム解析

ヒト由来リンパ管内皮細胞を通常の培養ディッシュ上で培養すると敷石上の形態で増殖したが、matrigel 上に播種すると、血管内皮細胞で知られていると同様に数時間後から管腔を形成しはじめ、5 時間後では、細胞同士のネットワークが形成されていた (図 1)。リンパ組織を人工的に構築するうえで、リンパ管の誘導促進は重要であり、matrigel での管腔形成系は有用な評価系になるものと考えられる。

次に、リンパ管内皮細胞が分化して管腔形成するメカニズムを明らかとするための基礎検討として、matrigel 上で管腔形成したリンパ管内皮細胞と、管腔形成させていない内皮細胞両者でのプロテオームの比較を試みた。2D-DIGE を行った結果、管腔形成に伴って発現変動している蛋白質スポットが多数見いだされた (図 2)。今後、これらを質量分析で同定することで、管腔形成に関わる分子の同定と、その知見を応用したリンパ管誘導法等が確立できるものと考えられる。

C-2. ファージペプチドライブラリによる改良型 PTD の創出

まず Tat 改変体ライブラリ、及びランダム 18 mer ペプチドライブラリの構築のため、ランダムな NNS 塩基配列 (N = A/T/G/C, S = G/C) を含む degenerate primer を用いた PCR 法によって、Tat 配列中の目的アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した Tat 改変体ライブラリ遺伝子、及び、ランダムな 18 アミノ酸をコードするランダム 18 mer ペプチドライブラリ遺伝子を作製した。本ライブラリ遺伝子をファージ

ミドベクターに組み込み、大腸菌 TG1 株に導入、ヘルパーファージを感染させることで、多様な種類のペプチドをファージマイナー外殻蛋白質である g3p の先端に発現する各ペプチド発現ファージライブラリを作製した。それぞれ作製したライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シークエンスを解析した結果、NNS 塩基配列を導入した箇所がランダムなアミノ酸に置換されており、独立したクローンで構成されていることを確認した (表 2, 3 and 4)。従って、構築した3種類のファージライブラリは、多様なペプチドを提示したファージクローンから構成される質の高いライブラリであることが示唆された。

構築した Tat 改変体ライブラリ-1 を用いて、モデル細胞である HaCaT 細胞に対してパンニングを3回行った。セルパンニングにより選別・濃縮されたクローンを、PSIF 発現ベクターに組換えた後に、大腸菌に形質転換し、PTD-PSIF 融合体を含む大腸菌培養上清を標的細胞に添加した際の細胞傷害活性を評価した。Tat 融合 PSIF 作用群が約 70% の viability を示す条件下で検討したところ、パンニング前は、いずれも Tat と同等以下の細胞傷害活性を示すクローンのみであったのに対し、パンニング後のクローンでは Tat よりも強い細胞傷害活性を示す多数のクローンを得ることに成功した (図 2)。このことから、筆者が考案した 2-step スクリーニングが、PTD の機能改変戦略として非常に有効であることが示唆された。Tat 改変体ライブラリ-1 から選別してきたクローンのアミノ酸配列を確認したところ (表 5)、アルギニンが増加している傾向が認められたことから、PTD の細胞内への移行には塩基性アミノ酸の中でもアルギニンが重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、Futaki らが報告しているように、鎖長の異なるポリアルギニンペプチドの細胞内移行効率の検討から、アルギニン数と細胞内移行活性が必ずしも正の相関を示すわけではないと考えられている。従って、PTD の細胞内移行活性はアルギニン残基の数、つまり塩基性の高さのみに依存するのではなく、アルギニン以外の構成アミノ酸の関与する可能性も十分に考えられる。事実、本検討で得られたクローン

では、アルギニンに次いでプロリンが増加している傾向にあった。プロリンは、唯一の環状アミノ酸であり、主鎖構造の折れ曲がりに関与する等、蛋白質やペプチドの立体構造上、重要な役割の担っていることが知られている。従って、プロリンのように蛋白質の立体構造を維持する上で非常に重要なアミノ酸が保存される傾向にあったという事実は、PTD の一次構造のみならず、高次構造が細胞内移行活性に関与している可能性を示唆するものである。

