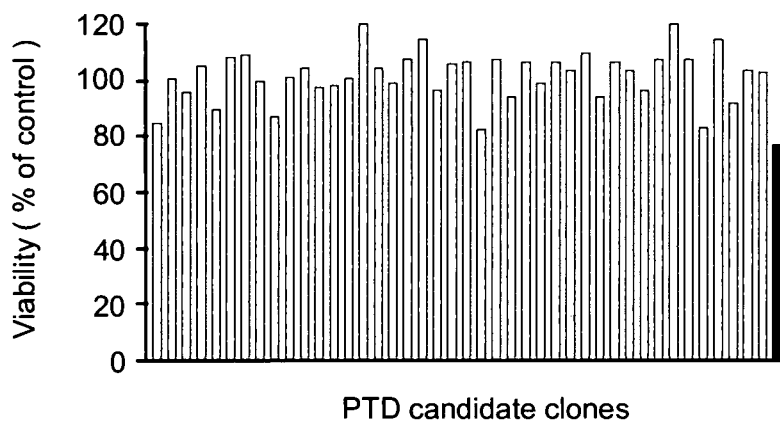


(A) Before cell panning



(B) After 3rd cell panning

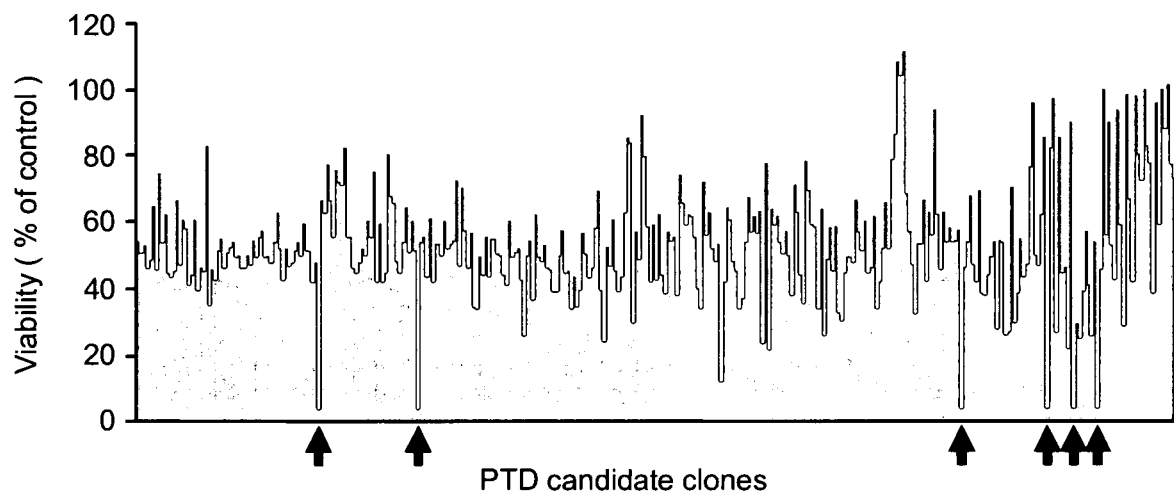


図3 モノクローン化したTat-PSIF融合蛋白質の細胞内移行能評価

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

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

分担研究者 水口裕之 独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト

研究要旨

蛋白質の抗原性試験のための効率の良い遺伝子発現系の開発のため、全てのアデノウイルスコード遺伝子配列を欠損させたヘルパー依存性 (guttled) アデノウイルスベクター発現系の確立を行った。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。

A. 研究目的

アデノウイルスベクターを生体に投与すると、通常数週間から数ヶ月間の一過性の遺伝子発現を示す。しかしながら、免疫不全マウスにおいては、数ヶ月から1年以上（場合によっては一生涯）に渡る長期間の遺伝子発現を示すことから（増殖停止期の終末分化した細胞に遺伝子導入した場合には、導入遺伝子が染色体外にエピゾームとして存在するアデノウイルスベクターにおいても長期間の遺伝子発現を示す）、免疫系による遺伝子導入細胞の排除が一過性の遺伝子発現の原因と考えられている。即ち、従来のアデノウイルスベクターは、ウイルスの増殖やウイルスタンパク質の合成に必須の E1 遺伝子領域を除去することで、ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが、E1 遺伝子非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり、これが免疫系のターゲットとなることが明らかになっている（図1）。即ち、蛋白質の抗原性試験のための効率の良いアデノウイルス遺伝子発現系の開発のためには、この問題を克服する必要がある。そこで、

