

2008038026A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 21 年 4 月

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 21 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	23
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	23
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	35
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	41
4. 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	43
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物・別冊	51

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

研究代表者 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

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、これらを医薬品として応用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）化タンパク質、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がタンパク質を構成する結合アミノ酸にランダムに結合するため、結合分子数や部位の違い、さらにバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性の点から、その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いる。本研究課題は、機能性人工タンパク質製剤のレギュレーションに必須な安定性、抗原性の新規評価法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法の確立に向けて必要となる要素技術として、抗原性評価のための人工リンパ管作製に向けたリンパ内皮細胞の特性評価、変性タンパク質の持つリンパ球などの免疫細胞に対する影響と、その質量分析法を用いた評価系の開発、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確立、およびHLAアレイ構築に向けた基礎検討を行った。

研究分担者

角田 慎一 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
末松 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

レギュレーションの整備は、既存の低分子医薬品やタンパク質医薬品と比較して、立ち後れているのが現状である。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タンパク質製剤として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。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、例えば PEG 化タンパク質製剤の場合、分子量的に不均一な PEG 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など、致命的欠点を有している。従って、このような第三世代のタンパク質製剤に関しては、従来までの天然・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

A. 研究目的

血液製剤をはじめとする精製タンパク質が主として利用された第一世代のタンパク質製剤、抗体医薬を代表とする第二世代のタンパク質製剤に引き続き、機能性人工タンパク質を利用した第三世代の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おいて熾烈を極めている。しかし、このような第三世代のタンパク質製剤の承認審査、臨床試験の推進、安全性対策の点で、その品質を担保する安定性試験、抗原性試験、およびこれらをもとにした

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等の結合部位・結合数・結合安定性の評価、修飾剤としてのPEGの不均一性やこれら修飾剤を用いて作製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、天然および遺伝子組換えタンパク質との体内安定性や生物学的安定性、物理化学的安定性の評価、とりわけ、抗原性の評価が承認審査や臨床試験に不可欠となる。本申請研究は、実際に臨床に供されているタンパク質製剤を用い、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ものである。さらに、タンパク質の抗原性の判別に極めて重要な役割を持っているリンパ管組織を人工的に作製・模倣した *in vitro* 人工リンパ組織の作製や HLA-抗原ペプチド相互作用解析システムを用いた抗原性評価法の新規開発を試みるものである。また、これらの人工リンパ節の作製や機能解析に必須の遺伝子導入技術、さらに人工リンパ節組織の構築法の開発を行い、多面的な抗原性試験法の開発を行う。

B. 研究方法

B-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

細胞培養

ヒト肺組織から単離されたリンパ管内皮細胞 (HMVEC-Lly 細胞) と血管内皮細胞 (HMVEC-LBI 細胞) は TAKARA より購入したものをを用いた。培養には微小血管内皮細胞培地を用い、いずれも継代培養をしてサブコンフルエント状態のものを実験に供した。ヒト気管上皮細胞 (NHBE) は TAKARA より購入したものを、ヒト肺がん細胞株 (RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ) は JCRB Cell Bank より購入したものをを用いた。NHBE 細胞の培養には気管上皮細胞培地 Kit (TAKARA) を、RERF-LC-MS の培養には、10% FBS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む E-MEM 培地

を、RERF-LC-KJ の培養には 10% FBS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む RPMI-1640 培地 (Wako Pure Chemicals) を用い、いずれも継代培養をしてサブコンフルエント状態のものを実験に供した。ヒト乳がん細胞株 (BT-474) は ATCC より購入したものをを用いた。BT-474 細胞の培養には、10 µg/ml ヒトインスリン含有 10% FCS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む RPMI-1640 培地を用いた。

管腔形成能試験

24 well プレートに BD Matrigel Matrix (BD Bioscience) を 300 µl/well でコーティングし、37 °C、飽和蒸気圧、5% 炭酸ガス気相下で、30 分静置し Matrigel をゲル化させた。その上に、各種阻害剤 2-Methoxyestradiol (9 µM)、D609 (243 µM) を加えた medium、もしくは 50 % の RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ の CM を含む medium で LECs と BECs を 3.0×10^4 cells/well を播種し、37 °C で、6 もしくは 24 時間培養した。その後、細胞を PBS で洗浄し、生細胞の状態を、蛍光顕微鏡 (Power IX81, OLYMPUS) を用いて観察した。なお、細胞の蛍光染色は Calcein-AM Solution (2 µg/ml) (DOJINDO) を 37 °C で 2 時間作用させることにより行った。管腔形成の定量化は、撮影した蛍光画像を MetaXpress (Molecular Devices, Inc.) で解析することにより行った。

2D-DIGE解析

2-methoxyestradiol (9 µM) の存在・非存在下における、Matrigel 上で培養したリンパ管内皮細胞 HMVEC-Lly と血管内皮細胞 HMVEC-LBI を培養した。各細胞のペレットを、細胞溶解液 (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)) にて溶解し、2D Quant Kit (Amersham) を用いてタンパク質の濃度を測定した。各細胞のうち発現タンパク質の比較を行いたい 2 種のサンプル各 50 µg をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 cy2, cy3, cy5 (Amersham) と氷上で 30 分間反応させ、その後

10 mM Lysine を加え、氷上で 10 分間静置して反応停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT, 2% pharmalyte (Amersham Biosciences), 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS) で 450 μ l にメスアップした。一方、タンパク質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化試薬にて標識しないサンプルも同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 5-6) スリップ (Amersham) を入れ、oil を重層した。ETTAN IPGPhor (Amersham Biosciences) を用いて、プレ膨潤を 10 時間行い、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB, 10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB, 25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に浸し、各 15 分間平衡化を行った。二次元目の SDS-PAGE を行うため、ゲル溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyltartardiamide gels) に IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (Amersham Biosciences) を用いて、2 次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences) を使用した。抗体作製のタンパク質抽出には、88 mM NaIO₄ を用いて室温で 30 分インキュベーションし、ゲルを溶解することでタンパク質を抽出した。