本研究で得られた PTD と細胞内移行活性との相関に関する情報は、2-step スクリーニングを駆使することによって初めて可能となった非常に興味深い知見である。本年度は、Tat 改変ライブラリ-1 に焦点を絞って解析したが、将来的には残り三つのライブラリを用いて同様の検討を行うことによって、改良型 PTD の設計指針を提示できる有用な知見が得られるものと期待される。今後は、本細胞内蛋白質導入ペプチドを用いて、蛋白質医薬品の細胞内安定性評価系の確立を試みる予定である。

C-3. gutted アデノウイルスベクター産生系の確立

B-3 により作製した gutted アデノウイルスベクターのヘルパーウイルス混在率を定量的 PCR 法で測定したところ、0.1~1% 程度であった。この混入率は、他の報告と同レベルであった。また、最終的な gutted アデノウイルスベクターのタイターは 10^{11} VP 前後であり、十分に高いものであった。従って、種々の実験に供することのできる gutted アデノウイルスベクターの調製に成功した。GFP 発現について、培養細胞を用いて検討したところ、従来の E1 欠損型 アデノウイルスベクターと同程度であり、目的遺伝子も期待通りに発現することを確認した。

全てのアデノウイルスコード遺伝子を欠損した gutted アデノウイルスベクターは、種々の作製法が知られている。例えば、cre-loxP の組換えを利用して、アデノウイルスコード遺伝子を欠損させて、外来遺伝子だけをパッケージングさせる方法や、本研究で検討したヘルパーウイルスを用いる方法等が知られている。ヘルパーウイルスを用いる gutted アデノウイルスベクター法が最も汎用されているが、へ

ルパーウイルスの混在率が高くなることや（数%以上）、高タイターの目的の gutted アデノウイルスベクターを得るのが難しいという問題があった。本研究で使用したベクター系は、パッケージング細胞（cre の発現レベルが高い）やヘルパーウイルスに種々の改良が加えられており、ある程度の技術を身につければ、実用に耐えるレベルの gutted アデノウイルスベクターの調製が可能となった。本ベクター系は、従来のアデノウイルスベクター発現系と異なり、アデノウイルス抗原の発現が全く起こらないため、蛋白質の抗原性試験を適切に行うことが可能になると期待される（図4）。来年度は、この系に、RNAi の系を搭載させ、安全に目的遺伝子をノックダウンさせる系の開発を行う予定である。

C-4. 人工リンパ組織の構築

二次リンパ組織の発生にはその発生原基に存在するストローマ細胞が TNF ファミリー受容体を介したシグナルによってリンパ組織性ケモカインを発現することが重要であるとされている。そこで人工リンパ組織構築において最も多数のリンパ球を集積させたストローマ細胞株に *in vitro* で TNF ファミリー受容体刺激を加えて発現が誘導される分子を調べた結果、予測に反して CCL19, CCL21 および CXCL13 などのリンパ組織性ケモカインは刺激の有無に関係なく発現していないことが分かった（図5）。人工リンパ組織が強力な獲得免疫機能を発揮するためには、抗原特異的であるか否かに係らずリンパ球が多数集積することが重要であると考えており、我々が今回選り出したストローマ細胞株からのリンパ組織性ケモカインの分泌が効率のよい人工リンパ組織の構築に有用なのであろうと予測していた。しかし、このストローマ細胞がリンパ組織性ケモカインを発現していなかったことから、人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積には他のサイトカイン（ケモカインを含む）が直接的あるいは間接的に関与していることが示唆される。それが既知のサイトカインの組み合わせであるのか、また未知のケモカインであるのかは不明であるが、さらに別の数種類のストローマ細胞を用いた人工リンパ組織構造の比

較を行うことにより重要因子の絞り込みが可能であると考えている（図6）。

C-5. タンパク質変性に伴う構造変化の検出

本研究では、タンパク質製剤の抗原性を規定する、製剤中に含まれる不純物（変性タンパク質等）の解析を目的に、モデルタンパク質医薬品として抗体医薬（エンブレル）を用いて、各種変性条件下での変性状態を、HDMS を用いたモビリティ解析を行い、タンパク質の抗原性に深く関与するとされる立体構造変化を評価した。最初に、熱変性がエンブレルに対する影響を解析した（図7）。その結果、コントロールと比較して、サンプル番号を重ねるにつれ、左側にシフトする傾向が見られた（図8）。モビリティ解析において、見かけの分子サイズが低下したのに関しては、イオンモビリティが短時間側へシフトすることから、今回行った熱変性については、分子サイズがよりコンパクトな形状へと変性している可能性が示唆された。

