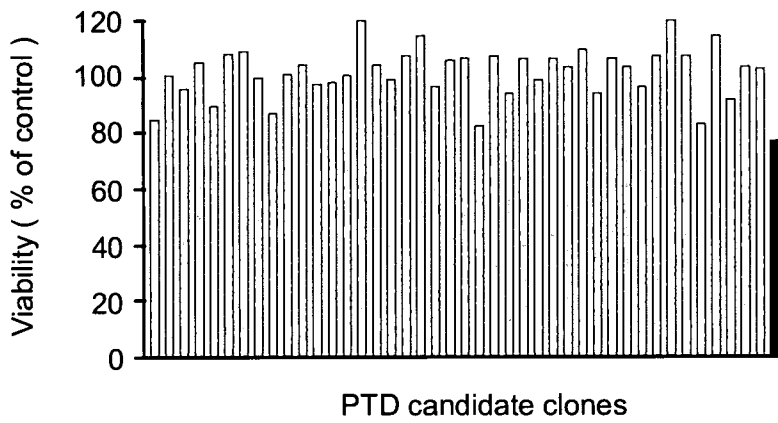


(A) Before cell panning



(B) After 3<sup>rd</sup> cell panning

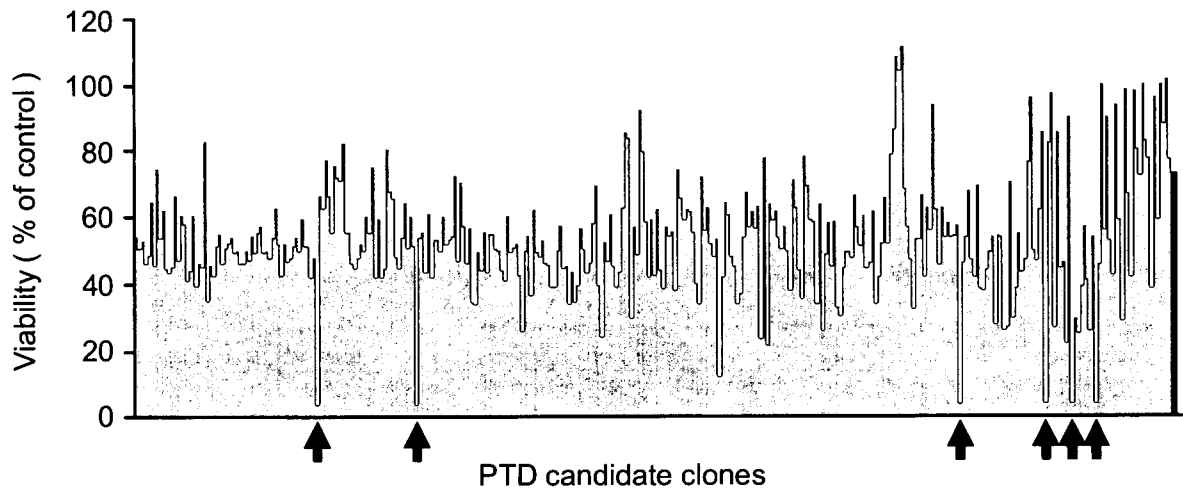


図3 モノクローン化したTat-PSIF融合蛋白質の細胞内移行能評価

表5 細胞内移行活性に優れたTat改変体アミノ酸配列

clone	position										
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Tat	Y	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R
mT1	W	A	R	N	R	R	R	Q	R	R	R
mT2	E	R	R	R	T	R	R	S	R	R	R
mT3	P	Y	R	H	Q	R	R	S	R	R	R
mT4	R	N	R	A	R	R	R	Q	R	R	R
mT5	P	V	R	R	P	R	R	R	R	R	R
mT6	T	H	R	L	P	R	R	R	R	R	R

