

図 6 イオンモビリティ-質量分析機による加熱変性トラスツズマブのドリフトシフトパターン トラスツズマブを各温度で 2 分間加熱し、加熱変性したサンプルをイオンモビリティ質量分析装置にて測定した

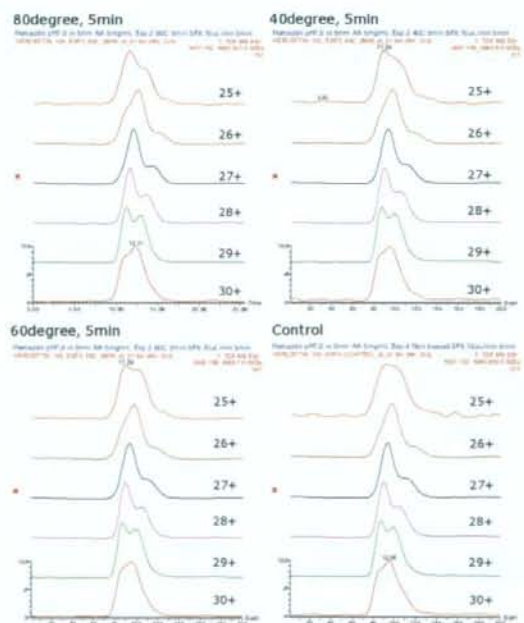
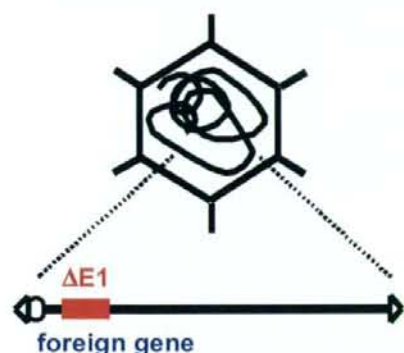


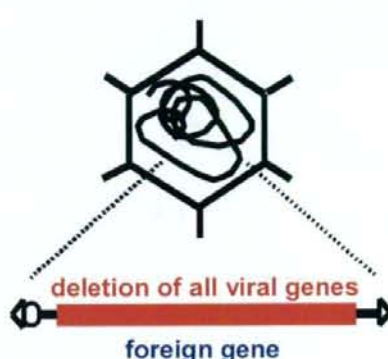
図 7 イオンモビリティ-質量分析機による加熱変性トラスツズマブのドリフトシフトパターン トラスツズマブを各温度で 5 分間加熱し、加熱変性したサンプルをイオンモビリティ質量分析装置にて測定した

1st generation adenovirus vector



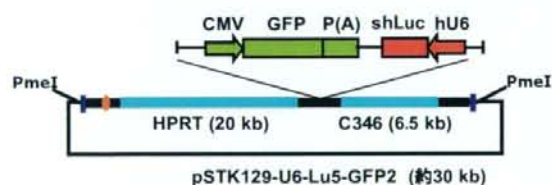
ウイルス遺伝子の発現に伴う免疫反応、毒性の発現

helper-dependent (guttled) adenovirus vector



免疫反応の完全回避
毒性の軽減

図8 gutted アデノウイルスベクターの活用



HPRT ; hypoxanthine phosphoribosyltransferase
C346 ; C346 cosmid-derived sequence

