

200940008A
200940008B

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 21 年度 総括・分担研究報告書
平成 19-21 年度 総合報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュ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 21 年度 総括・分担研究報告書
平成 19-21 年度 総合報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

| | | |
|-------------|--|----|
| I-1 | 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 |
| I-2. | 分担研究報告 | 19 |
| 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 | 19 |
| 2. | 各種 HLA の精製と抗原性評価システムの開発 鎌田 春彦 | 23 |
| 3. | 抗原性評価システムの開発 阿部 康弘 | 30 |
| 4. | 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 | 34 |
| 5. | 人工リンパ組織における抗原特異的免疫反応評価に関する研究 末松 佐知子 | 38 |
| 6. | 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 | 40 |
| I-3. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 44 |
| I-4. | 研究成果の刊行物・別冊 | 45 |

II. 総合報告書

| | | |
|--------------|--|-----|
| II-1. | 総合報告 | 69 |
| | 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 | 69 |
| II-2. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 117 |
| II-3. | 研究成果の刊行物・別冊 | 123 |

厚生労働科学研究補助金

医薬品・医療機器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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 年 3 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」

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

抗体医薬やサイトカインに代表されるバイオ医薬品は、これまで有効な治療法のなかった難治性疾患に対する特効薬として、臨床の現場で目覚ましい成績を挙げている。とりわけ、野生型のタンパク質とは構造の異なる“機能性人工タンパク質”を医薬品として応用しようとする試みが近年注目されており、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PEG化タンパク質を一例として考えた場合、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。そこで本研究課題では、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することを目指している。本年度は、タンパク質製剤の抗原性評価法の確立のために必要な要素技術として、抗原性を規定するリンパ組織の構成細胞であるリンパ管内皮細胞の特性評価、抗原性発揮の原因となる変性タンパク質の立体構造とその生物活性との連関評価、リンパ球などの免疫細胞に対する変性タンパク質の影響、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
鎌田 春彦 独立行政法人医薬基盤研究所
阿部 康弘 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
未松 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

A. 研究目的

慢性関節リウマチの治療薬として利用される抗TNF薬に代表される抗体医薬、C型肝炎の治療薬として利用されるインターフェロン製剤など、タンパク質を医薬品として利用したバイオ医薬の台頭が近年目覚ましい。過去を振り返っても、血液製剤やインスリンなどの精製タンパク質も、古くから臨床応用されており、目覚ましい治療成績をあげている。

これら第一世代のタンパク質製剤や抗体医薬を代表とする第二世代のタンパク質製剤、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などにおいて熾烈を極めていますが、このようなタンパク質製剤の承認審査、臨床治験の推進、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、立ち後れていると言わざるを得ない。したがって、機能性人工タンパク質を含むバイオ医薬品を、安全かつ有効な医薬品として実用化するためには、科学的かつ適正な承認審査の指針など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。特に、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医薬とは異なる。例えば PEG

化タンパク質製剤の場合、PEG をタンパク質中のアミノ酸にランダムに化学的修飾した、分子的・機能的に不均一なものであり、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、依然として服すべき課題が多く残されている。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などで要求されてきた製造・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 などの結合部位・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連関評価、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、その安全性を左右するタンパク質製剤の抗原性などを、質量分析等を駆使した立体構造解析を利用して、高感度な安定性評価法、抗原性試験法を新たに確立しようとするものである。また、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組織に着目し、リンパ管内皮細胞の特性評価、さらに遺伝子導入技術等を駆使して人工的に作製・模倣した *in vitro* 人工リンパ組織の機能評価システムの作製やその機能評価法を、タンパク質製剤の抗原性評価法に応用するものである。

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

2D-DIGE 解析

通常培養環境下、もしくは肺がん細胞 RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ の Condition Medium (CM) で培養したリンパ管内皮細胞 HMVEC-LLy ライセートをサン

プルとして用いた。サンプル各 50 μ g 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 分間静置して反応を停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT、2% pharmalyte (Amersham)、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、ラベル化試薬で標識してい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 4-7) ストリップ (Amersham) を入れ、oil を重層した。ETTAN IPGPhor (Amersham) 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'-diallyl-tartardiamide gels) に IPG-gel スリップをセットした。アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (Amersham) 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) を使用した。抗体作製用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% acetone (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振盪させた後、脱色液を取り除くことで脱色を行った。続いて 200 μ l の 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 trypsin 溶液 (20 μ l/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を抽出した。このペプチド抽出液を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 Anchor Chip (BRUKER DALTONICS) に滴下し、乾燥後、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た。

B-2. 各種 HLA の精製と抗原性評価システムの開発 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 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 培地を用いた。

タンパク質の変性

今回の測定にあたって、用いるタンパク質は乳がんの分子標的医薬品として臨床応用されている抗 HER2 抗体であるトラスツズマブと抗リウマチ薬として利用されている TNFR2 chimera タンパク質のエタネルセプトを用いた。タンパク質の熱変性は、各タンパク質医薬品を、95°C あるいは 80°C に加熱した湯浴内で加温し、0、5、15、45 分間加熱し、その後、氷上にて急冷したものをサンプルとして用いた。なお、今回の検討では、サンプルの脱塩処理は行っていない。

IM-MS (Ion Mobility Mass Spectrometry) を用いた変性タンパク質の分離

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。

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。

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。

B-3. 抗原性評価システムの開発

細胞

ヒト単球細胞株 (THP-1) の培養には、10% FCS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む RPMI-1640 培地を用いた。

タンパク質の変性

今回の測定にあたって、用いるタンパク質は乳がんの分子標的医薬品として臨床応用されている抗体医薬の一つである、トラスツズマブを用いた。タンパク質の熱変性は、各タンパク質医薬品を、95 °C で 20 分間加熱し、その後、氷上にて急冷したものをサンプルとして用いた。

