

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

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 19-21 年度 総合報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 年 3 月

総合報告書

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 プロジェクトリーダー

研究要旨

生物学的あるいは化学的アプローチにて、疾病治療効果や安定性に優れた機能性人工タンパク質を創出し、これらを医薬品として応用しようとする試みが注目されており、タンパク質のアミノ酸配列置換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。特に最近では、タンパク質のアミノ酸配列置換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、それに加えて、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が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。上記のような、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の中で、例えばPEG化タンパク質の場合、PEGをタンパク質に結合させる際に、PEGがランダムに結合してしまうため、結合分子数・部位の違いはバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性をもたらす結果となるなど、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、糖鎖修飾タンパク質は、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。具体的には、研究期間の中で、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、変性タンパク質の質量分析法を用いた評価系の基礎検討、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検討、リンパ管内皮細胞の特性解析およびHLAアレイ構築に向けた基礎検討を行い、有用な知見を得た。

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
末松 佐知子	独立行政法人医薬基盤研究所
吉岡 靖雄	大阪大学臨床医工学 研究教育センター

A. 研究目的

抗体医薬やサイトカインに代表されるいわゆるバイオ医薬品は、動物やヒト由来の精製タンパク質を利用してきた時代から、培養細胞等を駆使して作製するリコンビナントタンパク質へと移行し、現在は第三世代のタンパク質製剤（アミノ酸置換体等の機能性人工タンパク質製剤）へと変遷している。その開発競争は、国内外のバイオ製薬産業等により熾烈を極めてい一方、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。従って機能性人工タンパク質に関する基礎研究の成果を実用化するためには、上記問題点の克服、即ち科学的かつ適正な承認審査の指針等を確立しなければならず、これは厚生労働行政の最重要課題と言える。上述した機能性人工タンパク質は、これまでの物理化学的に均一な低分子薬物とは異なり、例えばPEG化タンパク質製剤や糖鎖修飾型タンパク質製剤の場合、分子量的に不均一なPEGや質的に不均一な糖鎖をタンパク質中のアミノ酸をランダムに化学的修飾したブロードなもの（タンパク質へのPEGや糖鎖の導入部位や導入個数は、個々のタンパク質を見た場合、バラバラであり、物理化学的に「構造的にも機能的にも」不均一なもの）であり、また融合タンパク質や構造変異タンパク質、糖鎖修飾型タンパク質を利用したバイオ医薬品の場合、新たに抗原性を呈する

ようになる等の致命的欠陥を有している。従って第三世代の機能性人工タンパク質製剤に関しては、従来までの野生型タンパク質製剤の承認審査や指針等で要求されてきた製造・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 や糖鎖の結合部位・結合数・結合安定性の評価、修飾剤としての PEG や糖鎖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、天然型および遺伝子組換え型タンパク質（生体に存在するタンパク質およびその模倣体）との体内安定性（体内挙動特性）、生物学的安定性（生物活性）、物理化学的安定性（構造・組成）の評価、さらに重要なことに抗原性の評価が承認審査や臨床試験に不可欠となる。そこで本研究では、実際に臨床に供されている腫瘍壊死因子（TNF）や IFN 等のサイトカイン、また、抗体医薬を用い、2次元電気泳動・クロマトグラフィー、構造解析、質量分析、分子イメージングを融合した高感度な安定性評価法を新規確立しようとすると共に、人工リンパ組織や HLA-抗原ペプチド相互作用解析システムを用いた機能性人工タンパク質の抗原性評価法の新規開発を試みた。

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、およびファージペプチドライブラリによる改良型 PTD の創出

細胞培養

ヒト肺組織から単離されたリンパ管内皮細胞（HMVEC-LLy 細胞）と血管内皮細胞（HMVEC-LBI 細胞）は TAKARA より購入したものをを用いた。培養には微小血管内皮細胞培地を用い、いずれも継代培養をしてサブコンフルエント状態のものを実験に供した。ヒト気管上皮細胞（NHBE）は TAKARA より購入したものを、ヒト肺がん細胞株（RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ）は JCRB Cell Bank より購入したものをを用いた。NHBE 細胞の培養には気管上皮細胞培地 Kit（TAKARA）を、RERF-LC-MS の培養には、10% FBS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む E-MEM 培地を、RERF-LC-KJ の培養には 10% FBS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む RPMI-1640 培地（Wako Pure Chemicals）を用い、いずれも継代培養をしてサブコンフルエント状態のものを実験に供した。

リンパ管内皮細胞の in vitro 管腔形成

ヒト肺由来正常リンパ管内皮細胞（HMVE-LLy, Cambrex）を 15ml の matrigel basement matrix（BD Biosciences）でゲル層を形成させた 150φ 培養ディッシュ上に 5×10^6 cells 播種し、EGM2-MV 培地（Cambrex）中で培養した。一方で、matrigel が無いディッシュ上でも培養した。5 時間後、matrigel 上で管腔ネットワークが形成されたリンパ管内皮細胞は、セルスクレイパーでゲルとともに遠心管に移し、Cell Recovery Solution（BD Bioscience）を加えてゲルを分解することで細胞を回収した。一方、matrigel を用いないで培養した細胞も同様の操作で細胞を回収した。

管腔形成能試験

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

2D-DIGE 解析

2-methoxyestradiol（9 μ M）の存在・非存在下における、Matrigel 上で培養したリンパ管内皮細胞 HMVEC-LLy と血管内皮細胞 HMVEC-LBI を培養した。各細胞のペレットを、細胞溶解液（7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、10 mM Tris-HCl（pH 8.5））にて溶解し、2D Quant Kit（Amersham）を用いてタンパク質の濃度を測定した。各細胞のうち発現タンパク質の比較を行いたい 2 種のサンプル各 50 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 分間静置して反応停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer（2% DTT、2% pharmalyte（Amersham