MS解析

ゲル片に 100 μ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振盪させることで脱色を行った。続いて 200 μ l の 100%

acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器 (CENTRIFUGAL CONCENTRATOR, TOMY) によって乾燥させることで脱水を行った。脱水したゲル片に 5 μ l のトリプシン溶液 (20 μ g/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内のタンパク質をトリプシン消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ l の 100% acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドの抽出を行った。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) のカラムを用いて精製し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 1 μ l を Prespotted AnchorChip Set for Proteomics (BRUKER DALTONICS) に滴下し、乾燥させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS, autoflexII, BRUKER DALTONICS) によりトリプシン消化ペプチドの質量分析を行った。なお、キャリブレーションは M/z : 757.39916, 1046.54180, 1296.68480, 1672.91700, 1758.93261, 2093.08620 のピークを基準物質として行った。なお、ペプチドの同定には、メチオニン残基の酸化、iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮して行った。

conditioned medium (CM) の作製

100 ϕ のシャーレに肺がん細胞株 RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ もしくは遺伝子導入した肺がん細胞株を播種し、微小血管内皮細胞培地 Kit (TAKARA) 存在下で 48 時間培養した。回収した上清を 1000 rpm、5 分間遠心後、0.2 μ m の Millex®-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過し、CM を作製した。以降はこの CM を各 assay に使用した。なお、細胞浸潤を促進する分子として、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-C) をポジティブコントロール

として選択した。

リンパ管・血管内皮細胞を用いたin vitro invasion assay

リンパ管内皮細胞 LECs と血管内皮細胞 BECs を、無血清培地で 24 時間培養した。In vitro invasion assay には 96 well BME cell invasion assay Kit を使用した。Top chamber に BME を 50 μ l 添加し 4 時間インキュベーションした。続いて、上清を除き、無血清培地で 1×10^6 cells/ml に調製した各種細胞を 50 μ l 播種し、75 μ l の血清培地と 75 μ l の CM 入りの bottom chamber で 48 時間培養した。アスピレーターで bottom chamber の培地を吸引後、wash buffer で 2 回洗浄し、calcein-AM solution を 100 μ l 添加し、1 時間インキュベーションした。細胞の蛍光強度は、ARVO MX を用いて測定した。培地のみの蛍光強度をブランク (0%)、Top chamber に播種した細胞の蛍光強度をポジティブコントロール (100%) として、bottom chamber に浸潤した細胞の割合 (% invasion) を算出した。

タンパク質変性

サンプルタンパク質は医薬品として既に臨床応用されている抗 HER-2 抗体である、トラスツズマブ (ハーセプチン: 中外薬品) を用いた。タンパク質の変性は、熱変性を選択した。トラスツズマブを、40~95 °C の範囲で加熱し、様々な時間で加熱し、その後、氷上にて急冷したものをサンプルとして用いた。

タンパク質活性測定

フラスコにて培養した BT-474 細胞を、0.25% トリプシンにて剥離し、50 mL チューブに回収したものを 1000 rpm、5 分間遠心し、細胞のペレットを得た。10 μ g/ml ヒトインスリン含有 10% FCS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む RPMI-1640 培地にて懸濁後、70 μ m メッシュ (Cell Strainer: BD Falcon) にて、細胞懸濁液を濾過し、細胞塊を除去した。培養液にて、 1×10^4 cells/100 μ l/well の濃度に調整したのち、

96 well プレートに細胞を播種した。1 日培養後、PBS (-) にて種々の濃度に懸濁したトラスツズマブ溶液を 100 μ l/well で添加し、4 日間培養した。培養後、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque) を 10 μ l/well で加え、37 °C で 2 時間培養後、Benchmark Plus マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc.) にて吸光度を測定 (Test wave length; 450 nm / Reference wave length; 650 nm) した。なお、viability はトラスツズマブを加えなかった群の吸光度を 100% として算出し、細胞非添加 well をバックグラウンドとして差し引いたものを使った。

タンパク定量

タンパク質の定量には、BCA protein assay kit (Pierce) を使用した。

Synapt HDMSによる変性タンパク質の性状変化評価

各サンプル原液の全量を取り、限外ろ過フィルター (10kDa, PALL 社) にて原液中の低分子を遠心除去した。フィルター膜上の抗体分画を 200 mL の 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH7.2) で回収した。この 0.25 mg/mL 溶液をインフュージョン分析に供した。インフュージョンによる分析条件としては、流速を 5 mL/min に設定し、積算時間を 5 分間とした。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 3.8 kV に設定し、コーン電圧を 33 V に設定した。ソース温度を 150 °C に設定し、イオン化後の脱溶媒として N₂ ガス (1000 L/Hr, 350 °C) を使用した。イオンモビリティの設定としては、IMS Gas として N₂ (0.5mbar) を使用し、IMS Wave Velocity を 300 m/s に設定し、IMS Wave Hight を 9.7 V に設定し、Mass range を m/z 500-8000 の範囲で測定した。

B-2. gutted アデノウイルスベクター産生系の確立 ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA を発現する

guttedアデノウイルスベクターの作製

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA 配列 (ヒト U6 プロモーターで shRNA (short hairpin RNA) をドライブ) 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 (図 9)。

アデノウイルス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密度勾配遠心を 2 回繰り返し精製した。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。

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA を発現する 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。

VP titer = 吸光度 × 希釈倍率 × 1.1 × 10¹² × 36 / gutted アデノウイルスベクターの全長(kb)

RNAi効果の検証

A549Lu 細胞 (ルシフェラーゼ安定発現細胞株) を 96well Black plate に 1 × 10⁴ cells/100 μl/well で播種し、24 時間後にルシフェラーゼに対する標的 siRNA 配列を有した従来型のアデノウイルスベクター、gutted アデノウイルスベクター、そしてコントロールとして U6 プロモーター配列のみを有したアデノウイルスベクターを 15 ifu/cell、50 ifu/cell、150 ifu/cell で感染 (n=4) させた。1.5 時間後、培地を添加しさらに 3 日間培養した。その後、ルシフェラーゼ assay を行った。