ヘルパーウイルス

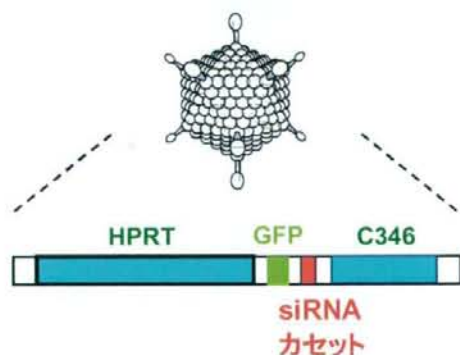
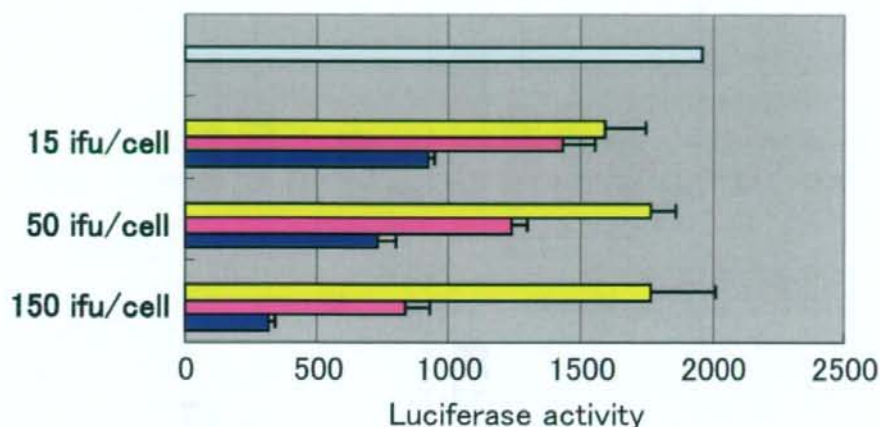


図9 作製した gutted アデノウイルスベクター



- Uninfect (無処理)
- U6プロモーターだけを搭載したアデノウイルスベクター
- ルシフェラーゼに対するsiRNA発現カセットを搭載した従来型アデノウイルスベクター
- ルシフェラーゼに対するsiRNA発現カセットを搭載したguttedアデノウイルスベクター

図10 gutted アデノウイルスベクターによる RNA 活性の増強

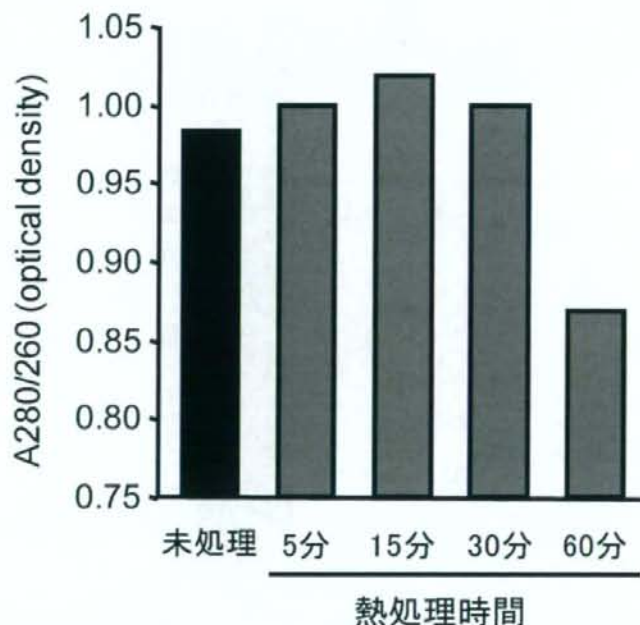


図11. ハーセプチンの熱処理による蛋白質変性。ハーセプチンを95度で5分、15分、30分、60分間熱処理し、蛋白質変性の1つの指標であるOD280/260を測定した。

