

図8 Ad-L(E1)とAd-L(E3)の収率

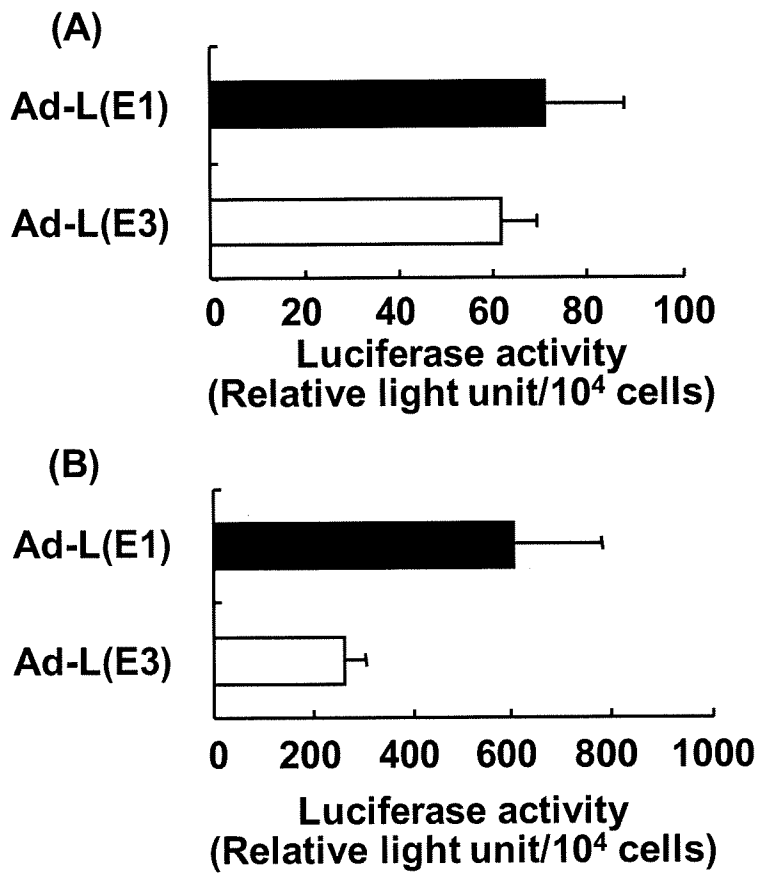


図9 Ad-L(E1)とAd-L(E3)にて添加したルシフェラーゼ活性の比較

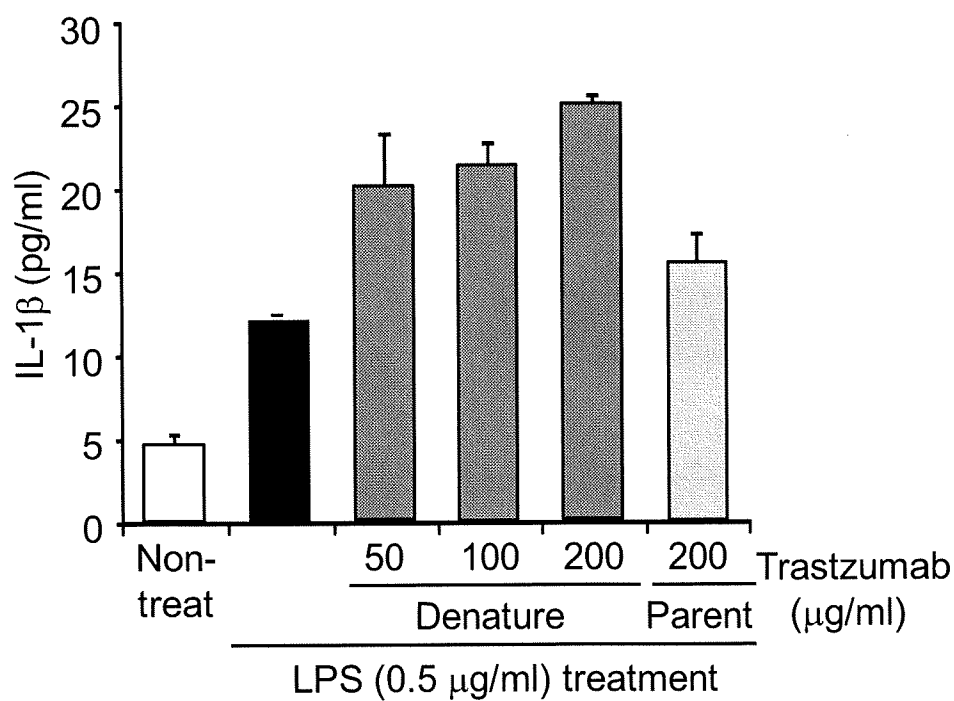


図 10. 熱処理したタンパク質製剤のマクロファージ様細胞に対する IL-1β 産生への影響

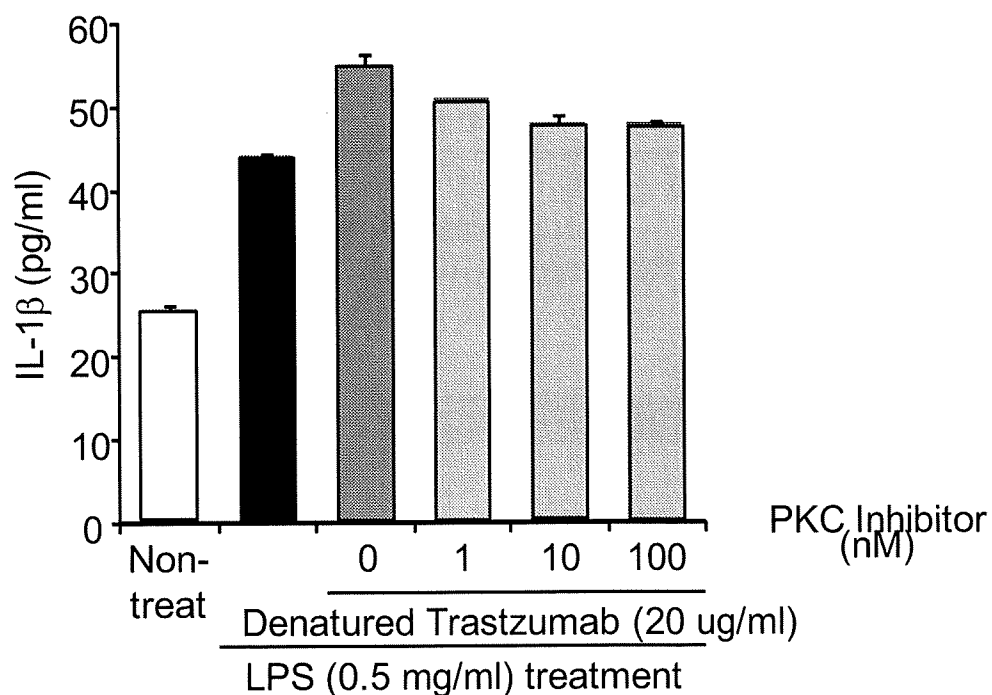


図 11. 熱処理トラスツズマブによる IL-1β 誘導機構における PKC シグナルの関与

## 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

分担研究者 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備し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、ポリエチレングリコール (PEG) もしくは糖鎖修飾タンパク質は、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一方、その医薬品としての承認審査、臨床治験の推進、安全性対策といった点で必要とされる“高度な品質保証”を可能とする安定性試験、抗原性試験、およびこれらをもとにしたレギュレーションの整備は立ち後れている。

このように、キメラ型抗体医薬等の外来性蛋白質に対して生体は、外部から侵入した抗原となる蛋白質を効率良く認識するために、リンパ組織を形成しており、本来的にウィルスなどの病原菌からの生体防御を行っている。またこのリンパ組織は、各臓器や病態の違いにより、その性質が異なることが知られている。特に、慢性炎症疾患やがん等の疾患組織では、正常とは異なるリンパ組織の形成が見られ、リンパ管の機能不全が認められている。

このような背景のもと我々は、昨年までの検討により、肺がん細胞株の CM をリンパ管内皮細胞に作用させることで、*in vitro* におけるがん組織リンパ管が再現できることを明らかにした。このがん組織リ

ンパ管は、通常のリンパ管内皮細胞とは異なり、管腔形成能や浸潤能の亢進等の独自の特性を有することから、同細胞の特異的マーカー蛋白質が存在する可能性が高い。これらリンパ管の形質に関わる分子を見出すことができれば、リンパ組織構築に応用することが可能と考えられる。

そこで本年度は、昨年までの研究成果により確立した抗体プロテオミクス技術を駆使して、形質の異なる二種類の肺がん細胞株の CM を作用させたリンパ管内皮細胞と通常のリンパ管内皮細胞をサンプルとして供し、プロテオーム解析によってがん組織リンパ管関連マーカー蛋白質候補の同定を試みた。本研究課題は、タンパク質医薬品の抗原性発揮に重要なリンパ節を構成するリンパ管内皮細胞の、健常状態と疾患状態におけるリンパ管の特徴を明らかにできるため、機能性人工タンパク質の抗原性を予測するための基盤情報の収集に有益な知見を与えるものと期待される。

### B. 研究方法

#### 2D-DIGE 解析

通常培養環境下、もしくは RERF-LC-MS (高転移性

肺がん細胞株)、RERF-LC-KJ (低転移性肺がん細胞株) の CM 存在下における、リンパ管内皮細胞 HMVEC-LLy を細胞溶解液で溶解したものをサンプルとして用いた。サンプル各 50  $\mu$ 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  $\mu$ l 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 Biosciences) を入れ、oil を重層した。ETTAN IPGPhor (Amersham Biosciences) を用いて、プレ膨潤を 10 時間行い、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に浸し、各 15 分間平衡化を行った。二次元目の SDS-PAGE を行うため、ゲル溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyltartardiamide gels) に IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (Amersham Biosciences) を用いて、2次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences) を使用した。抗体作製の蛋白質抽出には、88 mM NaIO<sub>4</sub> 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  $\mu$ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振盪させた後、脱色