Biosciences)、7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS) で 450 μ l にメスアップした。一方、タンパク質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化試薬にて標識しないサンプルも同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 3-10 あるいは pH 5-6) スリップ (Amersham) を入れ、oil を重層した。ETTAN IPGPhor (Amersham Biosciences) を用いて、プレ膨潤を 10 時間行い、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に浸し、各 15 分間平衡化を行った。二次元目の SDS-PAGE を行うため、ゲル溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyltartardiamide gels) に IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (Amersham Biosciences) を用いて、2 次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences) を使用した。抗体作製のタンパク質抽出には、88 mM NaIO₄ を用いて室温で 30 分インキュベーションし、ゲルを溶解することでタンパク質を抽出した。

MS 解析

ゲル片に 100 μ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振盪させることで脱色を行った。続いて 200 μ l の 100% acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器 (CENTRIFUGAL CONCENTRATOR, TOMY) によって乾燥させることで脱水を行った。脱水したゲル片に 5 μ l のトリプシン溶液 (20 μ g/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内のタンパク質をトリプシン消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ l の 100% acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボル

テックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドの抽出を行った。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) のカラムを用いて精製し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 1 μ l を Prespotted AnchorChip Set for Proteomics (BRUKER DALTONICS) に滴下し、乾燥させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS, autoflexII, BRUKER DALTONICS) によりトリプシン消化ペプチドの質量分析を行った。なお、キャリブレーションは M/z : 757.39916, 1046.54180, 1296.68480, 1672.91700, 1758.93261, 2093.08620 のピークを基準物質として行った。なお、ペプチドの同定には、メチオニン残基の酸化、iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮して行った。

conditioned medium (CM) の作製

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

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

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

invasion) を算出した。

Tat 改変体ライブラリ-1 の構築

PCR 法を用い、アルギニン以外のアミノ酸をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードするランダムな塩基配列 (NNS 配列; N = A/T/G/C, S = G/C) に置換した遺伝子ライブラリを調製した。pY03'mTNF FLAG をテンプレートに、PCR プライマー: Y-oligo22 3'ex と Tat11 (47-57) R を用い (表 1)、PCR (95°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル) により Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hind III (Toyobo. Co., Ltd.) 及び Not I (Toyobo. Co., Ltd.) によって処理した。あらかじめ Hind III、Not I で処理したファージミドベクター pY03'FLAG へ、T4 ligase (Roche Diagnostics) を用いて 16°C、16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を Eco 81 I 及び Alkaline phosphatase (Toyobo. Co., Ltd.) で処理し、QIAquick PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10% グリセロール溶液で 200 µl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 µl を添加し、Gene purser II (Bio-Rad) を用い、2.5 kV、0.25 µF、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2% グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 µg/ml アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2% グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスク (TAKARA BIO. Inc.) に播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

Tat 改変体ライブラリ-2 の構築

PCR 法を用い、Tat 配列中の 10 個のアミノ酸 (下線部が変異アミノ酸: GRKKRRQRRRPPQ) をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードする NNS 配列に置換した遺伝子ライブラリを調製した。プライマー: P-oligo1 と P-oligo2 (表 1) をアニーリング (96°C, 10 min → 72°C, 5 min → 68°C, 5 min → 37°C, 5 min、各段階を 0.01 °C/sec) させた。この反応液に Klenow Fragment (Toyobo. Co., Ltd.) 1 µl、10 mM dNTP (Sigma-Aldrich, Inc) 1 µl、10 × klenow Buffer 1 µl、DW 7 µl を添加し、37°C で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification

kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 µl をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR (96°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル) により、Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hind III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hind III、Not I で処理したファージミドベクター pY03'FLAG へ、T4 ligase を用いて 16°C、16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10% グリセロール溶液で 200 µl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 µl を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 µF、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2% グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 µg/ml アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

ランダム 18 mer ペプチド発現ファージライブラリの作製

PCR 法を用い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子ライブラリを調製した。プライマー: P-oligo1 と P-oligo4 (表 1) をアニーリング (96°C, 10 min → 72°C, 5 min → 68°C, 5 min → 37°C, 5 min、各段階を 0.01 °C/sec) させた。この反応液に Klenow Fragment 1 µl、10 mM dNTP 1 µl、10 × klenow Buffer 1 µl、DW 7 µl を添加し、37°C で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 µl をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR (96°C, 1 min → 65°C, 1 min → 68°C, 1 min, 35 サイクル) により、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hind III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hind III、Not I で処理したファージミドベクター pY03'FLAG へ、T4 ligase を用いて 16°C、16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10% グリセロール

溶液で 200 μ l に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μ l を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μ F、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

シークエンス解析

得られたコロニーから任意に選択した各クローンのプラスミドを QIAprep Miniprep kit (QIAGEN GmbH) を用いて回収し、DNA sequencing Kit (Applied Biosystems) 及び 5 \times Sequencing Buffer (Applied Biosystems) を用いてシークエンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge (Edge Bio Systems) を用いて精製し、減圧加熱により乾燥させた。シークエンス解析は ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) により行った。

ファージの作製

作製したライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TG1 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 LB プレートに播種し、37°C で一晚培養した。50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を加えてコロニーをすべて回収し、OD₆₀₀ = 0.3 まで振盪培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37°C で 30 分間、250 rpm、37°C で 30 分間培養した後、4°C、2000 rpm、10 分間遠心し、得られたペレットに対して 50 μ g/ml アンピシリン、100 μ g/ml カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養することで、Tat のアミノ酸置換体を表面提示したファージを調製した。

ファージの精製

ファージ粒子を含む TG1 培養液を 4°C、2000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 4°C、10000 rpm、15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-8000 (Wako Pure Chemicals)、2.5 M NaCl (Wako Pure Chemicals) を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。続いて 4°C、15000 rpm、10 分間遠心し

て得られたファージペレットを NTE Buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 μ m の Millex-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過して精製ファージ溶液とした。

