

パ組織にはリンパ球の流入に関与していると考えられる特殊な血管構造が観察されたことより、②「A 細胞株が分泌する何らかのサイトカインがこの特殊な血管新生を誘導する」可能性も示唆される。別のストローマ細胞株に遺伝子を導入して B リンパ球ケモカインである CXCL13 を発現させた細胞株 (B-CXCL13 細胞と略称する) を用いて人工リンパ組織を構築した場合でも B リンパ球の集積は顕著でなく、また A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織に見られる特殊な血管構造が少ないという実験結果は前述の①と②の可能性を支持するものである。さらに A 細胞株を用いて構築した人工リンパ組織で抗原特異的抗体産生及び細胞性免疫能を効率よく誘導されたことから人工リンパ組織に抗原特異的なリンパ球が選択的に集積するメカニズムの存在が示唆される。

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するようになる。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<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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. タンパク質変性に伴う構造変化の検出

タンパク質製剤のモデルとして、多発性硬化症、リウマチなどの自己免疫疾患に適用されている腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体の Fc キメラであるエンブレルを用いた。蛋白性医薬品は、製造工程・保存過程で酸化修飾を受けることが知られている。そこで次に、エンブレルを人工的に酸化処理し、変性状態など特性を評価した。酸化処理は一般的に使用される、塩化銅、アスコルビン酸による酸化法を用いた。その結果、エンブレルの酸化処理群において、目視では白濁などは観察されなかったが、タンパク質凝集の指標である A280/260 の低下が観察された (図 28)。また、SDS-PAGE 解析の結果、未処理群と比較して全く異なるバンドパターンを示した (図 29)。分子量の増大したバンドと同時に分子量の低下した分解産物なども観察されたが、詳細は不明である。現在、ゲルろ過 HPLC を用い、より詳細な分子量変化に関して検討を進めている。

次に、分子間の $\beta$ 構造を認識するプローブであり、アミロイド繊維に特異的に結合するチオフラビン T を用い、酸化処理によるタンパク質変性を詳細

に観察した。その結果、酸化処理群において、チオフラビン T による蛍光強度の増加が確認されたことから、酸化処理によりアミロイド繊維を含む変性が誘導されることが判明した (図 30)。本検討では、96 穴プレートによる解析を行ったが、より感度の高い機器を用い測定することで、より高感度に評価する必要がある。

更に、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。ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞に加え、24 時間後に上清中の IL-8 量を ELISA にて測定した。その結果、未処理群では全く IL-8 産生は認められなかったが、酸化処理群では有意な IL-8 産生が観察された (図 31)。以上の結果から、エンブレルの酸化処理により免疫細胞から炎症性サイトカインが産生される可能性が示唆された。TNF 受容体 Fc キメラは、リウマチ患者への投与において 16% の患者で抗 TNF 受容体 Fc キメラ抗体の産生が認められたが、治療成績に影響はなかった報告がある。一方で、多発性硬化症患者への投与では、90% の患者において抗体産生が認められ、TNF 受容体 Fc キメラの体内クリアランスが増大したとの報告もある。疾患により抗原性に違いが出た理由は明らかでないが、今後もその抗原性を詳細に検討していく必要性が高い蛋白性医薬品の一つである。そこで、次の検討ではエンブレルを用い、酸化処理によるタンパク質変性、免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、酸化処理によりアミロイド繊維を含むタンパク質変性が誘発され、マクロファージを活性化する可能性が示唆された。本検討では、IL-8 のみを測定したが、今後は他のサイトカイン、ケモカインについても検討する予定である。また、マクロファージだけでなく、抗原性惹起により深く関与している樹状細胞に対する影響も検討する予定である。