次に酸化変性が及ぼす影響に関して解析を試みた（図9）。その結果、コントロールと比較して、サンプル番号を重ねるにつれ、左にシフトする傾向が確認でき、さらにメインピークの左側にショルダーが確認できた（図10）。従って、酸化変性については、コンパクトな形状に変性することだけではなく、さらに異なる複雑な形状の分子が存在している可能性が示唆された。

今回、分析を行う上での問題点として、夾雑成分によるノイズが多く、解析が難しい傾向にあったため、詳細な解析はできなかったが、少なくとも、本質量分析装置を用いることで、タンパク質の変性状態が解析できることが明らかになった。今後、透析などによるバッファー交換を行うことで、より詳細な変性状態の解析が可能になるものと考えている。また、質量分析装置で測定を行う際、イオン化をさせる条件に関して、本検討では、中性付近でのイオン化を検討したが、安定したイオン化が難しい為、最終的にギ酸を用いた分析を行った。pH 2.5-3 程度の強酸条件になるため、コントロールタンパク質の変性が危惧されたが、イオン化まで約3分程度と短

時間であるために、分析結果から大きな影響がないものと考えている。

本検討では、タンパク質医薬品の各種評価法の確立を目指して、*in vivo*におけるHLA分子の重要性に着目するとともに、最新の技術としてのイオンモビリティシフトを利用したHDMSを、医薬品の品質管理に利用できる可能性が示唆された。今後、より詳細な解析を行うことで、タンパク質の変性状態と、その抗原性に関する基礎情報を集積できるものと期待している。

C-6. 酸化処理による蛋白質の構造特性変化の評価

蛋白質製剤のモデルとして、多発性硬化症、リウマチなどの自己免疫疾患に適用されている腫瘍壊死因子(TNF)受容体のFcキメラであるエンブレルを用いた。蛋白質性医薬品は、製造工程・保存過程で酸化修飾を受けることが知られている。そこで本年度は、エンブレルを人工的に酸化処理し、変性状態など特性を評価した。酸化処理は一般的に使用される、塩化銅、アスコルビン酸による酸化法を用いた。その結果、エンブレルの酸化処理群において、目視では白濁などは観察されなかったが、タンパク質凝集の指標であるA280/260の低下が観察された(図11)。また、SDS-PAGE解析の結果、未処理群と比較して全く異なるバンドパターンを示した(図12)。分子量の増大したバンドと同時に分子量の低下した分解産物なども観察されたが、詳細は不明である。現在、ゲルろ過HPLCを用い、より詳細な分子量変化に関して検討を進めている。

次に、分子間のβ構造を認識するプローブであり、アミロイド繊維に特異的に結合するチオフラビンTを用い、酸化処理によるタンパク質変性を詳細に観察した。その結果、酸化処理群において、チオフラビンTによる蛍光強度の増加が確認されたことから、酸化処理によりアミロイド繊維を含む変性が誘導されることが判明した(図13)。本検討では、96穴プレートによる解析を行ったが、来年度はより感度の高い機器を用い測定することで、より高感度に評価する予定である。

更に、これら変性タンパク質の免疫細胞に与える

影響を検討した。ヒトマクロファージ細胞株THP-1細胞に加え、24時間後に上清中のIL-8量をELISAにて測定した。その結果、未処理群では全くIL-8産生は認められなかったが、酸化処理群では有意なIL-8産生が観察された(図14)。以上の結果から、エンブレルの酸化処理により免疫細胞から炎症性サイトカインが産生される可能性が示唆された。TNF受容体Fcキメラは、リウマチ患者への投与において16%の患者で抗TNF受容体Fcキメラ抗体の産生が認められたが、治療成績に影響はなかった報告がある。一方で、多発性硬化症患者への投与では、90%の患者において抗体産生が認められ、TNF受容体Fcキメラの体内クリアランスが増大したとの報告もある。疾患により抗原性に違いが出た理由は明らかでないが、今後もその抗原性を詳細に検討していく必要性が高い蛋白質性医薬品の一つである。そこで、本年度はエンブレルを用い、酸化処理によるタンパク質変性、免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、酸化処理によりアミロイド繊維を含むタンパク質変性が誘発され、マクロファージを活性化する可能性が示唆された。本年度は、IL-8のみを測定したが、来年度は他のサイトカイン、ケモカインに関しても検討する予定である。また、マクロファージだけでなく、抗原性惹起により深く関与している樹状細胞に対する影響も検討する予定である。