変性タンパク質による刺激

24 穴プレートにヒト単球細胞株 THP-1 細胞を 5×10^5 cells/well で播種し、熱変性処理したトラスツズマブを最終濃度 200 µg/ml、あるいは 20 µg/ml となるように加え、共刺激した。また、陰性コントロールとして、非加熱のトラスツズマブ 200 µg/ml の濃度で刺激する群も作製した。さらに、PMA (6.25 ng/ml) にてマクロファージ様に分化させた細胞に対しても同様の検討を行った。24 時間後、細胞懸濁液を 1.5 mL チューブ上清を回収し、3500 rpm の速度で遠心後、その上清をサンプルとして以下の検討に使用した。

IL-1βの測定

加熱変性させたハーセプチンにて刺激した THP-1 より産生される IL-1β の産生量は、ELISA (OptEIA™, human IL-1β ELISA Set II) にて評価した。サンプルおよびスタンダードの希釈に関しては、4% Block Ace (DS ファーマバイオメディカル) を用いた。また発色基質は、TMBZ solution (ナカライテスク株式会社) を用い、1N H₂SO₄ を反応停止液として用いて、マイクロプレートリーダーにて 450 nm の吸収波長を測定した。

B-4. アデノウイルスなどを用いたサイトカイン産生システムの開発

ルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターの作製

ルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクター Ad-L(E1)、Ad-L(E3) を in vitro ライゲーション法により作製し、塩化セシウム密度勾配遠心を用いた常法により精製した。Ad-L(E1) は従来型のアデノウイルスベクターで、E1 欠損領域に CMV プロモーターでドライブされたルシフェラーゼ発現カセットを有している。Ad-L(E3) は RCA 出現を抑えたアデノウイルスベクターであり、E3 領域に CMV プロモーターでドライブされたルシフェラーゼ発現カセットを有している。精製したアデノウイルスベクターの物理学的力価 (VP) は分光学的方法により、生物学

的タイター (ifu/ml) は Adeno-X rapid titer kit (ク
ロンテック社) を用いて測定した。

ルシフェラーゼ活性の測定

A549、SK HEP-1 細胞にアデノウイルスベクターを
5 ifu/cell で 1.5 時間作用させ、48 時間培養後にル
シフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性
は luciferase assay system (PicaGene LT2.0;
Toyo Ink)を用いて測定した。

B-5. 人工リンパ組織における抗原特異的免疫反応 評価に関する研究

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) リンパ球が
集積し、3 週間以内に適応免疫機能を発揮する人工
リンパ組織が構築される。

人工リンパ組織への免疫細胞や抗原などの輸送
ルートとなる脈管系 (血管とリンパ管) の形成を調
べるために、経時的に人工リンパ組織を回収して組
織切片の免疫組織学的解析とホールマウント免疫
組織解析を行った。リンパ管形成については機能
的なリンパ管であるかどうかを調べるために
lymphangiography を行った。また前述の①-③
を合わせて腎皮膜下移植 3 週間後の人工リンパ
組織 (3-week-old aLT) に集積するリンパ球に
発現するリンパ球ホーミングレセプター (CCR7
及び CD62L) の発現をフローサイトメトリーに
より解析した。さらに、卵白アルブミン (OVA)
特異的 T 細胞受容体を発現させたトランスジェニ
ックマウス (DO11.10 Tg マウス) を用いて人工
リンパ組織に集積するリンパ球の抗原 (OVA) 特

異的反応をインターフェロン γ (IFN- γ) ELISPOT
assay により検討した。

B-6. 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

タンパク質製剤の熱処理

21 mg/ml のトラスツズマブを 95°C で 20 分間加熱
処理した。

変性タンパク質の IL-1 β 産生に及ぼす影響

24 穴プレートにヒト単核球細胞株 THP-1 細胞を 2×10^4 cells/well で播種し、0.5 μ g/ml LPS と熱変
性処理したハーセプチンを最終濃度 50 μ g/ml、100
 μ g/ml、200 μ g/ml となるように加え、共刺激した。
48 時間後、上清を回収し、IL-1 β 量を ELISA kit (BD,
OptEIA human IL-1 β) にて測定した。

変性タンパク質刺激による IL-1 β 産生のシグナル伝 達経路の解析

24 穴プレートにヒト単核球細胞株 THP-1 細胞を
 5×10^4 cells/well で播種し、0.5 μ g/ml LPS と熱変
性処理したハーセプチンを最終濃度 200 μ g/ml と
なるように加えた。そこに PKC Inhibitor として知
られる Gö6983 を 100 ~ 1 nM の濃度で加え、48
時間培養後の培養上清に産生された IL-1 β 量を
ELISA kit にて測定した。

C. 研究結果

C-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

近年、リンパ組織を介した癌転移について注目が集
まっており、病態形成と正常リンパ管の性質を比較
することで、リンパ管の持つ役割をより詳細に検討
することができるものと考えられる。特に、がん組
織においては、リンパ管の存在が認められるものの、
一般にがん組織における免疫が低下していることも
知られており、免疫低下のメカニズムとリンパ管内

皮細胞の関係性も注目されている。そこで本研究では、抗原性を規定しているとされる、リンパ管内皮細胞の性質をより詳細に調べるため、リンパ管内皮細胞関連マーカータンパク質候補の探索を行った。特に本研究では、正常組織におけるリンパ管内皮細胞の性質と、疾患状態におけるリンパ管内皮細胞の性質を比較するため、通常培養したリンパ管内皮細胞と低リンパ節転移肺がん細胞 RERF-LC-MS、及び高リンパ節転移肺がん細胞 RERF-LC-KJ の Condition Medium (CM) で培養したリンパ管内皮細胞のそれぞれから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 1)。その結果、通常培養したリンパ管内皮細胞に比べ、高リンパ節転移肺がん細胞の CM で培養したリンパ管内皮細胞で有意に発現増加した 14 個の spot に対して、MS 解析によるタンパク質の同定に成功した (表 1)。今後、これらの性質の違いをより詳細に検討することで、抗原性を規定するリンパ管内皮細胞、ならびにリンパ組織の性質を明らかにしたいと考えている。