液を取り除くことで脱色を行った。続いて 200  $\mu$ 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  $\mu$ l の trypsin 溶液 (20  $\mu$ 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、ゲル内の蛋白質を消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50  $\mu$ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50  $\mu$ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50  $\mu$ l の 100% acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドの抽出を行った。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) のカラムを用いて精製し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 1  $\mu$ 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。

#### C. 研究結果

病態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、免疫低下メカニズムとリンパ管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、リンパ管細胞の性質をより詳細に調べるため、リンパ管関連マーカー蛋白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の性質と、疾患状態におけるリンパ管の性質を

比較するため、通常培養したリンパ管内皮細胞と2種類の肺がん細胞 RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ の CM を作用させたリンパ管内皮細胞のそれぞれから蛋白質を調製し、各サンプルを 2D-DIGE 法にて解析した (Fig. 1)。上記の実験を行った結果、通常培養したリンパ管内皮細胞で発現が少なく、RERF-LC-MS 細胞の CM を作用させ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 解析による蛋白質の同定に成功した (Table 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、ならびにリンパ節の性質を明らかにしたいと考えている。

#### D. 考察

リンパ節に存在する、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、中でもリンパ管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等、詳細な機能が明らかになっていなかった。近年、リンパ管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、リンパ管への移動 (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、組織内のリンパ管の性質を理解するために、必要不可欠であると考えられている。特に、がん組織には最近まで、リンパ管様の組織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、リンパ管構造は存在しながら、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、リンパ管構造と各組織における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。

#### 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、蛋白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。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### ① 論文発表