データに示していないが、本年度熱処理による影響も検討した。エンブレルの熱処理によってもチオフラビンTの蛍光値増大が酸化処理群と同等に認められたことから、アミロイド繊維を含むタンパク質変性を誘発したと考えられる。しかし、熱処理群では全くIL-8産生は観察されなかった。この違いが何に起因するのか、現段階では詳細は不明であり手掛かりは無い状態である。そのため、酸化処理群でどのようなメカニズムでIL-8産生を誘導するかを検討していくことが重要と考えられる。近年、アルツハイマー病発症に関与するβアミロイドなど、アミロイド様物質がスカベンジャーレセプターを介して、細胞に認識されることが明らかとなってきた。現在、酸化処理したエンブレルが、スカベンジャーレセプターを介してマクロファージを活性化していると考

えており、来年度の検討課題としている。

実際の医薬品の製造工程・保存過程で、どの程度このような現象が誘導されているかは不明である。しかし、現在販売されている蛋白性医薬品においても、長期保存においてタンパク質が変性しているとの報告もある。来年度は、エンブレルなど他のタンパク質医薬品においても、長期保存などにおいてどの程度、アミロイド繊維を含む変性が誘発されるかに関して検討する予定である。

D. 考察

C. 研究結果の欄に記載

E. 結論

E-1.

本研究では、タンパク質製剤の抗原性評価方法の確立に向けて必要となる要素技術として、タンパク質の細胞内導入技術、人工リンパ組織構築有用となるリンパ管内皮細胞の特性解析に向けた基礎検討を行い、タンパク質の細胞内への効率的導入を可能とするペプチドの創製、リンパ管誘導制御法開発に向けての評価系に関する有用な知見を得ることができた。

E-2.

ヘルパーウイルスの混在率が1%以下の gutted アデノウイルスベクターの産生系を確立した。

E-3.

選択したストローマ細胞から分泌されるどのサイトカインがリンパ球の遊走と集積に重要であるかについてはさらに検討が必要である。その一方で、このストローマ細胞が分泌していないリンパ組織性ケモカイン遺伝子を導入して安定発現細胞株を樹立して人工リンパ組織構築に用いる事も、より多くのリンパ球や樹状細胞を遊走させるためには有用であろうと考えている。順次、安定発現細胞株を樹立して人工リンパ組織構築に適用し、抗原特異的な免疫反応に及ぼす効果を検証する予定である。

E-4.

本研究課題においては、タンパク質製剤の最大の問

題でありながらも、未だ検討方法が確立されていない“タンパク質の抗原性評価方法の開発”に焦点を絞り、タンパク質の抗原性を規定する原因の一つと考えられているタンパク質の変性状態に関する基礎情報を得るために、タンパク質の抗原性を規定する鍵分子としての HLA に着目し、in vivo におけるタンパク質製剤の抗原性を評価しうる、全く新しい抗原性評価システムに関する基礎情報の集積を行った。タンパク質製剤等のタンパク質変性状態ならびに分子不均一性を直接観察しうる、HDMS を利用することで、タンパク質の構造情報と変性状態にあるタンパク質の割合が簡便かつ同時に、解析・評価できる可能性が示唆された。今後、この HDMS を用いたタンパク質の変性状態の解析を通じて、機能性人工タンパク質製剤に科学的合理性と社会的正当性を付与するためのレギュレーションを定めるための技術基盤の作製につなげていきたいと考えている。

E-5.