C-2. 各種 HLA の精製と抗原性評価システムの開発

前年度までの検討で、臨床応用されている 2 種類のタンパク質医薬である、エタネルセプトとトラスツズマブを用いた検討を行い、各種変性条件によって、タンパク質医薬の活性低下に依存して、タンパク質の構造も変化する様子を観察することができている。そこでまず、抗体医薬として知られるトラスツズマブと TNFR2 キメラタンパク質のエンブレルの立体構造の違いを、IM-MS にて解析した (図 2, 3)。エンブレルは、これまでの検討結果から、一部糖鎖が付加され、複雑な立体構造を取っていることが示唆されており、実際に観察された、抗体そのものであるトラスツズマブよりもドリフトグラムが複雑であった。そのため、熱変性による立体構造の変化が顕著には表れなかったものと考えられる。その一方、糖鎖が結合していないトラスツズマブは比較的単純なドリフトグラムを示し、また熱変性においても、

幾つかの特徴的なパターンを示すことが明らかになった。

特に、本研究結果からは、28 価のイオンの状態におけるモビリティに顕著な変化が見られたために、その価数のイオンに着目した (図 4)。

図 4 B に典型的なモビリティの概念図を示した。通常、非変性の抗体は、二峰性のスペクトルを示し、スキャン数の小さい (分子サイズが小さい: ピーク A) ものと、それよりもスキャン数が多い (分子サイズが大きい: ピーク B) ものが、二種類混在している。非変性のものは、分子サイズの小さいものが主体であり、変性により、分子サイズが大きいものが増加する傾向にあった。また、分子サイズの小さいものも、詳細に観察すると、少し、大きな分子サイズにシフトしており、スキャン数がやや大きい部分にピークが出現していた。

一方で、この熱変性による抗体医薬の薬理活性の低下を BT-474 細胞を用いたバイオアッセイにて検討した (図 5)。80 °C で、5~45 分の範囲で、加熱した結果、加熱する時間に依存して、薬理活性の顕著な低下が観察された。

上記、二つの結果を総合的に解析するために、以下のモデルを構築した。まず、スキャン数の少ないタイムスケールに出てくるピーク A のドリフトタイムとその後に出てくるピーク B の谷の差 (Valley of Peak B/Height of peak B) について各変性タンパク質のドリフトグラムから算出した値を比較した (表 2)。さらに、図 5 の結果から算出した IC₅₀ の値をまとめた (表 2)。その結果、活性の低下は、加熱後 5 分という短期間で観察され、その活性の低下は、ピーク A のドリフトタイムの変化と相関する傾向にあった。また、その変化は、Valley of Peak B/Height of peak B とも相関しており、これらのスペクトルの変化と活性の変化には、何らかの相関がある可能性が示唆された。しかし、これらの変化は、検出されるイオン強度とも相関しており (表 2)、今後より詳細な検討が必要であることが示唆された。

C-3. 抗原性評価システムの開発

これまでの検討から、95 °Cで 20 分以上加熱することで、トラスツズマブの変性が確認できることから、この条件で変性させたトラスツズマブを単核球細胞株である THP-1 に添加した。その結果、24 時間後の上清中に、炎症性サイトカインの IL-1 β の産生が確認された (図 6)。また、この IL-1 β の産生は添加した変性トラスツズマブの濃度依存的なものであることが確認できた。それに加えて、PMA にてマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞に対して、変性トラスツズマブを加えた検討を行った (図 7)。PMA によって分化を誘導することで、IL-1 β の産生は、約 40 倍に増加することが明らかになった。さらに PMA 刺激の場合でも、変性トラスツズマブを加えることで、同様の結果が得られた。その一方で、変性させていないトラスツズマブに関しては、THP-1 細胞からの IL-1 β の産生は確認できなかったが、PMA にて分化させた場合においては、変性させていない場合においても若干の産生上昇が認められた。以上の結果から、変性させたトラスツズマブは、単核球、あるいはマクロファージから炎症性サイトカインを誘導し、それに伴う炎症の惹起が起こる可能性が示された。

C-4. アデノウイルスなどを用いたサイトカイン産生システムの開発

Ad-L(E1)、Ad-L(E3)を 7 継代まで増幅させ、150 mm dish (サブコンフルエントの 293 細胞を播種) 5 枚からそれぞれのアデノウイルスベクターを回収、精製 (塩化セシウム密度勾配遠心を 2 度) した。各ロットのアデノウイルスベクターについて物理学的力価を測定したところ、Ad-L(E1)、Ad-L(E3)は同程度であり (図 8)、RCA 出現しない新規アデノウイルスベクターは、従来のアデノウイルスベクターと同等の高力価のベクター調製が可能なが判明した。つぎに、遺伝子発現への影響について、A549 細胞、

SK HEP-1 細胞にそれぞれのアデノウイルスベクター (Ad-L(E1)、Ad-L(E3)) を作用させた (図 9)。その結果、A549 細胞の場合には、Ad-L(E1)と Ad-L(E3)とで同程度のルシフェラーゼ発現を示したが、SK HEP-1 細胞においては、Ad-L(E1)の方が Ad-L(E3)に比べ、約 2 倍程度高いルシフェラーゼ活性を示した。従って、細胞種により目的遺伝子の発現の程度は若干異なるものの、ベクター (Ad-L(E1)、Ad-L(E3)) 間で、遺伝子やタンパク質の機能解析研究に影響を及ぼすほどの劇的な遺伝子発現効率の違いはないことが明らかとなった。

C-5. 人工リンパ組織における抗原特異的免疫反応評価に関する研究

人工リンパ組織に形成される血管とリンパ管の発生を経時的に解析した結果、腎皮膜下移植後 5 日目の人工リンパ組織切片には成熟した小血管の形成が見られ、10 日目には組織切片全体に血管が散在ようになる。ホールマウント免疫組織解析の結果をスコア化し血管とリンパ管形成を評価したところ、全ての 2-week-old aLT で血管がよく発達しているのに対して、リンパ管は約半数に少数のリンパ管が形成されているに過ぎなかった。全ての人工リンパ組織でリンパ管が観察されたのは 5-week-old の人工リンパ組織であった。また、コラーゲンスポンジ (③) のみの腎皮膜下移植と①-③を合わせた腎皮膜下移植を比較した結果、ストローマ細胞と BMDC を加えた方が有意に脈管形成が増強されること、それも移植後 2 週までの血管形成が特に促進されることが分かった。これらのことから人工リンパ組織では i) 血管形成よりもリンパ管形成には時間がかかること、および ii) ストローマ細胞と BMDC を加える事により早期の血管形成が進む事は人工リンパ組織へのリンパ球集積に関与する可能性が示された。