B-3. 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(BMDC)、及び (3) 生体適合性高分子材料 (コラーゲンスポンジ) を組み合わせてマウスの腎皮膜下に移植するとリンパ球や樹状細胞などがコラーゲンスポンジの周囲に集積して人工リンパ組織が構築される。予め、マウスを既知の抗原で免疫しておけばその抗原に特異的な (抗原を認識する) リンパ球も集積し、獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織

が構築可能となる。

異なる組織由来の複数のストローマ細胞（細胞株と初代培養細胞）を用いて構築した人工リンパ組織をTリンパ球あるいはBリンパ球の集積を指標として免疫組織学的に比較検討し、リンパ球、特にBリンパ球を多数集積させるストローマ細胞株を選択した（A細胞株と略称する）。A細胞株を用いた場合に人工リンパ組織に多くのリンパ球が集積するメカニズムを調べるため、A細胞株の発現分子をDNAマイクロアレイで解析し、またリンパ組織性ケモカイン（CCL19, CCL21, CXCL12及びCXCL13）については抗体を用いてタンパクレベルでの発現の有無を検討した。

予め既知の抗原で免疫したマウスの腎皮膜下にA細胞株と同じ抗原で刺激したBMDCをコラーゲンスポンジに組み込んで移植して人工リンパ組織を構築し、当該抗原に対する特異的免疫反応を抗原特異的な抗体産生とT細胞の活性化を検証した。

B-4. 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

変性蛋白質の免疫細胞に与える影響

蛋白質製剤の熱処理；21 mg/mlのハーセプチンを95度で5分、15分、30分、60分間処理した。

IL-1 β 産生の評価；96穴プレートにヒトマクロファージ様細胞株THP-1細胞を 1.5×10^4 cells/wellで播種し、熱変性処理したハーセプチンを最終濃度400 μ g/ml、80 μ g/ml、16 μ g/ml、3.2 μ g/mlとなるように加えた。6時間後、上清を回収し、IL-1 β 量をELISAで測定した。

抗原性評価システムの開発

腹水採取；マウスにプリスタン0.5 mlを腹腔内投与し、約1週間飼育した。その後、抗HLA-DR抗体を産生するハイブリドーマLB3.1細胞を、マウスの腹腔に接種し、10～14日後に腹水を回収した。

IgG精製；上記で回収した腹水を用い、Melon Gel

Monoclonal IgG精製キット（PIERCE）により抗HLA-DR抗体を精製した。

抗体カラムの作成；精製した抗HLA-DR抗体を用い、アフィニティ・ゲルHzイムノアフィニティキット（BIO-RAD）によりアフィニティカラムを作成した。

HLA-DRの精製；HLA-DR発現EBV細胞を、10% FCS、1% グルタミン、1% 抗生物質含有RPMI-1640で培養した。 1.0×10^9 細胞に、約20 mlの破碎溶液（50 mM Tris (pH8.5)、1% Nonidet P-40、150 mM NaCl）を加え、氷上で1時間攪拌した。その後、27000gで30分遠心し、HLAを含む上清を回収した。この上清を抗体カラムに加え、洗浄液（10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1% Nonidet P-40）でカラムを洗浄した後、溶出液（0.15 M NaCl、50 mM diethylamine、0.4% octylglucoside、0.02% Na $_3$ N $_3$ ）でHLAを溶出した。溶出液は、直ちに2M Trisで中和した。

C. 研究結果

C-1. リンパ管のin vitro再構築に関する検討

がんの血行性転移に関する研究において、がん組織の可溶性基底膜調製品であるMatrigelや、転移能の高いがん細胞株の馴らし培地（conditioned medium：CM）等を血管内皮細胞に作用させることで、がん組織内に呼び込まれる血管（がん組織血管）をin vitroで再現しようとする試みがこれまで報告されている（図1）。そこで本研究ではまず、リンパ節転移患者におけるがん組織内に呼び込まれるリンパ管（がん組織リンパ管）をin vitroで再現することを目的として、ヒト肺由来リンパ管内皮細胞HMVEC-LLy（LECs）及びヒト肺由来血管内皮細胞HMVEC-LBI（BECs）を用いて、それらの特性を評価した。まず、リンパ管・血管内皮細胞が異なる新生メカニズムを持つかどうかを評価する目的で、各種抗がん剤（D609、2-methoxyestradiol（2ME））を用いて、それらがMatrigel上で培養したリンパ管内皮細胞と血管内皮細胞の管腔形成能に与える影響

を解析した (図 2)。その結果、D609 はリンパ管・血管内皮細胞の両方の管腔形成を阻害していたのに対し、2ME はリンパ管内皮細胞の管腔形成のみを阻害していることが確認され、リンパ管内皮細胞の管腔形成 (リンパ管新生) には血管のそれとは異なるメカニズムが存在する可能性が示唆された。D609 は細胞増殖に必須のフォスファチジルコリン特異的フォスホリパーゼCやプロテインキナーゼCの阻害剤として報告されており、リンパ管・血管内皮細胞の管腔形成を阻害していたことから、両細胞の細胞増殖阻害が関与しているのではないかと推察される。一方で、2ME は種々のサイトカイン分泌の調節に必須な低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α) の阻害剤として報告されており、2ME がリンパ管内皮細胞特異的に管腔形成を阻害していたことから、詳細なメカニズムは不明ではあるが、リンパ管・血管内皮細胞の HIF-1 α の発現が関与しているのではないかと考えられる。そこで、この特性の違いに関わるリンパ管特異的な新生関連タンパク質の探索のために、Matrigel 上で培養し、2ME 存在・非存在下におけるリンパ管・血管内皮細胞からそれぞれタンパク質を調製し、各サンプルを 2D-DIGE 法にて解析した (図 3)。そして、2ME 存在下におけるリンパ管内皮細胞において有意に発現が減少し、かつ同様の 2ME 存在下において血管内皮細胞では発現変動の見られなかった 4 個の spot に対して、MS 解析によるタンパク質の同定を試みたところ (表 1)、細胞の形状の変化に由来して発現変動したと思われる細胞骨格タンパク質である keratin 9 の他に、HSP90 や GDP dissociation inhibitor 2 等の細胞内輸送関連タンパク質が見出された。このことは、更に詳細な解析が必要とされるものの、リンパ管内皮細胞特異的な新生にこれら発現変動タンパク質や HIF-1 α の相互作用が主導的に機能する可能性を示している。今後、本検討から得られたリンパ管特異的な新生関連タンパク質の情報を基盤として、その新生メカニズムが明らかにされていくものと期待している。