①エンブレルを熱処理、酸化処理することで、アミロイド繊維形成を伴うタンパク質変性が誘導されることが判明した。更に、酸化処理群では、マクロファージの活性化を惹起する可能性が示唆された。

②MHC クラス II とペプチドの結合性を指標とした抗原性評価システムの構築に向けて、材料などの準備を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. : Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain., Biol. Pharm. Bull., 30(2):218-223, 2007.

2. Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035, 2007.
 3. Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library., *Pharmazie*, 62(8):569-573, 2007.
 4. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363:1027-1032, 2007.
 5. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
 6. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, in press.
- 総説・その他
1. 堤 康央, 石井明子, 早川堯夫 : 第 6 節 機能性人工タンパク質., *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, (株)エル・アイ・シー, p.369-378, 2007.
 2. Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y. : Development of new anti-TNF therapy., *Inflammation and Regeneration*, 27:512-515, 2007
 3. 水口裕之 ; 遺伝子治療研究の動向 ; 医薬ジャーナル新薬展望 2008, 印刷中
 4. 水口裕之, 櫻井文教, 川端健二 ; カプシドタンパク質改変アデノウイルスベクター, 遺伝子医学 MOOK 別冊 絵で見てわかるナノ DDS, 235-242 (2007)
 5. 水口裕之 ; アデノウイルスベクター開発の最前線, *バイオテクノロジージャーナル*, 7(2), 168-173 (2007)
 6. 水口裕之・早川堯夫 ; アデノウイルスベクター ; *バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保*, 早川堯夫監修, エル・アイ・シー, pp563~577 (2007)
 7. 末松 佐知子 ; 人工リンパ組織構築とは何か *Organ Biology* (印刷中)
- ②学会発表
- 国内学会発表
1. 衛藤佑介, 吉岡靖雄, 森重智弘, 姚 醒蕾, 倉知 慎之輔, 水口裕之, 堤 康央, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作 : 全身投与による癌遺伝子治療の最適化を目指した高分子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7回シンポジウム, 東京, 2007年7月.
 2. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央 : 抗腫瘍活性に優れた TNF レセプター指向性変異体の創製., 第23回 DDS 学会, 熊本, 2007年6月.
 3. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : プロテオミクス創薬を志向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの

- 開発., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
4. 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 腫瘍壊死因子- α の活性に及ぼす 90 番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
 5. 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 鎌田春彦, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使した TNFR2 指向性アゴニストの創製., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
 6. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤康央 : 三酸化ヒ素の抗白血病治療効果発現に関連した蛋白質の探索., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
 7. Mukai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S. : Application of membrane-permeable Protein Transduction Domain (PTD) for efficient intracellular drug delivery., 第 5 回メンブレン・ストレスバイオテクノロジー (MSB) シンポジウム, 大阪, 2007 年 9 月.
 8. Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of phage library and 2D-DIGE., 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
 9. 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 細胞膜透過性 TAT ペプチドと膜融合性 HA2 ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
 10. 向 洋平, 今井 直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一 : 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第 57 回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007 年 10 月.
 11. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
 12. 長野一也, 今井 直, 杉田敏樹, 向 洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指したフェージ抗体ライブラリの構築., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
 13. 向 洋平, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : TNF レセプター選択的阻害剤開発を目指した TNFR2-TNF 複合体の X 線結晶構造解析., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
 14. 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
 15. 杉田敏樹, 吉川友章, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発-2., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
 16. 吉田康伸, 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規細胞内移行ペプチドの創出と血管機能制御技術としての展開., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
 17. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤康央 : プロテオーム解析を用いた白血病における血栓症発症に関与する蛋白質の探索., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.

