

Wu *et al.*

11

however, recent reports have demonstrated that cyclin D1 mRNA is also controlled at the level of mRNA export from the nucleus, and this transport of cyclin D1 mRNA to the cytoplasm is important for transformation activity.<sup>25-27</sup> Thus, we investigated whether eIF4H also regulates at the mRNA level. RKO cells were treated with eIF4H siRNA (si103 and 104), and then nuclear and cytoplasmic cyclin D1 mRNA were evaluated by real-time quantitative RT-PCR. Cyclin D1 mRNA levels did not alter either in the nucleus or cytoplasm of siRNA-treated cells (Fig. 6g). Although it is possible that eIF4H could control other processes on cyclin D1 mRNA, regulation of cyclin D1 expression at the protein level seems to be the main mechanism, as the decrease of cyclin D expression after eIF4H isoform 1 downregulation is more pronounced at protein level.

**Discussion**

In our study, we investigated whether an alternative splicing form of eIF4H, which is overexpressed in gastrointestinal cancers, contributes to cell proliferation and carcinogenesis. We found that the overexpression of eIF4H isoform 1 in immortalized mouse fibroblasts developed tumors in nude mice. Conversely, silencing of the eIF4H isoform 1 inhibited the proliferation and induced apoptosis of colon cancer cell lines. It is striking that the growth suppression is specific to eIF4H isoform 1 siRNA and not isoform 2. Suppression of eIF4H isoform 1 also inhibited tumor growth in nude mice, although it showed no effect on the proliferation of immortalized human fibroblasts. Moreover, eIF4H isoform 1 upregulated the cyclin D1 level, a protein involved in cell proliferation. Thus, eIF4H isoform 1 stimulates cell proliferation and inhibits apoptosis, both of which are a possible mechanism of the transforming activity of eIF4H isoform 1. These observations provided strong evidence that eIF4H isoform 1 is a novel oncogene and might be a promising molecule target for colon cancer therapy.

Recently, many studies have argued that eIFs play an important role in carcinogenesis.<sup>4,28</sup> eIF4E, an mRNA 5'-capping protein, has been identified to play a pivotal role in the tumorigenesis and metastatic progression of various cancers. Another subunit of eIF-4F complex eIF4G, a scaffolding protein, is also implicated in malignant transformation.<sup>11,29</sup> In our work, we demonstrated that another translation initiation factor, eIF4H, is involved in tumorigenesis, which suggests that translation initiation is a key event for the development of cancer. A mechanism suggested to contribute to tumorigenesis is the translational de-repression of structurally burdened mRNA known to encode proto-oncogenes, *e.g.*, cyclin D1, *c-Myc*, ODC, FGF and VEGF, through increased levels of eIFs.<sup>30-32</sup> Cyclin D1 was one of the first discovered targets of eIF4E. It has been reported that eIF4E regulates the amount of cyclin D1 not only by translation initiation but by nuclear export of its mRNA.<sup>25-27</sup> Thus, we investigated whether eIF4H isoform 1 is also involved in the nuclear export of cyclin D1 mRNA. Unlike eIF4E, eIF4H isoform 1

showed no effect on the nuclear export (Fig. 6g), which suggests that upregulation of cyclin D1 by eIF4H isoform 1 occurs at the translational level.

We also found that suppression of eIF4H isoform 1 induced the apoptosis of colon cancer cells. The induction of apoptosis is associated with the downregulation of translation rates, and underlying changes to the translation mechanism during apoptosis have been elucidated recently.<sup>33</sup> Apoptosis-associated modifications include the specific fragmentation of translational mechanism, such as eIF4G, eIF4B and eIF3j, and alterations in the phosphorylation states of initiation factors, such as eIF2 $\alpha$ , eIF4E and eIF4E-BP1,<sup>34</sup> which might change the translation rates of pro- or antiapoptotic proteins. Moreover, eIF4E mediates *myc*-dependent apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome *c* release through an increase in Bcl-X<sub>L</sub> mRNA translation.<sup>35</sup> One explanation for apoptosis occurring by the suppression of eIF4H isoform 1 is that low levels of eIF4H decrease the translational efficiency of antiapoptotic factors, although knockdown of eIF4H isoform 1 showed no effect on Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub> levels (data not shown). Further investigation is needed to clarify the precise mechanism of the induction of apoptosis.

Pre-mRNA splicing is a sophisticated and ubiquitous nuclear process, which is a natural source of cancer-causing errors in gene expression. A large number of cancer-related genes that exhibit alternative splicing have been characterized, including CD44, WT1, BRCA1, MDM2, FGFR and kallikrein family members.<sup>19</sup> As well as being associated with cancer, the nature of alternative gene products is usually consistent with an active role in cancer; for example, several splicing variants of HDM2, the human homolog of MDM2, increase p53 levels and enhance p53 transcriptional activity.<sup>36</sup> Our recent data also showed that a splicing variant of *c-myc* suppressor FIR was frequently found in colon cancer tissues and promoted tumor development by disabling FIR repression to sustain high levels of *c-myc*<sup>37</sup>; therefore, the alternative spliced isoform plays an important role in carcinogenesis and eIF4H isoform 1 is one of these.

In our study, we showed that only eIF4H isoform 1 and not isoform 2 possesses transforming activity. An important question is why only one isoform has oncogenic potential. eIF4H is thought to stimulate protein synthesis by enhancing the helicase activity of eIF4A. The most likely explanation of eIF4H isoform 1-specific activity is that the isoform 1-specific exon 5 causes conformational change of the protein and enhances its helicase activity, which increases the cyclin D1 level, although this was not confirmed. Another possibility is that eIF4H isoform 1 specifically binds to other oncogene products or tumor suppressor proteins and enhances/inhibits their activities. Further studies are needed to elucidate the mechanism of the isoform 1-specific oncogenic potential of eIF4H.

Drugs that can selectively kill pathogenic cells without damaging healthy cells are so-called "magic bullets."<sup>38</sup> Our

Cancer Cell Biology

12

Splicing variant of eIF4H promotes tumorigenesis

1295  
1296  
1297  
1298 observation showed that selective suppression of a splicing  
1299 variant of eIF4H inhibited the proliferation of colon cancer  
1300 cells and had no effect on immortalized human fibroblasts.  
1301 Consequently, eIF4H isoform 1 would be an ideal therapeutic  
1302 target for colon cancer.

## 1303 References

1. Averous J, Proud CG. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 2006;25:6423–35.
2. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E—from translation to transformation. *Oncogene* 2004;23:3172–9.
3. Clemens MJ. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 2004;23:3180–8.
4. de Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004;23:3189–99.
5. Rosenwald IB. The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene* 2004;23:3230–47.
6. Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5'-cap. *Nature* 1990;345:544–7.
7. Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 2004;10:484–6.
8. Avdulov S, Li S, Michalek V, Burrichter D, Peterson M, Perlman DM, Manivel JC, Sonenberg N, Yee D, Bitterman PB, Polunovsky VA. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* 2004;5:553–63.
9. Brass N, Heckel D, Sahin U, Pfreundschuh M, Sybrecht GW, Meese E. Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum Mol Genet* 1997;6:33–9.
10. Bauer C, Diesinger I, Brass N, Steinhart H, Iro H, Meese EU. Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;92:822–9.
11. Fukuchi-Shimogori T, Ishii I, Kashiwagi K, Mashiba H, Ekimoto H, Igarashi K. Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Cancer Res* 1997;57:5041–4.
12. Eberle J, Krasagakis K, Orfanos CE. Translation initiation factor eIF-4A1

- mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro. *Int J Cancer* 1997;71:396–401.
13. Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Shichita M, et al. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:2489–94.
14. Rogers GW, Jr, Richter NJ, Merrick WC. Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem* 1999;274:12236–44.
15. Richter-Cook NJ, Dever TE, Hensold JO, Merrick WC. Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* 1998;273:7579–87.
16. Richter NJ, Rogers GW, Jr, Hensold JO, Merrick WC. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* 1999;274:35415–24.
17. Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oh-Ishi M, Kodaera Y, Maeda T, Shimada H, Ochiai T, Nomura F. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res* 2004;10:2007–14.
18. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003;72:291–336.
19. Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* 2004;37:584–94.
20. Srebrow A, Kornbliht AR. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 2006;119:2635–41.
21. Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007;8:349–57.
22. Martindale DW, Wilson MD, Wang D, Burke RD, Chen X, Duronio V, Koop BF. Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1-RFC2) of human chromosome 7q11.23. *Mamm Genome* 2000;11:890–8.
23. Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in

- human primary colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:3511–6.
24. Tomonaga T, Matsushita K, Ishibashi M, Nezu M, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F. Centromere protein H is up-regulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. *Cancer Res* 2005;65:4683–9.
25. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1065–70.
26. Cohen N, Sharma M, Kentsis A, Perez JM, Strudwick S, Borden KL. PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* 2001;20:4547–59.
27. Topisirovic I, Guzman ML, McConnell MJ, Licht JD, Culjkovic B, Neering SJ, Jordan CT, Borden KL. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:8992–9002.
28. Clemens MJ, Bushell M, Morley SJ. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* 1998;17:2921–31.
29. Hayashi S, Nishimura K, Fukuchi-Shimogori T, Kashiwagi K, Igarashi K. Increase in cap- and IRES-dependent protein synthesis by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:117–23.
30. Kevil C, Carter P, Hu B, DeBenedetti A. Translational enhancement of FGF-2 by eIF-4 factors, and alternate utilization of CUG and AUG codons for translation initiation. *Oncogene* 1995;11:2339–48.
31. Scott PA, Smith K, Poulsom R, de Benedetti A, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA vs protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E. *Br J Cancer* 1998;77:2120–8.
32. Shantz LM, Pegg AE. Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of

## Acknowledgements

We thank Tetsuo Noda and Kazuei Igarashi for critical reading of this article, and Masumi Ishibashi and Nobuko Tanaka for technical assistance. This work was supported by Grants-in-Aid to T.T. from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

1413  
1414  
1415  
1416  
1417  
1418  
1419  
1420  
1421  
1422  
1423  
1424  
1425  
1426  
1427  
1428  
1429  
1430  
1431  
1432  
1433  
1434  
1435  
1436  
1437  
1438  
1439  
1440  
1441  
1442  
1443  
1444  
1445  
1446  
1447  
1448  
1449  
1450  
1451  
1452  
1453  
1454  
1455  
1456  
1457  
1458  
1459  
1460  
1461  
1462  
1463  
1464  
1465  
1466  
1467  
1468  
1469  
1470  
1471

Wu *et al.*

translational repression is associated with neoplastic transformation. *Cancer Res* 1994; 54:2313-6.

33. Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ* 2000;7: 603-15.
34. Morley SJ, Jeffrey I, Bushell M, Pain VM, Clemens MJ. Differential requirements for caspase-8 activity in the mechanism of phosphorylation of eIF2alpha, cleavage of

eIF4GI and signaling events associated with the inhibition of protein synthesis in apoptotic Jurkat T cells. *FEBS Lett* 2000; 477:229-36.

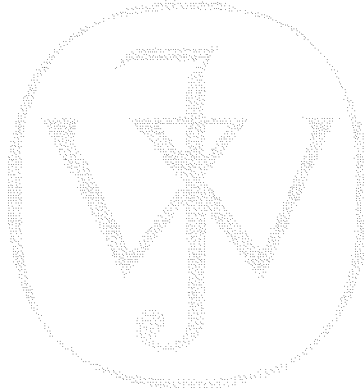
35. Li S, Takasu T, Perlman DM, Peterson MS, Burrichter D, Avdulov S, Bitterman PB, Polunovsky VA. Translation factor eIF4E rescues cells from Myc-dependent apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *J Biol Chem* 2003;278: 3015-22.
36. Evans SC, Viswanathan M, Grier JD, Narayana M, El-Naggar AK, Lozano G. An

alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. *Oncogene* 2001;20:4041-9.

37. Matsushita K, Tomonaga T, Shimada H, Shioya A, Higashi M, Matsubara H, Harigaya K, Nomura F, Libutti D, Levens D, Ochiai T. An essential role of alternative splicing of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor in carcinogenesis. *Cancer Res* 2006;66: 1409-17.
38. Khosla S. Magic bullets to kill nasty osteoclasts. *Endocrinology* 2005;146:3233-4.

13

1472  
1473  
1474  
1475  
1476  
1477  
1478  
1479  
1480  
1481  
1482  
1483  
1484  
1485  
1486  
1487  
1488  
1489  
1490  
1491  
149  
149  
149  
149  
149  
149  
149  
149  
150  
150  
150  
150  
150  
150  
1506  
1507  
1508  
1509  
1510  
1511  
1512  
1513  
1514  
1515  
1516  
1517  
1518  
1519  
1520  
1521  
1522  
1523  
1524  
1525  
1526  
1527  
1528  
1529  
1530



Author Proof

Cancer Cell Biology

Laboratory of Pharmaceutical Proteomics<sup>1</sup>, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio), Graduate School of Pharmaceutical Sciences<sup>2</sup>, The Center of Advanced Medical Engineering and Informatics<sup>3</sup>, Osaka University, Osaka, Japan

## Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library

K. NAGANO<sup>1,2</sup>, S. IMAI<sup>1,2</sup>, Y. MUKAI<sup>1,2</sup>, S. NAKAGAWA<sup>2,3</sup>, Y. ABE<sup>1</sup>, H. KAMADA<sup>1,3</sup>, S. TSUNODA<sup>1,3</sup>, Y. TSUTSUMI<sup>1,2,3</sup>

Received November 27, 2008, accepted December 1, 2008

Shin-ichi Tsunoda, Ph.D., Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan  
tsunoda@nibio.go.jp

Pharmazie 64: 238–241 (2009)

doi: 10.1691/ph.2009.8352

Phage antibody library is a promising tool for rapidly creating *in vitro* single-chain Fv (scFv) antibodies to various antigens. The scFv can also act like a subcellularly-expressed antibody, known as intrabody, and can either be used as a novel research tool or used efficiently for targeted molecular therapy. However, there are only a few existing reports about the successful expression of scFvs as functional antibodies in the cell, mainly because poor quality scFv phage antibody libraries were used to isolate the intrabody clones. The aim of this study was to isolate intrabody-forming scFv clones from the non-immune scFv phage antibody library we have generated. Using this library, we isolated a scFv clone against the apoptosis-related intracellular protein Bid in two weeks. To evaluate the intrabody-forming quality of this anti-Bid scFv clone, we expressed it in cultured mammalian cells after fusing it with the fluorescent protein Venus. The expression of the soluble form of anti-Bid scFv-Venus fusion protein was confirmed by fluorescence microscopy analysis. These results show that our scFv phage library is not only optimized for antibody production but can also be used to efficiently generate intrabodies.

### 1. Introduction

Recently, it was suggested that most of the disease-related proteins or drug target proteins are located in the intracellular compartment. Therefore, it is important to elucidate the functions of these intracellular proteins to explore for novel drugs or clinical therapies and to develop ways for modulating their functions. In this respect, the intrabody technology, which is expressing an antibody in the cytoplasm, is considered to be a promising tool for analyzing the functions of subcellular proteins (Huston et al. 2001). Especially, intrabody can be useful for the analysis of post-translated modifications, because it can selectively inhibit the function of a protein. The intrabody-induced inhibition of selective protein function is different from the siRNA method, which acts by totally knocking down the protein expression. Intrabodies can also be of therapeutic use by neutralizing intracellular proteins (Miller et al. 2005; Alvarez et al. 2000). However, it has been difficult to establish the intrabody technology because the reducing cytoplasmic environment generally leads to low intrabody stability (Cattaneo et al. 1999).

Isolation of intrabodies using the phage or yeast antibody library can replace the hybridoma technique as the latter takes more time and effort (Popkov et al. 2005, 2003; Holler et al. 2000). However, only a few research groups have reported the creation of the intrabody from the non-immune phage antibody library (Rajpal et al. 2001; Colby et al. 2004), mainly because of the low quality of the antibody library.

We have already reported the construction of a high-quality non-immune phage antibody library and the optimized

screening conditions to efficiently isolate a monoclonal antibody from this library (Imai et al. 2006). Thus, we believe that we can easily isolate subcellular protein-specific antibodies using this optimized non-immune phage library.

Using this phage library we first isolated a scFv clone against the apoptosis-related intracellular protein Bid, which is reported to be one of the candidate proteins relating to acute hepatitis (Yin et al. 1999). Next, we created a fusion protein between the anti-Bid scFv and the yellow fluorescence protein Venus, and then expressed this fusion protein as a soluble intrabody in cultured cells.

### 2. Investigations, results and discussion

We have previously reported methods to improve the quality of the non-immune murine scFv phage library and to use this phage library for the rapid isolation of monoclonal antibodies to various antigens (Imai et al. 2006). In this report, we isolated scFvs to an intracellular protein and then evaluated their intrabody formation quality. The scFv phage display library was prepared from the glycerol stock of *E. coli* TG1 containing the scFv phagemid library. The Bid-His-tag or native Bid protein was immobilized on the surface of the Biacore sensor chip and the affinity panning was performed for 3 to 5 cycles. The output/input ratio (titer of the recovered phage library after the panning/titer of phage library before the panning) was increased as the panning round was repeated (data not shown). This elevated output/input ratio indicated the en-

VL				
	FR1	CDR1	FR2	
scFv clone 1	DI VMTQS QK F M S T S V G D R V S V T C	K A S Q N V G T N V A	W Y Q Q K P G Q S P K A L I Y	
scFv clone 2	-- Q --- T T S S L - A - L --- T I S -	R --- D I S N Y L N	----- D G T V - L ---	

CDR2	FR3	CDR3	FR4
S A S Y R Y S	G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A E Y F C	Q Q Y N S Y P Y T	F G G G T K L E I K R
Y T - R L H -	--- S - - S - - - - - Y S - - - - - L E Q - - I - T - - -	-- G - T L - L -	-- A - - - - - - - -

VH				
	FR1	CDR1	FR2	
scFv clone 1	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S	S Y A M S	W V R Q T P E K R L E W V A	
scFv clone 2	Q - - - Q Q - - A E - A - - - A - V - - - K - - - Y - - T	-- W - H	-- K - R - G Q G - - - I G	

CDR2	FR3	CDR3	FR4
T I S D G G S Y T Y P D N V K G	R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S H L K S E D T A M Y Y C A R	R V G P P H Y Y A M D Y	W G Q G T S Y T V S S
Y - N P S S G - - K - N Q K F - -	K A - L T A - K S S S T A - M E L R S - T - - - S - V - - - T -	W D Y	----- T L Q S - -

Fig. 1: Amino acid sequence of the antibodies isolated from the non-immune scFv phage library by affinity panning. Amino acid sequences of the scFvs for His-Bid or native Bid, isolated from the library, were determined by DNA sequence analysis. VL; light chain variable domain of an antibody. VH; heavy chain variable domain of an antibody. FR; framework region. CDR; complementarity determining region. "-" in Fig. 1 means that the same amino acid occurs at that position in clone 2 as the clone 1

richment of the antigen-binding scFv clones. A total 96 clones were randomly picked from the post-panning output phage library and their bindings to each antigen were tested by phage ELISA. Among them, several phage clones showed higher binding to the target antigens, Bid-His or native Bid (data not shown). Analysis of the DNA sequences of these positive clones led to the identification of one Bid-His binding scFv clone and another native Bid binding scFv clone (Fig. 1). The antigenic specificity of these scFvs was investigated by phage ELISA using various proteins as antigens. The scFv clone isolated by using the Bid-His (scFv clone 1) as antigen bound not only to the Bid-His but also to the other His-tagged proteins (data not shown). Thus, scFv clone 1 may be an anti-His-tag scFv antibody. On the other hand, the scFv clone isolated by using the native Bid as antigen (scFv clone 2) bound specifically to the native Bid, but not to the His-tagged caspase-8, His-tagged importin- $\beta$ , luciferase, tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)-Fc-chimera, His-tagged Venus and KDR-Fc-chimera (Fig. 2). This result suggested that the scFv clone 2 was an anti-Bid specific scFv antibody.

Very often a His-tag is added to a recombinant protein for purification purposes. However, we have found that when a His-tagged protein was used as an antigen for panning, the clones of binding to the His-tag concentrated rapidly. Therefore, a modified method, which includes a step to eliminate the tag-binding clones, should be developed when having to use the His-tagged protein as antigen for panning.