該当なし

#### 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

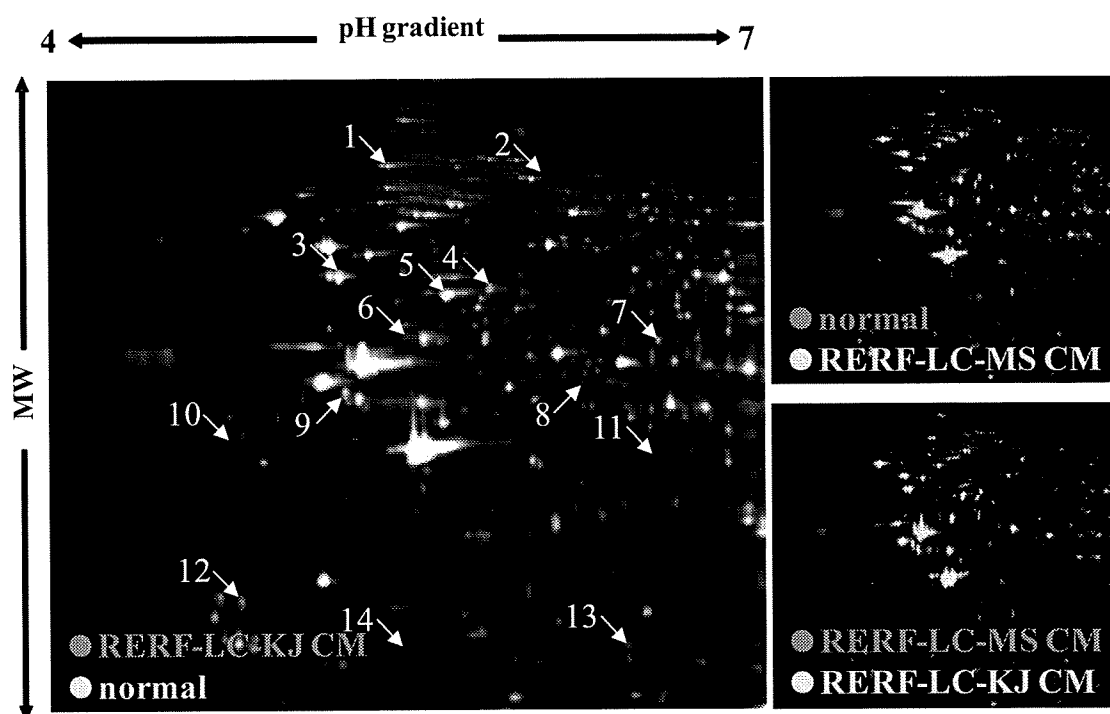
該当なし

##### ③ その他

該当なし

#### I. 研究協力者

該当なし



**Fig. 1** 2D-DIGE image of fluorescently labeled proteins from LECs by treatment with lung cancer cell CM

Proteins derived from LECs by treatment with two lung cancer cell (RERF-LC-MS / RERF-LC-KJ) CM were labeled using cy3 and cy5, and used for performing 2D electrophoresis. The spots indicated by arrows are the proteins identified by MALDI-TOF/MS.

**Table 1 Identification of RERF-LC-MS CM related proteins by MALDI-TOF/MS**

| 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 dihydroipoamide 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 ↑                             |

「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  
機能的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」  
分担研究報告書

## 各種 HLA の精製と抗原性評価システムの開発

分担研究者 鎌田 春彦 独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト 主任研究員

### 研究要旨

特定タンパク質の機能阻害を目的とした抗体医薬をはじめとする、いわゆるタンパク質製剤は現在、数多くの製薬企業がその開発競争に参戦し、多数の有力な医薬品候補が見出されつつある。一方で、タンパク質製剤の医薬品としての“高度な品質保証”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、医薬品開発の現状と比較して後れをとっており、その科学的かつ適正な承認審査を可能とするタンパク質製剤の品質評価法の確立が最重要課題となっている。以上の観点から本申請課題では、国民の保健衛生および生活の質の向上に資することを最終目的として、近年目覚ましい発展を遂げている質量分析などの手法を中心に、生物学的製剤の立体構造やその不純物の検出を、生物学的・物理化学的側面から解析するとともに、生物学的製剤の有効性と安全性を担保するレギュレーションを定め、医薬品行政の円滑な推進を図るための基盤的研究を行う。これまでに分担研究者は、生物学的製剤の品質管理に必要な情報を獲得するために、質量分析の手法を用いて、立体構造の変化と生物学的製剤との活性変化が連関する可能性を見出した。本研究結果を踏まえ、本年度では、生物学的製剤の、同等/同質性の確保に資する新規検出法の確立を行うものである。具体的には、生物学的製剤の立体構造変化(変性・糖鎖修飾等)とその生物活性などとの連関解析から、医薬品の有効性と安全性を評価可能な新規方法論の確立を達成する。本研究で用いる質量分析法の利点は、従来のクロマトグラフィーと比較し、感度や分離能にすぐれているため、糖鎖などの複雑な立体構造を解析可能であるとともに、測定試料中に含まれる微量の不純物の定量も可能な点にある。特に、研究で用いるイオンモビリティ質量分析機(IM-MS)は、イオン化された蛋白質の見かけの分子サイズをモビリティの変化として検出が可能であるとともに、その質量を質量分析機で測定できる利点を持っている。本研究ではこのIM-MSを有効活用し、蛋白質の立体構造変化による見かけの分子量変化を分離・検出するとともに、培養細胞や動物を用いた検討から、抗原性を発揮する分子メカニズム解析に関する基礎検討を行う予定である。

#### A. 研究目的

サイトカインや増殖因子、さらに特定タンパク質の機能を阻害する抗体等の、いわゆるタンパク質製剤の開発競争は現在、国内外のバイオ製薬産業等により熾烈を極めてしている。しかし、その医薬品としての承認審査、臨床治験の推進、安全性対策といった点で必要とされる“高度な品質保証”を可能とする安定性試験、抗原性試験、およびこれらをもとにしたレギュレーションの整備は立ち後れている。従って、タンパク質製剤の安全性・有効性を担保する、科学的かつ適正な承認審査の指針等の確立が最重要