Cell panning

24 穴プレート (Nalge NUNC International) に HaCaT 細胞を 5 \times 10⁵ cells/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、Opti-MEM I で希釈した 2%ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングした。精製したファージについても等量の 2%BSA を用いて 4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキングが終了したファージを HaCaT 細胞に加え、15 分ごとに振とうしながら 37°C で 2 時間培養した。この細胞を PBS で 20 回洗浄した後、50 mM HCl 1 ml を加えて 4°C で 10 分間培養した。このファージ溶出液を回収し、1 M Tris-HCl pH 8.0 500 μ l を添加し、その 50 μ l を用いて下記の方法に従いタイターを測定した。残りのファージ溶液は 2%グルコース含有 2YT 培地を 4.5 ml 加えて再度 TG1 に感染させ、増幅させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニングとした。

タイターの測定

2%グルコース含有 2YT 培地で OD₆₀₀ = 0.3 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C で 1 時間培養した。培養液の一部に 50 μ g/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、クローンディスクに播種し一晚培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

PSIF 発現ベクターへの組換え

作製したライブラリ及び 3rd パンニング後のライブラリから回収したプラスミドを Nco I 及び Not I で処理した。あらかじめ Nco I 及び Not I で処理した PSIF 発現ベクター-pY7 (pCANTAB5E に PSIF 発現コドンを組み込んだもの) にライゲーションキット Ver.2 を用いて組み込むことで、ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを構築した。

ペプチドと PSIF との融合体を含む培養上清の調整

ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを TG1 にエレクトロポレーションにより導入し、得られたコロニーを 96 穴プレートヘラダムにピックアップして一晩培養した。50 µg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地 100 µl を新たに添加したプレートに、一晩培養した培養液 10 µl を添加し、OD600 = 0.4-0.5 まで培養した。4℃、3000 rpm、20 分間遠心した後、上清を除き 1 mM IPTG、50 µg/ml アンピシリン含有 2YT 培地 200 µl を添加し、37℃で 12 時間培養した。再び 4℃、3000 rpm、20 分間遠心し、上清を回収して以降のスクリーニングに供した。

ペプチドの細胞内移行能の評価

96 穴プレートに Opti-MEM で 1.5×10^4 cells/well に希釈した HaCaT 細胞を播種し、終濃度 50 µg/ml となるようにシクロヘキシミド (Wako Pure Chemicals) を添加した。続いて、上記の方法に従って調整した培養上清をそれぞれ 50 µl ずつ加え、37℃、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。その後、5 mg/ml の MTT (Wako Pure Chemicals) 溶液を 10 µl 加え、さらに 37℃で 4 時間培養した。20% SDS/0.01 N HCl を 100 µl 加え暗所で 4 時間静置することで、生成したホルマザンを溶解し、Benchmark Plus マイクロプレートリーダーで吸光度を測定 (Test wave length; 595 nm / Reference wave length; 655 nm) し、PSIF による細胞傷害性を指標にペプチドの細胞内移行能を評価した。また、viability は PSIF を発現しない TG1 の培養上清を加えた群を 100%、終濃度 1 mg/ml のシクロヘキシミドを加えた群を 0%として算出した。

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 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。タンパク質の変性

は、熱変性を選択した。タンパク質の熱変性は、各タンパク質医薬品を、40~95 °C で、0~45 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。

UPLC を用いた変性タンパク質の分離

熱および酸化による変性を行ったタンパク質は、以下の条件で分離し、Synapt HDMS に導入した。まず、カラムとして、Symmetry300 C4, 2.1 × 100mm, 3.5 µm を用い、移動相には、A: 0.1% ギ酸 B: 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを用いたグラジエント分離を行った。UPLC の条件としては、流速を 0.3 ml/min に設定し、サンプルの注入量 5 µl をアプライした。なお、カラムの温度は 65℃に設定した。

Synapt HDMS による変性タンパク質の性状変化評価

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 3.5kV に設定し、コーン電圧を 60V に設定した。ソース温度を 80℃に設定し、イオン化後の脱溶媒として N₂ ガス (600L/Hr、250℃) を使用した。またイオンモードの測定にはアルゴンガス (20 ml/min) を使用した。

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、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

B-2 に記載した方法に準じて行った。

変性タンパク質による刺激

24 穴プレートにヒト単核球細胞株 THP-1 細胞を 5×10^5 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

gutted アデノウイルスベクターの作製

Green Fluorescent Protein (GFP) 発現カセットを gutted アデノウイルスベクター作製のためのベクタープラスミド pSTK129 に挿入した。生じたプラスミドを、ITR 配列の両末端に存在する制限酵素認識部位 PmeI を切断することにより線状にし、lipofectamine 2000 を用いて、60 mm 培養 dish に播種した cre 発現 293 細胞 (116 細胞) にトランスフェクションした。翌日ヘルパーウイルスを感染させ、約 3~4 日後に gutted アデノウイルスベクターを得た。

各ベクターは感染した 116 細胞の核内に大部分が存在しているため、細胞を回収し、凍結融解を 4 回繰り返すことで破壊した。2000 rpm、10 分遠心し、gutted アデノウイルスベクターを含む上清をヘルパーウイルスと同時に新しい 116 細胞に感染させた。この操作を数回繰り返すことにより gutted アデノウイルスベクターを調製した。150 mm 培養ディッシュ 10 枚の 116 細胞に gutted アデノウイルスベクターとヘルパーウイルスを加え、3~4 日後 116 細胞を回収し、150 mm 培養ディッシュ 1 枚あたり 1 ml の PBS を加え超音波にて細胞を破壊した。これを 2000 rpm、10 分遠心し、上清 (gutted アデノウイルスベクター懸濁液) を回収した。gutted アデノウイルスベクター懸濁液に MgCl₂ (最終濃度 10 mM)、RNaseA (最終濃度 0.2 mg/ml)、DNaseI (最終濃度 0.2 mg/ml) を加え 37 °C、30 分反応させた。反応後、gutted アデノウイルスベクター懸濁液を塩化セシウムの密度勾配遠心を 2 回繰り返して精製した。1 次遠心では、比重 1.5 g/cm³、1.32 g/cm³、1.25 g/cm³ の塩化セシウムを順に 0.5 ml、2.5 ml、4 ml 重層し、その上に gutted アデノウイルスベク