In order for scFv to act as an intrabody, the most important criteria is that the scFv is expressed in the soluble form in an environment that is not suitable for antibodies (Worn and Pluckthun 2001). To evaluate the characteristics

of the scFvs as intrabodies, the fluorescent protein Venus was fused to the C-terminus of the scFv and each fusion construct was subsequently analyzed for subcellular expression. The expression vector harboring the scFv clone 1 (anti-His tag scFv) or clone 2 (anti-Bid scFv) was transfected into the HEp2 cells and the expression of the fluorescent fusion protein was observed using the Olympus IX-81 fluorescence microscope. The fluorescent images 24 h after transfection revealed that both the scFv-Venus fusions were expressed in the cytoplasm (Fig. 3). Although

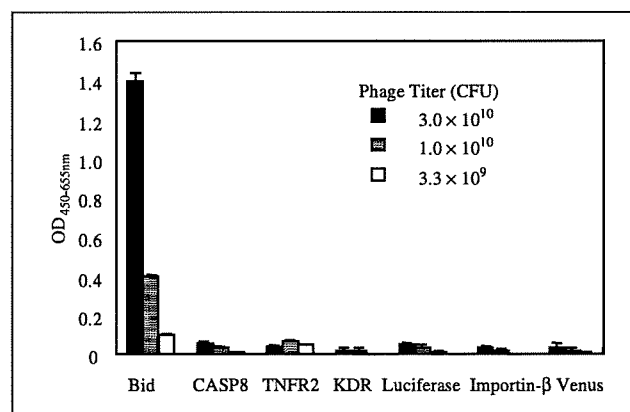
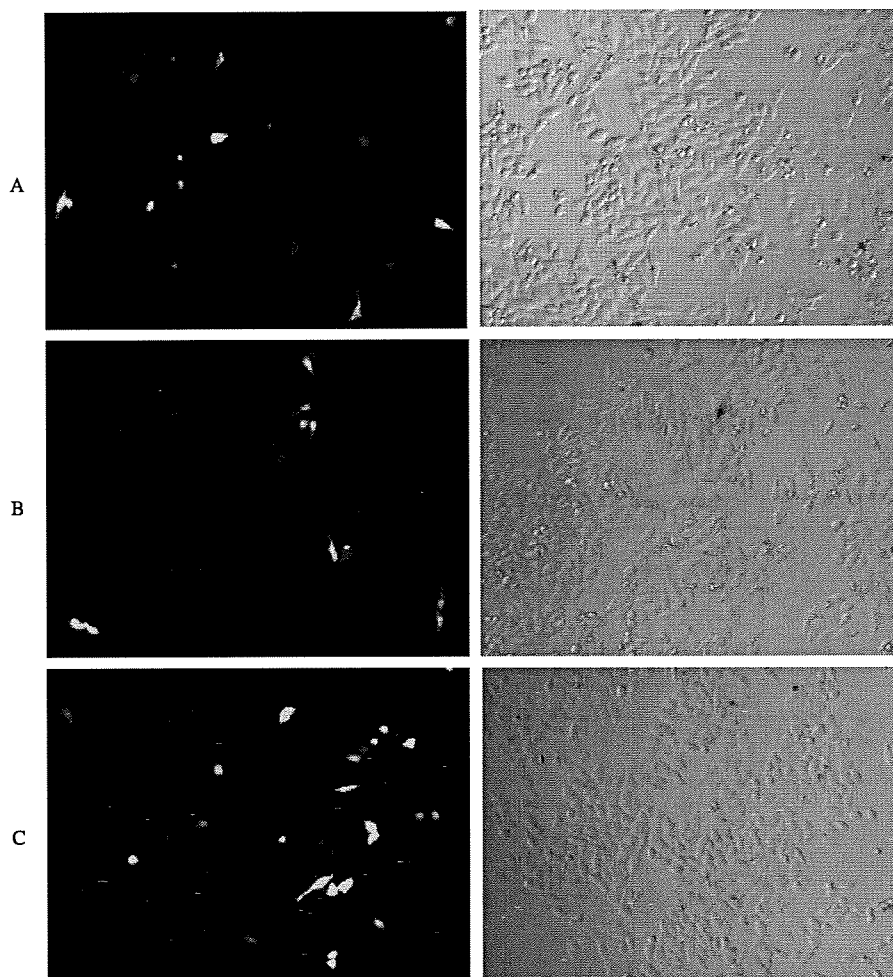


Fig. 2: Binding specificity of the isolated anti-Bid scFv antibody. Binding specificity of the anti-Bid scFv was determined by phage ELISA. Native human Bid, His-tagged human caspase-8, human TNFR2-Fc-chimera, human KDR-Fc-chimera, luciferase, His-tagged importin- $\beta$ , His-tagged Venus (50 ng each) were immobilized on the immunoassay plate and then the purified anti-Bid scFv phage ( $3.0 \times 10^{10}$ ,  $1.0 \times 10^{10}$  and  $3.3 \times 10^9$  CFU each) was applied to the wells. Each bar represents the mean OD450-655 nm  $\pm$  SD (error bars) in three wells



**Fig. 3:** Intracellular expression of scFv-Venus fusion protein  
The left panels depict the fluorescence in the Venus (YFP) channel. The right panels show the bright-field images. The expression plasmids containing the scFv-Venus gene fusions were transiently transfected into the HEp2 cells by lipofection. A. Cells transfected with the scFv clone1-Venus fusion construct. B. Cells transfected with the scFv clone2-Venus fusion construct. C. Cells transfected with the pTriEx vector containing the Venus gene (control)

we will have to assess the binding of scFv to antigen in the cell and the anti-apoptotic property of the anti-Bid intrabody (clone 2) in the near future, our results suggest that we were able to isolate intrabodies from our non-immune phage antibody library.

We believe that intrabody-induced functional inhibition of Bid could be a novel therapeutic method for treating diseases, such as acute hepatitis, for which there are no treatment available (Yin et al. 1999).

It is not known which antibody can be expressed in the cytoplasm. Such fundamentally useful information can be achieved by isolating various antigen specific intrabody candidate clones using our phage library and analyzing their amino acid sequences.

### 3. Experimental

#### 3.1. Cell

Human pharynx cancer cell line HEp2 cells (TKG0403, Cell Resource Center for Biomedical Research, Tohoku University) were sub-cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum, 0.1% 2-mercaptoethanol and 1% sodium pyruvate. TNF- $\alpha$  treatment induces apoptosis in HEp2 cells (Berkova et al. 1999).

#### 3.2. Non-immune phage scFv antibody library

Construction of the non-immune murine scFv phage library was described previously (Imai et al. 2006). The phage display library was prepared from the glycerol stock of *E. coli* TG1 containing the scFv gene library, and was immediately used for affinity panning.

#### 3.3. Affinity panning using BIAcore

Affinity panning of antigens was performed using the microfluidic flow system based BIAcore 3000 instrument (BIAcore International AB., Uppsala,

Sweden) as described previously (Imai et al. 2006). Briefly, 5  $\mu$ g His-tagged Bid (Alexis Biochemicals Co., Taejeon, Korea) or non-tagged Bid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was immobilized on the surface of the sensor chip CM3 (BIAcore). The phage library solution was injected onto the sensor chip at flow rate of 3  $\mu$ L/min. After injection, the sensor chip was rinsed 10 times with the HBS-EPT (HBS-EP running buffer containing 0.05% Tween 20, BIAcore). The bound phages were eluted with glycine-HCl (pH 2.0), and were treated first with glycine-NaOH (pH 11.0) and then with tris-HCl (pH 8.0) to neutralize. Recovered phages were amplified by infecting log phase TG1 cells for the next round of panning.

#### 3.4. Phage ELISA

Single clones of affinity-panned phages were prepared from the culture supernatant of TG1 in 96 well format plate. These phages were blocked with 2% Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. Osaka, Japan) at 4  $^{\circ}$ C for 1 h, and then applied to the antigen-immobilized immuno-assay plate. His-tagged human caspase-8, His-tagged human-importin- $\beta$ , luciferase, tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)-Fc-chimera, His-tagged Venus and KDR-Fc-chimera were used as antigens. After shaking for 2~3 h at 250 rpm, the bound phage was detected using the HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

#### 3.5. Intracellular expression of scFv-Venus fusion protein

The cDNA of the fluorescent protein Venus was kindly provided by Dr. Miyawaki (Riken Brain Science Institute, Saitama, Japan). The isolated scFv genes were inserted into the NcoI and NotI digested mammalian expression vector pTriEx (Novagen), which contained the Venus gene. The resulted plasmid containing the scFv-Venus fusion protein gene was transfected into the HEp2 cells using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 24 h incubation at 37  $^{\circ}$ C, the expression of the scFv-Venus fusion protein in the cells was observed using the Olympus IX-81 fluorescence microscope (Tokyo, Japan).

**Acknowledgement:** This study was supported in part by a Health and Labor Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and in part by a JSPS Research Fellowships for Young Scientists (No. 19-2872) from the Japan Society for the Promotion of Science.

## References

- Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Wang M, Strong TV, Arafat W, Arani RB, Johnson MR, Roberts BL, Siegal GP, Curiel DT (2000) A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* 6: 3081–3087.
- Berkova N, Lemay A, Korobko V, Shingarova L, Sagaidak L, Goupil S (1999) Tumor necrosis factor mutants with selective cytotoxic activity. *Cancer Detect Prev* 23: 1–7.
- Cattaneo A, Biocca S (1999) The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol* 17: 115–121.
- Colby DW, Garg P, Holden T, Chao G, Webster JM, Messer A, Ingram VM, Wittrup KD (2004) Development of a human light chain variable domain (V(L)) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. *J Mol Biol* 342: 901–912.
- Holler PD, Holman PO, Shusta EV, O'Herrin S, Wittrup KD, Kranz DM (2000) In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5387–5392.
- Huston JS, George AJ (2001) Engineered antibodies take center stage. *Hum Antibodies* 10: 127–142.
- Imai S, Mukai Y, Nagano K, Shibata H, Sugita T, Abe Y, Nomura T, Tsutsumi Y, Kamada H, Nakagawa S, Tsunoda S (2006) Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. *Biol Pharm Bull* 29: 1325–1330.
- Miller TW, Messer A (2005) Intrabody applications in neurological disorders: progress and future prospects. *Mol Ther* 12: 394–401.
- Popkov M, Mage RG, Alexander C, Thundivalappil S, Barbas CF 3<sup>rd</sup>, Rader C (2003) Rabbit immune repertoires as sources for therapeutic monoclonal antibodies: the impact of kappa allotype-correlated variation in cysteine content on antibody libraries selected by phage display. *J Mol Biol* 325: 325–335.
- Popkov M, Jendreyko N, McGavern DB, Rader C, Barbas CF 3<sup>rd</sup> (2005) Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody. *Cancer Res* 6: 972–981.
- Rajpal A, Turi TG (2001) Intracellular stability of anti-caspase-3 intrabodies determines efficacy in retargeting the antigen. *J Biol Chem* 276: 33139–33146.
- Worm A, Pluckthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 305: 989–1010.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400: 886–891.