表6 UPLCグラジエント条件

Time (min)	A %	B %	Curve
0.0	95	5	1
1.0	95	5	6
2.0	5	95	6
5.0	95	5	11

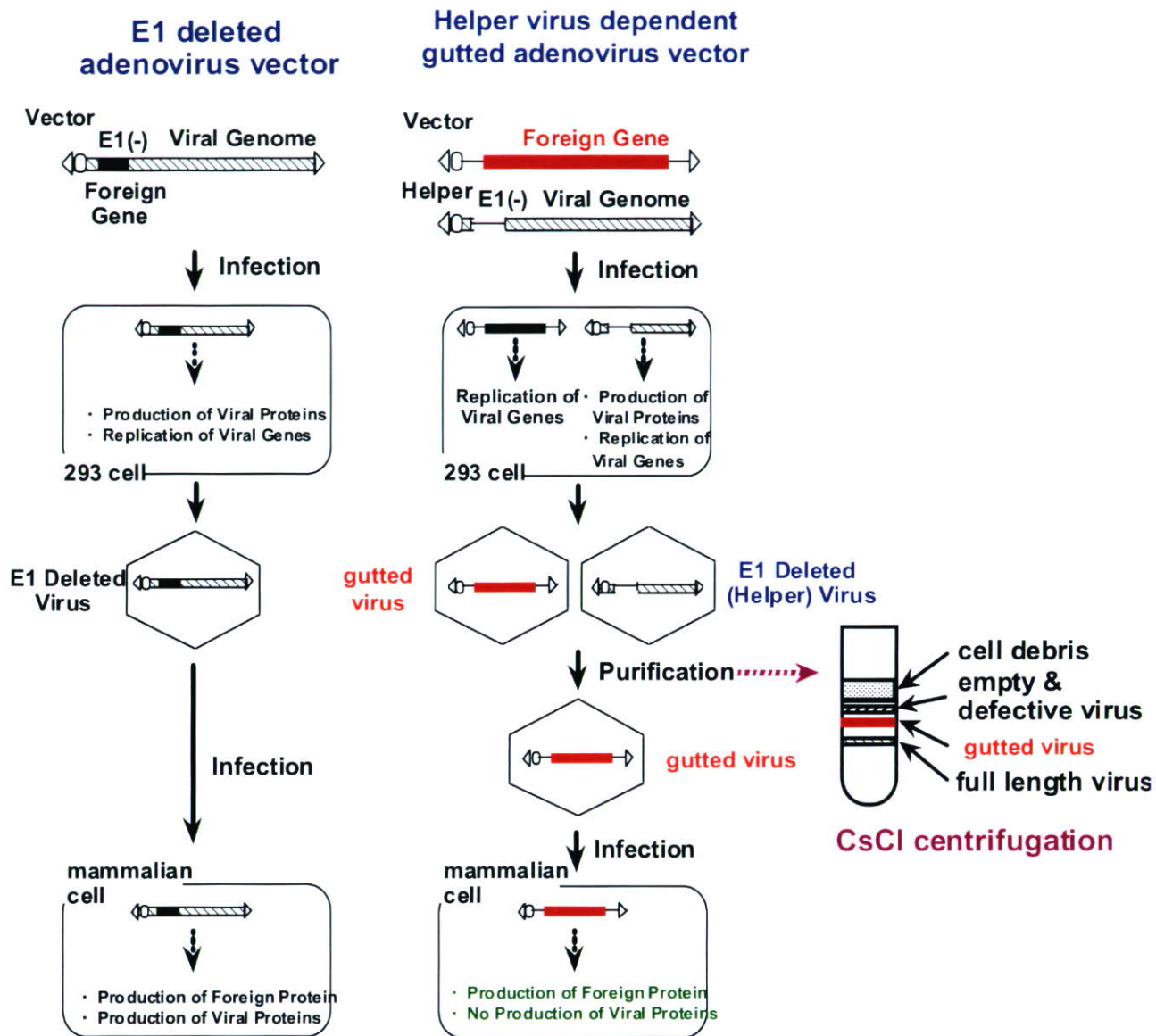


図4 guttedアデノウイルスベクターの作成法