アデノウイルスコード遺伝子を全て除去した guttled アデノウイルスベクター系の確立を行った（図1）。guttled アデノウイルスベクターを用いた場合は、上記免疫の問題が克服される結果、通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められることが報告されている。本年度は、ヘルパーウイルスを用いた guttled アデノウイルスベクターの産生系の確立と、ヘルパーウイルスの混在率の評価を行った。

B. 研究方法

B-1. guttled 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 guttled 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 guttled 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、guttred 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 (guttred アデノウイルスベクター懸濁液) を回収した。guttred アデノウイルスベクター懸濁液に $MgCl_2$ (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、guttred 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、guttred 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。guttred 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 $MgCl_2$ 、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。

B-2. gutted アデノウイルスベクターのタイター測定

guttred 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。

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

B-3. ヘルパーウイルスの混在率の評価

guttred 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、guttred 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。

C. 研究結果

B-1 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。

D. 考察

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、ヘ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、実用に耐えうるレベルの 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。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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

①論文発表

- 1) 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
- 2) 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)

- 3) 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)
- 4) 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)

②学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

目

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Ⅰ. 研究協力者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所
主任研究員

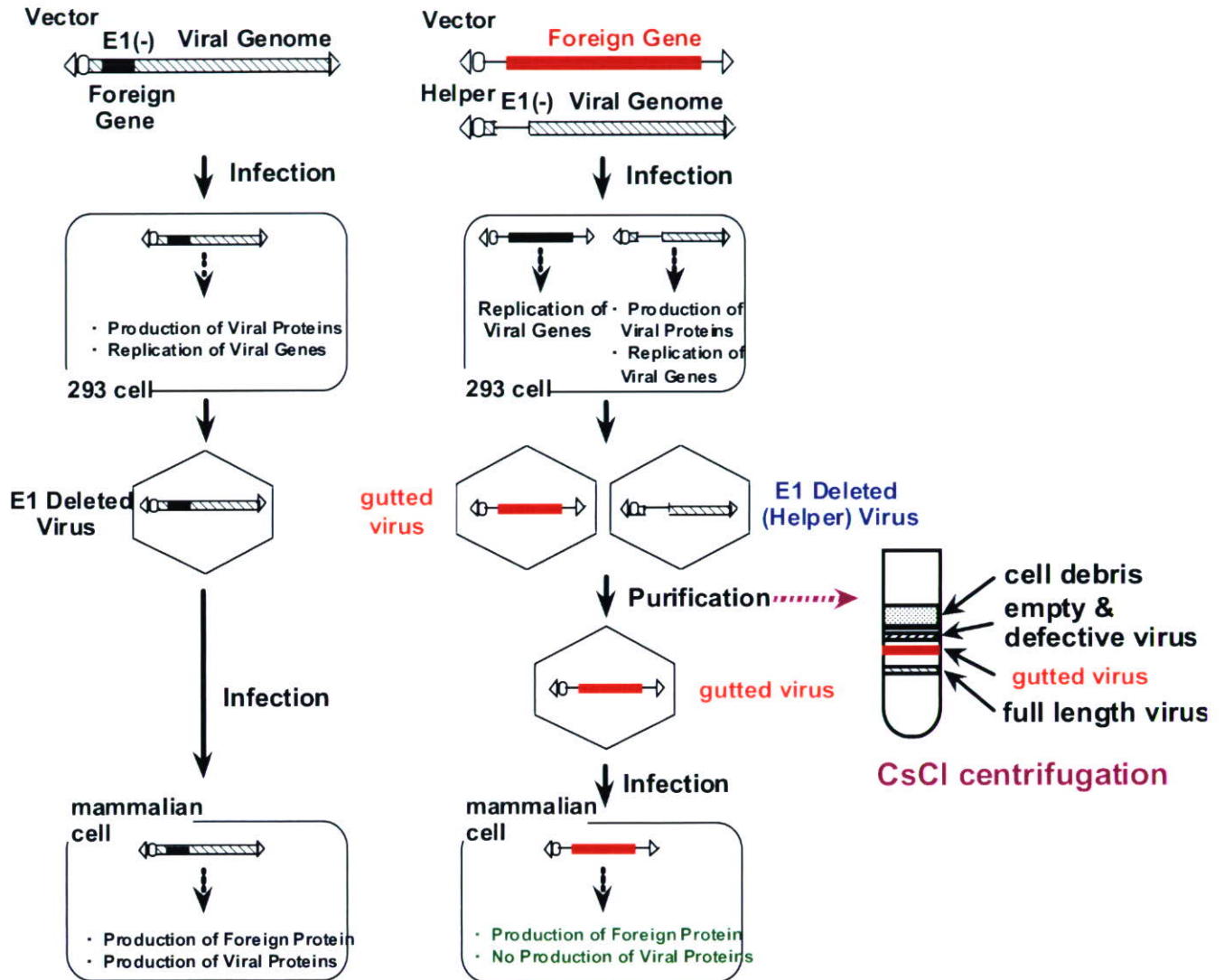
櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員