人工リンパ組織でのリンパ管が機能的であるかどうかを Evans blue lymphangiography で調べた

ところ、人工リンパ組織に形成されるほとんどのリンパ管でのリンパの流れは遠心性、すなわちリンパ節の輸出リンパ管に相当することが分かった。また、免疫組織学的解析により、抗原特異的抗体産生細胞を含むリンパ球が管腔内に存在するリンパ管が存在したことから、リンパ球や抗体が輸出リンパ管を通過して人工リンパ組織から外部へ供給されることが分かった。

リンパ節内への主たるリンパ球流出経路は高内皮細静脈 (HEV) と呼ばれる特殊な血管であることがよく知られている。今回、人工リンパ組織の血管を詳しく解析した結果、人工リンパ組織は HEV に類似した形態を有し、HEV に付随するケモカインや ICAM-1 を強く発現しているにも関わらず HEV マーカーでもある vascular addressin の発現がほとんど見られない特殊な血管が形成される事が分かった。HEV 上での vascular addressin の発現は多くのリンパ球 (抗原に出会った事のないリンパ球や一部のメモリー細胞) がリンパ節内に流出する際に重要であることが分かっている。そこで人工リンパ組織内のリンパ球上のホーミングレセプター (CCR7 及び CD62L) の発現を調べたところ、CCR7⁺CD62L⁺ T 細胞の割合が脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織に比べて有意に高いことが明らかになった。

次に人工リンパ組織に抗原特異的リンパ球が選択的に集積するかどうかを OVA で免疫した DO11.10 Tg マウスで構築した人工リンパ組織から細胞を回収して *in vitro* で OVA ペプチドで刺激後に IFN- γ 産生細胞数を ELISPOT assay で検討した結果、人工リンパ組織には脾臓やリンパ節に比べて OVA ペプチド刺激特異的に IFN- γ を産生するリンパ球の割合が数十倍以上であることが分かった。

C-6. 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

タンパク質製剤のモデルとして、トラスツズマブ

を用いた。タンパク性医薬品は、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、トラスツズマブを人工的に熱処理し、変性タンパク質が免疫細胞に与える影響を評価した。トラスツズマブを 95 °C で 20 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。次に、これら変性タンパク質の免疫細胞に与える影響を検討した。熱処理したトラスツズマブを、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞に加え、48 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、LPS 刺激にて IL-1 β 産生はやや増加する傾向が認められた。さらに変性タンパク質を添加することで、より強い IL-1 β 産生が認められ、添加したタンパク質の濃度依存的な IL-1 β 産生の増加が観察された (図 10)。一方、熱変性を行わなかったタンパク質では、IL-1 β 産生の増加が認められなかったことから、タンパク質の変性が IL-1 β の産生を増加させることが明らかになった。

この、IL-1 β 産生の増加がどのようなシグナル伝達経路で行われているのかを検討するために、まずプロテインキナーゼ C の阻害剤として知られる Gö6983 を用いて、そのシグナル伝達に関する検討を行った (図 11)。その結果、添加した Gö6983 の濃度依存的な IL-1 β 産生の低下が認められた。また、単独の Gö6983 の添加では、LPS 添加に伴う IL-1 β 産生を抑制しなかったことから (データには示さず)、この PKC を介した IL-1 β 産生は、変性タンパク質からのシグナル伝達にのみ関与することが示唆された。以上の結果から、今後より詳細な検討は必要なものの、トラスツズマブの熱処理により免疫細胞を活性化する可能性が示唆され、このシグナル伝達の一部は PKC が関与する可能性が示唆された。

D. 考 察

D-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

リンパ組織に存在する、樹状細胞（DC）やリンパ球などの各種細胞が、外来抗原に対する免疫を制御することが知られており、中でもリンパ組織を構成するリンパ管内皮細胞の性質に注目が集まっている。特に、リンパ管内皮細胞は、最近までそのマーカーが不明であったことから、組織内における役割など、詳細な機能が明らかになっていなかった。近年、リンパ管内皮細胞の重要な性質として、プロフェッショナルな抗原提示細胞として知られる DC の、リンパ組織への移動（トラフィッキング）が、抗原性を規定する重要な役割であることが明らかになりつつあり、組織内のリンパ管内皮細胞の性質を詳細に解析することは極めて重要な課題である。特に、がん組織には最近まで、リンパ組織としての構造が存在しないとされてきたが、近年の研究結果からも、リンパ管内皮細胞は存在しながら、免疫の活性化が起こらない結果、がん組織の増大が認められることが明らかになってきた。本研究では、リンパ管内皮細胞の性質を詳細に調べるために、プロテオーム解析を行うことで検討した。今後、この結果をもとにして、リンパ組織とリンパ管内皮細胞の性質を明らかにし、外来性のタンパク質に対する抗原性がどのように規定されているのかを検討したいと考えている。

D-2. 各種 HLA の精製と抗原性評価システムの開発

イオンモビリティは、同一の分子量を持ちながら、見かけの分子サイズが異なる分子の分離に利用される方法として知られている。すなわち、測定時におけるスキャン時間が増大すると相関して、分子サイズが大きくなる傾向にある。本結果では、図 4 の結果からも明らかのように、変性させた抗体医薬のモビリティは、全体的に後半へとシフトし、その結果からも分子サイズとしては、増大している可能性が示された。タンパク質の構造は一般的に、シヤペロンなどの機能により、低エネルギー状態に収束するよう折りたたまれるが、熱などによる変性が