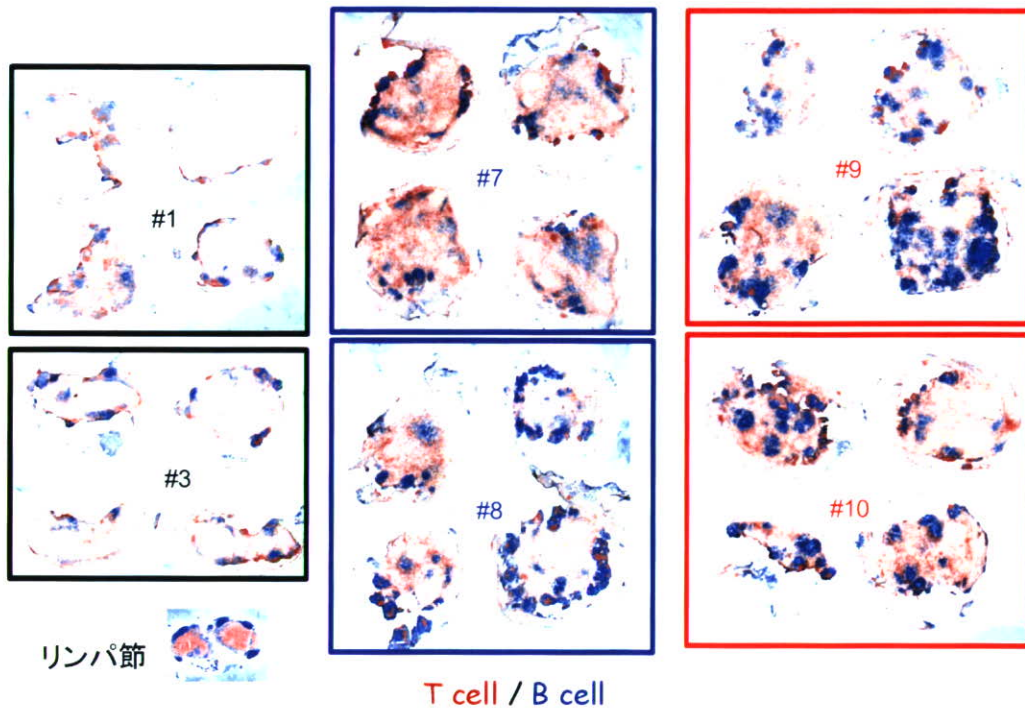


図5 ストローマ細胞株によるリンパ球集積の差

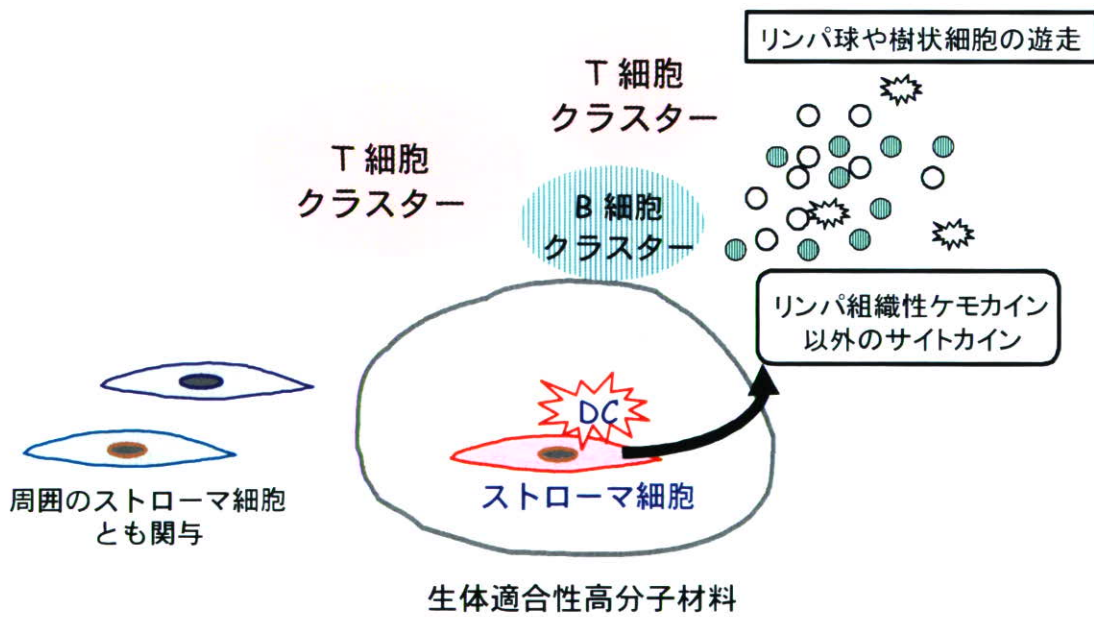


図6 ストローマ細胞の重要性

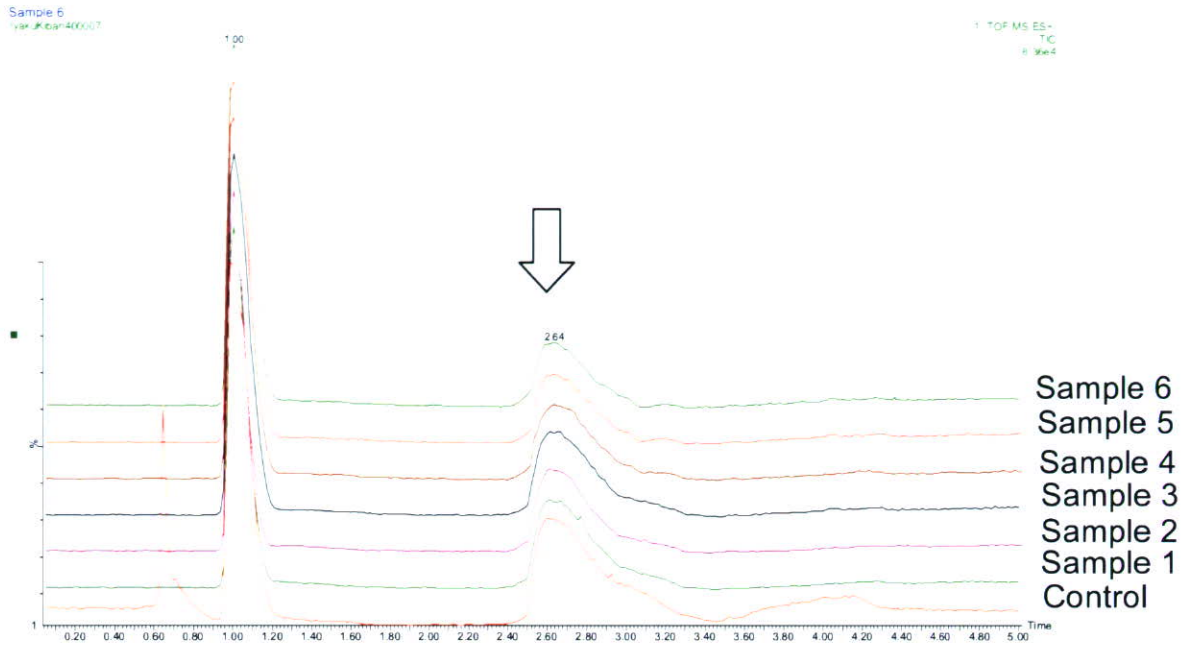


図7 トータルイオンクロマトグラム (コントロール、熱変性サンプル1-6)