課題となっている。そこで本研究では、特にタンパク質製剤の抗原性の問題に焦点を絞り、抗原性の評価を行うための評価系の開発を目的とした基礎検討を行った。

2015年までに米国では、慢性関節リウマチの治療薬であるエンブレルや非ホジキンリンパ腫治療薬のリツキサンなどのブロックバスターが次々と独占的販売期間の終了を迎えるため、このような比較的薬価の高い生物学的製剤のジェネリック化は、健康福祉にとっても極めて重要な案件として、現在国内外で議論されている。このような背景のもと、生物学

的製剤の開発競争は現在、海外・国内のバイオ製薬産業において熾烈を極めて一方、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、有効性試験（生物学的製剤の立体構造）や安全性試験（抗原性、不純物の混入など）、およびそれ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。従って、生物学的製剤の有効性と安全性を評価するためには、科学的かつ適正な同質/同等性評価系の確立が必須であり、これは厚生労働行政の重要課題と考えられる。また、バイオシミラーは特に、既存の先行品にて行われた臨床試験を省略するような開発手法が許されるのか、といった議論があり、先行品の製造・保管過程における同質/同等性評価を基準とするだけでは不十分であると指摘されている。従って、生産方法によって変化が予想される立体構造の変化（糖鎖結合の部位や数等）、生成過程で混入する不純物の不均一性と活性など、生物学的製剤の持つ免疫原性等の、同等性/同質性を担保する評価法の確立が不可欠である。そこで本申請課題は、これまで研究代表者が先行して行ってきた、質量分析を利用した蛋白性医薬品の構造解析とその構造変化が免疫細胞に及ぼす影響に関する研究を、継続的に推進するため、実際に臨床に供されている抗体医薬品やホルモンなどの生物学的製剤を用い、近年目覚ましい発展を遂げた質量分析を最大限に活用した高感度な同質/同等性の評価法を新規確立することで、蛋白質製剤の立体構造や不純物の混入などに起因する生物学的製剤の有効性と安全性、中でもその抗原性の解析に焦点を絞った新規解析システムの開発を行うものである。本申請課題は、質量分析を活用した生物学的医薬品の立体構造と不純物の解析を同時に達成しうる測定系を新たに確立し、立体構造の違いに起因する薬理活性の変化や、医薬品に含まれる微量の不純物を検出する試験法を初めて確立しようとする点で他に類を見ない。

以上の観点から、タンパク質製剤の中に含まれる不純物（上述した、変性タンパク質や、精製が不十分であることによる不純物など）の検出のためには、①高感度にその不純物の割合を定量すること、およ

び②変性タンパク質の割合を検討するためにも質量数が同じ分子を分離・解析できること、を同時に実現しうる方法論の確立が必要不可欠である。

その中で、イオンモビリティスペクトル分析（Ion mobility Spectrometry：IMS）は、イオン化された分子が電場（ゲート）内を移動する際に、アルゴンガスなどの移動阻止物質をゲート内に導入することで、分子サイズや電荷の異なる分子を分離・検出する方法として、古くから利用されていた。IMSはこれまで、低分子化合物などの分析に利用された方法であるが、測定分子のイオン化、ならびに、イオン化された分子が電圧のかかったゲート内を移動するなど、先述した質量分析装置と、非常に似通った機械的構造を有している。従って、この質量分析装置とIMSを組み合わせることで、簡便に両装置のメリットを享受できるというアイデアのもと、四重極イオンモビリティー飛行時間型質量分析装置（Synapt™ HDMS™）が開発された。この測定装置は、分子量の同じ分子を、IMSにより分子サイズの異なるものに分離できる上、質量分析装置が得意とする、極微量分子の検出、さらに質量数の決定など、一度の解析で様々な情報が得られるのが特徴である。特に、タンパク質製剤の品質評価に利用する場合、タンパク質の変性による分子サイズの違いや、低分子不純物の検出など、短時間で一挙にその情報が得られるばかりでなく、サンプルの種類によって、イオン化の方法や質量分析装置の設定を一部調整するだけで、あらゆる分子に対して、同様の検討ができるというメリットがある。従って、本研究における「機能性人工タンパク質製剤の高感度な安定性評価法、抗原性試験法の確立」に最適な装置であると研究分担者は考え、本装置を利用したタンパク質の構造変化の検出のための基礎検討を行うことにした。すなわち、本研究では、タンパク質製剤の抗原性を規定する、製剤中に含まれる不純物（変性タンパク質等）の解析を目的に、モデルタンパク質性医薬品として抗体医薬（エンブレル、およびトラスツズマブ）を用いて、各種変性条件下での変性状態を、HDMSを用いたモビリティ解析を行い、タンパク質の抗原性に深く関与するとされる立体構造変化を評価した。



## B. 研究方法

### 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

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、Trastuzumab と抗リウマチ薬として利用されている TNFR2 chimera 蛋白質の Enbrel を用いた。タンパク質の熱変性は、各蛋白質医薬品を、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 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 N<sub>2</sub> 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 N<sub>2</sub> (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、 $1 \times 10^4$  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。

## C. 研究結果

前年度までの検討で、臨床応用されている 2 種類の蛋白質医薬である、エンブレル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、蛋白質医薬の活性低下に依存して、蛋白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 キメラ蛋白質のエンブレルの立体構造の違いを、IM-MS にて解析した (Figure 1、2)。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ており、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思われる。その一方、糖鎖結合のみられ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 (Figure 3)。

Figure 3B 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 (Figure 4)。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) について各変性蛋白質のドリフトグラムから算出した値を比較した (Table 1)。さらに、Figure 4 の結果から算出した IC50 の値をまとめた (Table 1)。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 (Table 1)、今後より詳細な検討が必要であることが示唆された。

#### D. 考察

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、Figure 3 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唆された。タンパク質の構造は一般的に、シャ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、これらの変性蛋白質と HDMS を用いた蛋白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。