起きると、それよりもエネルギーの高い状態（不安定な状態）へとシフトし、見かけの分子サイズが増大する傾向になることが知られている。本測定結果は、それを裏付ける結果ともとれることから、今後、これらの変性タンパク質と IM-MS を用いたタンパク質の立体構造解析を推進し、より多くの情報を得たいと考えている。

D-3. 抗原性評価システムの開発

熱変性に伴いタンパク質は、立体構造の変化が引き起こされることが知られている。特に、加熱などによりタンパク質はその本来持っている構造が崩れ、一般的にアミロイドと呼ばれる凝集体を形成することが古くから知られている。このアミロイド凝集は、疾患の原因にもなっており、特にアルツハイマー病におけるβアミロイドの沈着がよく知られるところである。このアミロイド凝集は、脳内のマクローファージの一種であるミクログリア細胞の活性化を引き起こし、脳組織における炎症を誘導する可能性が報告されている。このアミロイドによる細胞の刺激メカニズムに関しては、現在様々な検討が行われ、アミロイドタンパク質に対する受容体が明らかになりつつある。アミロイドタンパク質は、生体内に存在する酸化型 LDL 受容体の CD36 を介してシグナル伝達を起こす可能性が示唆されており、その役割が注目されている。本検討課題では、トラスツズマブが熱変性によりアミロイドを形成し、THP-1 を活性化した可能性があることから、今後、これら細胞の膜表面上に発現していると考えられる CD36 などの検出を行いたいと考えている。また、最近の研究から、抗体医薬の抗原性に関して、様々な仮説が考えられている。特に、完全ヒト化抗体に対する抗体（human-anti humanized antibody: HAHA）反応も知られており、その抗体の出現メカニズムが議論されている。Jiskoot W らは、この HAHA の出現は、その抗体医薬に含まれる凝集体（aggregates）の有無によって引き起こされるものと推測しており、今

回、我々が検討した結果と相関する可能性がある。特に、本研究課題で用いたマクロファージ様細胞は、抗原提示細胞としての役割も持つことから、IL-1 β の産生とともに、各種免疫担当細胞（T cell、B cell など）に、この抗体に対する免疫反応性を惹起し、抗体産生へと誘導している可能性も考えられる。今後、本研究を通じて、より詳細な免疫活性化メカニズムに関して検討を行いたいと考えている。

D-4. 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

Ad-L(E1)、Ad-L(E3)の遺伝子発現能、ベクター収量について検討したところ、ベクター収量については、RCA 出現しない新規アデノウイルスベクターは、従来のアデノウイルスベクターと同等であったが、遺伝子発現については細胞種により両者の活性が異なるという結果が得られた。本研究で用いた RCA 出現しない新規アデノウイルスベクター（Ad-L(E3)）では、アデノウイルスゲノムの 28593bp 部位に遺伝子発現カセットが挿入されており、この部位に外来遺伝子を挿入しても、Adenovirus Death Protein (ADP)の発現には影響を与えないため、通常の E3 領域を欠損したアデノウイルスベクターに比べ、ウイルス増幅が容易で高タイトターのベクターが得やすいという特徴を有する。一方、28593bp 部位の両端には、複数の E3 遺伝子が存在しており、これらの E3 遺伝子の発現により外来遺伝子発現カセットの遺伝子発現が細胞種により影響を受けた可能性が考えられる。本研究では検討していないが、RCA 出現しない新規アデノウイルスベクターとして E3 遺伝子を欠損し、その領域に外来遺伝子を挿入できるベクター系も我々は開発済みであり、そのようなベクターを用いれば、遺伝子発現の結果は今回とは異なってくることも考えられる。また、E3 領域を含んだアデノウイルスベクターにおいても、28593bp 部位以外の E3 領域にクロニング部位を導入すれば、遺伝子発現は異なってくる

ことも考えられる。いずれにせよ、E3 領域に外来遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターについても、従来型の E1 領域に外来遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターと劇的な遺伝子発現の違いは認められず、本新規アデノウイルスベクターは、従来のアデノウイルスベクターと同様に優れた遺伝子導入ベクターとなりうる事が明らかとなった。

D-5. 人工リンパ組織における抗原特異的免疫反応評価に関する研究

人工リンパ組織にはリンパ節や脾臓とは異なる特殊な血管（HEV に似ているが vascular addressin の発現がほとんどない）が形成される。血中を流れる大多数のホーミングレセプター陽性リンパ球（抗原に出会った事のないリンパ球や一部のメモリー細胞）はこの特殊な血管を介して人工リンパ組織内に流出することができないと考えられる。その代わりにホーミングレセプター陰性のリンパ球（CCR7⁺CD62L⁻T 細胞であるエフェクターあるいはエフェクターメモリータイプのリンパ球）が流出して人工リンパ組織に選択的に集積する結果となるのであろう。これが人工リンパ組織による強い適応免疫反応誘導メカニズムの本態であると考えられる。

D-6. 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

本年度は昨年度に引き続き、トラスツズマブをモデル抗体医薬として用い、熱処理によるタンパク質変性と、変性抗体が免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、熱処理により誘発されたタンパク質変性が、マクロファージを活性化し、IL-1 β を産生する可能性が示唆された。最近の研究から 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し免疫を活性化させるだけでなく、自然免疫の観点からも注目されている。一方で、熱処理にともなうタンパク質の変性も注目される場所である。特に、変性にともな

タンパク質のアミロイド形成は、さまざまな疾患の発症に作用するだけでなく、炎症の惹起にも関与することが知られつつある。今回示したマクロファージなどの細胞は、CD36 などの受容体を通じて、変性タンパク質を回収するとともに、炎症を惹起し、生体の防御機構を作動させることが知られている。また、古くから知られるアルツハイマー病発症にもβアミロイドが関与し、ミクログリアなどからのIL-1β産生を誘発することも、アルツハイマー病の悪化に関与するとの報告がなされている。従って、タンパク質製剤の変性によっても、IL-1β産生に引き続き免疫反応が誘導される可能性が示されると同時に、予期せぬ副作用の原因になる可能性も考えられる。今後、より詳細な検討が必要になるものと考えられる。