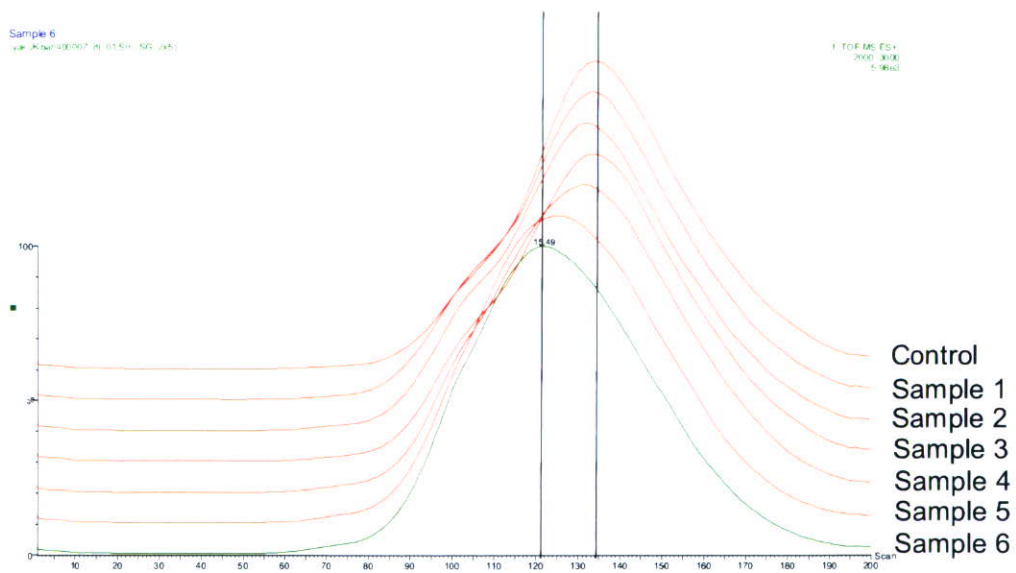


図8 熱変性がEnbrelに及ぼすイオンモビリティへの影響

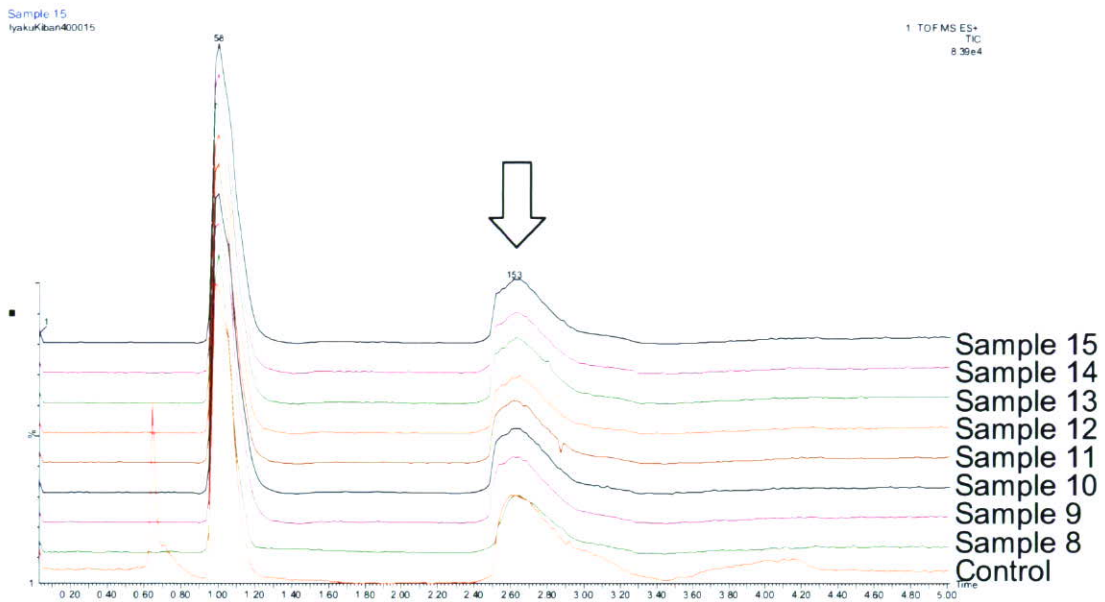


図9 トータルイオンクロマトグラム (コントロール、酸変性サンプル1-6)