#### E. 結論

本研究課題においては、タンパク質製剤の最大の問題でありながらも、未だ検討方法が確立されていない“タンパク質の抗原性評価方法の開発”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った。タンパク質製剤等のタンパク質変性状態ならびに分子不均一性を直接観察しうる、IM-MS を利用することで、タンパク質の構造情報と変性状態にあるタンパク質の割合が簡便かつ同時に、解析・評価できる可能性が示唆された。今後、この IM-MS を用いたタンパク質の変性状態の解析を通じて、機能性人工タンパク質製剤に科学的合理性と社会的正当性を付与するためのレギュレーションを定めるための技術基盤の作製につなげていきたいと考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

①発表論文  
該当無し

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蛋白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蛋白質医薬品の品質管理に向けた基礎検討., 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本 2009 年 5 月

国際学会

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

該当なし

②実用新案登録

該当なし

③その他

特になし

I. 研究協力者

なし

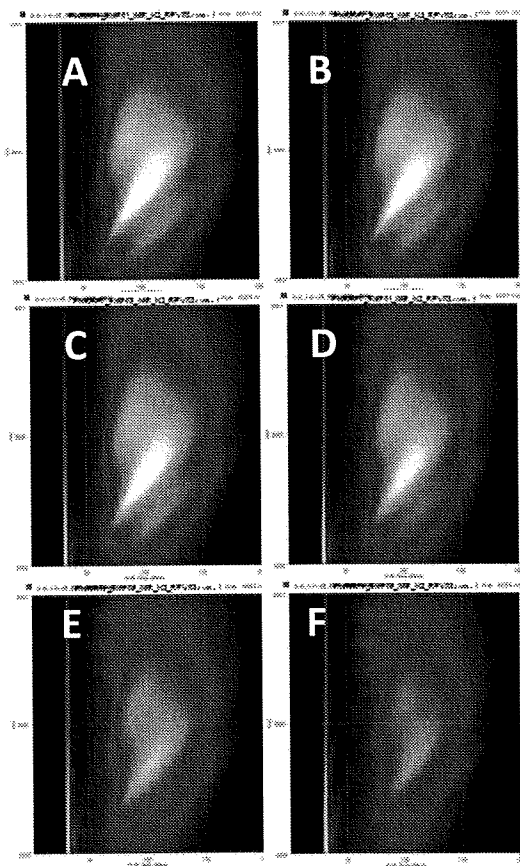


Figure 1 IM-MS を用いて測定した熱変性エタネルセプトのスペクトル

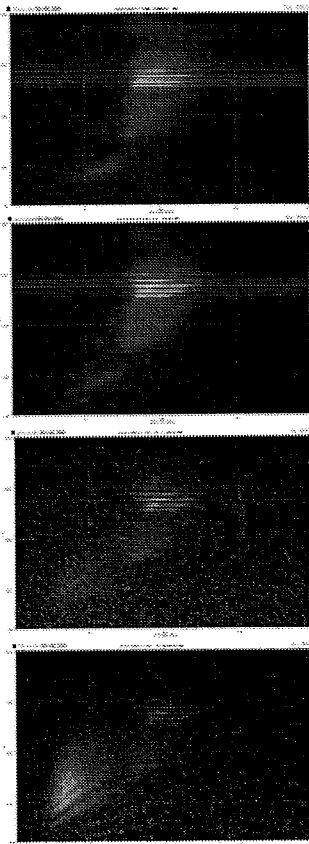


Figure 2 IM-MS を用いて測定した熱変性トラスツズマブのスペクトル

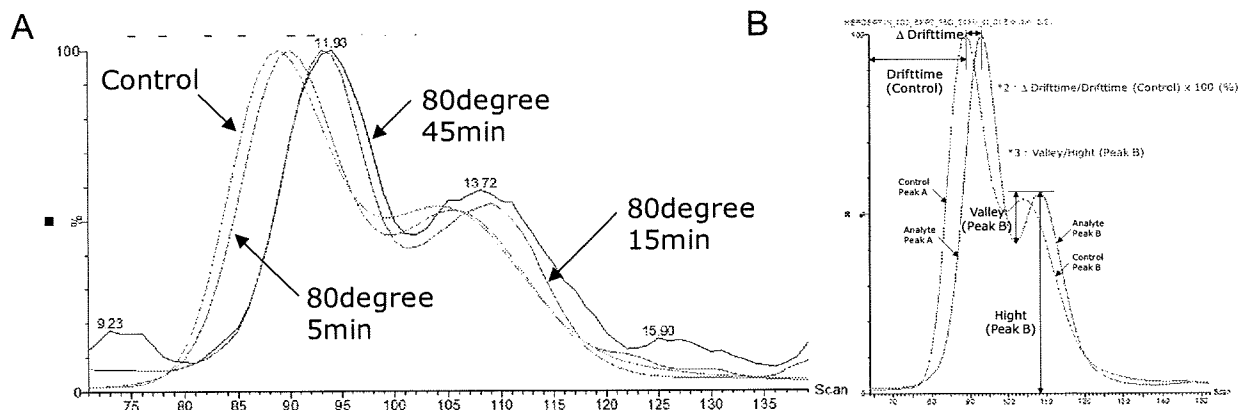


Figure 3 28+ イオンに着目した、変性あるいは非変性trastuzumabのモビリティ  
 A. 80°Cにて加熱変性させたtrastuzumabのモビリティシフトにおける反応時間依存性  
 B. モビリティシフトとスペクトル変化の概要