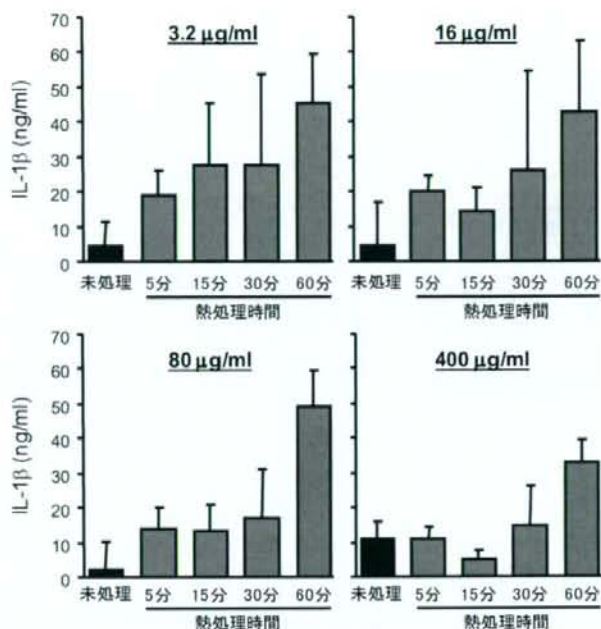


図 1 2. 熱処理ハーセプチンをマクロファージに処理した際に誘導される IL-1 β 量. ハーセプチンを 95 度で 5 分、15 分、30 分、60 分間熱処理した後、各濃度のサンプルを THP-1 細胞に加えた。6 時間後に、培養上清中の IL-1 β 量を ELISA により測定した。

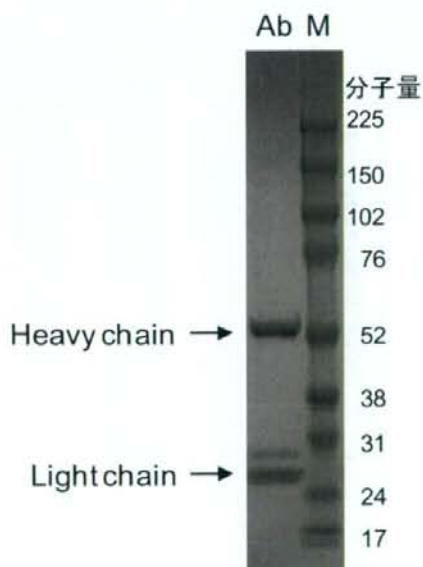


図 1 3. 精製抗 HLA-DR 抗体の SDS-PAGE 解析. 精製した抗 HLA-DR 抗体を SDS-PAGE し、クマシーブルー染色した。Ab ; 抗 HLA-DR 抗体、M ; プロテインマーカー

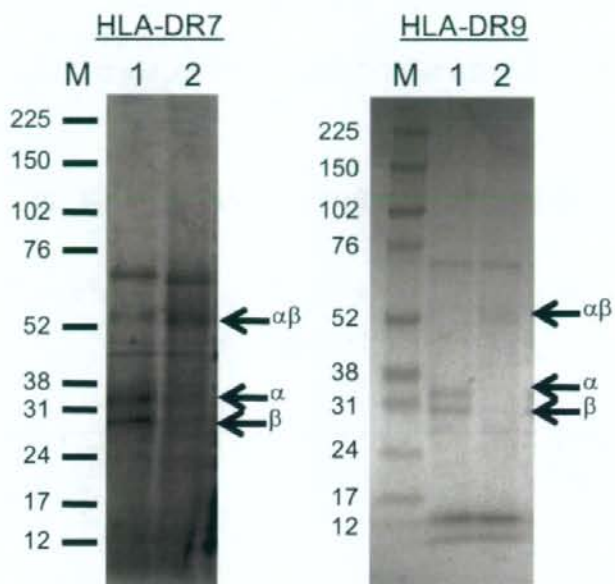


図 1 4. 精製 HLA-DR の SDS-PAGE 解析. HLA-DR を SDS-PAGE し、クマシーブルー染色した。Lane 1; 還元剤存在下で加熱処理したサンプル、Lane 2; 還元剤存在下で非加熱処理のサンプル、M; プロテインマーカー

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

研究分担者 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 サブプロジェクトリーダー

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利用することで、有効性と安全性を兼ね備えた生物学的製剤を開発しようとする試みが推進されつつある。このような“機能性人工タンパク質”であるアミノ酸配列改変体や各種融合タンパク質、化学修飾タンパク質は、本来的に分子的・機能的な不均一性を有し、その品質に少なからず問題点を有している。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、元々生体には存在しないために、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、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、ならびに質量分析装置を用いたタンパク質の立体構造解析に向けた基礎検討を行った。