E. 結論

本研究では、タンパク質製剤の抗原性評価方法の確立に向けて必要となる要素技術として、タンパク質の細胞内導入技術、人工リンパ組織構築有用となるリンパ管内皮細胞の特性解析に向けた基礎検討を行い、タンパク質の細胞内への効率的導入を可能とするペプチドの創製、リンパ管誘導制御法の開発に向けての評価系に関する有用な知見を得ることができた。中でも、変性した抗体医薬等のタンパク質は、リンパ組織の存在する免疫担当細胞の活性化を惹起する可能性が示唆された。さらに、人工リンパ組織が二次リンパ組織よりも効率よく抗原特異的免疫反応を示すことを具体的に証明し、そのメカニズムが人工リンパ組織内での抗原特異的エフェクターおよびエフェクターメモリータイプT細胞の濃縮による可能性を示す結果が得られた。このような人工リンパ節の作製に必須の遺伝子導入技術として、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を行い、E3領域に外来遺伝子を挿入したRCAを生じないアデノウイルスベクターは、従来のアデノウイルスベクターと同様に優れた遺伝子導入ベクタ

ーとなりうることを明らかとすることができた。

一方、タンパク質製剤の最大の問題でありながらも、未だ検討方法が確立されていない“タンパク質の抗原性評価方法の開発”を念頭に、抗原性を規定する原因の一つと考えられているタンパク質の構造情報に関する基礎情報を得るための基礎情報の集積を行い、タンパク質変性状態ならびに分子不均一性を直接観察しうる、高性能質量分析装置を利用することで、タンパク質の構造情報と変性状態にあるタンパク質の割合が簡便かつ同時に、解析・評価できる可能性が示唆された。今後、本研究課題により解明された情報を元に、機能性人工タンパク質製剤等に科学的合理性と社会的正当性を付与するためのレギュレーションを定めるための技術基盤の確立につなげていきたいと考えている。

E-6. 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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. 堤 康央：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., Drug Delivery System, 24(5):514-521, 2009.

②学会発表

国内学会発表

1. 鎌田春彦, 廣瀬賢治, 阿部康弘, 角田慎一, 堤康央：イオンモビリティ質量分析法によるタンパク質医薬品の構造と活性の連関解析., 第57回日本質量分析総合討論会, 大阪 2009年5月
2. 鎌田春彦, 廣瀬賢治, 阿部康弘, 角田慎一, 堤康央：イオンモビリティ質量分析法を用いたタンパク質医薬品の品質管理に向けた基礎検討., 第9回日本タンパク質科学会年会, 熊本

2009年5月

国際学会発表

1. Kamada H, Roesli C, Fugmann T, Tsunoda S., Tsutsumi Y. Neri D.: On resin deglycosylation and cysteine modification improve sequence coverage of biomarker proteins, The 18th International Mass Spectrometry Conference, Bremen (Germany), 30 August - 4 September, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当無し

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

吉川友章、長野一也、橋野のぶよ、山根美紀、鍋師裕美、野村鉄也、萱室裕之、山下琢矢、赤瀬貴憲、岡村賢孝、仲里泰太郎、松山恵吾、山下浩平、吉田徳幸、東阪和馬、栃木彩恵子、渡邊貴信、藤村真穂、有田修平、真部詩織、平井敏郎、近藤小百合、金崎聡一郎、古屋 剛、森下裕貴