鈴木孝幸 (独) 医薬基盤研究所
研修生

山口朋子 (独) 医薬基盤研究所
研修生

E1 deleted adenovirus vector

Helper virus dependent gutted adenovirus vector



効率的な人工リンパ組織構築法の開発に関する研究

分担研究者 末松 佐知子 (独) 医薬基盤研究所 免疫細胞制御プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨

我々の「人工リンパ組織」は二次リンパ組織の特殊な組織構造と機能を模倣した人工組織である。その特徴は (1) 比較的単純な組織工学的的方法によって新規に生体内に構築可能であること (2) 抗原特異的な免疫機能 (すなわち獲得免疫機能) を有すること、さらに (3) 移植により獲得免疫機能を他の個体に移植できること、である。より強力な獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織を構築するために人工リンパ組織構築に用いている数種類のストローマ細胞株の性質を比較検討した。その結果、予測に反して最もリンパ球を人工リンパ組織に集積させるストローマ細胞株は既知のリンパ組織性ケモカインは発現していないことが分かった。このストローマ細胞が発現するリンパ組織性ケモカイン以外のサイトカインが直接的あるいは間接的にリンパ球の集積に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究経過から人工リンパ組織構築にはストローマ細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究はストローマ細胞が発現する様々な分子の中からリンパ球や樹状細胞のホーミングに関与する分子を検索し、強力な獲得免疫機能を有する人工リンパ組織構築法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

(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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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、我々が今回選出され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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

①論文発表

人工リンパ組織構築とは何か

末松 佐知子

Organ Biology (印刷中)