A. 研究目的

アミノ酸配列改変タンパク質や PEG 化タンパク質などを利用した第三世代の生物学的製剤の開発競争が現在、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遅れている。そこで本研究は、タンパク質医薬品の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を開発するための基盤技術の創出を行った。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、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うとともに、タンパク質の立体構造を簡便に解析するための質量分析装置の応用に関する基礎検討を行った。

B. 研究方法

B-1. リンパ管の in vitro 再構築に関する検討

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。

管腔形成能試験

24 well プレートに BD Matrigel Matrix (BD Bioscience) を 300 μ l/well でコーティングし、37 $^{\circ}$ 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 μ M)、D609 (243 μ M) 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) を用いて蛋白質の濃度を測定した。各細胞のうち発現蛋白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 µl にメスアップした。一方、蛋白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。抗体作製の蛋白質抽出には、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蛋白質を抽出した。

MS解析

ゲル片に 100 µl 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 µl 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 µl のトリプシン溶液 (20 µg/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白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 µl の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 µl の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 µl 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 µl 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

100φ 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 μm 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 μl 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 μl 播種し、75 μl の血清培地と 75 μl 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 μl 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。

B-2. タンパク質の立体構造と活性の相関解析

細胞培養

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。

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 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 培地にて懸濁後、70 μm 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 μl/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 μl/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 μl/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 Height を 9.7 V に設定し、Mass range を m/z 500-8000 の範囲で測定した。

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 (Fig. 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 (Fig. 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蛋白質の探索のために、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蛋白質を調製し、各サンプルを 2D-DIGE 法にて解析した (Fig. 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 解析による蛋白質の同定を試みたところ (Table 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蛋白質である keratin 9 の他に、HSP90 や GDP dissociation inhibitor 2 等の細胞内輸送関連蛋白質が見出された。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蛋白質や 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蛋白質の情報を基盤として、その新生メカニズムが明らかになっ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 (Fig. 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

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 PIGF 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、そ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。

C-2. タンパク質の立体構造と活性の相関解析

タンパク質の変性を行うにあたり、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ズマブを用いた。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ズ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（Fig. 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、今後の蛋白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（Fig. 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質量した結果、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。

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、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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. 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.
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., Taniai 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.

② 学会発表

(国内学会)

1. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 義輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, **角田慎一**, 堤 康央: アント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: フェージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン α 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., ファーマバイオフィォラム 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.

(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- α 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 Interferon 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

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 創薬プロテ

オミクスプロジェクト

鎌田 春彦 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ

阿部 康弘 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

テオミクスプロジェクト

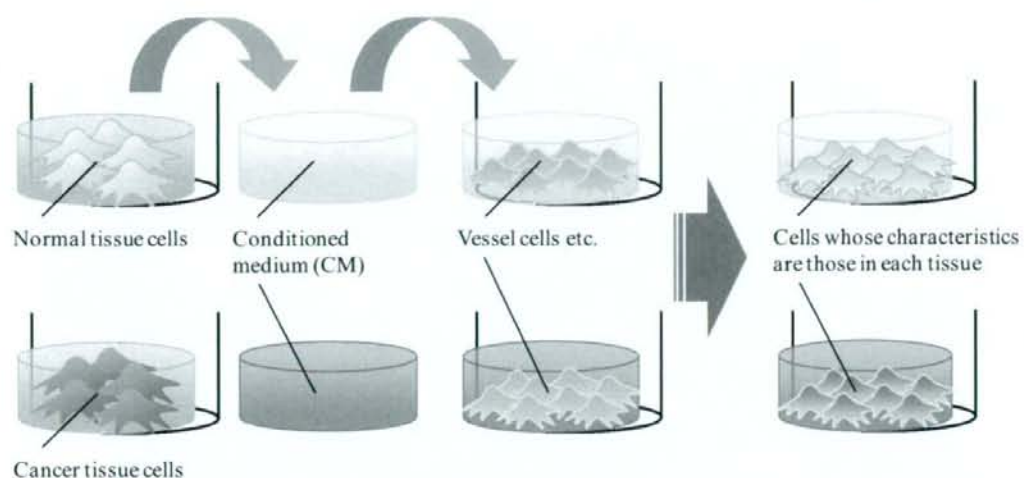


Fig. 1 Strategy for reproduction of intratumor lymph endothelial cells using conditioned medium (CM)