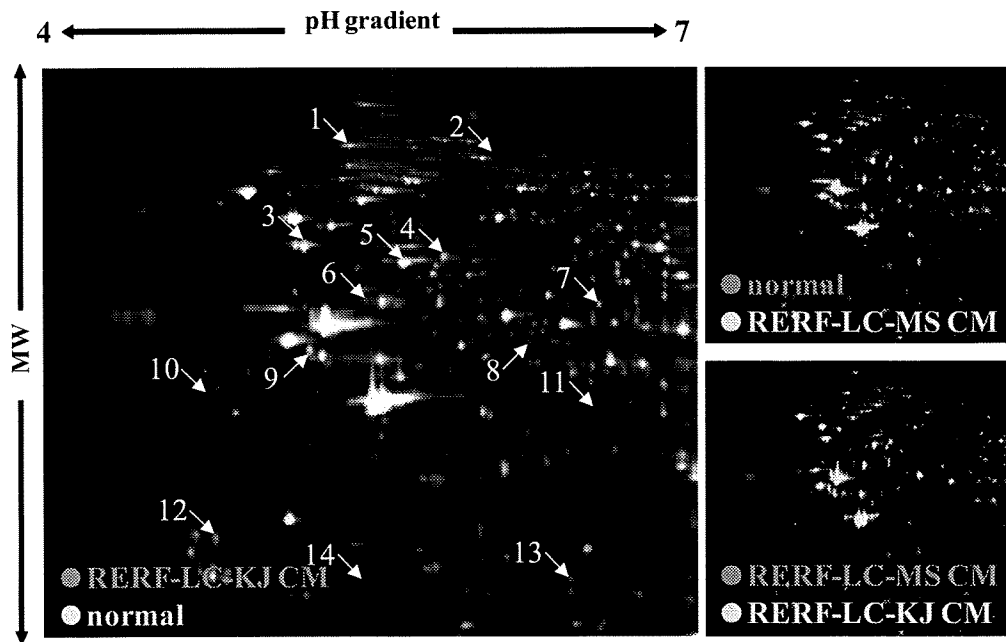


図 1 肺がん細胞由来の馴らし培地 (CM) を作用させたリンパ管内皮細胞の 2 次元蛍光電気泳動像

表 1 タンデム質量分析機を用いた CM 刺激リンパ管内皮細胞由来タンパク質

| spot | protein name | MW | pI | high metastasis CM / normal | high metastasis CM / low metastasis CM |
|------|--|--------|------|-----------------------------|--|
| #1 | Hypoxia up-regulated 1 (HYOU1) | 111266 | 5.16 | 1.7-fold ↑ | 1.1-fold ↑ |
| #2 | Mitochondrial lon peptidase 1 | 106422 | 6.01 | 3.8-fold ↑ | 1.4-fold ↑ |
| #3 | Protein disulfide isomerase-associated 4 | 72887 | 4.96 | 1.8-fold ↑ | 1.1-fold ↑ |
| #4 | Heat shock 70kDa protein 9 precursor | 73635 | 5.87 | 1.7-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #5 | Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 | 70854 | 5.37 | 1.6-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #6 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNPK) | 47528 | 5.46 | 2.0-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #7 | Thioredoxin reductase GRIM-12 | 54580 | 6.36 | 1.8-fold ↑ | 1.5-fold ↑ |
| #8 | Mitochondrial dihydrolipoamide succinyltransferase | 48657 | 9.01 | 1.9-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #9 | Vimentin | 53619 | 5.06 | 1.9-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #10 | Reticulocalbin 1 | 38866 | 4.86 | 1.9-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #11 | Galactokinase 1 | 45329 | 6.24 | 1.9-fold ↑ | 1.1-fold ↑ |
| #12 | Tropomyosin 3 isoform 2 | 29015 | 4.75 | 2.0-fold ↑ | 1.5-fold ↑ |
| #13 | Chain A, The Crystal Structure Of Human Echs1 | 31019 | 6.09 | 1.9-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |
| #14 | C21orf66 protein | 21643 | 5.23 | 1.7-fold ↑ | 1.2-fold ↑ |