②学会発表

1. 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

2. 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会 シンポジウム 5

「遺伝子工学と組織再生」札幌 2007 年 11 月

3. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

②実用新案登録

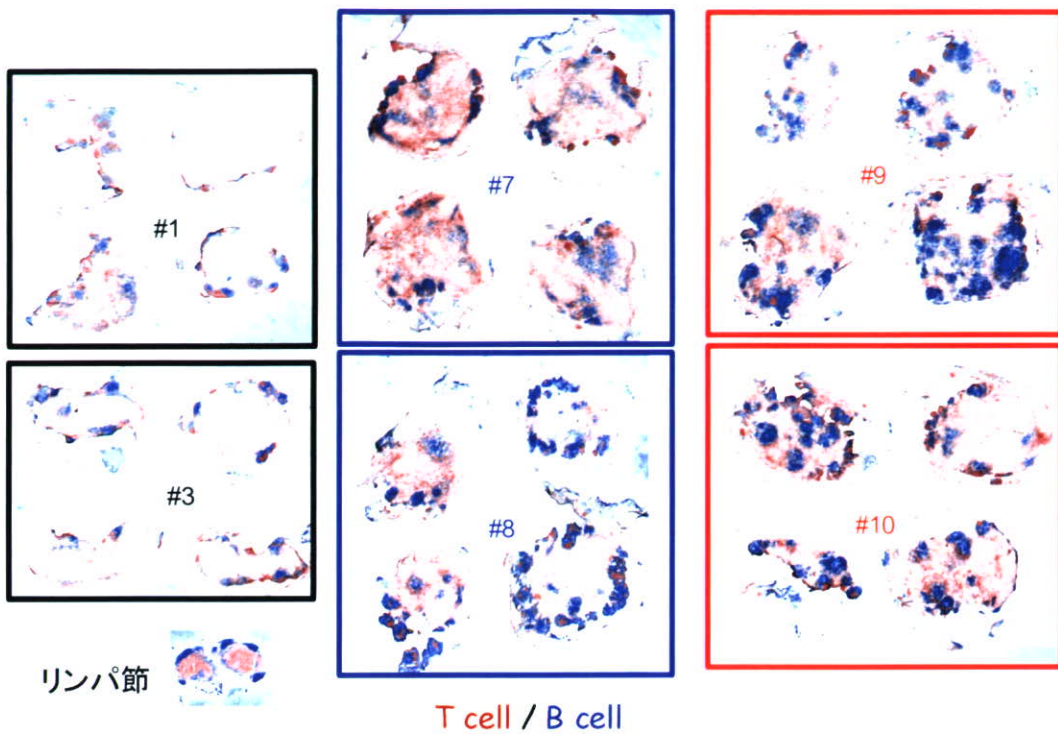
③その他

人工リンパ節 (特願 2003-052088) 特許審査請求中

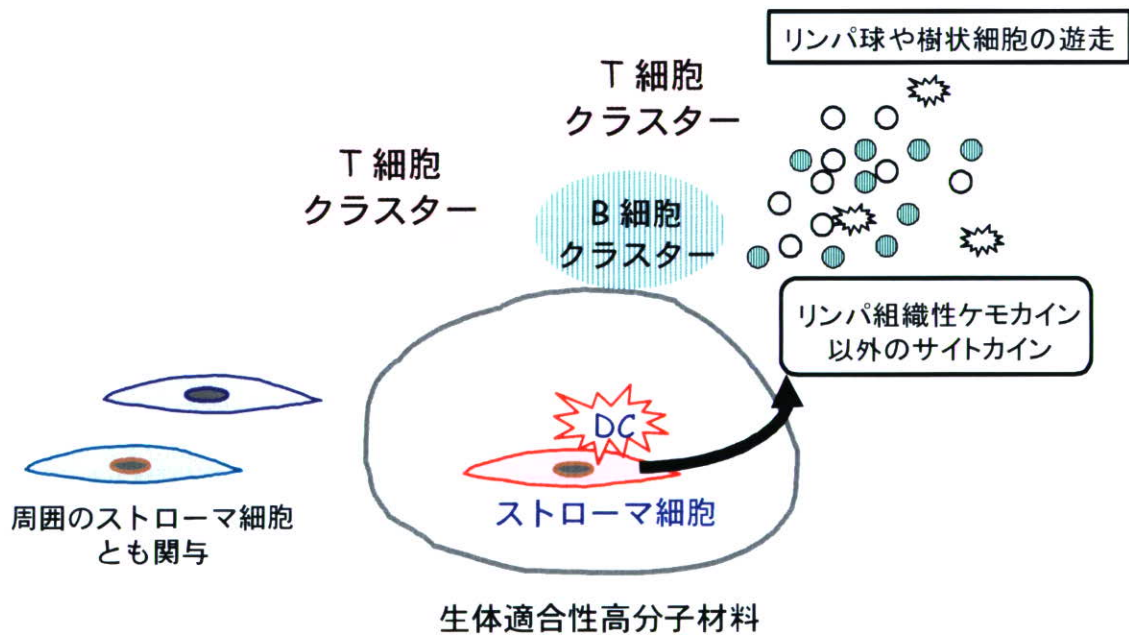
I. 研究協力者

服部祐紀

坂口永里子



ストローマ細胞株によるリンパ球集積の差



ストローマ細胞の重要性

各種 HLA の精製と抗原評価システムの開発

分担研究者 鎌田 春彦 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

サイトカインや増殖因子、さらに特定タンパク質の機能阻害抗体等の、いわゆる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している。しかし、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おり、タンパク質製剤の安全性・有効性を担保する、科学的かつ適正な承認審査の指針等の確立が最重要課題となっている。特に、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は、この抗原性が重要視されているが、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源性/同質性試験や安定性試験といった品質評価のみでは十分な抗原性評価にはいたっていない。そこで本研究では、特にタンパク質製剤の抗原性の問題に焦点を絞り、タンパク質製剤の抗原性を評価するための評価系の開発に関する基礎検討を行った。本研究ではまず、*in vivo* におけるタンパク質の抗原性を規定する HLA 分子に着目するとともに、タンパク質製剤の抗原性や分子不均一性に深く関与するとされる、タンパク質の立体構造異常（種々タンパク質変性に伴う構造変化）を検出しよう、質量分析装置の利用に関する基礎的検討を行った。タンパク質の構造情報を、容易に観察することができる、四重極ーイオンモビリティー飛行時間型質量分析計 (Synapt™ HDMS™) を用いて、タンパク質性医薬品の一つであるエンブレルをモデルタンパク質製剤として用い、加熱ならびに酸化による変性を解析した結果、熱変性および酸化変性に伴いタンパク質の分子構造が変化する様子を確認することができた。本方法は、微量タンパク質の変性状態を半定量的に検出・解析可能であるため、変性したタンパク質の割合とその抗原性の発現に関する基礎情報の集積が容易になるものと示唆される。今後、これらの情報をもとに、様々なタンパク質製剤の抗原性とその性状変化に関する情報を集積していく予定である。

A. 研究目的