続いて、リンパ節転移能に着目してがん組織リンパ管を *in vitro* での再現する目的で、リンパ節転移能の異なる肺がん細胞株 (RERF-LC-MS, RERF-LC-KJ) と気管上皮細胞 NHBE の CM をリンパ管内皮細胞に作用させ、管腔形成能及び浸潤能に与える影響を解析した (図 4)。その結果、気管上皮細胞の CM を作用させた群と比較して、低リンパ節転移肺がん細胞株 RERF-LC-MS の CM を作用させた群では管腔形成能や浸潤能が殆ど変化しなかったのに対し、高リンパ節転移肺がん細胞株 RERF-LC-KJ の CM を作用させた群ではそれらが有意に増加しており、その結果ががん組織内における特性と一致することから、各種がん CM を用いることでがん組織リンパ管を *in vitro* で再現できることが判明した。また、これは preliminary なデータではあるが、RT-PCR 解析の結果、低リンパ節転移肺がん細胞株と比較して、高リンパ節転移肺がん細胞株ではリンパ管新生因子である VEGF-C や PlGF 等が過剰発現している傾向があった。以上の結果より、高リンパ節転移肺がん細胞株は低リンパ節転移のものと比較して VEGF-C 等のリンパ管新生因子を過剰に分泌すること、また、これらの因子の添加によって得られるリンパ管内皮細胞の特性 (管腔形成・浸潤) ががん組織内のそれと同様であることから、各種がん CM によってがん組織リンパ管を *in vitro* で再現できること等が推察された。

また、タンパク質の立体構造と活性の相関を解析するにあたり、タンパク質の変性には、短時間で変性が可能であり、操作が比較的単純かつ再現性の得られやすいものとして、熱変性を選択した。また、モデルタンパク質としては、現在、臨床応用されているトラスツマブを用いた。前年度までの結果から、これまで用いてきたタンパク質医薬品であるエンブレルは、糖鎖が結合している可能性が示唆されており、質量分析装置を用いた解析ではやや複雑な結果が得られる可能性が明らかになっていることから、糖鎖結合のみられないトラスツマブが基礎

検討には最適であると考えられた。また、用いたトラスツズマブ溶液は、PBS(-)にて希釈後に変性させることで、白色の沈殿が生じることが明らかになったため (data not shown)、原液 (21 mg/ml) を用いて熱変性を行うことにした。その結果、希釈後に加熱を行ったときに観察されたような沈殿は、いずれの加熱時間においても観察されなかった。本条件にて沈殿が生じなくなった原因は明らかではないが、PBS(-)を用いて希釈したことで、リン酸との反応性が変化し、沈殿を原因である可能性も考えられる。

本実験系にて用いた、BT-474 細胞は、トラスツズマブの標的分子である Her-2 が発現していることが報告されており、トラスツズマブの添加により、Her-2 からのシグナル伝達が起こり、細胞への影響が示唆される。本検討では、加えたトラスツズマブの濃度依存的な BT-474 の Viability の低下が認められた。本バイオアッセイによって、ハーセプチンの熱変性に伴う活性低下を測定出来るものと考えられた。但し、ばらつきが大きいので、今後、ばらつきをより減らすような条件を考える必要があると考えられる。

本検討結果では、加熱処理時間の長さに依存して、トラスツズマブの生物活性は低下することが明らかになった (図 5)。加熱変性により、タンパク質の構造が変化し、その結果として活性が低下するものと考えられる。再現性を取る必要があるものの、本活性測定条件は、今後のタンパク性薬物の検定作業に有用な方法であることが示唆された。

本検討結果から明らかとなった、活性の低下しているトラスツズマブをイオンモビリティ質量分析装置にて、その構造を解析した。変性条件が厳しく (高温、長時間) なるにつれ、検出されるトータルシグナル量の低下が認められた (図 6、7)。この結果から、変性により装置に添加されている試料が、何らかの形で失われている可能性が示唆された。そこで、測定後のサンプルをタンパク定量した結果、いずれのサンプルにおいても、タンパク質の顕著な低下は

観察されなかった。この原因に関しては現在検討中であるが、測定条件、特にイオン化時の価数と測定マスレンジによって、シグナルが増強している可能性も考えられるため、今後は異なる価数、およびマスにおけるシグナルも測定する予定である。

C-2. gutted アデノウイルスベクター産生系の確立

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 1% 以下であり、実験に供するに十分な純度であった。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。

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA を発現する gutted アデノウイルスベクターの RNAi 効果を従来型の E1 欠損型アデノウイルスベクター (E1 欠損領域にルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA カセットを搭載) と比較検討したところ、従来型に比べ gutted アデノウイルスベクターでより高いルシフェラーゼ発現抑制効果が見られた (図 10)。従って、gutted アデノウイルスベクターを用いた場合は、免疫反応の抑制が期待できるだけでなく、よい高い RNAi 効果も期待できることが判明し、特定の遺伝子発現抑制を目的とした研究に極めて有用なことが示唆された。

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、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、タンパク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。