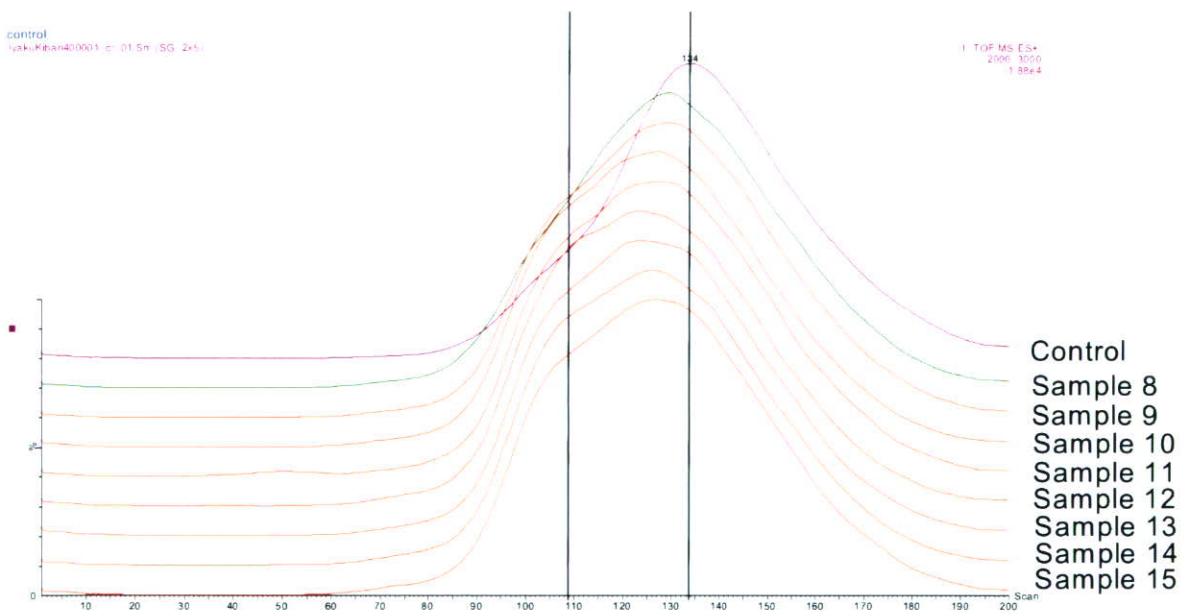


図10 酸変性がEnbrellに及ぼすイオンモビリティへの影響

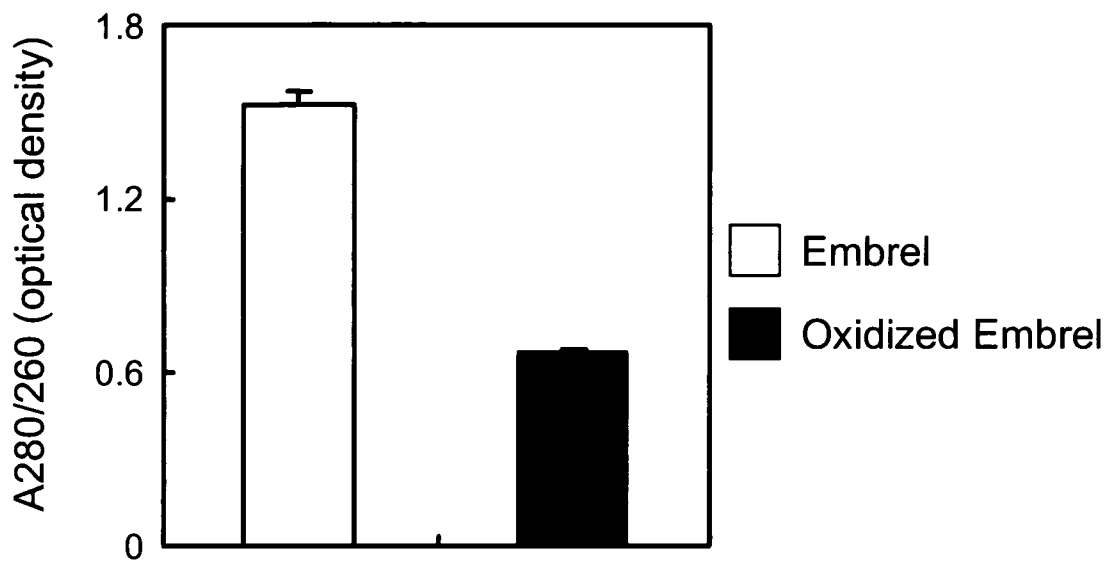


図11 酸化処理によるエンブレルの蛋白質凝集

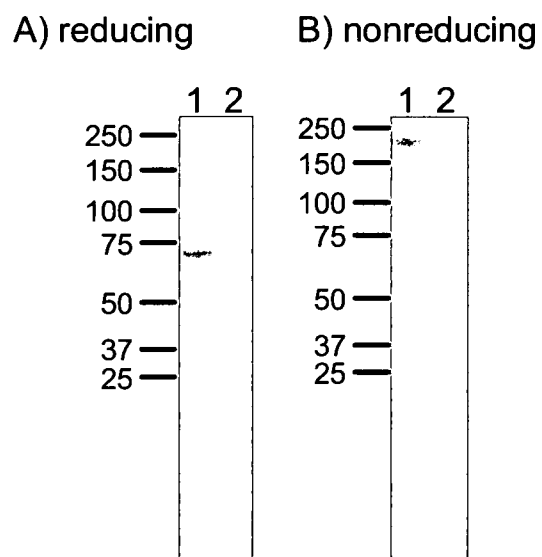


図12 SDS-PAGE解析 1. Embrel, 2. Oxidized Embrel

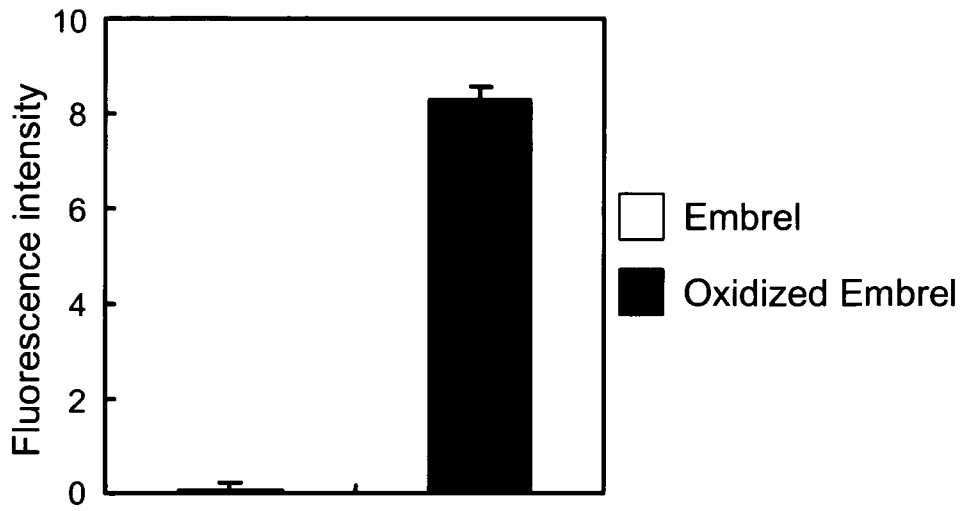


図13 酸化変性エンブレルのチオフラビンT染色

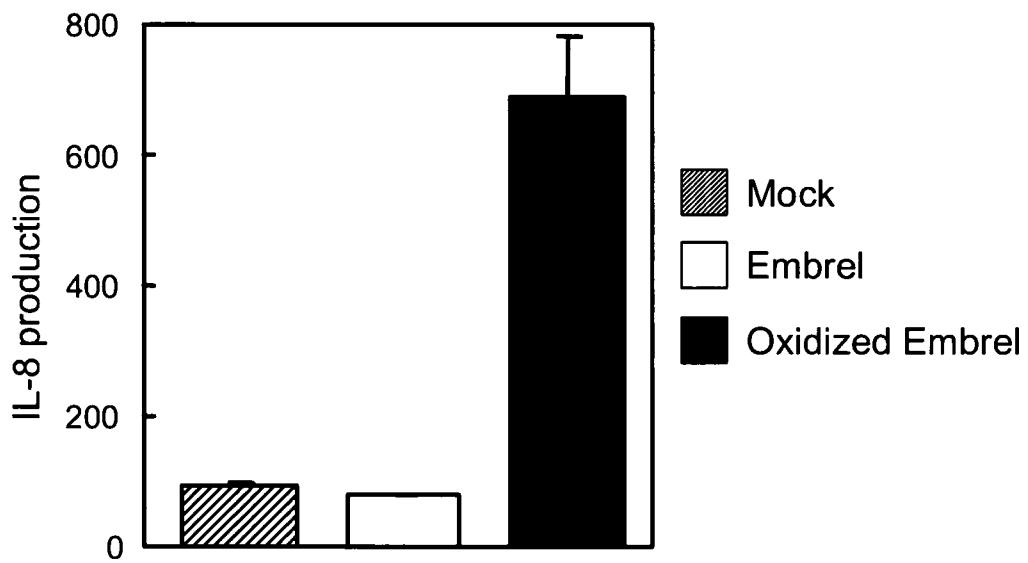


図14 酸化変性エンブレルによるIL-8の産生誘導



## 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

分担研究者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト 主任研究員

### 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う。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り、本分担研究課題においては、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った。