平成 20 年度 薬学研究ビジョン部会 部会賞

癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究

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)

1. はじめに

近年、各種疾患に関するプロテオミクス研究の進展に伴って、創薬ターゲット、あるいは医薬品シーズとなりうる蛋白質が次々と同定され、また、それら蛋白質の機能も解明されつつある。これら標的蛋白質の中で、細胞膜上、あるいは細胞外で機能する分子に対しては、既に抗体医薬やサイトカイン医薬が、様々な難治性疾患に対する特効薬として台頭しているように、生理活性ペプチド・蛋白質等の高分子物質を医薬品として積極的に活用しようとする流れが加速している。一方で、細胞内で機能する疾患関連蛋白質を標的とする場合においては、同じくペプチドや蛋白質、あるいは核酸といった高分子薬物の応用が期待されるものの、一般に高分子薬物は細胞膜透過性や標的蛋白質が局在する特定オルガネラへの移行性に乏しいという問題を抱えている。したがって、高分子薬物を細胞内に効率よく送達した上で、細胞内での薬物動態をも緻密に制御可能な新規 Drug Delivery System (DDS) を開発することができれば、細胞内蛋白質を標的とした次世代の薬物治療法が確立できるものと考えられる。本観点から著者らは、近年見出された、細胞内移行活性を有するペプチド、protein transduction domain (PTD)、あるいは cell penetrating peptide (CPP) を応用した細胞内 DDS 技術の開発を試みている。本稿では、種々の PTD の細胞内高分子導入キャリアーとしての特性について、また、それら情報を基に我々が考案した、ファージ表面提示法を基盤とした改良型 PTD 創出技術、ならびに細胞内薬物ターゲティング技術について紹介させていただきたい。

2. PTD の細胞内 DDS キャリアーとしての特性評価

1988 年に Green や Frankel らによって、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の転写因子である Tat

蛋白質が細胞膜を透過し、細胞内で転写活性を発揮するという報告がなされた。この Tat 蛋白質は自然界に存在する細胞膜透過性蛋白質として注目され、膜透過機序の解析から Tat 蛋白質中のアミノ酸 10~16 残基よりなる領域が膜透過に必須の領域 (Protein transduction domain: PTD) であることが明らかにされている。このような PTD は、ショウジョウバエのホメオドメイン蛋白質、HIV-1 の mRNA 核外輸送蛋白質、単純ヘルペスウイルス (HSV) の構造蛋白質等にも存在し、それぞれ Antp、Rev、VP22 と命名されている。PTD の発見は蛋白質の細胞膜“非”透過性という既存の常識を覆し、細胞内薬物導入技術に新たな活路を開く画期的方法論として期待を集めることとなり、既に化学的架橋や遺伝子操作によって、これらの配列を導入することで、ペプチドや蛋白質等の高分子物質を細胞内に容易に導入できることが明らかとされている。しかし、PTD をもってしても、蛋白質が本来有する機能・薬効を十分に引き出せないことが明らかにされており、本手法をより汎用的な手法として確立するための改良/最適化が求められている。

そこで我々は、まず PTD の細胞内 DDS キャリアーとしての特性を解析/検証するため、代表的な 4 種類の PTD の細胞内移行特性の比較解析、ならびに克服すべき課題の抽出を試みた (Table 1)。

PTD	origin	sequence
Tat	HIV-1	YGRKKRRQRRR
Antp	Drosophila	RQIKIWFQNRRMKWKK
Rev	HIV-1	TQRARRNRRRRWRERQR
VP22	HSV	NAKTRRHERRRKLAIER

Table 1 Amino acids sequence of PTD.

PTD 自身の細胞内移行特性を細胞内移行活性及び細胞傷害性の観点から評価するため、接着細



胞として、HeLa 細胞、HaCaT 細胞、A431 細胞を、浮遊細胞として Jurkat 細胞、MOLT-4 細胞、HL60 細胞を用い、これらの細胞における蛍光標識 PTD (PTD-FAM) の移行量を Flow cytometry により定量化した (Fig. 1)。

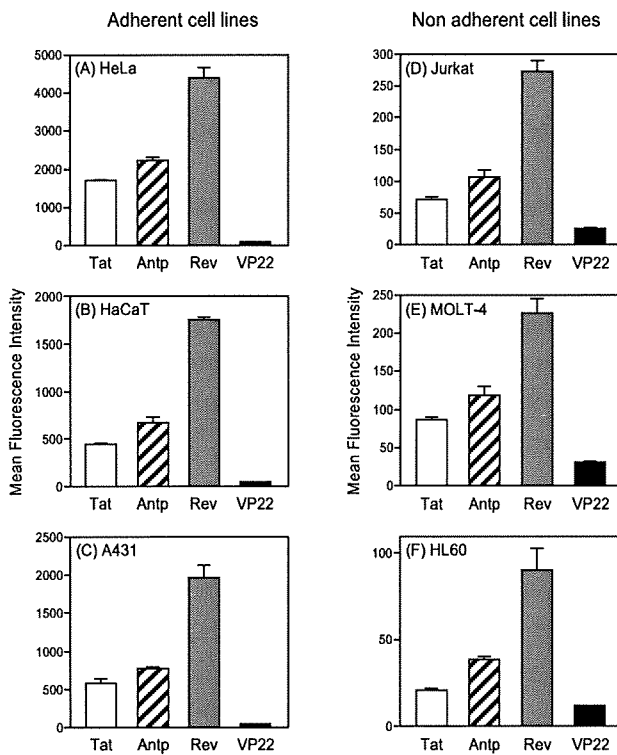


Figure 1.

**Comparison of the cellular uptake of PTDs.**

Various cell lines were incubated with FAM-labeled Tat (white column), Antp (hatched column), Rev (gray column), and VP22 (black column): HeLa (A), HaCaT (B), A431 (C), Jurkat (D), MOLT-4 (E) and HL60 (F) at 10 μM for 3 h. After trypsin treatment to digest PTDs adsorbed on the cell surface, the PTD-transduced cells were harvested and analyzed by flow cytometry. Error bars indicate the mean ± S.D. of triplicate assays.

その結果、Rev は今回用いた全ての細胞種に対して優れた細胞内移行活性を示し、以下、Antp・Tat・VP22 の順で高い細胞内移行能を示した。一方、安全性を検証するため各 PTD の細胞傷害活性を検討したところ、Rev 及び Antp 作用群において濃度依存的な細胞増殖阻害が認められた。さらに、LDH leakage assay によって各 PTD の細胞膜に対する傷害性を評価したところ、Rev 及

び Antp 作用群においてのみ顕著な細胞膜傷害性が認められた。したがって、毒性発現メカニズムについては明らかでないものの、Rev や Antp は細胞膜に影響を与え、最終的に細胞傷害性を示すことが示唆された。

次に PTD の細胞内移行機序を解析するため、各 PTD-FAM の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。その結果、いずれの PTD を作用させた細胞においても、細胞内にドット状の蛍光が認められた。Tat はクラスリン非依存性エンドサイトーシスの一つであるマクロピノサイトーシスによって細胞内に移行することが報告されていることも考慮すると、細胞内へ移行した PTD の大部分は、エンドソーム小胞内に蓄積し、細胞内に導入された薬物の薬効を大きく制限されてしまうものと考えられた。

以上の特性評価の結果から、PTD を用いた有効かつ安全な細胞内薬物療法を実現するためには、細胞内移行活性/安全性を両立した PTD の創出と、エンドソーム捕捉性の克服が課題であるものと考えられた。

**3. フェージ表面提示法を駆使した改良型 PTD 創出技術の開発**

上述のように、細胞内薬物療法を達成するためには、細胞内に安全かつ高効率に薬物を導入可能な PTD を創出する必要がある。そこで、これら課題を達成しうる新規 PTD を創出するための方法として、フェージ表面提示法の応用を試みた。フェージ表面提示法は、約 1 億種類もの多様性を有したアミノ酸置換体ライブラリの中から、結合親和性に基づく選別 (パンニング) によって、標的とする蛋白質や細胞に対して結合活性を示す新規蛋白質あるいはペプチドを迅速に単離可能な方法論である。我々は、細胞に対する結合親和性に基づく PTD 候補分子の選別 (セルパンニング) と、細胞内に導入された場合にのみ細胞傷害性を発揮する蛋白質合成阻害因子 (protein synthesis inhibitory factor: PSIF) を利用した独自の細胞内移行活性評価を組み合わせることで、改良型 PTD をハイスループットに同定できる新たなスクリーニング法を考案した (2-step スクリーニング) (Fig. 2)。

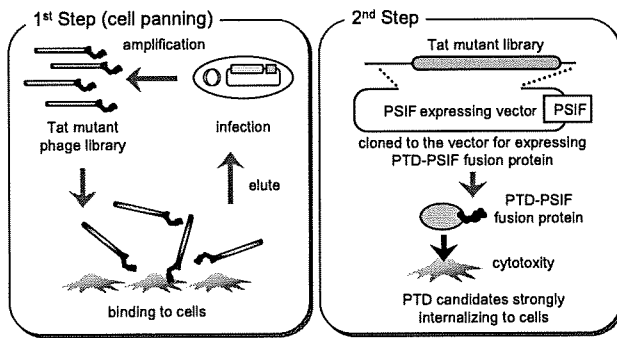


Figure 2.  
Scheme of 2-step screening

本手法は、まず①セルパンニングにより改変 PTD 発現ファージライブラリの中から細胞に強く結合、もしくは細胞内に移行するファージを濃縮してくる。続いて、②濃縮 PTD ライブラリと PSIF を遺伝子工学的に連結して大腸菌を形質転換し、PTD-PSIF 融合体を含む大腸菌培養上清を標的細胞に添加する。そして、細胞傷害活性に基づくスクリーニングを行うことで、最終的に細胞内移行活性を有する改変型 PTD クローンを迅速かつ簡便に選別可能とするものである。そこで、本スクリーニングの有用性を評価するため、これまでの検討で安全性/移行効率バランスに最も優れていた Tat をリード PTD として用い、安全性を保持しつつ細胞内移行効率のみを選択的に向上させた改良型 Tat の創製を試みた。

まず、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 配列中の細胞内移行活性に重要と考えられているアルギニン以外の 5 個のアミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した Tat 改変体遺伝子ライブラリを作製した。モデル細胞である HaCaT 細胞に対し、本ライブラリを用いて 2-step スクリーニングを実施したところ、Tat よりも強い細胞傷害活性を示すクローンが多数得られてきた。その中で、特に強い細胞傷害活性を示した 6 クローン (mT1~mT6) の細胞内移行活性を蛍光標識ペプチドを用いて定量的に評価したところ、mT5 ならびに mT6 は Tat よりも 2.5~3 倍以上優れた細胞内移行活性を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。

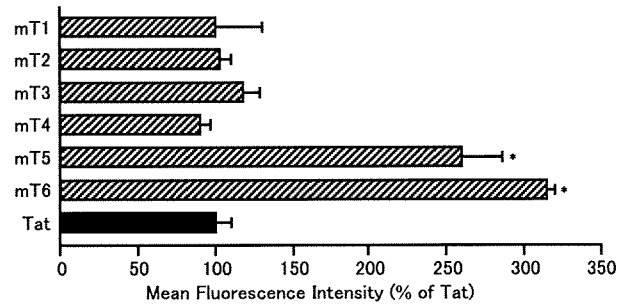


Figure 3.  
Cellular uptake of PTD-FITC conjugates into HaCaT cells.