サイトカインや増殖因子、さらに特定タンパク質の機能を阻害する抗体等の、いわゆる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している。しかし、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、タンパク質製剤の安全性・有効性を担保する、科学

的かつ適正な承認審査の指針等の確立が最重要課題となっている。そこで本研究では、特にタンパク質製剤の抗原性の問題に焦点を絞り、抗原性の評価を行うための評価系の開発を目的とした基礎検討を行った。

タンパク質製剤は、これまでの通説として、製剤化した後の、ロット間の違いにより、治療効果や副作用などが、少しずつ異なる可能性について報告されていた。これは、タンパク質製剤の製造過程や保存状態が少しずつ異なることが影響することに加え、

化学修飾や糖鎖修飾による、分子不均一性が問題となっていることがその可能性として示唆されている。特に、精製段階での不純物の混入や、一部の変性タンパク質が混入することによる影響が懸念されつつあるものの、それらを正確に検出し、同等性/同質性試験や安定性試験といった品質評価を行うための方法論は、タンパク質製剤においては立ち後れていたのが現状である。これまで、このようなタンパク質の立体構造異常（変性）の評価法として、①液体クロマトグラフによるカラムからの溶出時間の変化、②タンパク質の活性測定、③プラスミノゲン等を用いた変性タンパクのシス構造変化の検出、などいくつかの方法が試みられてきた。しかし、①液体クロマトグラフでは、小さな分子構造変化では、検出が不可能であること、②タンパク質の活性を個々に測定するには、時間と労力がかかる上、不純物の影響を考慮する必要があること、③シス構造をとらないタンパク質に対しては測定が不可能であること、など、種々問題点が提起されており、全てのタンパク質に対して一律に適応可能な測定法は現在のところ存在しない。

一方で、質量分析装置（MS）は、近年のプロテオーム研究を支えてきた根幹であり、これまでに測定が不可能であった、pg オーダーの微量タンパク質やペプチドの、構造情報の解析や検出に利用されている。飛行時間型質量分析装置（TOF-MS）は、ペプチドやタンパク質などを、レーザーあるいは、高電圧をかけた真空中で試料をイオン化し、電圧がかかった装置内を、飛行する時間を測定することにより、イオン化した分子の質量を求めることができる。また、質量分析装置の感度は、これまでのタンパク質の紫外吸収や溶媒の屈折率を利用した方法よりも、極めて高感度に測定しうることから、微量分子の検出にも有効である。しかし、このような質量分析装置を用いた方法論では、質量数が同じ分子、特に熱などの変性では、タンパク質自体の質量数に変化が伴わないために、その差を区別することができない。従って、これらの質量数以外の情報によりタンパク質の構造変化を分離・測定できる新しい方法論の探索が、タンパク質製剤の不純物測定には、必要不可

欠である。

以上の観点から、タンパク質製剤の中に含まれる不純物（上述した、変性タンパク質や、精製が不十分であることによる不純物など）の検出のためには、①高感度にその不純物の割合を定量すること、および②変性タンパク質の割合を検討するためにも質量数が同じ分子を分離・解析できること、を同時に実現しうる方法論の確立が必要不可欠である。