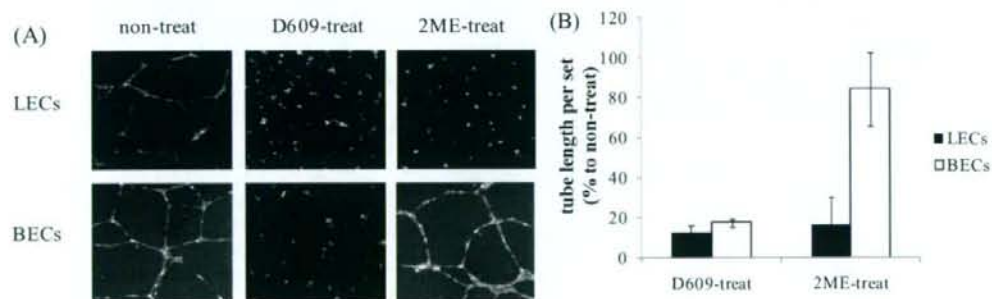


Fig.2 Inhibitory effect of diverse inhibitors, D609 and 2ME, on tube formation of LECs and BECs. Inhibitory effect of D609 and 2ME for tube formation on LECs and BECs was assessed by tube formation assay. After incubation of LECs / BECs on Matrigel with D609 or 2ME, tube formation in the two cell lines was observed using a fluorescence microscope (A). (upper ; LECs), (bottom ; BECs) Total tube length for each condition was measured using MetaXpress (B). Error bars indicate the mean \pm S.D. of triplicate assays. (filled column ; LECs), (open column ; BECs).

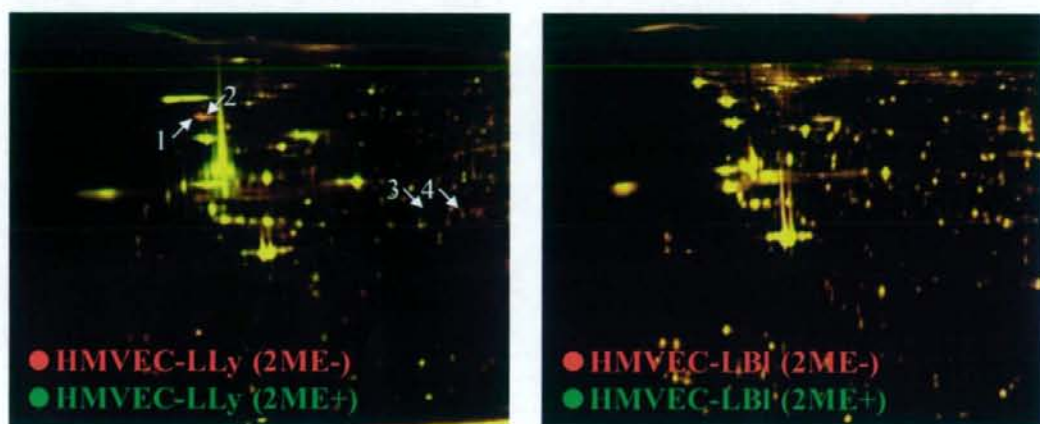


Fig. 3 2D-DIGE image of fluorescently labeled proteins derived from LECs or BECs by treatment with and without 2ME. Proteins derived from LECs or BECs, which treated with or without 2ME, were labeled using cy3 and cy5, and used for performing 2D electrophoresis. The spots indicated by arrows are identified proteins by MALDI-TOF-MS/MS analysis.