データに示していないが、熱処理による影響も検討した。エンブレルの熱処理によってもチオフラビン T の蛍光値増大が酸化処理群と同等に認められたことから、アミロイド繊維を含むタンパク質変性を誘発したと考えられる。しかし、熱処理群では全く IL-8 産生は観察されなかった。この違いが何に起因するのか、現段階では詳細は不明であり手がかりは無い状態である。そのため、酸化処理群でどのようなメカニズムで IL-8 産生を誘導するかを検討していくことが重要と考えられる。近年、アルツハイマー病発症に関与する  $\beta$  アミロイドなど、アミロイド様物質がスカベンジャーレセプターを介して、細胞に認識されることが明らか

となってきた。現在、酸化処理したエンブレルが、スカベンジャーレセプターを介してマクロファージを活性化していると考えており、以降の検討課題としている。

実際の医薬品の製造工程・保存過程で、どの程度このような現象が誘導されているかは不明である。しかし、現在販売されている蛋白性医薬品においても、長期保存においてタンパク質が変性しているとの報告もある。今後は、エンブレルなど他のタンパク質医薬品においても、長期保存などにおいてどの程度、アミロイド繊維を含む変性が誘発されるかに関して検討する予定である。

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を行うにあたり、まず変性タンパク質の免疫細胞に与える影響を検討した。タンパク質製剤のモデルとして、抗体医薬として既に汎用されている抗 Her2 抗体ハーセプチンを用いた。蛋白性医薬品は、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。そこで本検討では、ハーセプチン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。ハーセプチンを 95℃ で 5 分、15 分、30 分、60 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が、タンパク質凝集の指標である A280/260 の低下が観察された (図 32)。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。熱処理したハーセプチンを、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 細胞に加え、6 時間後に上清中の IL-1 $\beta$  産生量を ELISA にて測定した。その結果、未処理群では全く IL-1 $\beta$  産生は認められなかったのに対して、熱処理群では熱処理時間依存的に IL-1 $\beta$  産生の増大が観察された (図 33)。本検討では、加えるタンパク質の濃度依存的な IL-1 $\beta$  産生の増大はクリアに観察されなかったことから、今後より詳細な検討は必要であるが、ハーセプチン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た。

次に、抗原性評価システムの開発のために、ヒトに代表的な HLA の精製を行った。生体内において抗原 (異物) は樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、10-30 アミノ酸のペプチドとして MHC クラス II に抗原提示される。この MHC クラス II -ペプチド複合体を CD4 陽性 T 細胞が T 細胞受容体を介して認識し、抗原特異的 B 細胞を活性化することで抗原特異的抗体産生が惹起される。この過程で、抗原が持つ“抗原性”の強弱 (抗体誘導能) は、CD4 陽性 T 細胞の活性化や、プロセシ

グを受けたペプチドの MHC クラス II に対する結合親和性の強弱と正の相関を示すことが知られている。そこで本研究では、タンパク質製剤由来ペプチドの MHC クラス II への結合親和性を指標とした、簡便かつ再現性よく抗原性を評価可能な *in vitro* 評価システムの確立を図った。本研究では、多種類の MHC クラス II 分子を得ることが大きな鍵となる。しかし、MHC クラス II 分子は、当然販売されておらず、大腸菌、酵母などを用いたリコンビナントタンパク質の作成も困難とされている。そこで、単一の MHC クラス II 分子を大量発現している B 細胞株から精製する方法を試みた。ヒト MHC クラス II 分子 (HLA-DR) に対する抗体を発現するハイブリドーマを入手し、マウス腹水から抗体を回収した。SDS-PAGE 解析の結果から、高純度の抗体が得られていることが示された (図 34)。抗 HLA-DR 抗体を用いアフィニティーカラムを作成した後、単一の HLA-DR 分子を大量に発現する細胞株の破碎液をアフィニティーカラムに通すことで、HLA-DR を 2 種類 (HLA-DR7、HLA-DR9) 大量に精製することに成功した。次に、精製した HLA-DR の特性評価のため、SDS-PAGE 解析を行った (図 35)。HLA-DR7、HLA-DR9 共に、還元剤存在下で加熱後、SDS-PAGE 解析すると 30kDa 付近に  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖と考えられるバンドが観察された。これまでの報告から、機能的な HLA-DR タンパク質は、還元剤存在下で非加熱で SDS-PAGE 解析すると、 $\alpha$ 、 $\beta$  のヘテロダイマーが観察されることが知られている。そこで次に、精製した HLA-DR7、HLA-DR9 タンパク質を、還元剤存在下で非加熱で SDS-PAGE 解析したところ、 $\alpha$ 、 $\beta$  鎖の個々のバンドが消失し、 $\alpha\beta$  鎖ヘテロダイマーと予想されるバンドが観察された。以上の結果から、精製度は 50-70% であるが、機能的な HLA-DR が精製されていることが示された。