FITC labeled PTDs were incubated with HaCaT cells for 3 h and their cellular uptakes were measured by flow cytometry analysis. Stripy columns show uptakes of PTD candidates from the Tat mutant library. Black column shows uptake of control Tat-FITC. Error bars indicate the mean±S.D. of triplicate assays. \* p < 0.01, compared with Tat.

また、WST-8 assay ならびに LDH leakage assay によって、これら PTD クローンの安全性を検証したところ、mT6 作用群においては細胞膜傷害に伴う細胞傷害性がわずかに認められたものの、mT5 作用群においては 100 μM という高濃度のペプチドを作用させた場合でも細胞傷害性が全く認められなかった。これらの結果から、2-step スクリーニングを用いることで、目的とする機能を有した改良型 PTD を迅速に創出可能であること、また mT5 は Tat と同等の安全性を保持しつつ、細胞内移行活性が増強された優れた PTD であることが示された。以上の結果は、我々が考案した 2-step スクリーニングが新規 PTD 創製法として非常に有効な方法論であることを示すものである。本手法は、PTD の細胞内移行活性増強体のみならず、細胞特異性を有するような改変型 PTD のスクリーニングにも応用可能であると考えられ、それら細胞選択的な PTD を用いれば、蛋白性医薬品を標的組織/細胞へと選択的に送達したうえで細胞内へと導入可能な、より高度な細胞内薬物療法が確立できるものと期待される。

#### 4. PTD を基盤とした細胞内ターゲティング技術の確立

有効かつ安全な細胞内薬物療法を確立するた

めの次のステップとして、薬物を細胞内に高効率に送達した上で、さらにその薬物を標的オルガネラへと送達可能な薬物動態制御法が必要となる。しかし、先の検討において示唆されたように、細胞内に移行した PTD の大部分はエンドソーム内に捕捉されることから、導入された薬物の薬効は著しく制限されることになる。そこで細胞内の特定領域へと蛋白性医薬品を選択的に送達しうる方法論として、我々は、①インフルエンザウイルス由来のエンドソーム膜破壊ペプチド (HA2) を利用したエンドソームから細胞質への漏出と②細胞内オルガネラ移行シグナルペプチドを活用した標的オルガネラへの選択的送達という、2 段階の細胞内ターゲティング技術の確立を試みた。

HA2 は、インフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白質由来のペプチド断片であり、エンドソーム内における pH 低下に応答して、エンドソーム膜を破壊する活性を発揮することが知られている。したがって、Tat 融合薬物と Tat を付加した HA2 ペプチド (HA2-Tat) を同時に細胞に添加することによって、両者を同じエンドソーム内に共存させることができれば、薬物を細胞質内へと効率よく送達できるものと考えられる。そこで、本手法の細胞質内薬物送達法としての有用性を評価するため、HA2-Tat と Tat 融合蛍光蛋白質 (Tat-VENUS) を共処理した際の HeLa 細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察した (Fig. 4)。

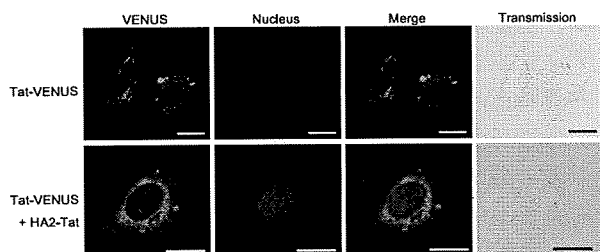


Figure 4.

#### Intracellular distributions of Tat-VENUS.

HeLa cells were treated with 10  $\mu$ M Tat-VENUS alone or in the presence of 5  $\mu$ M HA2-Tat, and cultured for 3 h. Fluorescence images were acquired by confocal laser scanning microscopy and the signals were digitally merged. The nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars in each microphotograph indicate 20  $\mu$ m.

その結果、Tat-VENUS 単独作用群では、VENUS 蛋白質がエンドソームに補足されていることを示すドット状の蛍光のみが認められたのに対して、Tat-VENUS と HA2-Tat を共処理した群では、VENUS 由来の蛍光が細胞質全体に拡散した像が認められた。以上の結果は、Tat 融合蛋白質と同じエンドソーム小胞内に侵入した HA2-Tat がエンドソーム破壊活性を発揮し、最終的に Tat 融合蛋白質の細胞質移行が促進されたことを示唆している。続いて、代表的なオルガネラ移行シグナルである SV40 Large T 抗原由来の核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS) を付与した Tat-VENUS (Tat-VENUS-NLS) を用いて、本手法の細胞内ターゲティング技術としての応用を試みた。Tat-VENUS-NLS を単独、あるいは HA2-Tat と共に 3 時間共培養した HeLa 細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、Tat-VENUS-NLS を単独で作用させた群では、VENUS 由来の蛍光がドット状に認められた (Fig. 5)。それに対して、HA2-Tat と Tat-VENUS-NLS とを共処理した群においては、VENUS 由来の蛍光が核に集積した像が観察された。したがって、PTD、HA2、NLS の機能性ペプチドを組み合わせることによって、分子量数万の蛋白質をも核内にまで選択的に送達可能であることが示された。

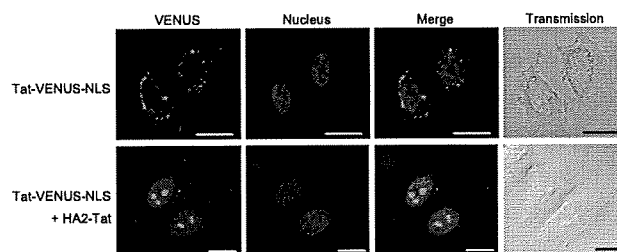


Figure 5.

#### Intracellular distributions of Tat-VENUS-NLS.

HeLa cells were treated with 10  $\mu$ M Tat-VENUS-NLS alone or in the presence of 5  $\mu$ M HA2-Tat, and cultured for 3 h. Fluorescence images were acquired by confocal laser scanning microscopy and the signals were digitally merged. The nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars in each microphotograph indicate 20  $\mu$ m.

そこで次に、本手法の薬物療法における有効性を検証するため、抗がんペプチドとして知られる PNC28 を用いて腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。PNC28 は核局在性のがん遺伝子産物 MDM2 に結合し、MDM2 の p53 分解活性を阻害することによって、がん細胞に細胞死を誘導できるペプチドである。そこで PNC28 の核ターゲティングをモデルケースとして、PTD、HA2、NLS を組み合わせた細胞内ターゲティング技術の有効性を評価した (Fig. 6)。

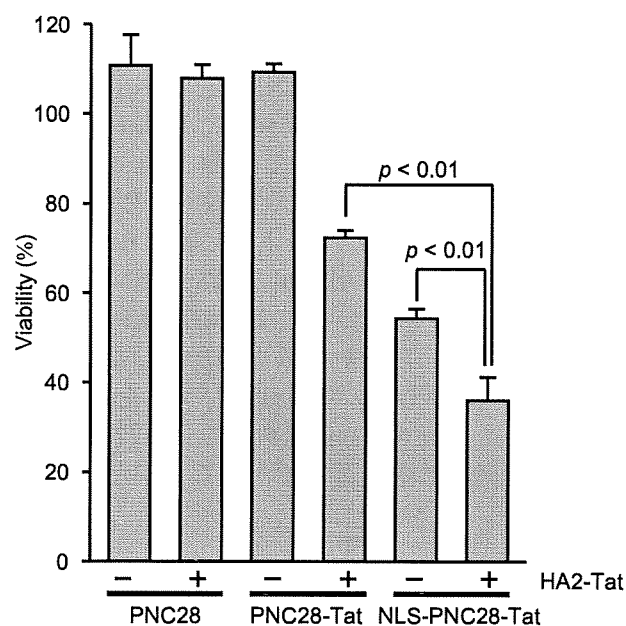


Figure 6.

**HA2-Tat enhances the cytotoxicity of NLS-PNC28-Tat**

A549 cells were treated with 6  $\mu$ M PNC28, PNC28-Tat or NLS-PNC28-Tat in the presence of 5  $\mu$ M HA2-Tat. After 6 h, the cell viability was analyzed by WST-8 assay. Error bars indicate the mean  $\pm$  S.D. of triplicate assays.

各種 PNC28 を作用させた MDM2 高発現腫瘍細胞 (A549) の細胞生存率を評価したところ、PNC28-Tat 単独作用群と比較して、PNC28-Tat と HA2-Tat の共処理群では 70%、NLS 融合 PNC28-Tat (NLS-PNC28-Tat) 処理群においては約 50%にまで生存率が低下していた。それに対

して、NLS-PNC28-Tat と HA2-Tat を併用した群では、より強力な抗腫瘍効果が認められ、生存率が約 30%にまで低下していた。これらの結果から、3種類の機能性ペプチド (PTD、HA2、NLS) を組み合わせた細胞内ターゲティング技術が、細胞内作用性の抗がんペプチドの薬効を飛躍的に増強できる有効ながん治療戦略となり得ることが示された。

以上のように、PTD、HA2、NLS を利用することによって、①エンドソームエスケープと②核ターゲティングという、2段階の細胞内ターゲティング技術の開発に成功した。本細胞内ターゲティング技術は、ミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソーム等の様々なオルガネラ移行シグナルを利用することによって、核以外のオルガネラへも選択的に高分子を送達することが可能な方法論であると考えられ、将来的には薬物の細胞内挙動を自在に制御可能な基盤技術になるものと期待される。