### A. 研究目的

近年、体内安定性の向上や抗原性の低下を目的としたPEG化タンパク質製剤（IFN $\alpha$ 、抗TNF抗体、G-CSF）や、血中濃度維持を目的とした融合タンパク質製剤（TNFR2-抗体やLEA3-抗体のFc融合体）、薬効の即効/持続性、比活性増強を目的とした構造変異タンパク質製剤（インスリンやtPA等のアミノ酸置換体やコンセンサスIFN）が、第三世代（機能性人工タンパク質製剤）として開発され、種々難治性疾患に著効を発揮している。これら付加価値を導入した第三世代の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おり、その医薬品としての承認審査、臨床試験の推進、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。そこで本研究は、世界的に観ても未だ確立していない抗原性試験法の確立を中心に、機能性人工タンパク質の安定性試験法の開発（特に細胞内でのタンパク質の安定性評価）について検討するものである。特に本分担研究課題においては、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試みた。

### 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150 $\phi$ 培養ディッシュ上に $5 \times 10^6$  cells 播種し、EGM2-MV培地（Cambrex）中で培養した。一方で、matrigelがな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、Hind III (Toyobo. Co., Ltd.)及びNot I (Toyobo. Co., Ltd.)によって処理した。あらかじめHind 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 x 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 µlをテンプレートとし、pCANTAB HindIII及びNot I extensionを用い、PCR(96°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、Hind III及びNot Iによって処理した。あらかじめHind 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°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 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、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°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 1 µl、10 mM dNTP 1 µl、10 x klenow Buffer

1  $\mu$ l, DW 7  $\mu$ l 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 で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5  $\mu$ l をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR (96°C, 1 min  $\rightarrow$  65°C, 1 min  $\rightarrow$  68°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°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  $\mu$ 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  $\mu$ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25  $\mu$ F、200  $\Omega$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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°C で一晚

培養した。50  $\mu$ 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°C で 30 分間、250 rpm、37°C で 30 分間培養した後、4°C、2000 rpm、10 分間遠心し、得られたペレットに対して 50  $\mu$ g/ml アンピシリン、100  $\mu$ 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°C、2000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 4°C、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°C、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  $\mu$ m 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  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、37°C、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°C 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°C 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°C 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°C 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  $\mu$ l を添加し、その 50  $\mu$ l 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°C で 1 時間培養した。培養液の一部に 50 µg/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晩培養した。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 穴プレートヘランダムにピックアップして一晩培養した。50 µg/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、一晩培養した培養液 10 µl を添加し、OD600 = 0.4-0.5 まで培養した。4°C、3000 rpm、20 分間遠心した後、上清を除き 1 mM IPTG、50 µg/ml アンピシリン含有 2YT 培地 200 µl を添加し、37°C で 12 時間培養した。再び 4°C、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  $1.5 \times 10^4$  cells/well に希釈した HaCaT 細胞を播種し、終濃度 50 µg/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°C、

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°C 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。

### 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。

## D. 考 察

C. 結果の項に記載。

## E. 結論

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、蛋白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。

## 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., Tani 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.
7. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity., *J. Immunol. Methods.*, in press.

### ② 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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- $\alpha$  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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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・治療を目指したファ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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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關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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 角田慎一: 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2007年6月.
30. 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.
31. m, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. 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.

杉田 敏樹 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト  
ロテオミクスプロジェクト  
吉川 友章 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト  
ロテオミクスプロジェクト

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### ① 特許取得

該当なし

### ② 実用新案登録

該当なし

### ③ その他

該当なし

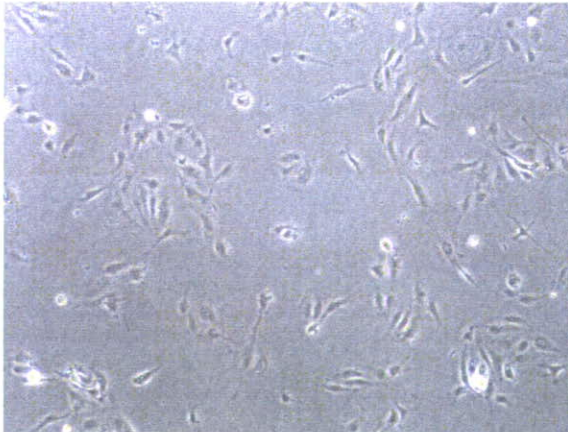
## I. 研究協力者

吉田 康伸 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト  
ロテオミクスプロジェクト  
今井 直 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト  
テオミクスプロジェクト