ター懸濁液を 5 ml 加え、35000 rpm、14 °C、2 時間遠心した。1 次遠心後、guttet アデノウイルスベクターのバンドを回収し、比重 1.35 g/cm³ の塩化セシウムで 12 ml に懸濁し 35000 rpm、14 °C、12-14 時間遠心した。guttet アデノウイルスベクターのバンドを回収し、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10% glycerol からなる溶液で 4 °C、一晚透析した。回収した溶液を gutted アデノウイルスベクター溶液として実験に用いた。

guttet アデノウイルスベクターのタイター測定

guttet アデノウイルスベクター溶液を SDS-TE 溶液にて最終 SDS 濃度が 0.1% になるように希釈した。5 分混合した後、15000 rpm で 5 分遠心、上清を回収し 260 nm の吸光度を測定した。求めた吸光度を以下の式に当てはめ virus particle (VP) titer を求めた。

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

ヘルパーウイルスの混在率の評価

guttet アデノウイルスベクター溶液を SDS-TE 溶液により最終 SDS 濃度が 0.1% になるように希釈した。5 分混合した後、15000 rpm で 5 分遠心し、上清を回収した。回収したサンプルを用いて、guttet アデノウイルスベクターゲノム量とヘルパーウイルスゲノム量を定量的 PCR により測定することによって、ヘルパーウイルスの混在率の評価を行なった。

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA を発現する gutted アデノウイルスベクターの作製

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA 配列 (ヒト U6 プロモーターで shRNA (short hairpin RNA) をドライブ) を gutted アデノウイルスベクター作製のためのベクタープラスミド pSTK129 に挿入した。生じたプラスミドを、ITR 配列の両末端に存在する制限酵素認識部位 PmeI を切断することにより線状にし、lipofectamine 2000 を用いて、60 mm 培養 dish に播種した cre 発現 293 細胞(116 細胞)にトランスフェクションした。翌日ヘルパーウイルスを感染させ、約 3~4 日後に gutted アデノウイルスベクターを得た。

アデノウイルスベクターは感染した 116 細胞の核内に大部分が存在しているため、細胞を回収し、凍結融解を 4 回繰り返すことで破壊した。2000 rpm、10 分遠心し、guttet アデノウイルスベク

ターを含む上清をヘルパーウイルスと同時に新しい 116 細胞に感染させた。この操作を数回繰り返すことにより gutted アデノウイルスベクターを調製した。150 mm 培養ディッシュ 10 枚の 116 細胞に gutted アデノウイルスベクターとヘルパーウイルスを加え、3~4 日後 116 細胞を回収し、150 mm 培養ディッシュ 1 枚あたり 1 ml の PBS を加え超音波にて細胞を破壊した。これを 2000 rpm、10 分遠心し、上清 (guttet アデノウイルスベクター懸濁液) を回収した。guttet アデノウイルスベクター懸濁液に MgCl₂ (最終濃度 10 mM)、RNaseA (最終濃度 0.2 mg/ml)、DNaseI (最終濃度 0.2 mg/ml) を加え 37 °C、30 分反応させた。反応後、guttet アデノウイルスベクター懸濁液を塩化セシウムの密度勾配遠心を 2 回繰り返して精製した。1 次遠心では、比重 1.5 g/cm³、1.32 g/cm³、1.25 g/cm³ の塩化セシウムを順に 0.5 ml、2.5 ml、4 ml 重層し、その上に gutted アデノウイルスベクター懸濁液を 5 ml 加え、35000 rpm、14 °C、2 時間遠心した。1 次遠心後、guttet アデノウイルスベクターのバンドを回収し、比重 1.35 g/cm³ の塩化セシウムで 12 ml に懸濁し 35000 rpm、14 °C、12-14 時間遠心した。guttet アデノウイルスベクターのバンドを回収し、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl₂、10% glycerol からなる溶液で 4 °C、一晚透析した。回収した溶液を gutted アデノウイルスベクター溶液として実験に用いた。

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA を発現する gutted アデノウイルスベクターのタイター測定

guttet アデノウイルスベクター溶液を SDS-TE 溶液にて最終 SDS 濃度が 0.1% になるように希釈した。5 分混合した後、15000 rpm で 5 分遠心、上清を回収し 260 nm の吸光度を測定した。求めた吸光度を以下の式に当てはめ virus particle (VP) titer を求めた。

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

RNAi 効果の検証

A549Lu 細胞 (ルシフェラーゼ安定発現細胞株) を 96well Black plate に 1x10⁴ cells/100 μl/well で播種し、24 時間後にルシフェラーゼに対する標的 siRNA 配列を有した従来型のアデノウイルスベクター、guttet アデノウイルスベクター、そしてコントロールとして U6 プロモーター配列のみを

有したアデノウイルスベクターを 15 ifu/cell、50 ifu/cell、150 ifu/cell で感染 (n=4) させた。1.5 時間後、培地を添加しさらに 3 日間培養した。その後、ルシフェラーゼ assay を行った。

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) リンパ球も集積し、獲得免疫機能を発揮する人工リンパ組織が構築可能となる。

ストローマ細胞としては異なる組織由来の複数のストローマ細胞株を用いた。三週間後に人工リンパ組織を回収して免疫組織学的解析を行い、もっとも多数のリンパ球が集積するストローマ細胞株を選び出した。このストローマ細胞株を腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリー受容体を刺激することによって発現が誘導される分子について検索した。

異なる組織由来の複数のストローマ細胞 (細胞

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

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

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

タンパク質変性

今回の測定にあたって、用いるタンパク質は医薬品として既に臨床応用されている TNFR2-Fc レセプターキメラである、エンブレルを用いた。タンパク質の変性は、熱による変性、および酸化による変性の二種類を選択した。まず、熱による変性に関して、エンブレルを、95℃に加熱した湯浴内で加温し、0、3、10、30 および 60 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。また、酸化による変性は、4 mM アスコルビン酸、40 μ M MgCl₂、1 mM EDTA を添加し、0、15、30、60、120、240 分間反応させること