**5. おわりに**

本研究では、既存の PTD のキャリアー特性を比較解析することによって細胞内薬物動態制御法の最適化に適う PTD 改良指針の明確化を試み、細胞内移行活性と安全性の両立、エンドソーム捕捉性の克服が必要不可欠であることを見出した。さらに、これらの指針に立脚して独自の改変 PTD 創出法や細胞内ターゲティング技術の開発を試み、上記問題点を克服した新規細胞内薬物ターゲティング技術を開発した。本研究で確立した細胞内薬物動態制御技術が、プロテオミクス研究等によって今後数多く見出されてくる創薬ターゲット蛋白質、あるいは医薬品シーズ蛋白質を活用するための次世代創薬基盤技術として貢献できることを願っている。

なお、本研究は、医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト、堤 康央先生、大阪大学大学院薬学研究科、中川晋作先生、吉川友章先生、向 洋平先生、医薬品医療機器総合機構、杉田敏樹先生をはじめとする多くの共同研究者の協力を得てなされたものであり、ここに感謝の意を表します。

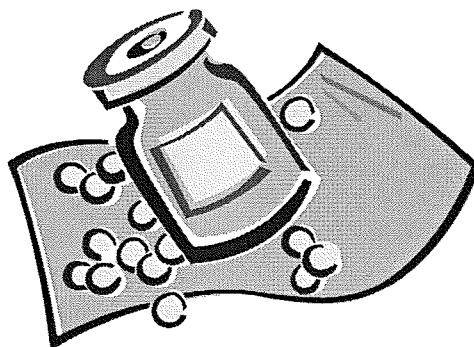
## 参考文献

1. Mukai Y. et al., Biol. Pharm. Bull. 29: 1570-1574 (2006)
2. Sugita T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 363: 1027-1032 (2007)
3. Sugita T. et al., Br. J. Pharmacol. 153: 1143-1152 (2008)
4. Yoshikawa T. et al., J. Mol. Biol. 380: 777-782 (2008)

---

### ◆略歴◆ 角田 慎一 (Shin-ichi TSUNODA)

1999年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了、工業技術院生命工学工業技術研究所ポスドク、2001年(独)産業技術総合研究所研究員、2004年国立医薬品食品衛生研究所主任研究官、2005年(独)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、2008年より同サブプロジェクトリーダー。



# 蛋白療法の最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価

## 第9回日本 DDS 学会永井賞受賞によせて

*Drug delivery systems for proteomics-based drug innovation: the 9th Nagai Award in the 25th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System*

Yasuo Tsutsumi\*

わが国の五大疾患や種々難病に対する次世代創薬を志向したプロテオミクス研究(創薬プロテオミクス研究)は、(1)病態情報を迅速かつ的確に集積・評価できる「疾患バイオマーカー候補蛋白質」や「疾患の発症・悪化に関わる創薬ターゲット候補蛋白質」、さらには「疾患の治療に関わる医薬品シーズ候補蛋白質」の同定、(2)医薬品の有効性・安全性を高度に予測・解析できる「薬物治療バイオマーカー候補蛋白質」の同定、(3)これら候補蛋白質を有効活用した画期的診断・治療法の開発にフォーカスされている。

一般に、疾患の発症や悪化あるいは医薬品の有効性・毒性発現の際には、数百種類以上もの蛋白質が、質的・量的・時空間的に発現変動している。そのため、創薬プロテオミクス研究の成功の鍵は、①数多くの発現変動蛋白質のなかから、バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズとなりうる候補蛋白質を絞り込むこと、②バイオマーカー蛋白質や創薬ターゲット/医薬品シーズ蛋白質をいかに医療現場や医薬品開発へ有効活用していくか、ということに尽きる。世界的にみて、プロテオミクスをはじめとするオミクス研究の成功例が乏しいのは、上記①および②を実現するための基盤技術が未成熟であることにほかならない。この点、筆者らが開発を進めている“抗体プロテオミクス技術”は、①に示した「候補蛋白質の絞り込みとバリデーション」を同時に実現できる独自の基盤技術であり、創薬プロテオミクス研究の推進や抗体医薬の開発などに大きく貢献できる可能

性を秘めている。一方で、①で見いだした、抗体やサイトカインなど、疾病治療に有用な医薬品シーズ蛋白質を医薬品として開発しようとした場合、体内安定性の乏しさや作用の多様性といった蛋白質固有の問題点を克服するための DDS 技術の開発が鍵となる。

この点、筆者らは、レセプター指向性のアゴニスト(ターゲティング能を有した機能性人工蛋白質)の迅速複製技術(生物学的 DDS)や部位特異的高分子バイオコンジュゲーション技術(高分子化学的 DDS)を新たに確立し、医薬品シーズ蛋白質の有効性と安全性を格段に向上できることを見いだしている。また、創薬ターゲット蛋白質に対する医薬品開発の鍵は、これらに対する有効な阻害分子をいかに迅速創出できるかである。この点でも筆者らは、前述の生物学的 DDS を駆使し、創薬ターゲット蛋白質に対する structural variants(構造変異蛋白質)を、1億種類以上もの多様性を持ったファージライブラリとして構築することで、このなかからレセプター指向性(ターゲティング能)を有する「アンタゴニスト活性を有する機能性人工蛋白質」の創出にもはじめて成功している。

本稿では、以上に概略を記載した、創薬プロテオミクス研究の実現に叶う独自の DDS 研究に関して、筆者らの最新の知見を紹介させていただく。

ヒトゲノム解読が完了し、「ヒトの設計図」は2万数千種類の遺伝子で描かれていることが明らかとなった。RNA として機能する例外を除き、これら遺伝子の機能を具現するのは、最終産物である蛋白質である。この蛋白質は、「翻訳調節や翻訳後修飾」を受けるため、mRNA と蛋白質の間には、多くの場合、量的な相関関係は成立しない。特に、蛋白質の酸化的修飾やリン酸化等に伴う“蛋白質の機能変化・異常”は、後天的な疾患の発症や悪化の主因となっている。そのため先天的な遺伝子疾患など

\*1) Department of Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究科・毒性学分野

\*2) Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation 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

を除き、病態メカニズムなどを解明しようとするライフサイエンス研究では、遺伝子(ゲノム・トランスクリプトーム)の解析研究だけでは不十分であり、蛋白質(プロテオーム)の解析研究、すなわちプロテオミクスへの期待が高まっている<sup>1)</sup>。

プロテオームとは、細胞・個体の生命活動に必要な全蛋白質をひとまとめに捉えた概念であり、細胞や個体で発現している遺伝子(ゲノム)産物、すなわち蛋白質の総和(集合体)を示している。すなわちプロテオームは、細胞・個体中で翻訳され、部分的消化や翻訳後修飾などを受け、種々生体内分子と相互作用しつつ、機能している全発現蛋白質を意味している。周知のとおり、ゲノムは単なる情報(遺伝型)に過ぎず、このゲノム情報に基づき、多様な蛋白質群(表現型)が作られることで、生命体ははじめて生命現象が営める。したがってプロテオームには、組織や細胞の状態(分化・老化・疾患)を反映した情報が濃縮されていることになる。

細胞や個体においては、約2万数千種類の遺伝子の翻訳産物が種々修飾を受け、結果として10万種類以上にも及ぶ蛋白質として存在しうるものと考えられており、このうち一部(数千~5千種類)が機能的に発現しているものと推定されている。これら発現蛋白質の「種類(質)」や「量」、「時空間的な局在性」を網羅的に(動態)解析することで、健康状態における挙動とは異なった蛋白質を探索し、分化や老化といった生命現象や、疾患の発症や悪化に関連する蛋白質群を見だし、細胞や個体の状態(分化・老化・病態)情報を理解しようとする研究が、プロテオーム解析(プロテオミクス)であり、生命現象や種々疾患の解明のみならず、得られた情報・知見を活用し、安全性と有効性にすぐれた医薬品の開発などに展開していくことが期待されている。

なお、生体防御機構といった「生体が生まれながらに兼ね備えている恒常性維持機構」を、発現蛋白質の動態解析の視点で眺めようとするプロテオミクスは、DDSの観点から考えると、見事なまでの天然のDDSを学び取ろうとするものであり、筆者らのグループが目指している究極のDDSはプロテオミクス研究といった「生体が本来的に有している巧妙な仕組み」を総合的に理解しようとする試みから産み出されるものと信じている。

このようなプロテオミクス研究のなかでも、(1)疾患の発症や悪化、がんのステージ移行(がん転移、がん浸潤)といった病態の推移や合併症の発症、医薬品の効果(治療度合い)や副作用、有害事象を予測・評価できる創薬バイオマーカー(疾患バイオマーカーおよび薬物治療バイオマーカー)の探索、(2)疾患の発症や悪化に関与している創薬ターゲットあるいは疾患の治療に関わる医薬品シーズとなる蛋白質の探索は、資源に乏しく、知的創発に頼らざるを得ないわが国にとって、国民の健康と福祉の向上のみならず、知的財産立国(知財立国)・技術立国を標榜していくためにも、ライフラインと位置づけられている。しかしながら、ゲノミクス・トランスクリプトミクス研究で欧米に出遅れたわが国は、上記の創薬プロテオミクスにおいても、ゲノム創薬以上に立ち後れているのが現状であり、創薬プロテオミクス研究の推進は、まさに緊急命題となっている。

### 創薬プロテオミクス研究の現状

がん、糖尿病、高血圧、痴呆症、アレルギー性・炎症性免疫疾患といったわが国の五大疾患や種々難病に対する“創薬バイオマーカー”や“創薬ターゲットあるいは医薬品シーズ”の探索は、臨床現場で最適医療を提供するだけでなく、安全・安心かつ有効な医薬品の開発に際しての圧倒的な競争力の獲得に直結するため、これまでに類をみないほどに、熾烈な国際競争が繰り広げられている。なかでも、米国やドイツ、スイスなど、欧米各国はすでに、2000(平成12)年以降、大量の国家予算を投じ、メガファーマやバイオベンチャーを巻き込んで、創薬プロテオミクス研究に大規模着手している。

ゲノム創薬で出遅れたわが国にとって、これは深刻な状況であり、この劣勢を挽回し、国際競争力に満ち溢れた画期的な医薬開発を支援することを目的に、2003(平成15)年、厚生労働省および国立医薬品食品衛生研究所(2005年以降は、独立行政法人医薬基盤研究所)が中心となり、製薬メーカー22社、5カ所のナショナルセンター(国立循環器病センター、国立精神・神経センター、国立国際医療センター、国立成育医療センター、国立長寿医療研究セ