本検討ではハーセプチンを用い、熱処理によるタンパク質変性、免疫細胞に与える影響に関して検討した。その結果、熱処理によりタンパク質変性が誘発され、マクロファージを活性化する可能性が示唆された。IL-1 $\beta$  は、炎症反応のトリガーとして TNF $\alpha$  や IL-6 など他の炎症性サイトカインを誘導することで免疫を活性化させ、過剰な免疫応答を誘導することが知られている。近年、アルツハイマー病発症に関与する変性タンパク質  $\beta$  アミロイドが、脳内マクロファージであるミクログリアからの IL-1 $\beta$  産生を誘発することで、免疫反応を惹起する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-1 $\beta$  産生に引き続く免

疫反応が誘導される可能性が示唆され、より詳細な検討が今後必要と考えられる。

実際の医薬品の製造工程・保存過程で、どの程度このような現象が誘導されているかは不明である。しかし、現在販売されている蛋白性医薬品においても、長期保存においてタンパク質が変性しているとの報告もある。今後は、他のタンパク質医薬品においても、長期保存などにおいてどの程度、タンパク質変性が誘発されるかに関して検討する予定である。

また、機能的な HLA-DR を精製する方法論の確立に成功した。今後は、より多くの HLA-DR の精製を試みると共に、精製 HLA-DR とタンパク質製剤由来ペプチドとの結合力を評価することで、タンパク質製剤に内在する抗原性誘発ペプチドの同定を試みる予定である。

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。バイオ医薬品は、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。そこで本検討では、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 $\beta$  産生量を ELISA にて測定した。その結果、LPS 刺激にて IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  産生の増加が観察された (図 36)。一方、熱変性を行わなかったタンパク質では、IL-1 $\beta$  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 $\beta$  の産生を増加させることが明らかになった。

この、IL-1 $\beta$  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 37)。その結果、添加した Gö6983 の濃度依存的な IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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

C.研究結果の欄に記載

## E. 結論

### E-1.

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。

### E-2.

ヘルパーウイルスの混在率が 1%以下の gutted アデノウイルスベクターの産生系を確立した。

### E-3.

選択したストローマ細胞から分泌されるどのサイトカインがリンパ球の遊走と集積に重要であるかについてはさらに検討が必要である。その一方で、このストローマ細胞が分泌していないリンパ組織性ケモカイン遺伝子を導入して安定発現細胞株を樹立して人工リンパ組織構築に用いる事も、より多くのリンパ球や樹状細胞を遊走させるためには有用であろうと考えている。順次、安定発現細胞株を樹立して人工リンパ組織構築に適用し、抗原特異的な免疫反応に及ぼす効果を検証する予定である。

### E-4.

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”に焦点を絞り、タンパク質の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変性状態に関する基礎情報を得るために、タンパク質の抗原性を規定する鍵分子としての HLA に着目し、in vivo におけるタンパク質製剤の抗原性を評価しうる、全く新しい抗原性評価システムに関する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、HDMS 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 HDMS 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。

### E-5.

①エンブレルを熱処理、酸化処理することで、アミロイド繊維形成を伴うタンパク質変性が誘導されることが判明した。更に、酸化処理群では、マクロファージの活性化を惹起する可能性が示唆された。

②MHC クラス II とペプチドの結合性を指標とした抗原性評価システムの構築に向けて、材料などの準備を行った。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

1. Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. : Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain., *Biol. Pharm. Bull.*, 30(2):218-223, 2007.
2. Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035, 2007.
3. Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library., *Pharmazie*, 62(8):569-573, 2007.

4. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363:1027-1032, 2007.
  5. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Tani M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
  6. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, 153(6):1143-1152, 2008.
  7. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity., *J. Immunol. Methods.*, 335(1-2):71-78, 2008.
  8. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380(5):777-782, 2008.
  9. Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system., *Pharmazie.*, 63(10):760-764, 2008.
  10. Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., and Shimizu A. Organizer-Like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 181(9): 6189-6200, 2008
  11. Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells., *Pharmazie.*, 64(3): 214-216, 2009
  12. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex, *Acta. Crystallogr. Sect. F.*,65(Pt.3): 295-298, 2009
  13. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Tani M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.*, 385:1221-1229, 2009.
  - 14.
- 総説・その他
1. 堤 康央, 石井明子, 早川堯夫 : 第6節 機能性人工タンパク質., *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, (株)エル・アイ・シー, p.369-378, 2007.
  2. Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y. : Development of new anti-TNF therapy., *Inflammation and Regeneration*, 27:512-515, 2007
  3. 水口裕之、櫻井文教、川端健二 ; *カプシドタンパク質改変アデノウイルスベクター、遺伝子医学 MOOK 別冊 絵で見てわかるナノDDS*, 235-242 (2007)
  4. 水口裕之 ; *アデノウイルスベクター開発の最前線、バイオテクノロジージャーナル*, 7(2), 168-173 (2007)
  5. 水口裕之・早川堯夫 ; *アデノウイルスベクター ; バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保*,

- 早川堯夫監修、エル・アイ・シー、pp563～577 (2007)
6. 水口裕之; 遺伝子治療研究の動向; 医薬ジャーナル新薬展望 2008、44: 235-242, 2008
  7. 水口裕之; アデノウイルスベクター; 機能性 DDS キャリアの製剤設計 (シーエムシー出版)、岡田弘晃監修、133-141 (2008)
  8. 末松佐知子; 人工リンパ組織構築とは何か. Organ Biology 15(1) 23-32, 2008
  9. 水口裕之; 改良型アデノウイルスベクター開発の最前線、脳 2 1、12、123-131 (2009)
  10. 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. 衛藤佑介, 吉岡靖雄, 森重智弘, 姚 醒蕾, 倉知慎之輔, 水口裕之, 堤 康央, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 全身投与による癌遺伝子治療の最適化を目指した高分子バイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製., 遺伝子・デリバリー研究会 第 7 回シンポジウム, 東京, 2007 年 7 月.
2. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央: 抗腫瘍活性に優れた TNF レセプター指向性変異体の創製., 第 23 回 DDS 学会, 熊本, 2007 年 6 月.
3. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向 洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央: プロテオミクス創薬を志向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの開発., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
4. 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央: 腫瘍壊死因子- $\alpha$  の活性に及ぼす 90 番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
5. 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 鎌田春彦, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央: ファージ表面提示法を駆使した TNFR2 指向性アゴニストの創製., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
6. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央: 三酸化ヒ素の抗白血病治療効果発現に関連した蛋白質の探索., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
7. Mukai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S.: Application of membrane-permeable Protein Transduction Domain (PTD) for efficient intracellular drug delivery., 第 5 回メンブレン・ストレスバイオテクノロジー (MSB) シンポジウム, 大阪, 2007 年 9 月.
8. Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y.: A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of phage library and 2D-DIGE., 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
9. 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 細胞膜透過性 TAT ペプチドと膜融合性 HA2 ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
10. 向 洋平, 今井 直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一: 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第 57 回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007 年 10 月.
11. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
12. 長野一也, 今井 直, 杉田敏樹, 向 洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 血栓性疾患の機能解明・治療を目指したファージ抗体ライブラリの構築., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
13. 向 洋平, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央: TNF レセプター選択的阻害剤開発を目指した TNFR2-TNF 複合体の X 線結晶構造解析., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
14. 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.