一方で、イオンモビリティスペクトル分析（Ion mobility Spectrometry: IMS）は、イオン化された分子が電場（ゲート）内を移動する際に、アルゴンガスなどの移動阻止物質をゲート内に導入することで、分子サイズや電荷の異なる分子を分離・検出する方法として、古くから利用されていた。IMS はこれまで、低分子化合物などの分析に利用された方法であるが、測定分子のイオン化、ならびに、イオン化された分子が電圧のかかったゲート内を移動するなど、先述した質量分析装置と、非常に似通った機械的構造を有している。従って、この質量分析装置と IMS を組み合わせることで、簡便に両装置のメリットを享受できるというアイデアのもと、四重極ーイオンモビリティー飛行時間型質量分析装置（Synapt™ HDMS™）が開発された。この測定装置は、分子量の同じ分子を、IMS により分子サイズの異なるものに分離できる上、質量分析装置が得意とする、極微量分子の検出、さらに質量数の決定など、一度の解析で様々な情報が得られるのが特徴である。特に、タンパク質製剤の品質評価に利用する場合、タンパク質の変性による分子サイズの違いや、低分子不純物の検出など、短時間で一挙にその情報が得られるばかりでなく、サンプルの種類によって、イオン化の方法や質量分析装置の設定を一部調整するだけで、あらゆる分子に対して、同様の検討ができるというメリットがある。従って、本研究における「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」に最適な装置であると研究分担者は考え、本装置を利用したタンパク質の構造変化の検出のための基礎検討を行うことにした。すなわち、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、モデルタンパク性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。

B. 研究方法

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 MgCl₂、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, 2.1x100mm, 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 1 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。

Table 1 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

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 N₂ 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。

C. 研究結果

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、モデルタンパク性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（Figure 1）。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（Figure 2）。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（Figure 3）。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（Figure 4）。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。

D. 考察

C. 研究結果の欄に記載

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

原著論文

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., Kamada 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. Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of receptor-selective TNFs with agonistic activity., *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. Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y.: Development of new anti-TNF therapy., Inflammation and Regeneration, 27:512-515, 2007

②学会発表

シンポジウム等

1. 鎌田春彦：疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-2., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2007年6月.

国内学会発表

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：ファ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. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

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**
- ①特許取得
該当なし
 - ②実用新案登録
該当なし
 - ③その他
特になし
- I. 研究協力者**
- なし
- 鍋師裕美 大阪大学大学院薬学研究科 医薬基盤科学分野 博士後期課程1年
- 野村鉄也 大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野 博士後期課程1年

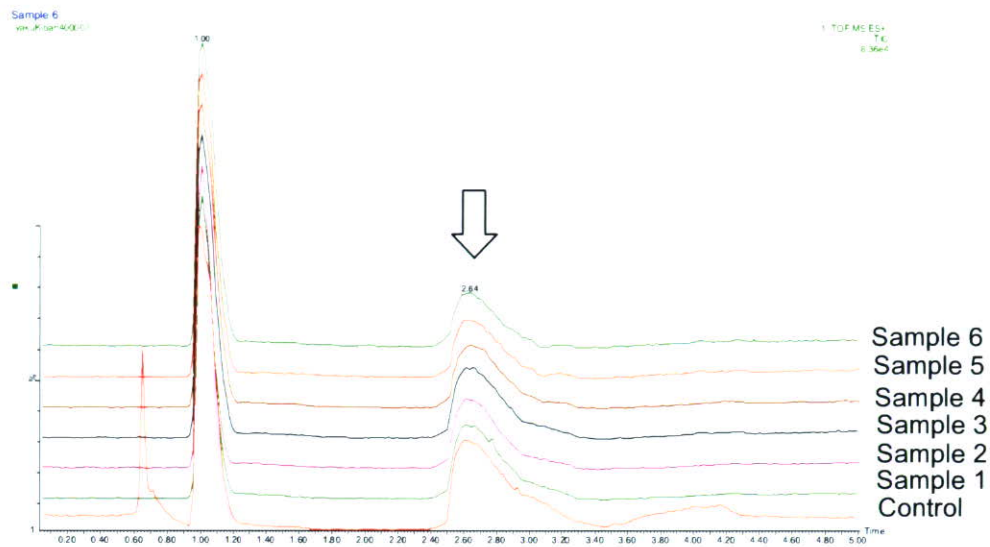


Figure 1 トータルイオンクロマトグラム (コントロール、熱変性サンプル1-6)