アデノウイルス DNA がコードする VA RNA (VA RNAI と VA RNAII) は、shRNA による RNAi 効果を顕著に抑制することが報告されている。VA RNA は、約 160 塩基長の非翻訳 RNA ポリメラーゼ III 転写産物であり、特に転写量が多い VA RNAI は、アデノウイルス複製時には細胞あたり $\sim 10^8$ 分子にも達する。VA RNAI はアデノウイルス複製時に、ウイルス dsRNA (2 本鎖 RNA) による protein kinase R (PKR) の活性化を阻害する中心的な働きをしており、VA RNAI 非存在下では、PKR が活性化し、翻訳因子の eIF-2 α のリン酸化を誘導し、ウイルス mRNA の翻訳を阻害することが知られている。また、VA RNAI は pre-miRNA や shRNA 前駆体の核外輸送を exportin5 と競合することで阻害したり、Dicer に結合することで Dicer 機能を阻害し、結果として、成熟 miRNA や siRNA の生成を阻害することが報告された。これらは E1 領域を含んだ野生型アデノウイルスについて主に認められる現象であるが、E1 領域を欠損した組換えアデノウイルスベクターにおいても、VA RNA (VA RNAI と VA RNAII) は発現していることから、これらが siRNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果を減弱している可能性が強く示唆される (ベクターとして用いる場合は VA RNA 自身の機能は不要である)。gutted アデノウイルスベクターにおいては、全てのウイルスコード遺伝子を欠損しているため、VA RNA の発現も認められず、これが本研究において gutted アデノウイルス

ベクターによる RNAi 効果が高かった原因と考えられ、特定の遺伝子発現抑制を目的とした研究においても、gutted アデノウイルスベクターは極めて有用な基盤技術になりうることが示唆された。

C-3. 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 A 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 DNA マイクロアレイによって検討したところ、CCL19, CCL21, CXCL12 及び、CXCL13 などのリンパ組織性ケモカインは刺激の有無に関わらず発現していないという結果であった。次に市販のポリクローナル抗体を使って A 細胞株の免疫細胞染色を行ったところ、やはりこれらのケモカインの発現は確認できなかった。

一方、A 細胞株を導入して構築した人工リンパ組織にはリンパ球集団の近傍に通常の血管とは接着分子の発現が異なり、形態的にも特殊な血管構造がしばしば観察された。

さらに A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織では抗原に対して効果的に抗原特異的抗体産生反応、及び、抗原特異的 T 細胞の活性化を誘導できることが分かった。

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リンパ球を含む免疫細胞を多数集積させる必要がある。今回の研究では A 細胞株によるリンパ組織性ケモカイン (CCL19, CCL21, CXCL12 及び、CXCL13) の発現が確認できなかったことから、A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積には①「リンパ組織性ケモカイン以外のサイトカイン (ケモカインを含む) が関与」していると考えられる。また、A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織にはリンパ球の流入に関与していると考えられる特殊な血管構造が

観察されたことより、②「A 細胞株が分泌する何らかのサイトカインがこの特殊な血管新生を誘導する」可能性も示唆される。別のストローマ細胞株に遺伝子を導入して B リンパ球ケモカインである CXCL13 を発現させた細胞株 (B-CXCL13 細胞と略称する) を用いて人工リンパ組織を構築した場合でも B リンパ球の集積は顕著でなく、また A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織に見られる特殊な血管構造が少ないという実験結果は前述の①と②の可能性を支持するものである。さらに A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織で抗原特異的抗体産生及び細胞性免疫能を効率よく誘導されたことから人工リンパ組織に抗原特異的なリンパ球が選択的に集積するメカニズムの存在が示唆される。

C-4. 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

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を行うにあたり、まず変性蛋白質の免疫細胞に与える影響を検討した。蛋白質製剤のモデルとして、抗体医薬として既に汎用されている抗 Her2 抗体ハーセプチンを用いた。蛋白性医薬品は、製造工程・保存過程で酸化・熱などのストレスにより若干変性することが知られている。そこで本年度は、ハーセプチンを人工的に熱処理し、変性蛋白質が免疫細胞に与える影響を評価した。ハーセプチンを 95 度で 5 分、15 分、30 分、60 分間熱処理した結果、目視では白濁などは観察されなかったが、蛋白質凝集の指標である A280/260 の低下が観察された (図 11)。次に、これら変性蛋白質の免疫細胞に与える影響を検討した。熱処理したハーセプチンを、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞に加え、6 時間後に上清中の IL-1 β 産生量を ELISA にて測定した。その結果、未処理群では全く IL-1 β 産生は認められなかったのに対して、熱処理群では熱処理時間依存的に IL-1 β 産生の増大が観察された (図 12)。本検討では、加える蛋白質の濃度

依存的な IL-1 β 産生の増大はクリアに観察されなかったことから、今後より詳細な検討は必要であるが、ハーセプチンの熱処理により免疫細胞を活性化させる可能性が示唆された。

次に、抗原性評価システムの開発のために、ヒトに代表的な HLA の精製を行った。生体内において抗原 (異物) は樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、10-30 アミノ酸のペプチドとして MHC クラス II に抗原提示される。この MHC クラス II - ペプチド複合体を CD4 陽性 T 細胞が T 細胞受容体を介して認識し、抗原特異的 B 細胞を活性化することで抗原特異的抗体産生が惹起される。この過程で、抗原が持つ「抗原性」の強弱 (抗体誘導能) は、CD4 陽性 T 細胞の活性化や、プロセッシングを受けたペプチドの MHC クラス II に対する結合親和性の強弱と正の相関を示すことが知られている。そこで本研究では、蛋白質製剤由来ペプチドの MHC クラス II への結合親和性を指標とした、簡便かつ再現性よく抗原性を評価可能な *in vitro* 評価システムの確立を図った。本研究では、多種類の MHC クラス II 分子を得ることが大きな鍵となる。しかし、MHC クラス II 分子は、当然販売されておらず、大腸菌、酵母などを用いたリコンビナント蛋白質の作成も困難とされている。そこで、単一の MHC クラス II 分子を大量発現している B 細胞株から精製する方法を試みた。ヒト MHC クラス II 分子 (HLA-DR) に対する抗体を発現するハイブリドーマを入手し、マウス腹水から抗体を回収した。SDS-PAGE 解析の結果から、高純度の抗体が得られていることが示された (図 13)。抗 HLA-DR 抗体を用いたアフィニティーカラムを作成した後、単一の HLA-DR 分子を大量に発現する細胞株の破碎液をアフィニティーカラムに通すことで、HLA-DR を 2 種類 (HLA-DR7、HLA-DR9) 大量に精製することに成功した。次に、精製した HLA-DR の特性評価のため、SDS-PAGE 解析を行った (図 14)。HLA-DR7、HLA-DR9 共に、還元剤存在下で加熱後、SDS-PAGE 解析すると 30kDa 付近に α 、 β 鎖