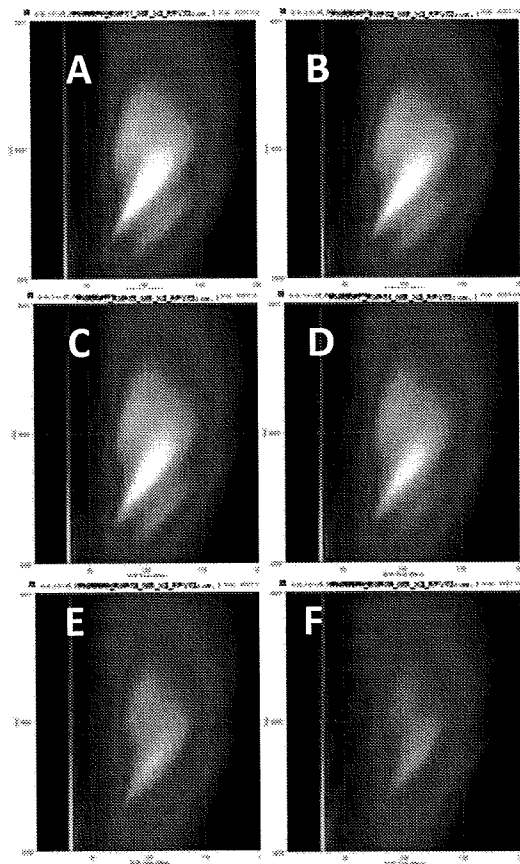


図2 IM-MS を用いて測定した熱変性エタネルセプトのスペクトル

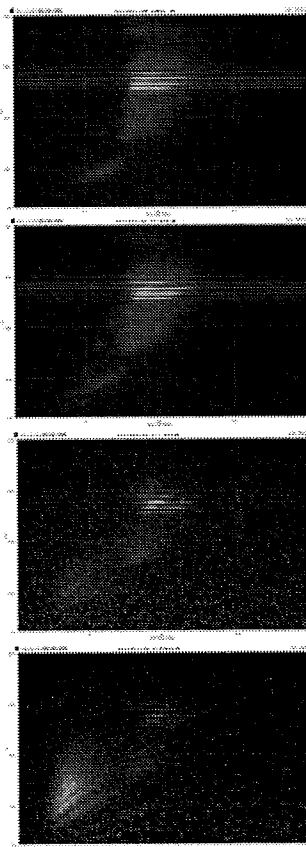


図3 IM-MS を用いて測定した熱変性トラスツズマブのスペクトル

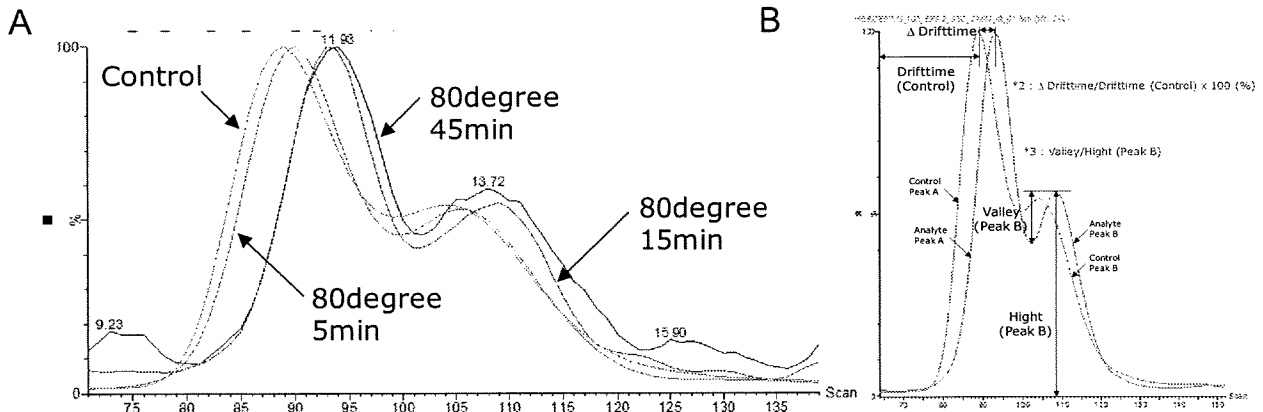


図 4 28+イオンに着目した、変性あるいは非変性トラスツズマブのモビリティ

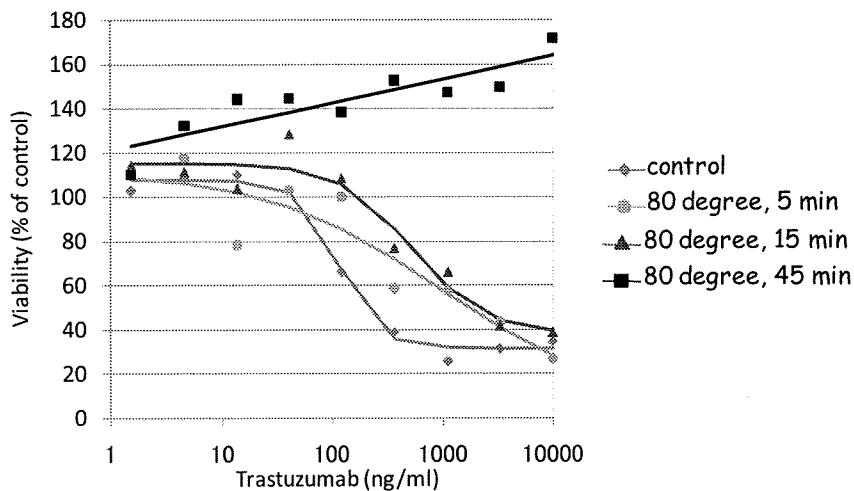


図 5 熱変性に伴うトラスツズマブの活性低下に及ぼす影響

表 2 トラスツズマブの活性変化とドリフトグラムの関係性

| Sample | Activity | | Driftgram similarity | | | |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | IC ₅₀ value (μg/ml) | Relative activity (% vs Control) | Δ drift time of Peak A (% vs Control) | Δ drift time of Peak B (% vs Control) | Valley of Peak B /Height of peak B | Ion intensity (% vs Control) |
| Control | 125.7 | 100.0 | - | - | 0.064 | 100.0 |
| 80 degree, 5 min | 838.8 | 15.0 | 1.1 (1 scan) | 1.9 (1 scan) | 0.140 | 50.8 |
| 80 degree, 15 min | 1045.2 | 12.0 | 4.5 (4 scan) | 4.8 (4 scan) | 0.286 | 12.3 |
| 80 degree, 45 min | (>10000) | (<1) | 5.7 (5 scan) | 3.8 (5 scan) | 0.219 | 5.4 |

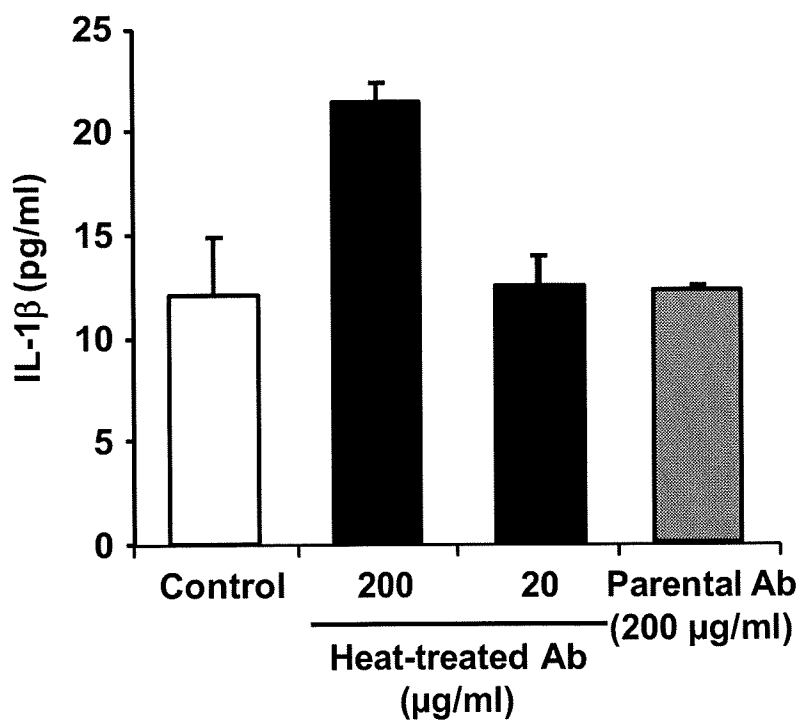


図6 変性トラスツズマブの THP-1 細胞由来 IL-1β産生に及ぼす影響

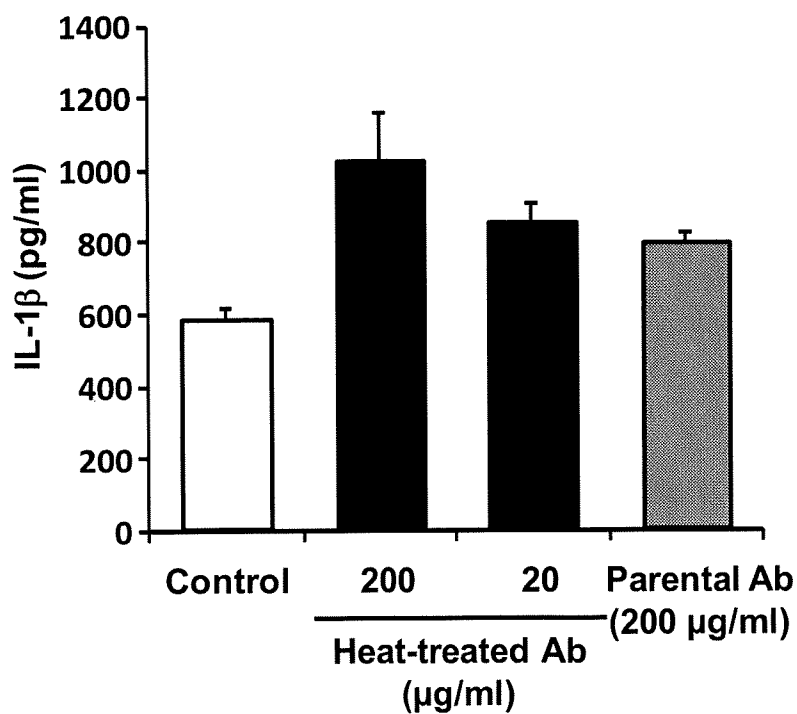


図7 変性トラスツズマブの PMA 刺激 THP-1 細胞由来 IL-1β産生に及ぼす影響