Table 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 |

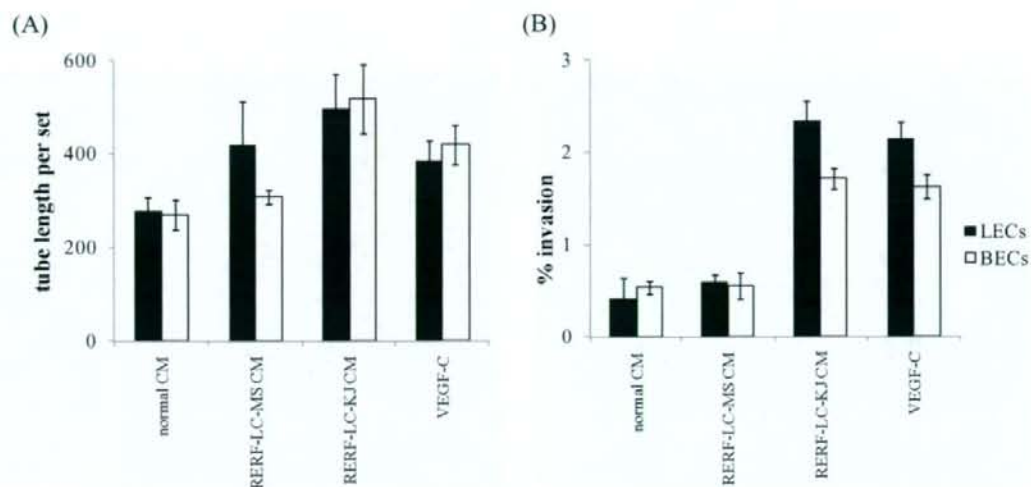


Fig. 4 Enhancement of lymphangiogenesis / angiogenesis by treatment with CM of lung cancer cell. Effect of both lymphangiogenesis and angiogenesis by treatment with low / high lymph metastasis lung cancer cell lines (RERF-LC-MS / RERF-LC-KJ) CM was assessed by tube formation assay and invasion assay. As positive control, VEGF-C (10 μ g/ml) was used. (A) tube formation assay, (B) invasion assay. Error bars indicate the mean \pm S.D. of triplicate assays. (filled column : LECs), (open column : BECs)

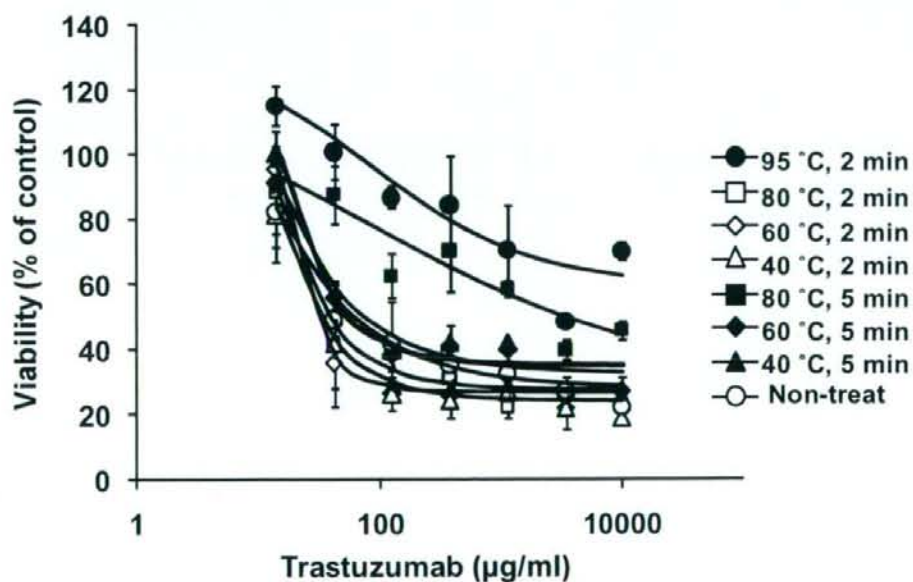


Fig. 5 Activity of Trastuzumab by heat denaturation. Trastuzumab was heated for two or five minutes at shown temperature. After denaturation, the activity was measured using BT-474 cell line and was reflected the viability of cells. The state of complete survive was indicated as 100%.