で、酸化による変性を行い、これをサンプルとした。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。

酸化処理によるタンパク質の構造特性変化の評価

酸化処理; 10mM リン酸バッファー (pH7.2) で 1mg/ml に調製したエンブレル 400 μ l と、40mM アスコルビン酸ナトリウム 50 μ l、0.4 mM 塩化銅 50 μ l を混合し、25 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。その後、100mM EDTA 5 μ l を加え反応を停止した。その後、10mM リン酸バッファー (pH7.2) で 4 $^{\circ}$ C、24 時間透析した後、サンプルとして用いた。

チオフラビン T; 65 μ M チオフラビン T 溶液 1.8ml とサンプル 0.2ml を混合し、室温で 30 分遮光で反応させた。その後、Ext435nm、emi485nm を測定した。

IL-8 産生; 96 穴プレートにヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞 1×10^5 cells/well で播種し、サンプルを加えた。24 時間後、上清中の IL-8 量を ELISA で測定した。

変性タンパク質の免疫細胞に与える影響

タンパク質製剤の熱処理; 21 mg/ml のハーセプチンを 95 $^{\circ}$ C で 5 分、15 分、30 分、60 分間処理した。

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

抗原性評価システムの開発

腹水採取; マウスにプリスタン 0.5 ml を腹腔内投与し、約 1 週間飼育した。その後、抗 HLA-DR 抗体を産生するハイブリドーマ LB3.1 細胞を、マウスの腹腔に接種し、10~14 日後に腹水を回収した。IgG 精製; 上記で回収した腹水を用い、Melon Gel Monoclonal IgG 精製キット (PIERCE) により抗 HLA-DR 抗体を精製した。

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

HLA-DR の精製; HLA-DR 発現 EBV 細胞を、10%

FCS、1% グルタミン、1% 抗生物質含有 RPMI-1640 で培養した。 1.0×10^9 細胞に、約 20 ml の破碎溶液 (50 mM Tris (pH8.5)、1% Nonidet P-40、150 mM NaCl) を加え、氷上で 1 時間攪拌した。その後、27000g で 30 分遠心し、HLA を含む上清を回収した。この上清を抗体カラムに加え、洗浄液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1% Nonidet P-40) でカラムを洗浄した後、溶出液 (0.15 M NaCl, 50 mM diethylamine, 0.4% octylglucoside, 0.02% NaN_3) で HLA を溶出した。溶出液は、直ちに 2M Tris で中和した。

タンパク質製剤の熱処理

21 mg/ml のトラスツズマブを 95 $^{\circ}$ 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、およびファージペプチドライブラリによる改良型 PTD の創出

ヒト由来リンパ管内皮細胞を通常の培養ディッシュ上で培養すると敷石上の形態で増殖したが、matrigel 上に播種すると、血管内皮細胞で知られていると同様に数時間後から管腔を形成しはじめ、5 時間後では、細胞同士のネットワークが形成されていた (図 1)。リンパ組織を人工的に構築するうえで、リンパ管の誘導促進は重要であり、matrigel での管腔形成系は有用な評価系になるものと考えられる。

次に、リンパ管内皮細胞が分化して管腔形成するメカニズムを明らかとするための基礎検討として、matrigel 上で管腔形成したリンパ管内皮細胞と、管腔形成させていない内皮細胞両者でのプロテオームの比較を試みた。2D-DIGE を行った結果、管腔形成に伴って発現変動しているタンパク質スポットが多数見いだされた(図2)。今後、これらを質量分析で同定することで、管腔形成に関わる分子の同定と、その知見を応用したリンパ管誘導法等が確立できるものと考えられる。

がんの血行性転移に関する研究において、がん組織の可溶性基底膜調製品である Matrigel や、転移能の高いがん細胞株の馴らし培地 (conditioned medium : CM) 等を血管内皮細胞に作用させることで、がん組織内に呼び込まれる血管 (がん組織血管) を *in vitro* で再現しようとする試みがこれまで報告されている(図3)。そこで本研究ではまず、リンパ節転移患者におけるがん組織内に呼び込まれるリンパ管 (がん組織リンパ管) を *in vitro* で再現することを目的として、ヒト肺由来リンパ管内皮細胞 HMVEC-LLy (LECs) 及びヒト肺由来血管内皮細胞 HMVEC-LBI (BECs) を用いて、それらの特性を評価した。まず、リンパ管・血管内皮細胞が異なる新生メカニズムを持つのかどうかを評価する目的で、各種抗がん剤 (D609、2-methoxyestradiol (2ME)) を用いて、それらが Matrigel 上で培養したリンパ管内皮細胞と血管内皮細胞の管腔形成能に与える影響を解析した(図4)。その結果、D609 はリンパ管・血管内皮細胞の両方の管腔形成を阻害していたのに対し、2ME はリンパ管内皮細胞の管腔形成のみを阻害していることが確認され、リンパ管内皮細胞の管腔形成 (リンパ管新生) には血管のそれとは異なるメカニズムが存在する可能性が示唆された。D609 は細胞増殖に必須のフォスファチジルコリン特異的フォスホオリパーゼCやプロテインキナーゼCの阻害剤として報告されており、リンパ管・血管内皮細胞の管腔形成を阻害していたことから、両細胞の細胞増殖阻害が関与しているのではないかと推察される。一方で、2ME は種々のサイトカイン分泌の調節に必須な低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α) の阻害剤として報告されており、2ME がリンパ管内皮細胞特異的に管腔形成を阻害していたことから、詳細なメカニズムは不明ではあるが、リンパ管・血管内皮細胞の HIF-1 α の発現が関与しているのではないかと考えられる。そこで、この特性の違いに関わるリンパ管特異的な新生関連タンパク質の探索のために、Matrigel 上で培養し、2ME 存在・