18. 萱室裕之, 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 吉川友章, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央 : Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice., 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007 年 11 月.
19. 吉田康伸, 今井 直, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 小泉桂一, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管新生阻害剤を用いたリンパ管新生シグナル伝達経路の解析..第 80 回日本生化学会大会, 横浜, 2007 年 12 月
20. 杉田敏樹, 吉川友章, 長野一也, 鍋師裕美, 向洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規 Protein Transduction Domain peptide の細胞内 DDS キャリアーとしての特性解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
21. 阿部康弘, 向 洋平, 角田慎一, 中川晋作, 堤康央 : 創薬プロテオミクスの実現に叶う機能性人工蛋白質の迅速創出技術の開発., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
22. 今井 直, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : 疾患関連蛋白質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
23. 鍋師裕美, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価 (1) : トキシコプロテオーム解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
24. 吉川友章, 鍋師裕美, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価 (2) : 細胞内局在解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
25. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 形山和史, 阿部康弘, 野村鉄也, 廣井隆親, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央 : 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての応用., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
26. 長野一也, 吉川友章, 杉田敏樹, 今井 直, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 免疫制御技術の開発に向けた制御性 T 細胞の抗体プロテオミクス研究., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
27. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 山本昌, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価 (1) : 関節リウマチモデルに対する治療効果の検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
28. 吉田康伸, 今井 直, 杉田敏樹, 阿部康弘, 萱室裕之, 長野一也, 鍋師裕美, 野村鉄也, 小泉桂一, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによるリンパ管新生関連分子の探索と機能評価に向けて.. 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
29. 西森 光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央, 八木清仁 : ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
30. 亀井数正, 向 洋平, 小島拓記, 吉川舞, 角田慎一, 堤 康央, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作 : 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
31. 水口裕之 ; 高性能なアデノウイルスベクターの開発を目指して ; 「遺伝子・細胞治療に携わる臨床研究者育成」セミナー -日本の遺伝子治療臨床研究の現状と今後の展望- ; 岡山大学医学部 (岡山) ; 2008 年 1 月 25 日
32. 水口裕之 ; 遺伝子導入技術の開発と先端科学への応用 ; 大阪市立大学医学部博士課程セミナー (大阪) ; 2007 年 12 月 4 日
33. Hiroyuki Mizuguchi ; Drug delivery system of adenovirus vectors ; 第 66 回日本癌学会総会 (横浜) ; 2007 年 10 月 3-5 日
34. 水口裕之 ; アデノウイルスベクターと DDS ;

第 44 回薬剤学懇談会研究討論会 (熊本) ; 2008 年 6 月 28 日

35. 水口裕之 ; 次世代アデノウイルスベクターの開発と先端科学への応用 ; 国立生育医療センター・研究所 特別セミナー (東京) ; 2008 年 6 月 21 日
36. 水口裕之 ; 遺伝子の機能解析基盤技術 —改良型アデノウイルスベクターを中心に— ; 第 80 回組織培養学会 (大阪) ; 2008 年 5 月 14 日
37. 末松 佐知子 ; ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築 ; 日本組織培養学会第 80 回大会 大阪 2007 年 5 月
38. 末松 佐知子 ; ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築 ; 第 34 回臓器保存生物医学学会, シンポジウム 5 遺伝子工学と組織再生, 札幌, 2007 年 11 月
39. Yuki Hattori and Sachiko Suematsu.: Functional Lymphatic Vessel Formation in Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-Like Organoids in Mice., 第 37 回日本免疫学会総会, 東京, 2007 年 11 月

国際学会

1. Minowa K., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Fujita T., Yamamoto A., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display system, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
2. Tsunoda S., Imai S., Yoshida Y., Nagano K., Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y. : An efficient method for the production of monoclonal antibodies to tumor-related proteins using a combination of phage display library and 2-dimensional differential gel electrophoresis, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
3. Mukai Y., Nakamura T., Shibata H., Abe Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi

Y. : Crystal structure of the receptor subtype I selective antagonistic TNF revealed its molecular basis as the proteo-antagonist, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.

4. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel therapeutic approach using an intracellular targeting strategy with membrane-permeable peptides., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
5. Nabeshi H., Kamada H., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Minowa K., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide alters expression and oxidative modification of the proteome in leukemic cells, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
6. Nomura T., Shibata H., Abe Y., Minowa K., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
7. Yoshikawa T., Imai S., Nagano K., Sugita T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simultaneous identification of tumor-specific proteins and their antibodies by combining a proteomics technique and phage display library, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
8. Yoshioka Y., Morishige T., Watanabe H., Tanabe A., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Okada N., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
9. Minowa K., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Kayamuro H., Shibata H., Fujita T., Yamamoto A., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi

Y. : Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.

10. Abe Y., Nabeshi H., Nomura T., Kayamuro H., Minowa K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of the valuable cell line which evaluates the bioactivity through TNFR2 using chimeric receptor strategy., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