と考えられるバンドが観察された。これまでの報告から、機能的な HLA-DR 蛋白質は、還元剤存在下で非加熱で SDS-PAGE 解析すると、 α 、 β のヘテロダイマーが観察されることが知られている。そこで次に、精製した HLA-DR7、HLA-DR9 蛋白質を、還元剤存在下で非加熱で SDS-PAGE 解析したところ、 α 、 β 鎖の個々のバンドが消失し、 $\alpha\beta$ 鎖ヘテロダイマーと予想されるバンドが観察された。以上の結果から、精製度は 50-70% であるが、機能的な HLA-DR が精製されていることが示された。

本検討ではハーセプチンを用い、熱処理による蛋白質変性、免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、熱処理により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。IL-1 β は、炎症反応のトリガーとして TNF α や IL-6 など他の炎症性サイトカインを誘導することで免疫を活性化させ、過剰な免疫応答を誘導することが知られている。近年、アルツハイマー病発症に関与する変性蛋白質 β アミロイドが、脳内マクロファージであるミクログリアからの IL-1 β 産生を誘発することで、免疫反応を惹起する報告がなされている。従って、蛋白質製剤の変性によっても、IL-1 β 産生に引き続く免疫反応が誘導される可能性が示唆され、より詳細な検討が今後必要と考えられる。

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質医薬品においても、長期保存において蛋白質が変性しているとの報告もある。今後は、他の蛋白質医薬品においても、長期保存などにおいてどの程度、蛋白質変性が誘発されるかに関して検討する予定である。

また、機能的な HLA-DR を精製する方法論の確立に成功した。今後は、より多くの HLA-DR の精製を試みると共に、精製 HLA-DR と蛋白質製剤由来ペプチドとの結合力を評価することで、蛋白質製剤に内在する抗原性誘発ペプチドの同定を試みる予定である。

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、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、および質量分析を用いたタンパク質の構造変化解析法に関する基礎検討を行い、リンパ管誘導制御法開発に向けての評価系、およびタンパク質の簡便な構造解析法に関する有用な知見を得ることができた。また、本研究では、タンパク質製剤の抗原性の発揮に極めて重要な要因になっている、タンパク質の構造情報を、質量分析装置にて解析した。本結果は、これまで医薬品の活性を個別に測定する方法とは大きく異なるため、汎用性の高い医薬品の品質評価法となりうる可能性があるものと考えている。

E-2.

gutted アデノウイルスベクターに siRNA 発現カセットを搭載した場合、従来の E1 欠損型アデノウイルスベクターの場合に比べ、よい高い RNAi 効果が期待できることを明らかにした。

E-3.

A 細胞株から分泌される何らかのサイトカインが人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積に重要な役割を果たしている事はほぼ間違いがなく、このサイトカインを同定できれば、より簡便に優れた獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織を構築する事にもつながる。

また、A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織が効率のよい獲得免疫機能を発揮する事を証明できたことから、人工リンパ組織構築のシステムを機能的な人工タンパク質の抗原性評価に応用することが可能になったと考えている。

E-4

ハーセプチンを熱処理することで、蛋白質変性が生

じ、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。また、MHC 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、機能的な MHC クラス II の精製に成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

原著論文

1. 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- α antagonist., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
2. 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.*, 153(6):1143-1152, 2008.
3. 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.*, 335(1-2):71-78, 2008.
4. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380(5):777-782, 2008.
5. Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S.,

Tsutsumi Y.: The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system., *Pharmazie.*, 63(10):760-764, 2008.

6. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Tani M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.: Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.*, 385:1221-1229, 2009.
7. Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells., *Pharmazie.*, in press.
8. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex., *Acta Crystallogr. Sect. F.*, in press.
9. Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., and Shimizu A. Organizer-Like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 181(9): 6189-6200, 2008

総説・その他

1. 水口裕之; アデノウイルスベクターの作製・増幅・精製法、脳21、印刷中
2. 水口裕之; 改良型アデノウイルスベクター開発の最前線、脳21、12、123-131 (2009)
3. 水口裕之; アデノウイルスベクター; 機能性 DDS キャリアの製剤設計 (シーエムシー出版)、岡田弘晃監修、133-141 (2008)
4. 末松佐知子; 人工リンパ組織構築とは何か。 *Organ Biology* 15(1) 23-32, 2008

② 学会発表

国内学会発表

1. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 藪輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 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: 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第

- 24回 DDS学会, 東京 2008年6月.
2. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作: ファージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン \square の創製とその特性評価., 第8回 日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008年6月.
 3. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 新規自己免疫疾患治療薬の開発を目指した TNFR1 指向性アンタゴニストの創出., ファーマバイオフォーラム 2008, 東京, 2008年11月.
 4. 吉田康伸, 今井 直, 長野一也, 岡村賢孝, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクスによるがんリンパ節転移マーカーの探索., 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月.
 5. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬の開発を目指した TNFR1 指向性変異体の創出., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月.
 6. 河原倫之, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 角田慎一, 近藤昌夫, 堤 康央, 八木清仁: C型肝炎の克服を目指した高機能化 IFN α 8 構造変異体の創製., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月.
 7. 水口裕之, 次世代アデノウイルスベクターの開発と先端医療・生命科学研究への応用, 第46回未来医療セミナー, 大阪, 2009年3月18日
 8. 水口裕之, 遺伝子導入技術開発と生命科学研究, 東北大学 21世紀 COE (CRESCENDO) 生活習慣病フォーラム, 仙台, 2009年3月10日
 9. 水口裕之, 次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への応用, 神戸学院大学 (神戸), 2009年3月6日
 10. 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開