15. 杉田敏樹, 吉川友章, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発-2., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
16. 吉田康伸, 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規細胞内移行ペプチドの創出と血管機能制御技術としての展開., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
17. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : プロテオーム解析を用いた白血病における血栓症発症に関する蛋白質の探索., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
18. 萱室裕之, 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 吉川友章, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央 : Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice., 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007 年 11 月.
19. 吉田康伸, 今井 直, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 小泉桂一, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管新生阻害剤を用いたリンパ管新生シグナル伝達経路の解析..第 80 回日本生化学会大会, 横浜, 2007 年 12 月
20. 杉田敏樹, 吉川友章, 長野一也, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規 Protein Transduction Domain peptide の細胞内 DDS キャリアーとしての特性解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
21. 阿部康弘, 向 洋平, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : 創薬プロテオミクスの実現に叶う機能性人工蛋白質の迅速創出技術の開発., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
22. 今井 直, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : 疾患関連蛋白質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
23. 鍋師裕美, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価 (1) : トキシコプロテオーム解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
24. 吉川友章, 鍋師裕美, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価 (2) : 細胞内局在解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
25. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 形山和史, 阿部康弘, 野村鉄也, 廣井隆親, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央 : 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての応用., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
26. 長野一也, 吉川友章, 杉田敏樹, 今井 直, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 免疫制御技術の開発に向けた制御性 T 細胞の抗体プロテオミクス研究., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
27. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 山本昌, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価 (1) : 関節リウマチモデルに対する治療効果の検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
28. 吉田康伸, 今井 直, 杉田敏樹, 阿部康弘, 萱室裕之, 長野一也, 鍋師裕美, 野村鉄也, 小泉桂一, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによるリンパ管新生関連分子の探索と機能評価に向けて.. 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
29. 西森 光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央, 八木清仁 : ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
30. 亀井数正, 向 洋平, 小島拓記, 吉川舞, 角田慎一, 堤 康央, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作 : 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
31. 水口裕之 ; 高性能なアデノウイルスベクターの開発を目指して ; 「遺伝子・細胞治療に携わる臨床研究者育成」セミナー -日本の遺伝子治療臨床研究の現状と今後の展望- ; 岡山大学医学部 (岡山) ; 2008 年 1 月 25 日
32. 水口裕之 ; 遺伝子導入技術の開発と先端科学への応用 ; 大阪市立大学医学部博士課程セミナー (大阪) ; 2007 年 12 月 4 日
33. Hiroyuki Mizuguchi ; Drug delivery system of adenovirus vectors ; 第 66 回日本癌学会