非存在下におけるリンパ管・血管内皮細胞からそれぞれタンパク質を調製し、各サンプルを 2D-DIGE 法にて解析した(図5)。そして、2ME 存在下におけるリンパ管内皮細胞において有意に発現が減少し、かつ同様の 2ME 存在下において血管内皮細胞では発現変動の見られなかった4個の spot に対して、MS 解析によるタンパク質の同定を試みたところ(表2)、細胞の形状の変化に由来して発現変動したと思われる細胞骨格タンパク質である keratin 9 の他に、HSP90 や GDP dissociation inhibitor 2 等の細胞内輸送関連タンパク質が見出された。このことは、更に詳細な解析が必要とされるものの、リンパ管内皮細胞特異的な新生にこれら発現変動タンパク質や HIF-1 α の相互作用が主導的に機能する可能性を示している。今後、本検討から得られたリンパ管特異的な新生関連タンパク質の情報を基盤として、その新生メカニズムが明らかにされていくものと期待している。

続いて、リンパ節転移能に着目してがん組織リンパ管を *in vitro* での再現する目的で、リンパ節転移能の異なる肺がん細胞株 (RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ) と気管上皮細胞 NHBE の CM をリンパ管内皮細胞に作用させ、管腔形成能及び浸潤能に与える影響を解析した(図6)。その結果、気管上皮細胞の CM を作用させた群と比較して、低リンパ節転移肺がん細胞株 RERF-LC-MS の CM を作用させた群では管腔形成能や浸潤能が殆ど変化しなかったのに対し、高リンパ節転移肺がん細胞株 RERF-LC-KJ の CM を作用させた群ではそれらが有意に増加しており、その結果ががん組織内における特性と一致することから、各種がん CM を用いることでがん組織リンパ管を *in vitro* で再現できることが判明した。また、これは preliminary なデータではあるが、RT-PCR 解析の結果、低リンパ節転移肺がん細胞株と比較して、高リンパ節転移肺がん細胞株ではリンパ管新生因子である VEGF-C や PlGF 等が過剰発現している傾向があった。以上の結果より、高リンパ節転移肺がん細胞株は低リンパ節転移のものと比較して VEGF-C 等のリンパ管新生因子を過剰に分泌すること、また、それらの因子の添加によって得られるリンパ管内皮細胞の特性 (管腔形成・浸潤) ががん組織内のそれと同様であることから、各種がん CM によってがん組織リンパ管を *in vitro* で再現できること等が推察された。

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 7)。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 3)。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。

まず Tat 改変体ライブラリ、及びランダム 18 mer ペプチドライブラリの構築のため、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 配列中の目的アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した Tat 改変体ライブラリ遺伝子、及び、ランダムな 18 アミノ酸をコードするランダム 18 mer ペプチドライブラリ遺伝子を作製した。本ライブラリ遺伝子をファージミドベクターに組み込み、大腸菌 TG1 株に導入、ヘルパーファージを感染させることで、多様な種類のペプチドをファージマイナー外殻タンパク質である g3p の先端に発現する各ペプチド発現ファージライブラリを作製した。それぞれ作製したライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シークエンスを解析した結果、NNS 塩基配列を導入した箇所がランダムなアミノ酸に置換されており、独立したクローンで構成されていることを確認した (表 4, 5, 6)。従って、構築した 3 種類のファージライブラリは、多様なペプチドを提示したファージクローンから構成される質の高いライブラリであることが示唆された。

構築した Tat 改変体ライブラリ-1 を用いて、モデル細胞である HaCaT 細胞に対してパンニングを 3 回行った。セルパンニングにより選別・濃縮されたクローンを、PSIF 発現ベクターに組換えた後に、大腸菌に形質転換し、PTD-PSIF 融合体を含む大腸菌培養上清を標的細胞に添加した際の細胞傷害活性を評価した。Tat 融合 PSIF 作用群が約 70% の viability を示す条件下で検討したところ、パンニング前は、いずれも Tat と同等以下の細胞傷害活性を示すクローンのみであったのに対し、パンニング後のクローンでは Tat よりも強い細胞傷害活性を示す多数のクローンを得ることに成功

した (図 8)。このことから、筆者が考案した 2-step スクリーニングが、PTD の機能改変戦略として非常に有効であることが示唆された。Tat 改変体ライブラリ-1 から選別してきたクローンのアミノ酸配列を確認したところ (表 7)、アルギニンが増加している傾向が認められたことから、PTD の細胞内への移行には塩基性アミノ酸の中でもアルギニンが重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、Futaki らが報告しているように、鎖長の異なるポリアルギニンペプチドの細胞内移行効率の検討から、アルギニン数と細胞内移行活性が必ずしも正の相関を示すわけではないと考えられている。従って、PTD の細胞内移行活性はアルギニン残基数、つまり塩基性の高さのみに依存するのではなく、アルギニン以外の構成アミノ酸の関与する可能性も十分に考えられる。事実、本検討で得られたクローンでは、アルギニンに次いでプロリンが増加している傾向にあった。プロリンは、唯一の環状アミノ酸であり、主鎖構造の折れ曲がりに関与する等、タンパク質やペプチドの立体構造上、重要な役割の担っていることが知られている。従って、プロリンのようにタンパク質の立体構造を維持する上で非常に重要なアミノ酸が保存される傾向にあったという事実は、PTD の一次構造のみならず、高次構造が細胞内移行活性に関与している可能性を示唆するものである。

本研究で得られた PTD と細胞内移行活性との相関に関する情報は、2-step スクリーニングを駆使することによって初めて可能となった非常に興味深い知見である。本検討は、Tat 改変ライブラリ-1 に焦点を絞って解析したが、将来的には残り三つのライブラリを用いて同様の検討を行うことによって、改良型 PTD の設計指針を提示できる有用な知見が得られるものと期待される。今後は、本細胞内タンパク質導入ペプチドを用いて、タンパク質医薬品の細胞内安定性評価系の確立を試みる予定である。

C-2. 各種 HLA の精製と抗原性評価システムの開発

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、モデルバイオ医薬品として抗体医薬 (エンブレル) 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。最初に、熱変性がエンブレルに対する影響を解析した (図 9)。その結