発; 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線 in 神戸 ~臨床応用に向けた課題と今後展開~ (神戸); 2008年12月8日

11. 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への貢献; 近畿大学第3回ハイテクリサーチシンポジウム (大阪); 2008年9月27日
12. Suematsu S., Hattori Y., Characteristic vascular system induction is important for artificial lymphoid tissue construction and its immune function. 第38回日本免疫学会総会学術集会, 京都, 2008年12月.
13. 服部 祐紀, 末松 佐知子, 松岡須美子, 竹下千恵: 腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果. 第8回再生医療学会総会, 東京, 2009年3月.

国際学会

1. Yoshida Y., Imai S., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Proteomic profiling of human lymphatic endothelial cells for analyzing lymphangiogenesis, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam (The Netherlands), 16 - 20 August, 2008.
2. Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Mukai Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive-subtractive panning., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008
3. Nomura T., Abe Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Mukai Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of mutant TNF- \square with TNF receptor-1 selective antagonistic activity for the development of a novel autoimmune disease drug., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.

4. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.: Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., 7th Joint Conference of the International Society for Interleukin and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.
5. Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Evaluation of safety and efficacy of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF as a novel anti-inflammatory drug., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U.S.A.), 15-19 March, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

人工リンパ節

(特許第 4097544 号平成 20 年 3 月 21 日)

②実用新案登録

該当なし

③その他

該当なし

尚、本研究の研究協力者を下記に列挙する

鎌田春彦、阿部康弘、山根美紀、今井 直、鍋師裕美、野村鉄也、長野一也、菅室裕之、吉田康伸、岡村賢孝、吉川友章、小野寺章、荻田郁弥、中里泰太郎、松山恵吾、山下浩平、吉田徳幸、有森亮裕、磯部将彰、東阪和馬、中西亮介

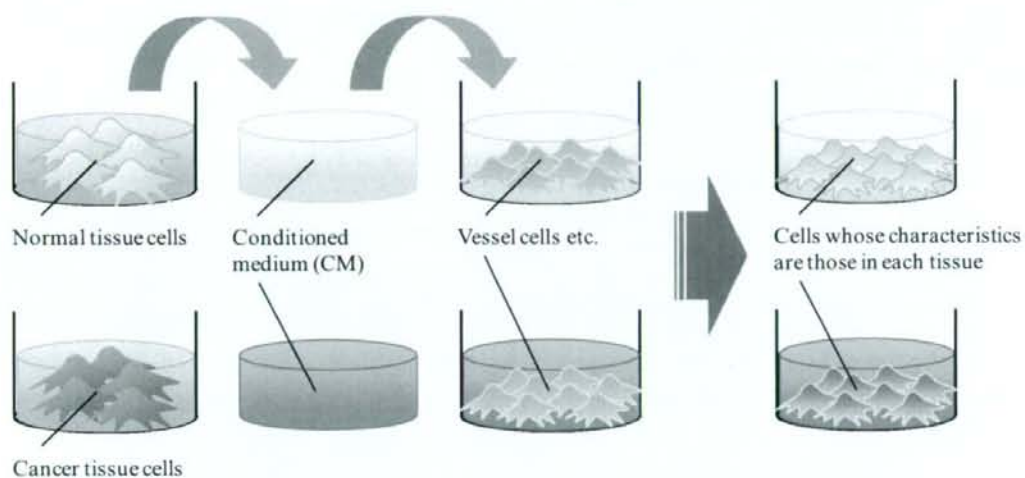


図1 馴らし培地 (CM) を用いた腫瘍内リンパ内皮細胞の in vitro 再構築

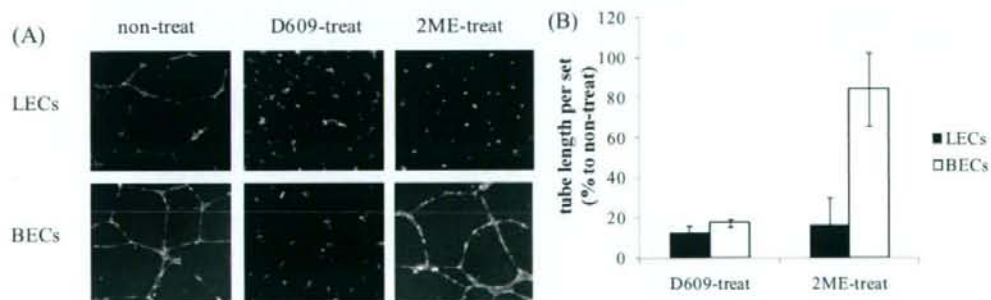


図2 LECおよびBECに及ぼす可逆的阻害剤D609と2MEの管腔形成阻害効果 マトリゲルに各細胞を播種し、管腔形成の阻害効果を tube formation assay にて検討した。A. 各細胞の管腔形成の様子 B. 各細胞の管腔形成に及ぼす阻害剤の影響