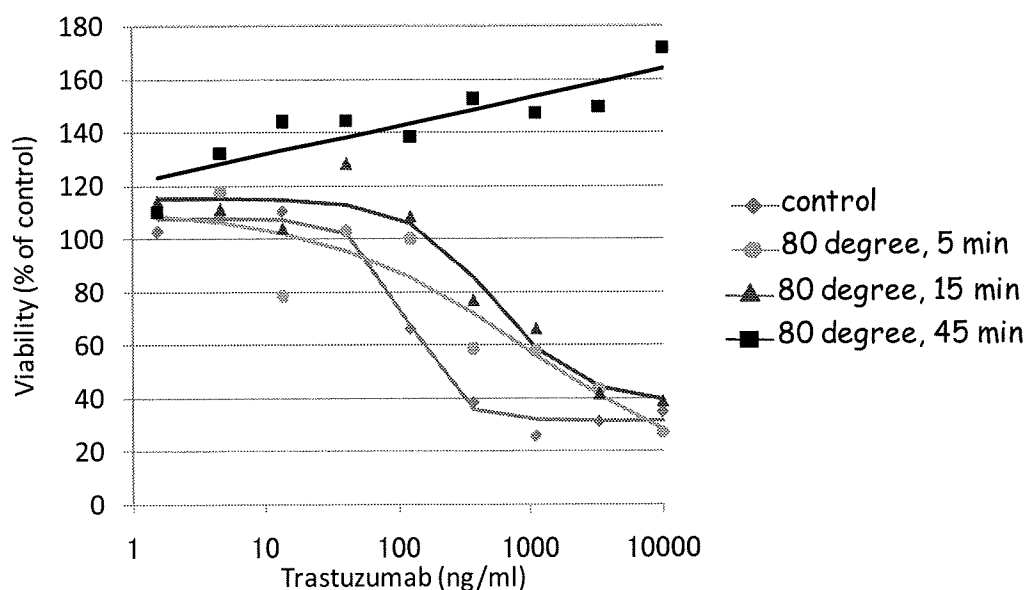


Figure 4 熱変性にともなうtrastuzumabの活性低下に及ぼす影響

Table1 Trastuzumabの活性変化とドリフトグラムの関係性

| Sample            | Activity                       |                                  | Driftgram similarity                  |                                       |                                    | Ion intensity (% vs Control) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|                   | IC <sub>50</sub> 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 |                              |
| 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                          |

## 抗原性評価システムの開発

分担研究者 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 研究員

### 研究要旨

近年、抗体やサイトカインなどを含む、いわゆる生物学的製剤が、自己免疫疾患やがんなどの難治性疾患に応用され、目覚ましい臨床成績を上げている。これらの生物学的製剤は、これまでの低分子医薬品とは異なり、遺伝子やタンパク質、ウイルス粒子等を用いるために、鋭い生理活性を示すことから、今後ますます普及が期待される一方で、従来の薬物規制（レギュレーション）とは異なる医薬品評価法の制定が必要であるとされている。現在、欧米においては、医薬品のレギュレーションを規定する政府機関により、生物学的製剤の危険性を評価する項目として、抗原性評価をその一つとして行うように推奨している。実際、ヒト由来のサイトカインや抗体医薬に対する抗体が産生される事実も認められている。このような生物学的製剤投与後の抗薬物抗体（Anti-drug antibodies; ADAs）の出現は、薬効を低下させるだけでなく、アナフィラキシーなどの重篤な副作用を招く危険性があるために、その評価法の確立は、今後の生物学的製剤の開発の上で、最も重要視される課題であると考えられる。

そこで本研究課題では、この抗原性を評価するシステムの開発を念頭に、*in vitro* のバイオアッセイを用いて、ヒトの抗原性を規定すると予想される免疫細胞に対する反応性に関する検討を行った。

#### A. 研究目的

現在、世界中では 250 種類以上の生物学的製剤が臨床応用されている。過去を遡ってみると、ヒト由来でないタンパク質が、医薬品として利用されている時期があり、その代表例としてウシ由来・ブタ由来インスリンがあった。その時代には、タンパク質の抗原性が当然のように問題視されていたが、その後のマウス抗体を利用したキメラ型抗体、さらに、バイオテクノロジーの最先端技術をもって作製された完全ヒト型抗体の出現した現在においても、抗原性のリスクは未だ消え去っておらず、この問題を複雑化している。

サイトカイン等の生物学的製剤において、この抗原性の問題は深刻であり、マクロファージ顆粒球コロニー刺激因子 (GM-CSF) やエリスロポエチン (EPO)、トロンボポエチン (TPO) がその代表として知られ、体内での抗体の出現により、薬物投与自体ができなくなるのが問題となっている。特に、現在開発が

進められているバイオシミラーに関しては、その抗原性が既存の生物学的製剤とは異なる特徴を持つ可能性がある。従って、このような生物学的製剤の安全性を評価する上で、簡便かつ有用な *in vitro* での評価法の確立は、非常に重要な課題であると位置づけられている。

抗原性の発揮は、免疫細胞の活性化によって起こり、特に生体内における生物学的製剤に対する抗体の出現は、B 細胞がその中心にあると考えられる。これら免疫細胞の活性化は、抗原提示細胞の効率の良い免疫活性化とともに、炎症性サイトカインなどの産生が重要な引き金となっている可能性が示唆されている。また、Jiskoot W. らのグループは、これら抗原性の発揮には、変性したタンパク質の凝集体 (aggregates) が重要な働きをしているものと考察しており、これらのメカニズムに着目したワクチン開発などに応用している例もある。

そこで本研究課題では、この抗原性の発揮メカニ

ズムを解析するために、抗原提示細胞としての役割も持つ単球・マクロファージ等の細胞に着目し、変性蛋白質がこれらの細胞に対して、どのような作用を示すのか、検討した。特に本研究課題では、細胞からの炎症性サイトカインの産生を指標に、そのタンパク質変性による抗原性誘発メカニズムに関する検討を実施した。

## B. 研究方法

### 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、Trastuzumab (ハーセプチン) を用いた。タンパク質の熱変性は、各蛋白質医薬品を、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。

### 変性蛋白質による刺激

24 穴プレートにヒト単核球細胞株 THP-1 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、熱変性処理したハーセプチンを最終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$ 、あるいは 20  $\mu\text{g/ml}$  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、非加熱のハーセプチン 200  $\mu\text{g/ml}$  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-1 $\beta$ 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-1 $\beta$  の産生量は、ELISA (OptEIA<sup>TM</sup>, human IL-1 $\beta$  ELISA Set II) を用いた。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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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。