果、コントロールと比較して、サンプル番号を重ねるにつれ、左側にシフトする傾向が見られた(図 10)。モビリティ解析において、見かけの分子サイズが低下したものに関しては、イオンモビリティが短時間側へシフトすることから、今回行った熱変性については、分子サイズがよりコンパクトな形状へと変性している可能性が示唆された。

次に酸化変性が及ぼす影響に関して解析を試みた(図 11)。その結果、コントロールと比較して、サンプル番号を重ねるにつれ、左にシフトする傾向が確認でき、さらにメインピークの左側にショルダーが確認できた(図 12)。従って、酸化変性については、コンパクトな形状に変性することだけではなく、さらに異なる複雑な形状の分子が存在している可能性が示唆された。

今回、分析を行う上での問題点として、夾雑成分によるノイズが多く、解析が難しい傾向にあったため、詳細な解析はできなかったが、少なくとも、本質量分析装置を用いることで、タンパク質の変性状態が解析できることが明らかになった。今後、透析などによるバッファー交換を行うことで、より詳細な変性状態の解析が可能になるものと考えている。また、質量分析装置で測定を行う際、イオン化をさせる条件に関して、本検討では、中性付近でのイオン化を検討したが、安定したイオン化が難しい為、最終的にギ酸を用いた分析を行った。pH 2.5-3 程度の強酸条件になるため、コントロールタンパク質の変性が危惧されたが、イオン化まで約 3 分程度と短時間であるために、分析結果から大きな影響がないものと考えている。

本検討では、タンパク質医薬品の各種評価法の確立を目指して、in vivo における HLA 分子の重要性に着目するとともに、最新の技術としてのイオンモビリティシフトを利用した HDMS を、医薬品の品質管理に利用できる可能性が示唆された。今後、より詳細な解析を行うことで、タンパク質の変性状態と、その抗原性に関する基礎情報を集積できるものと期待している。

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

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

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

本検討結果では、加熱処理時間の長さに依存して、トラスツズマブの生物活性は低下することが明らかになった(図 13)。加熱変性により、タンパク質の構造が変化し、その結果として活性が低下するものと考えられる。再現性を取る必要があるものの、本活性測定条件は、今後のタンパク質薬物の検定作業に有用な方法であることが示唆された。

本検討結果から明らかとなった、活性の低下しているトラスツズマブをイオンモビリティ質量分析装置にて、その構造を解析した。変性条件が厳しく(高温、長時間)なるにつれ、検出されるトータルシグナル量の低下が認められた(図 14, 15)。この結果から、変性により装置に添加されている試料が、何らかの形で失われている可能性が示唆された。そこで、測定後のサンプルをタンパク定量した結果、いずれのサンプルにおいても、タンパク質の顕著な低下は観察されなかった。この原因に関しては現在検討中であるが、測定条件、特にイオン化時の価数と測定マスレンジによって、シグナルが増強している可能性も考えられるため、今後は異なる価数、およびマスにおけるシグナルも測定する予定である。

これまでの検討で、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 16, 17)。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 18)。

図 18B 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 19)。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 8)。さらに、図 19 の結果から算出した IC50 の値をまとめた (表 8)。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 (表 8)、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 20)。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 21)。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

アデノウイルスベクターを生体に投与すると、通常数週間から数ヶ月間の一過性の遺伝子発現を示す。即ち、従来のアデノウイルスベクターは、ウイルスの増殖やウイルスタンパク質の合成に必須の E1 遺伝子領域を除去することで、ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが、E1 遺伝子非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり、これが免疫系のターゲットとなり、一過性の遺伝子発現の原因になると考えられている。即ち、タンパク質の抗原性試験のための効率の良いアデノウイルス遺伝子発現系の開発のためには、この問題を克服する必要がある。これまで我々は、アデノウイルスコード遺伝子を全て除去した gutted アデノウイルスベクター系の確立を行ってきた。gutted アデノウイルスベクターを用いた場合は、上記免疫の問題が克

服される結果、通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められることが報告されている(図 22)

作製した gutted アデノウイルスベクターのヘルパーウイルス混在率を定量的 PCR 法で測定したところ、0.1~1 %程度であった。この混入率は、他の報告と同レベルであった。また、最終的な gutted アデノウイルスベクターのタイターは 10^{11} VP 前後であり、十分に高いものであった。従って、種々の実験に供することのできる gutted アデノウイルスベクターの調製に成功した。GFP 発現について、培養細胞を用いて検討したところ、従来の E1 欠損型アデノウイルスベクターと同程度であり、目的遺伝子も期待通りに発現することを確認した。

全てのアデノウイルスコード遺伝子を欠損した gutted アデノウイルスベクターは、種々の作製法が知られている。例えば、cre-loxP の組換えを利用して、アデノウイルスコード遺伝子を欠損させて、外来遺伝子だけをパッケージングさせる方法や、本研究で検討したヘルパーウイルスを用いる方法等が知られている。ヘルパーウイルスを用いる gutted アデノウイルスベクター法が最も汎用されているが、ヘルパーウイルスの混在率が高くなることや(数%以上)、高タイターの目的の gutted アデノウイルスベクターを得るのが難しいという問題があった。本研究で使用したベクター系は、パッケージング細胞(cre の発現レベルが高い)やヘルパーウイルスに種々の改良が加えられており、ある程度の技術を身につければ、実用に耐えうるレベルの gutted アデノウイルスベクターの調製が可能となった。本ベクター系は、従来のアデノウイルスベクター発現系と異なり、アデノウイルス抗原の発現が全く起こらないため、タンパク質の抗原性試験を適切に行うことが可能になると期待される(図 22)。

作製した gutted アデノウイルスベクターのヘルパーウイルス混在率を定量的 PCR 法で測定したところ 1 %以下であり、実験に供するに十分な純度であった。また、最終的な gutted アデノウイルスベクターのタイターは 10^{11} VP 前後であり、十分に高いものであった。従って、種々の実験に供することのできる gutted アデノウイルスベクターの調製に成功した。