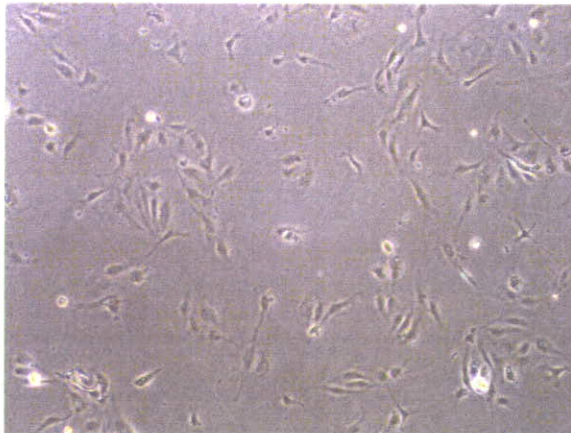
その他

人工リンパ節（特願 2003-052088）特許審査請求中

表1 ペプチドライブラリ作製用オリゴDNA配列

Y-oligo22 3'ex	TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
Tat11 (47-57) [5] R	TCATCCTTGTAGTCTGCGGCCGCACGACGACGSNNACGACGSNNSNNA CGSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATGAAAG
P-oligo1	GATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAA AAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCC GGCCATGGCC
P-oligo2	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNCGGSNNSNNSNCTGSNNSNNSN NSNNSNACCGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATAGAAAGG
P-oligo4	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCA TAGAA

(A) 通常培養dish



(B) matrigel

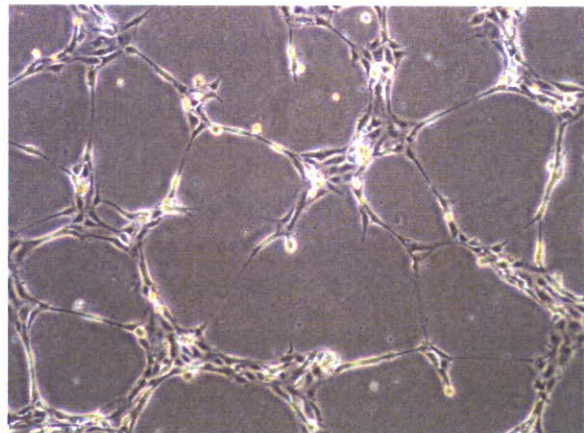


図1 ヒト由来リンパ管内皮細胞の管腔形成能評価

表3 mutant Tat library-2のアミノ酸配列

clone	position												
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Tat	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R	P	P	Q
1	G	M	H	I	N	G	Q	S	N	P	P	H	A
2	G	G	M	H	E	S	Q	S	H	M	P	G	D
3	G	T	Q	A	F	L	Q	Q	F	E	P	W	I
4	G	I	K	H	S	P	Q	Q	I	S	P	R	W
5	G	I	L	C	I	Q	Q	D	H	Q	P	L	G
6	G	F	K	L	S	S	Q	A	V	A	P	L	Q
7	G	S	I	R	A	P	Q	G	D	S	P	W	P
8	G	T	R	H	G	I	Q	T	Q	P	P	N	N

表4 random 18 mer peptide libraryのアミノ酸配列

clone	sequence																	
1	Y	A	Q	Y	K	I	T	T	A	S	P	G	D	V	K	T	S	N
2	T	Y	A	W	Q	Y	C	Q	R	T	G	R	A	L	P	N	T	K
3	R	K	H	D	A	M	D	S	T	R	R	C	W	P	H	A	P	C
4	H	N	Q	R	H	V	K	N	W	P	D	G	F	Q	R	N	W	S
5	K	E	Q	K	N	P	Q	K	Q	F	S	S	R	G	P	A	P	N
6	Y	P	R	Y	K	L	Q	D	T	V	Q	D	R	L	R	H	R	H
7	P	K	D	A	Q	A	S	Y	T	P	N	N	F	N	L	S	T	T
8	M	R	Q	P	K	P	D	T	S	N	Y	K	D	R	V	K	S	S
9	M	F	K	G	A	F	T	Q	Y	H	S	T	H	E	S	T	E	N