## C. 研究結果

これまでの検討から、95°C で 20 分以上加熱することで、ハーセプチンの変性が確認できることから、この条件で変性させたハーセプチン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 $\beta$  の産生が確認された。また、この IL-1 $\beta$  の産生は添加した変性ハーセプチン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、変性ハーセプチンを加えた検討を行った。PMA によって分化を誘導することで、IL-1 $\beta$  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、変性ハーセプチンを加えることで、同様の結果が見られた。その一方で、変性させていないハーセプチンに関しては、THP-1 細胞からの IL-1 $\beta$  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の上昇が認められた。以上の結果から、変性させたハーセプチンは、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唆された。

## D. 考察

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  $\beta$  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ているが、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、このハーセプチン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示唆されることから、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等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 $\beta$ の産生とともに、各種免疫担当細胞（T cell、B cell等）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。

#### E. 結論

本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変化と免疫担当細胞の活性化機構に関する基礎情報の集積を行った。タンパク質製剤等の変性に伴う抗原性の出現

をバイオアッセイを利用することで評価し、その結果として、変性したタンパク質の免疫細胞活性化機構として、炎症性サイトカインの産生が考えられた。今後、これらの炎症性サイトカインが及ぼす変性タンパク質の抗体産生の程度に関して検討していこうと考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### ① 発表論文

該当無し

##### ② 学会発表

国内学会発表

国際学会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ① 特許取得

該当なし

##### ② 実用新案登録

該当なし

##### ③ その他

特になし

#### I. 研究協力者

なし



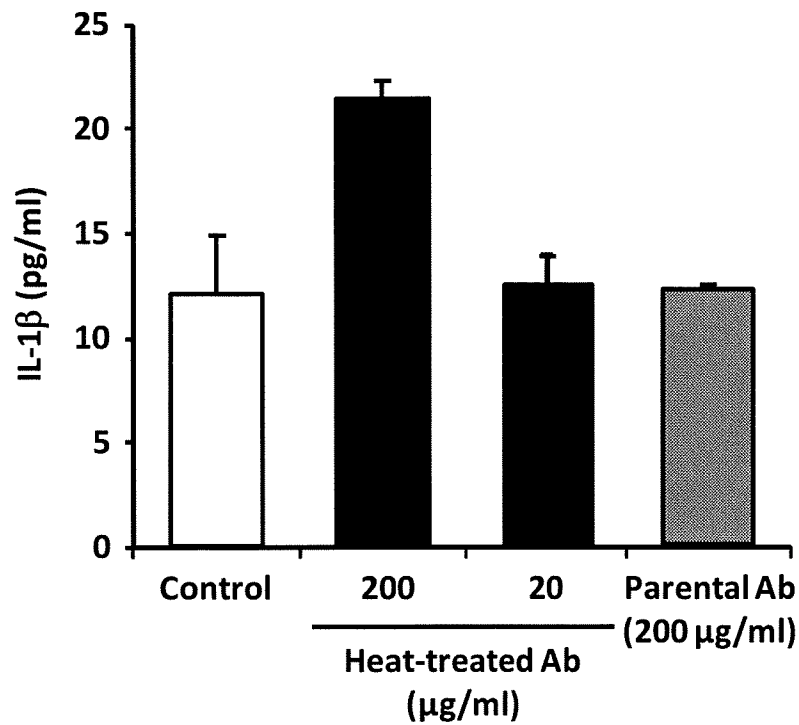


Figure 1 変性ハーセプチンの THP-1 細胞由来 IL-1 β 産生に及ぼす影響。

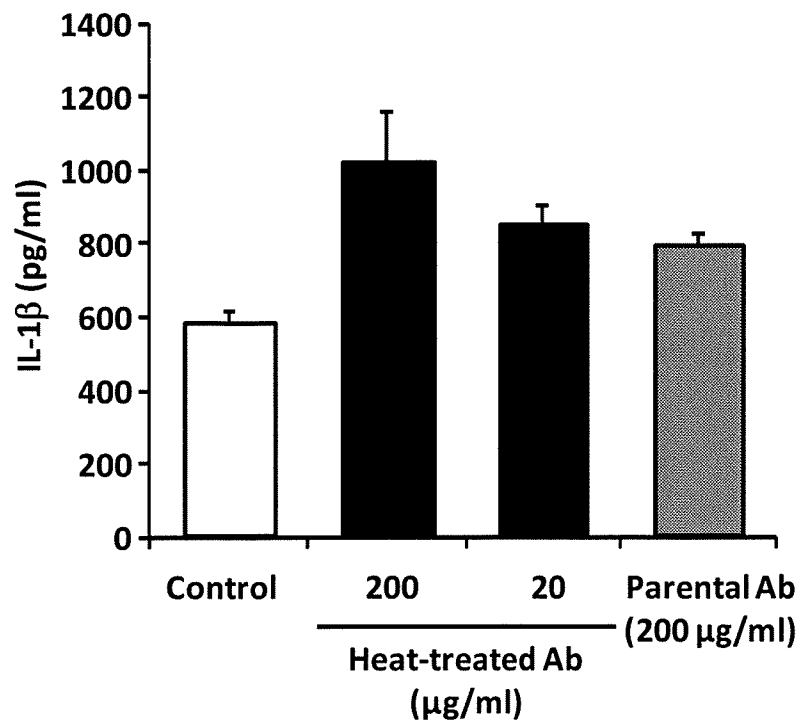


Figure 2 変性ハーセプチンの PMA 刺激 THP-1 細胞由来 IL-1 β 産生に及ぼす影響。

## アデノウイルス等を用いたサイトカイン産生システムの開発

分担研究者 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

アデノウイルスベクター複製中に増殖性アデノウイルス（RCA）を生じない新規アデノウイルスベクター（研究分担者が開発済み）は、遺伝子治療等の応用研究のみならず、遺伝子やタンパク質機能の解明研究等の基礎研究においても貴重な基盤技術となる。本研究では、RCAを生じない新規アデノウイルスベクターの機能（遺伝子発現、ベクター収量）を評価した。