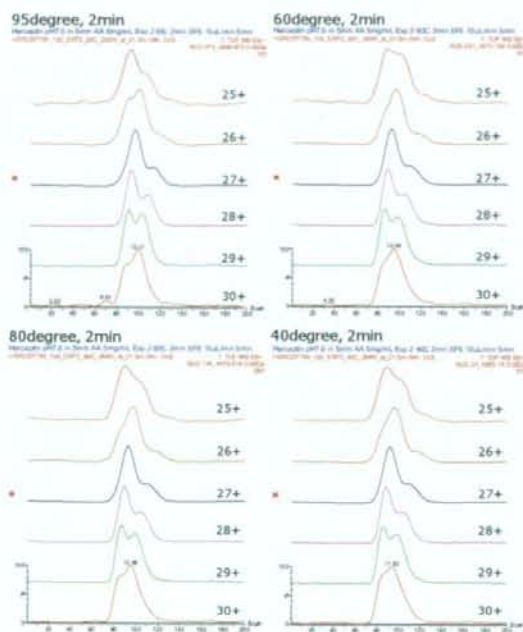


Fig. 6 Drift shift pattern of heated-Trastuzumab measured by IM-MS. Trastuzumab was heated for two or 5 minutes at shown temperature. After denaturation, the samples were measured using Ion Mobility Mass Spectrometry.

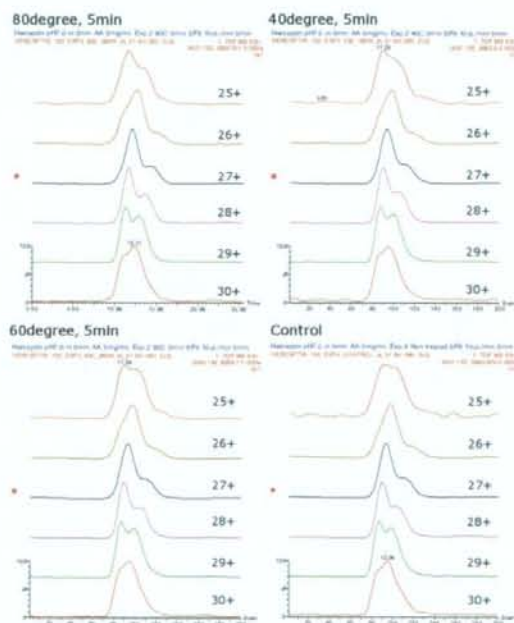


Fig. 7 Drift shift pattern of heated-Trastuzumab measured by IM-MS. Trastuzumab was heated for two or 5 minutes at shown temperature. After denaturation, the samples were measured using Ion Mobility Mass Spectrometry.

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

研究分担者 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 水口裕之

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 (gutted) アデノウイルスベクター発現系に、siRNA (small interfering RNA) 発現単位を搭載した。その結果、従来の E1 欠損アデノウイルスベクターに siRNA 発現単位を搭載させた場合に比べ、より効率良く目的遺伝子をノックダウン可能であった。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。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り、一過性の遺伝子発現の原因になると考えられている。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。そこで昨年度は、アデノウイルスコード遺伝子を全て除去した gutted アデノウイルスベクター系の確立を行った。gutted 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 (図. 1)。本年度は、モデルとして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遺伝子発現抑制効果について、E1 欠損アデノウイルスベクターの場合と比較検討した。

B. 研究方法

B-1. 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.2)。

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の密度勾配遠心を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。

B-2. 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。

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

B-3. 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 1×10^4 cells/100ul/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。

C. 研究結果

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. 3)。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。

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)、高タイトルの目的の 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。

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。

E. 結 論

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