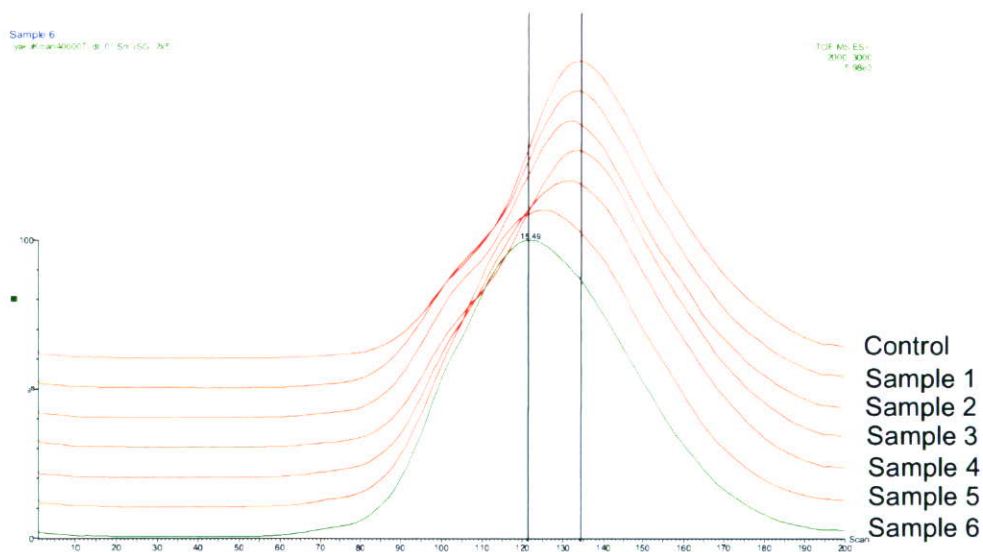


Figure 2 熱変性がEnbrellに及ぼすイオンモビリティへの影響

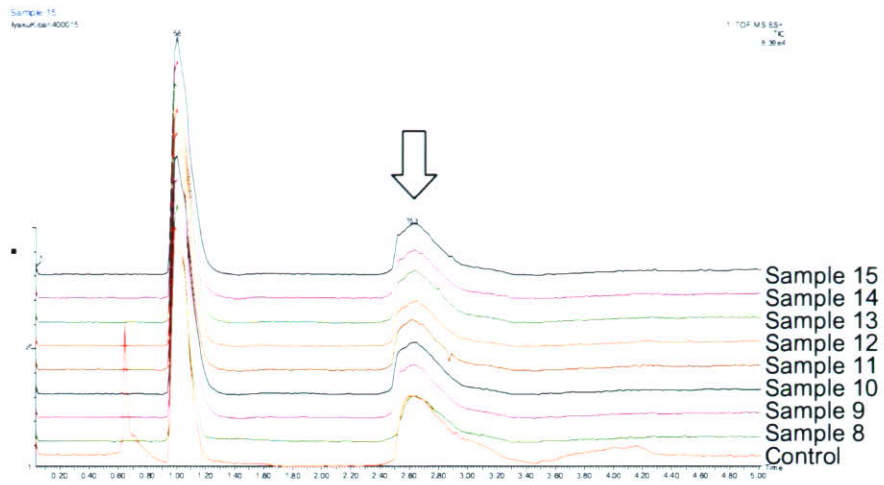


Figure 3 トータルイオンクロマトグラム (コントロール、酸変性サンプル1-6)