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	TCATCCTTG TAGTCTGCGGCCG CACGACGACGSNNACGACGSNNSNNA CGSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATGAAAG
P-oligo1	GATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAA AAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCC GGCCATGGCC
P-oligo2	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNCGGSNNSNNSNCTGSNNSNNSN NSNNSNACCGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATAGAAAGG
P-oligo4	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCA TAGAA

(A) 通常培養dish



(B) matrigel

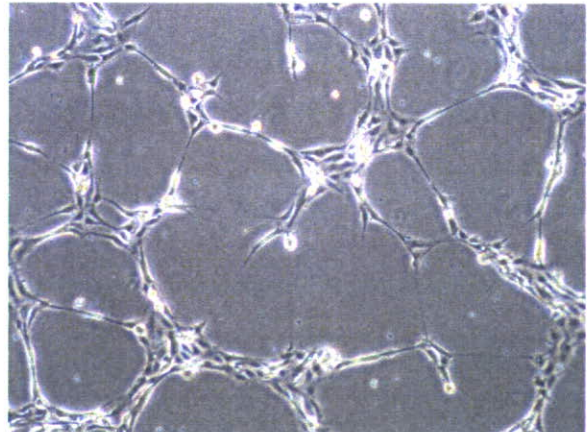
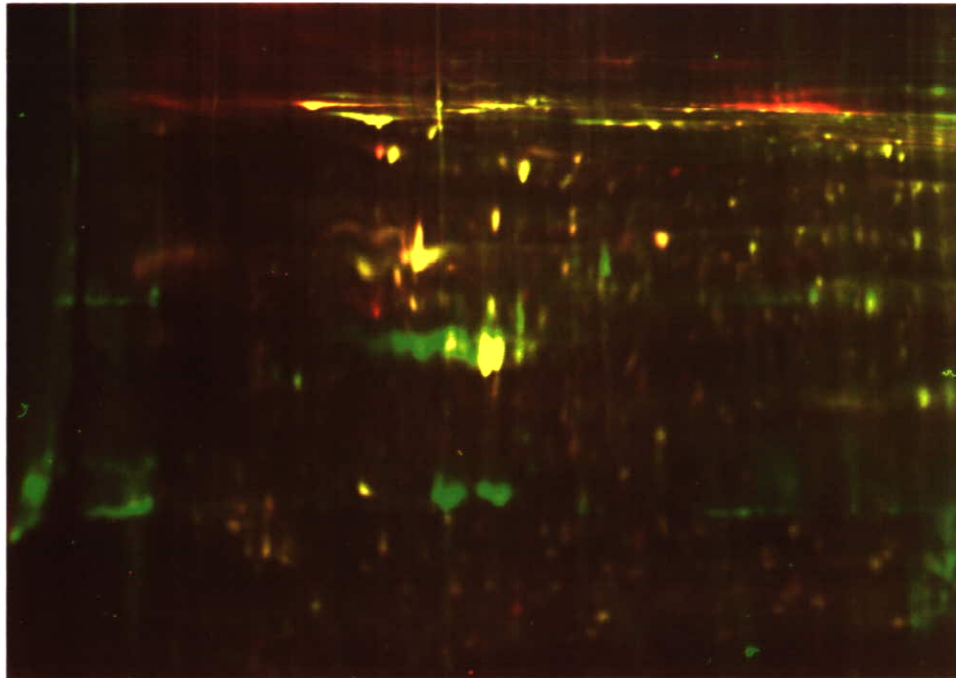


図1 ヒト由来リンパ管内皮細胞の管腔形成能評価

pH 3 ←————→ pH 10



- : 管腔形成時に発現上昇した蛋白質
- : 管腔形成時に発現減少した蛋白質
- : 発現変動のなかった蛋白質

図2 リンパ管内皮細胞を用いた2D-DIGE解析

表2 mutant Tat library-1の amino acid配列

clone	position										
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Tat	Y	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R
1	T	L	R	T	R	R	R	N	R	R	R
2	N	Y	R	T	G	R	R	K	R	R	R
3	L	T	R	W	T	R	R	M	R	R	R
4	Y	P	R	I	D	R	R	P	R	R	R
5	S	K	R	T	W	R	R	N	R	R	R
6	K	E	R	H	L	R	R	H	R	R	R
7	D	R	R	N	S	R	R	N	R	R	R
8	H	R	R	P	V	R	R	F	R	R	R
9	N	K	R	R	Q	R	R	K	R	R	R
10	A	P	R	D	W	R	R	A	R	R	R

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