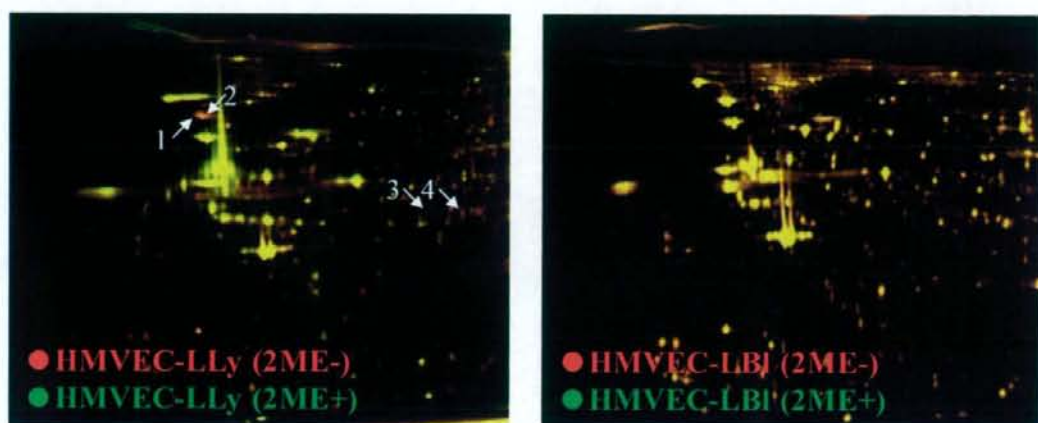


図3 二次元電気泳動法(2D-DIGE)による2MEのLECおよびBECのタンパク質発現に及ぼす影響。各細胞由来のタンパク質を蛍光試薬にてラベル化し、その発現の変化を、2D-DIGE法にて差分解析した。

表1 Identification of 2ME related proteins by MALDI-TOF/MS

spot	protein name	MW	pI	2ME (+) / 2ME (-) in LECs	2ME (+) / 2ME (-) in BECs
#1	HSP90AA1 protein	68619	5.08	2.0-fold ↓	1.0
#2	Keratin 9	62259	5.14	2.3-fold ↓	1.0
#3	GDP dissociation inhibitor 2	46054	5.91	2.2-fold ↓	1.0
#4	EEF1G protein	50162	6.27	2.0-fold ↓	1.0

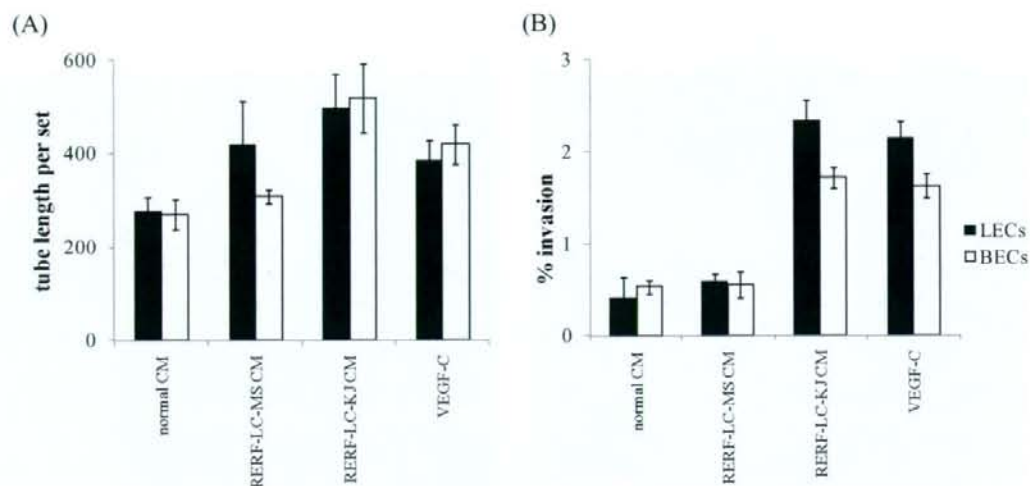


図4 肺がん細胞由来の馴らし培地が及ぼす各細胞に対するリンパ管新生、血管新生に対する影響。高転移がん細胞あるいは低転移がん細胞の馴らし培地をリンパ管内皮細胞、あるいは血管内皮細胞に作用させ、その影響をtube formation assayならびにinvasion assayにて検討した。なお、陽性コントロールとして、VEGF-C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用いた。A. tube formation assay, B. invasion assay

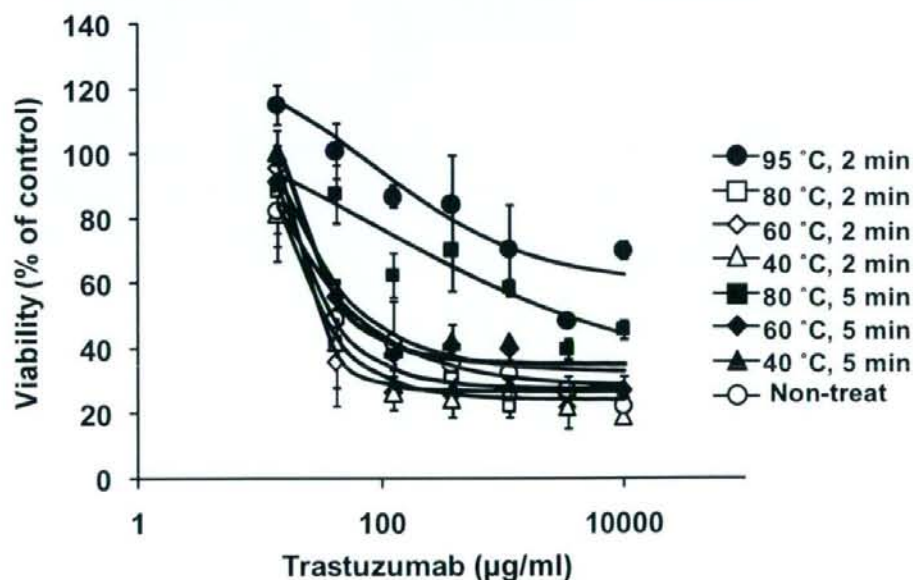


図5 トラストズマブの活性低下。トラストズマブを各温度で2あるいは5分間加熱し、その活性をBT-474細胞を用いたバイオアッセイにて検討した。なお、サンプル未処理の細胞のバイアビリティを100%とした。