ンター)、大阪大学医学部、大阪大学蛋白質研究所といった産官学が強固に連携し、国家プロジェクト「疾患関連蛋白質解析研究事業」がスタートした。

本研究事業は、わが国の主要疾患などに関して、⑦ 患者(薬物治療中の患者を含む)と健常人との間で、質的、量的、時空間的に発現変動している蛋白質(疾患関連蛋白質)を(動態)解析し、⑧ 数多く(数百種類以上)の発現変動蛋白質のなかから、疾患バイオマーカーや創薬ターゲットあるいは医薬品シーズとなりうる蛋白質を絞り込み、⑨ これらをバリデーションしたうえで、⑩ 新規医薬品の創出などに有効活用しようとするものである。当事業は、2008(平成20)年度より、第2期事業に移行し、⑪ 医薬品等の毒性発現に起因して発現変動する安全性バイオマーカーの同定と安全な医薬品の開発支援をも目指した「創薬バイオマーカー探索研究事業」として再スタートしている。

### 抗体プロテオミクス技術

しかし残念ながら、世界的にみても、創薬プロテオミクス研究に成功した例は、いまだ数少ないのが現状である。これはまず、疾患の発症や悪化・進展、医薬品の有効性あるいは毒性発現の際には、細胞・個体内に存在している蛋白質(数千類)のうち、数百種類以上もの蛋白質が、質的、量的、時空間的に発現変動し、このなかから、本当に意味(価値)のある「創薬バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ」の候補となる蛋白質を絞り込まねばならないことに起因している。すなわち、候補蛋白質の絞り込みを実現していくためには、数多くの発現変動蛋白質の機能・局在化解析と病態・薬効・毒性との関連追求が不可欠であり、ほとんどの場合、個々の発現変動蛋白質に対して各々のモノクローナル抗体を作製して解析することが必須となる。

そのため、極端なことをいえば、千種類の発現変動蛋白質が探索されてきた場合、千種類のモノクローナル抗体を作製せねばならないことになってしまう。一般にモノクローナル抗体作製には、わずか一種類の蛋白質を対象としたときですら、マウスなどの動物への免疫やハイブリドーマの作製、スクリーニングなどのステップが必要であり、多くの場

合、半年以上も要してしまう。これは、創薬プロテオミクスに限らず、ゲノミクス・トランスクリプトミクスといった創薬を志向したオミクス研究全般に当てはまることであり、その結果、画期的創薬などのアウトプットが皆無に等しい現状を招いてしまっている。

また、上記の抗体作製に関する諸課題を克服し、「創薬バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ」の候補蛋白質が絞り込まれたあとには、疾患情報(疾患の発症や悪化[ステージ]、症状[たとえばがんの組織浸潤や転移の有無、合併症の併発、予後など])や薬効情報(たとえば抗がん剤の有効性[著効、有効、無効]や耐性といった情報)、有害事象の情報(毒性発現の有無など)と、候補蛋白質の発現様式との関連をバリデーションし、有用な「創薬バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ」を同定せねばならない。しかし、このバリデーションに関しても、膨大な数の臨床検体数に頼らざるをえないのが現状であり、わが国をはじめとして、創薬を志向したオミクス研究の大きな足枷となっている。

この点、筆者らは最近、理論上あらゆる抗原に対する抗体を含んだ独自のファージ抗体ライブラリ(24億種類もの抗体の多様性を有している)を開発するとともに、プロテオーム解析サンプルから直接回収される微量(0.5ng程度)かつ多種類の変動蛋白質から、おのおのの特異的モノクローナル抗体をわずか2週間程度で単離できる方法を考案した。得られたファージ抗体は、ELISAや病理切片などの免疫染色をはじめとする機能解析に展開可能である。

筆者らは現在、病態ステージ、予後、転移・薬効といった臨床情報既知で、かつ1,500症例以上のヒト病態・正常組織がスポットされた組織アレイ(富山大学医学部 福岡順也博士との共同研究)を用い、バリデーションを一挙に実施している。

このヒト臨床検体の前処理から、プロテオーム解析による発現変動蛋白質の同定、抗体作製とバリデーションまでの過程を、約2~3週間で完了できるシステムを、筆者らは「抗体プロテオミクス技術」とよんでいる(図1)。この抗体プロテオミクス技術は、多数の変動蛋白質を質量分析器で同定すると同時に、その特異的モノクローナル抗体をおの



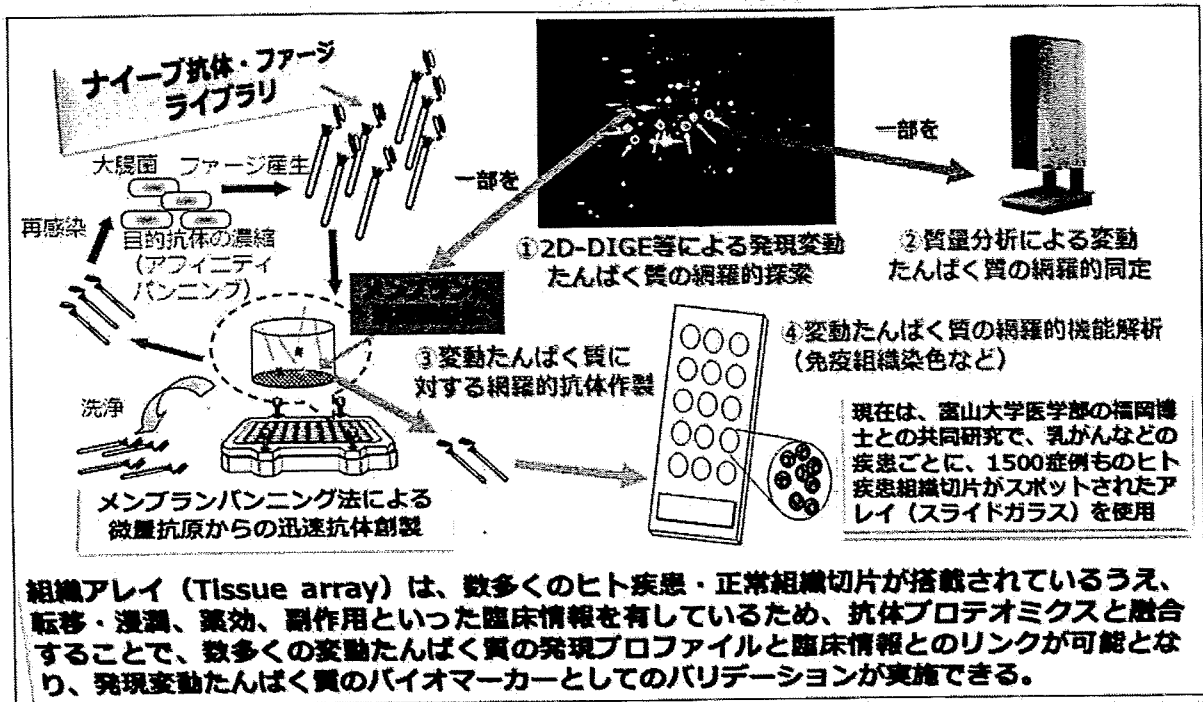


図1 抗体プロテオミクス技術による創薬バイオマーカー蛋白質の探索

ファージ抗体ライブラリによる *in vitro* 抗体作製法をプロテオミクスに応用することで、これまで達成困難であった 2D-DIGE spot 中の微量で多数の発現変動蛋白質に対する網羅的な抗体作製を実現し、多数の発現変動蛋白質のハイ スルーブットなバリデーションが可能となった。

おの作製し、臨床情報を豊富に搭載した“多数のヒト症例”に対し、一挙かつリアルタイムにバリデーションできる唯一の方法であり、先述した創薬プロテオミクス研究の諸問題を解決できるなど、他を圧倒する競争力を有している。

現在、乳がん・大腸がん・肺がんなどを対象に、産官学の連携のもと、抗体プロテオミクス研究を推進しており、いくつかの興味深いバイオマーカー蛋白質を見いだしている。

### ファージ表面提示法を利用した生物学的 DDS

創薬プロテオミクス研究の成果を社会に還元していくためには、人間ドックなどの機会を利用しつつ、迅速かつ的確な病態診断により疾患予備軍の健康コントロールを図るとともに、オーダーメイド医療をも視野に入れた、適切かつ安心できる治療(投薬)計画の立案、さらに治療モニタリングに有用な診断薬・技術の開発が必須となる。この点、臨床情報とリンクした創薬バイオマーカーは、国民の健康

そして医療現場にパラダイムシフトをもたらすものであろう。

また、製薬メーカーやバイオベンチャーにおいては、新規産業シーズの獲得と、開発段階から高度に有効性と安全性が保証された画期的医薬品の開発を強力にサポートするであろう。一方で、医薬品シーズ/創薬ターゲットとなる蛋白質を有効活用した創薬に関しては、すでに数多くの事例が物語るように、有効性と安全性を高度に保証していこうとする観点から、DDSの重要性がますます高まってくるものと考えられる。

ここでは、筆者らの種々DDS研究のなかから(図2)、自己免疫疾患の発症・悪化における創薬ターゲット(腫瘍壊死因子: TNF)を1例に、創薬プロテオミクス研究の成果を有効活用しようとする DDS について紹介する。

慢性関節リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患は、いまだ克服すべき難病の一つとして広く認識されている。そのため、自己免疫疾患を標的とした創薬プロテオミクス研究が盛んに行われており、