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA を発現する gutted アデノウイルスベクターの RNAi 効果を従来型の E1 欠損型アデノウイルスベクター(E1 欠損領域にルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA

カセットを搭載)と比較検討したところ、従来型に比べ gutted アデノウイルスベクターでより高いルシフェラーゼ発現抑制効果が見られた(図 23)。従って、gutted アデノウイルスベクターを用いた場合は、免疫反応の抑制が期待できるだけでなく、よい高い RNAi 効果も期待できることが判明し、特定の遺伝子発現抑制を目的とした研究に極めて有用なことが示唆された。

全てのアデノウイルスコード遺伝子を欠損した gutted アデノウイルスベクターは、種々の作製法が知られている。例えば、cre-loxP の組換えを利用して、アデノウイルスコード遺伝子を欠損させて、外来遺伝子だけをパッケージングさせる方法や、本研究で検討したヘルパーウイルスを用いる方法等が知られている。ヘルパーウイルスを用いる gutted アデノウイルスベクター法が最も汎用されているが、ヘルパーウイルスの混在率が高くなることや(数%以上)、高タイターの目的の gutted アデノウイルスベクターを得るのが難しいという問題があった。本研究で使用したベクター系は、パッケージング細胞(cre の発現レベルが高い)やヘルパーウイルスに種々の改良が加えられており、ある程度の技術を身につければ、実用に耐えうるレベルの gutted アデノウイルスベクターの調製が可能となった。本ベクター系は、従来のアデノウイルスベクター発現系と異なり、アデノウイルス抗原の発現が全く起こらないため、タンパク質の抗原性試験を適切に行うことが可能になると期待される。

アデノウイルス DNA がコードする VA RNA (VA RNAI と VA RNAII) は、shRNA による RNAi 効果を顕著に抑制することが報告されている。VA RNA は、約 160 塩基長の非翻訳 RNA ポリメラーゼ III 転写産物であり、特に転写量が多い VA RNAI は、アデノウイルス複製時には細胞あたり $\sim 10^8$ 分子にも達する。VA RNAI はアデノウイルス複製時に、ウイルス dsRNA (2 本鎖 RNA) による protein kinase R (PKR) の活性化を阻害する中心的な働きをしており、VA RNAI 非存在下では、PKR が活性化し、翻訳因子の eIF-2 α のリン酸化を誘導し、ウイルス mRNA の翻訳を阻害することが知られている。また、VA RNAI は pre-miRNA や shRNA 前駆体の核外輸送を exportin5 と競合することで阻害したり、Dicer に結合することで Dicer 機能を阻害し、結果として、成熟 miRNA や siRNA の生成を阻害することが報告された。これらは E1 領域を含んだ野生型アデノウイルスについて主に認められる現象であるが、E1 領域を欠損した組換えアデノ

ウイルスベクターにおいても、VA RNA (VARNAI と VARNAII) は発現していることから、これらが siRNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果を減弱している可能性が強く示唆される (ベクターとして用いる場合は VA RNA 自身の機能は不要である)。gutted アデノウイルスベクターにおいては、全てのウイルスコード遺伝子を欠損しているため、VA RNA の発現も認められず、これが本研究において gutted アデノウイルスベクターによる RNAi 効果が高かった原因と考えられ、特定の遺伝子発現抑制を目的とした研究においても、gutted アデノウイルスベクターは極めて有用な基盤技術になりうることを示唆された。

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24)、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25)。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. 人工リンパ組織の構築

二次リンパ組織の発生にはその発生原基に存在するストローマ細胞がTNFファミリー受容体を介したシグナルによってリンパ組織性ケモカインを発現することが重要であるとされている。そこで人工リンパ組織構築において最も多数のリンパ球を集積させたストローマ細胞株に *in vitro* でTNFファミリー受容体刺激を加えて発現が誘導される分子を調べた結果、予測に反してCCL19、CCL21およびCXCL13などのリンパ組織性ケモカインは刺激の有無に関係なく発現していないことが分

かった (図26)。人工リンパ組織が強力な獲得免疫機能を発揮するためには、抗原特異的であるか否かに係らずリンパ球が多数集積することが重要であると考えており、我々が今回選び出したストローマ細胞株からのリンパ組織性ケモカインの分泌が効率のよい人工リンパ組織の構築に有用なのであろうと予測していた。しかし、このストローマ細胞がリンパ組織性ケモカインを発現していなかったことから、人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積には他のサイトカイン (ケモカインを含む) が直接的あるいは間接的に関与していることが示唆される。それが既知のサイトカインの組み合わせであるのか、また未知のケモカインであるのかは不明であるが、さらに別の数種類のストローマ細胞を用いた人工リンパ組織構造の比較を行うことにより重要因子の絞り込みが可能であると考えている (図27)。

二次リンパ組織の発生にはその発生原基に存在するストローマ細胞がTNFファミリー受容体を介したシグナルによってリンパ組織性ケモカインを発現することが重要であるとされている。そこでA細胞株に *in vitro* でTNFファミリー受容体刺激を加えて発現が誘導される分子をDNAマイクロアレイによって検討したところ、CCL19、CCL21、CXCL12及び、CXCL13などのリンパ組織性ケモカインは刺激の有無に関わらず発現していないという結果であった。次に市販のポリクローナル抗体を使ってA細胞株の免疫細胞染色を行ったところ、やはりこれらのケモカインの発現は確認できなかった。

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

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

人工リンパ組織が強力な獲得免疫機能を発揮するためには抗原特異的リンパ球を含む免疫細胞を多数集積させる必要がある。今回の研究ではA細胞株によるリンパ組織性ケモカイン (CCL19、CCL21、CXCL12及び、CXCL13) の発現が確認できなかったことから、A細胞株を用いて構築した人工リンパ組織へのリンパ球の遊走と集積には①「リンパ組織性ケモカイン以外のサイトカイン (ケモカインを含む) が関与」していると考えられる。また、A細胞株を用いて構築した人工リン