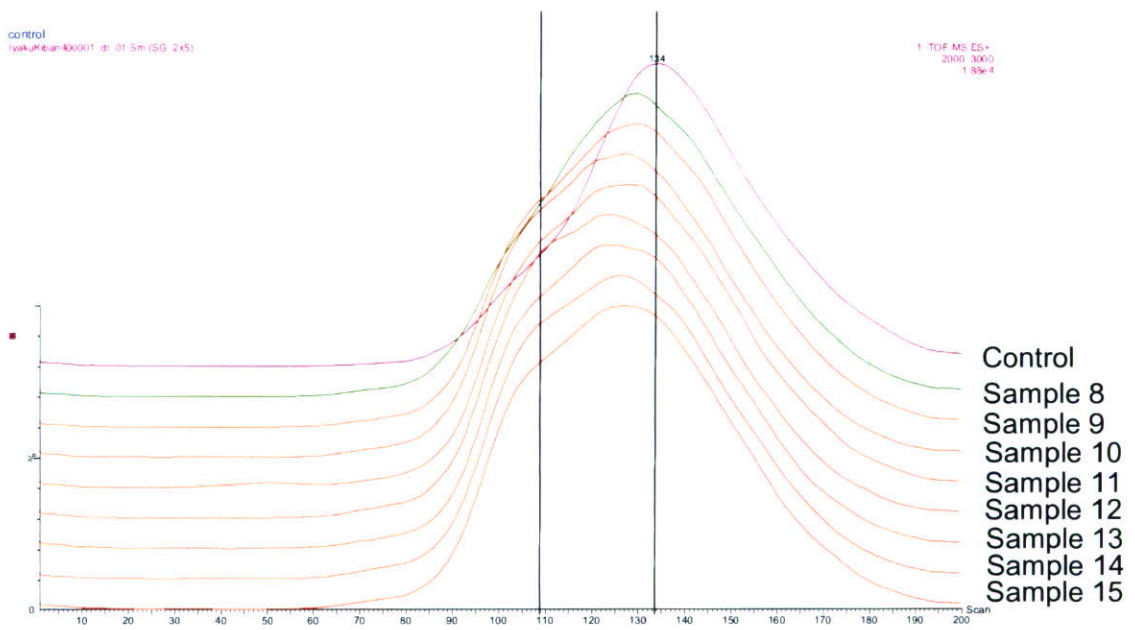


Figure 4 酸変性がEnbrellに及ぼすイオンモビリティへの影響

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

分担研究者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師（常勤）

研究要旨

数多くの蛋白性医薬品が、種々難治性疾患に対して、従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えつつある。一方で近年、これら蛋白性医薬品を投与した患者で、投与した治療用蛋白質に対する抗体が惹起されるケースが多数報告されるようになってきた。その原因の1つとして、蛋白性医薬品の製造工程・保存過程における蛋白質変性が大きな鍵を握ると考えられている。本年度は、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、酸化処理による蛋白質の構造特性変化を評価した。その結果、エンブレルの酸化処理により、アミロイド繊維を含む蛋白質変性が誘発され、マクロファージを活性化する可能性が示唆された。

A 研究目的

ホルモン、酵素、血液凝固因子、サイトカイン、抗体など数多くの蛋白性医薬品が、遺伝性疾患、代謝異常、循環器病、がん、免疫疾患、感染症などの各種疾病に対して、従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えてきた。多くの蛋白性医薬品は、ヒト由来蛋白質であるため、生体内に投与しても免疫反応は惹起されないと考えられていた。一方で近年、これら蛋白性医薬品を投与した患者で、投与した治療用蛋白質に対する抗体が惹起されるケースが多数報告されるようになってきた。インターフェロン（IFN） β 、エリスロポエチンを初めとする数多くの蛋白性医薬品で、患者に投与された蛋白質に対して特異的抗体が産生され、生理活性の著しい減弱ばかりでなく、思わぬ副作用が引き起こされている。現状では、なぜヒト由来の蛋白性医薬品で抗体産生が惹起されるかに関して全く情報はなく、何らかの対策が待望されている。

近年、蛋白性医薬品の製造工程・保存過程などで、蛋白質がわずかに変性することが明らかとなり、変性蛋白質の存在が抗原性発揮における重要な要素であることが示唆されつつある。しかし、変性蛋白質が、なぜ野生型と比較して抗原性が高いのかに関する知見は皆無である。また、そのような変性蛋白質の効率的な検出方法に関しても全く知見がないのが現状である。

本研究では、蛋白性医薬品の安全性に、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、医薬品行政の円滑な推進を図り、国民の保健衛生および生活の質の向上に資することを最終目的として、3年間で、蛋白性医薬品の抗原性誘発メカニズムの解明及び抗原性評価システムを構築しようとするものである。本年度は、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、酸化処理による蛋白質の構造特性変化を評価した。また、抗原性評価システム開発を目指し、MHCクラスII蛋白質の精製に向けた準備も試みた。