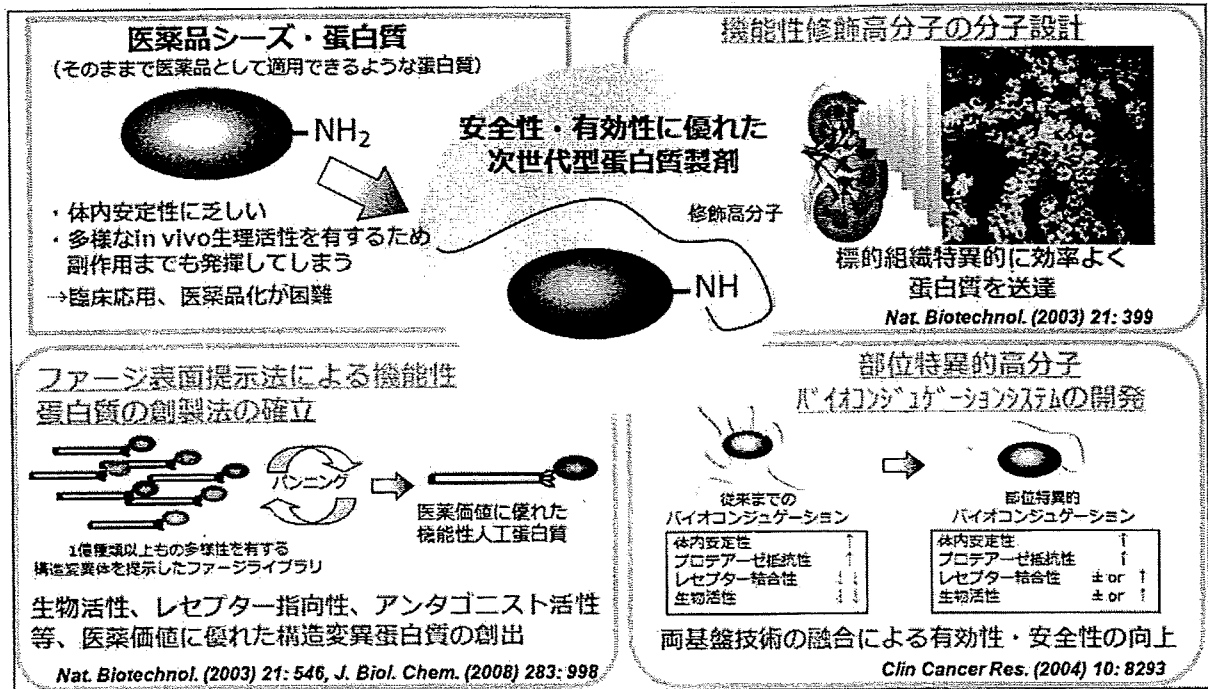


図2 創薬プロテオミクスの実現に向けた“生物学的 DDS”と“高分子化学的 DDS”の融合  
ファージ表面提示法を駆使することにより、目的の受容体に選択的に結合可能な構造変異蛋白質の創出技術とリジン欠損構造変異蛋白質のN末端特異的な高分子バイオコンジュゲーションシステムの開発を実現し、これまで蛋白質の医薬品化において問題となっていた複数の受容体を介した多様な生理作用による副作用発現と、体内安定性の乏しさによる大量頻回投与を一挙に克服することが可能になった。

広範な炎症の惹起・悪化における key molecule の一つとして、腫瘍壊死因子(TNF)が創薬ターゲットとなっている<sup>3-4)</sup>。一方でTNFは、発がんや種々感染症に対する生体防御活性の中心を担っていることも明らかとなっているが、病態(炎症)の発症・悪化と生体防御活性の発揮とのバランスやその調節メカニズムは、いまだ不明のままである。特にTNFの生体における2種類の存在形式(可溶性TNFと膜結合型TNF)の意義(役割分担)に加え、これらTNFに対する2種類の異なるレセプター(TNFR1およびTNFR2)を介した機能の相違等は十分に理解されていない。

現在、慢性関節リウマチに対する特效薬として、TNFに対する中和抗体や可溶性TNFレセプターが、臨床に供されている。これは投与した中和抗体や可溶性レセプターと、生体内に存在するTNFとの間で複合体を形成させ、内因性TNFのすべての活性を遮断する(内因性TNFを枯渇させる)ものである。これら抗TNF蛋白質医薬は、リウマチ患者の

QOLを格段に向上させるなど、切れ味鋭い治療成績を発揮している<sup>5,6)</sup>。しかし上述のように、TNFは本来、宿主の生体防御機構に重要な役割を担っているため、これら抗TNF蛋白質医薬の使用は、結核などの感染症や発がんに対する宿主の抵抗性を減弱させてしまい、臨床現場における大きな懸念事項となっている<sup>7,8)</sup>。事実、今後の科学的検証を必要とするものの、本邦において2007年12月に抗TNF蛋白質医薬投与患者における死亡例が報告されている(因果関係などの詳細を精査する必要あり)。また自己免疫疾患のなかでも、多発性硬化症では、これら抗TNF蛋白質医薬の使用は禁忌となっている<sup>9)</sup>。

前述したように、TNFが結合するレセプターにはTNFR1とTNFR2が存在し、各レセプターが可溶性/膜結合型TNFと作用しつつ、非常に複雑かつ巧妙にその生体内反応が、正負に制御されている。筆者らは現在、病態の発症や悪化に関わるTNF/TNFR結合のみを選択的に阻害できる抗TNF蛋白質医薬(TNFによる宿主の生体防御機構を

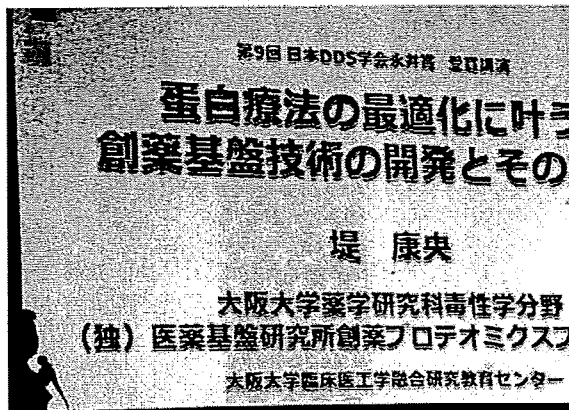


図3 受賞講演

保持したまま、自己免疫疾患を治療できる蛋白医薬)の開発を目指して、可溶型/膜結合型 TNF の TNFR1 もしくは TNFR2 を介した機能を解析し、宿主の生体防御機構や種々炎症反応の惹起・鎮静との連関追求を、産官学の共同研究で実施しており、興味深い知見を集積しつつある。

また、過去のいくつかの報告にもみられるように、可溶型 TNF の TNFR1 を介した過剰な活性発現が炎症反応の惹起・悪化に、可溶型/膜結合型 TNF の TNFR2 を介した活性発現がウイルス感染防御や多発性硬化症の抑制に関与していることが明らかとなりつつある<sup>10-12)</sup>。これは、可溶型 TNF の TNFR1 を介した活性発現を選択的に阻害することができれば、慢性関節リウマチのみならず、多発性硬化症などの自己免疫疾患にも有用かつ安全な医薬品が開発可能であることを示唆するものである。

この点、筆者らはこれまでに、ファージ表面提示法を独自に改良することにより  $10^8$  (1億)種類以上もの多様性を有した構造変異蛋白質(アミノ酸置換体)を一挙に combinatorial biosynthesis し、この構造変異体ライブラリのなかから、レセプター親和性(選択性/特異性)や体内安定性、生物活性を向上あるいは任意に制御した“機能性人工蛋白質”を迅速(2週間以内)かつ効率よく創出できる「蛋白質分子進化システム」を確立している。

本システムは、血中安定性の向上に加え、生物学的改変により特定のレセプターへのターゲティング能を蛋白質に付与できる点で、分子レベルの DDS であり、いわば蛋白医薬による疾病治療の最適化



図4 永井恒司先生からの賞状授与

を目指した“生物学的 DDS”と位置づけられる。そこで本創薬(DDS)テクノロジーを用い、TNFR1 特異的なアンタゴニスト(TNF 変異体)の創出を目的に、TNF の構造変異体ライブラリを網羅的に作製、スクリーニングしたところ、「TNFR2 とは結合せず、TNFR1 に対してのみ野生型 TNF と同等の結合親和性を示す TNFR1 指向性アンタゴニスト(TNF-T2)」を先駆けて創出した。

これまで、生理活性蛋白質の構造変異体が野生型蛋白質により発現する生物活性に対してアンタゴニスト活性を示すという概念すらなく、この「蛋白性アンタゴニスト」ともいふべき TNFR1 指向性アンタゴニストの創出は、独自に構築した基盤テクノロジーを応用することではじめてなしたものである。さらに、N 末端部位特異的に修飾高分子 PEG を導入した PEG 化 TNF-T2(PEG-T2)が、野生型 TNF-T2 と比較して、*in vitro* におけるアンタゴニスト活性を低下することなく、血中滞留性が飛躍的に増大していることを見いだしている。なお、この革新的な部位特異的バイオコンジュゲーション(高分子化学的 DDS)は、前述した生物学的 DDS によって機能性リジン欠損蛋白質を創製することではじめて実現可能になるものであり、両テクノロジーの融合で、従来法の諸問題の克服に成功したものである。

この PEG-T2 は、マウスレベルでの実験において、既存の抗 TNF 蛋白医薬で致命的な問題になっ



図5. ラボのメンバー

ていた宿主の感染防御能の低下を招くことなく、安全に、しかも種々肝炎や関節炎に対して治療効果を発揮すること、そのうえ、いまだ治療薬のない多発性硬化症においても副作用を示すことなく、有効性を発揮することが判明している。すなわち、TNF-T2はTNFR1を介した作用を選択的に阻害することで、生体防御機構の破綻を招くことなく、治療効果を発揮できることから、安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬となりうることが示された。現在、TNF-T2のさらなる有用性を評価すべく、他の自己免疫疾患モデルに対しての治療実験を進めるとともに、霊長類レベルで医薬品化(関節リウマチおよび多発性硬化症を対象)を目指した研究ステージに移行している。

### おわりに

以上、足早ではあるが、本稿では、第25回日本DDS学会学術集会(理事長：橋田 充先生、大会長：松村保広先生)での受賞講演(第9回日本DDS学会永井賞、座長：塚越 茂先生)の内容をまとめさせていただいた(図3、4)。今後、本受賞を励みに、ますます、安全かつ有効なDDS医薬の開発研究に邁進したいと念じている。

第9回日本DDS学会永井賞の受賞に際し、恩師真弓忠範先生(大阪大学名誉教授・神戸学院大学薬学研究科教授)には、ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を終始賜りました。この場をお借りして、厚く御礼を申し上げます。また本発表は、独立行政法人医薬基盤研究所理事長の山西弘一先生、独立行政法人医薬

品医療機器総合機構顧問の早川堯夫先生、大阪大学大学院薬学研究科教授の中川晋作先生にご支援を賜り、角田慎一先生・鎌田春彦先生・阿部康弘先生・長野一也先生(医薬基盤研究所)、岡田直貴先生・吉岡靖雄先生・吉川友章先生・向 洋平先生(大阪大学)、紀平哲也先生(厚生労働省)、柴田寛子先生(国立医薬品食品衛生研究所)、杉田敏樹先生(独立行政法人医薬品医療機器総合機構)、岡本貴行先生(三重大学)、さらには多くの共同研究者の先生方、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の全メンバー、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の学生の皆さんとの成果です(図5)。重ねて御礼を申し上げます。

なお本研究では、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究(No.20015052)、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究B一般(No.21390046)、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業(No.H19-化学一般-005)、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(No.H19-医薬一般-010)、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究(IIS)事業(No.KHC1017)、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業(No.H21-バイオ-指定-005)、文部科学省地域科学技術振興施策知的クラスター創成事業、環境省環境研究・技術開発推進費(地球環境研究総合推進費)、厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業(子H20-子ども一般-002)、財団法人永井記念薬学国際交流財団の支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。

最後になりましたが、種々ご高配を賜りました。