### A. 研究目的

アデノウイルスベクターはその優れた遺伝子導入特性（高効率かつ非分裂細胞への遺伝子導入が可能、高タイトーのベクターが得られること等）から、遺伝子治療全臨床試験中 26% で使用されている（2007 年 1 月現在）。現在汎用されているアデノウイルスベクターは 5 型（もしくは 2 型）アデノウイルスを基本骨格としており、自己複製に必須の E1 遺伝子（E1A と E1B 遺伝子からなる）を取り除き（342-3523 bp を欠損しているものが多い）、この部分に外来遺伝子（治療用遺伝子）に挿入している。従って、通常の細胞ではアデノウイルスベクターは複製しないため、アデノウイルスベクターの作製・増幅には、5 型アデノウイルス・E1 遺伝子を恒常的に発現している 293 細胞（ヒト胎児腎臓由来）等を用いている。しかしながら、293 細胞にはアデノウイルス・E1 遺伝子を含む 1-4344 bp が含まれており（染色体にインテグレートされている）、アデノウイルスベクター

ゲノムとの間に E1 領域の前後で相同な遺伝子配列（1-342 bp および 3523-4344 bp）が存在するため、相同組換えにより自己増殖可能なアデノウイルス（RCA）が出現する。RCA はアデノウイルスベクターと異なり、通常の細胞に感染した後、増殖し細胞融解を引き起こすことから、副作用を引き起こす危険性があり、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子やタンパク質機能の解明研究においても正確な評価が困難になる。申請者らは、E3 領域に外来遺伝子を挿入することで、例え 293 細胞（最も汎用されているパッケージング細胞）でのアデノウイルスベクター増幅中に E1 欠損領域で相同組換えが生じても、（ゲノムサイズがパッケージングリミットを超える様にアデノウイルスベクターを設計することで、）RCA 出現しない新規アデノウイルスベクターを最近開発した。本研究では、本ベクターの機能を評価することを目的に、遺伝子発現、ベクター収量について検討した。

## B. 研究方法

### B-1. 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。

### B-2. ルシフェラーゼ活性の測定

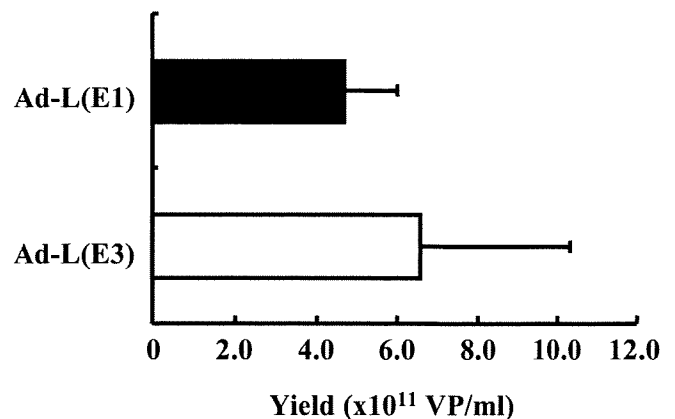
A549 (a human pulmonary epithelial cell line)、SK HEP-1 (a human hepatoma cell line) 細胞にアデノウイルスベクターを 5 ifu/cell で 1.5 時間作用させ、48 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は luciferase assay system (PicaGene LT2.0; Toyo Ink) を用いて測定した。

## C. 研究結果

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 (Fig. 1)、

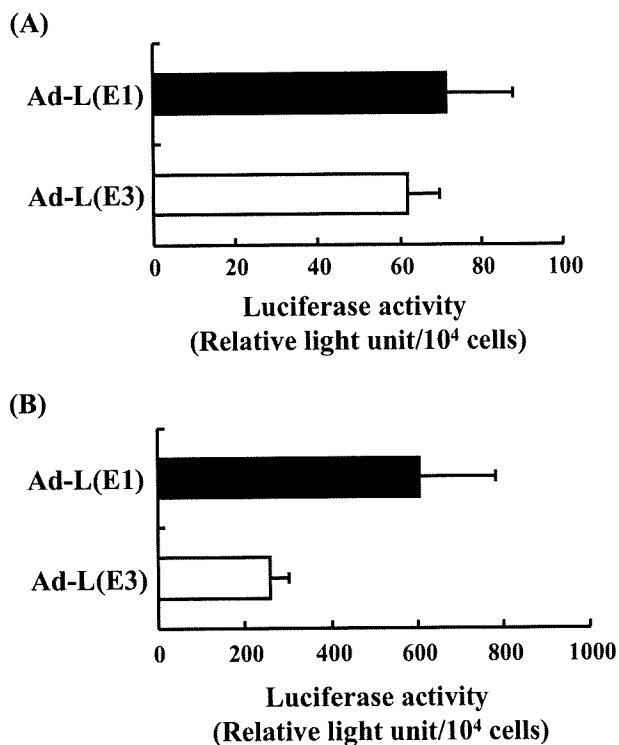
RCA 出現しない新規アデノウイルスベクターは、従来のアデノウイルスベクターと同等の高力価のベクター調製が可能なが判明した。

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、検討した (Fig. 2)。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。



**Figure 1 Yield of Ad-L(E1) and Ad-L(E3).**

Each batch of Ad-L(E1) and Ad-L(E3) was amplified and purified from five 150-mm dishes containing sub-confluent 293 cells each. The viral particle (VP) titer of each Ad vector was determined. Data are presented as the mean value  $\pm$  S.D. ( $n = 3$  or 5).



**Figure 2 Comparison of luciferase activity in the cells transduced by Ad-L(E1) or Ad-L(E3).**  
 (A) A549 and (B) SK HEP-1 cells were transduced with 5 ifu/cell of Ad-LacZ(E1) or Ad-LacZ(E3). After 48 hours of culture, the luciferase activity in the cells was measured by a luminescence assay. Data are presented as the mean value  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ).

#### D. 考 察

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るが、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。

#### E. 結 論

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事が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

特になし。