- 総会 (横浜); 2007年10月3-5日
34. 水口裕之; アデノウイルスベクターとDDS; 第44回薬剤学懇談会研究討論会(熊本); 2008年6月28日
  35. 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と先端科学への応用; 国立生育医療センター・研究所 特別セミナー(東京); 2008年6月21日
  36. 水口裕之; 遺伝子の機能解析基盤技術—改良型アデノウイルスベクターを中心に—; 第80回組織培養学会(大阪); 2008年5月14日
  37. 末松 佐知子; ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築; 日本組織培養学会第80回大会 大阪 2007年5月
  38. 末松 佐知子; ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築; 第34回臓器保存生物医学学会, シンポジウム5 遺伝子工学と組織再生、札幌, 2007年11月
  39. Yuki Hattori and Sachiko Suematsu.: Functional Lymphatic Vessel Formation in Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-Like Organoids in Mice., 第37回日本免疫学会総会, 東京, 2007年11月
  40. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: アンタゴニスト活性を有するI型受容体指向性TNF変異体の評価: 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第24回DDS学会, 東京 2008年6月.
  41. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作: ファージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン $\alpha$ の創製とその特性評価., 第8回日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008年6月.
  42. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 新規自己免疫疾患治療薬の開発を目指したTNFR1指向性アンタゴニストの創出., ファーマバイオフォーラム2008, 東京, 2008年11月.
  43. 吉田康伸, 今井 直, 長野一也, 岡村賢孝, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクスによるがんリンパ節転移マーカーの探索., 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月.
  44. 野村鉄也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬の開発を目指したTNFR1 指向性変異体の創出., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月.
  45. 河原倫之, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 角田慎一, 近藤昌夫, 堤 康央, 八木清仁: C型肝炎の克服を目指した高機能化IFN $\alpha$ 8構造変異体の創製., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月.
  46. 水口裕之, 次世代アデノウイルスベクターの開発と先端医療・生命科学研究への応用、第46回未来医療セミナー、大阪、2009年3月18日
  47. 水口裕之、遺伝子導入技術開発と生命科学研究、東北大学21世紀COE (CRESCENDO) 生活習慣病フォーラム、仙台、2009年3月10日
  48. 水口裕之、次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への応用、神戸学院大学(神戸)、2009年3月6日
  49. 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発; 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線 in 神戸 ~臨床応用に向けた課題と今後展開~ (神戸); 2008年12月8日
  50. 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への貢献; 近畿大学第3回ハイテクリサーチシンポジウム(大阪); 2008年9月27日
  51. Suematsu S., Hattori Y., Characteristic vascular system induction is important for artificial lymphoid tissue construction and its immune function. 第38回日本免疫学会総会学術集会, 京都, 2008年12月.
  52. 服部 祐紀, 末松 佐知子, 松岡須美子, 竹下千恵: 腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果. 第8回再生医療学会総会, 東京, 2009年3月.
  53. 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
  54. 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

1. Minowa K., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Fujita T., Yamamoto A., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H.,



- Tsutsumi Y. : Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display system, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
2. Tsunoda S., Imai S., Yoshida Y., Nagano K., Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y. : An efficient method for the production of monoclonal antibodies to tumor-related proteins using a combination of phage display library and 2-dimensional differential gel electrophoresis, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
  3. Mukai Y., Nakamura T., Shibata H., Abe Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystal structure of the receptor subtype I selective antagonistic TNF revealed its molecular basis as the proteo-antagonist, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
  4. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel therapeutic approach using an intracellular targeting strategy with membrane-permeable peptides., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
  5. Nabeshi H., Kamada H., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Minowa K., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide alters expression and oxidative modification of the proteome in leukemic cells, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
  6. Nomura T., Shibata H., Abe Y., Minowa K., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
  7. Yoshikawa T., Imai S., Nagano K., Sugita T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simultaneous identification of tumor-specific proteins and their antibodies by combining a proteomics technique and phage display library, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
  8. Yoshioka Y., Morishige T., Watanabe H., Tanabe A., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Okada N., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
  9. Minowa K., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Kayamuro H., Shibata H., Fujita T., Yamamoto A., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
  10. Abe Y., Nabeshi H., Nomura T., Kayamuro H., Minowa K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of the valuable cell line which evaluates the bioactivity through TNFR2 using chimeric receptor strategy., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
  11. Yoshida Y., Imai S., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Proteomic profiling of human lymphatic endothelial cells for analyzing lymphangiogenesis, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam (The Netherlands), 16 - 20 August, 2008.
  12. Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Mukai Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- $\alpha$  using a phage display system with one-step competitive-subtractive panning., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008

13. Nomura T., Abe Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Mukai Y., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of mutant TNF- $\alpha$  with TNF receptor-1 selective antagonistic activity for the development of a novel autoimmune disease drug., 7th Joint Conference of the International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.
14. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.: Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., 7th Joint Conference of the International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.
15. Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Evaluation of safety and efficacy of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF as a novel anti-inflammatory drug., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U.S.A.), 15-19 March, 2009.
16. 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

人工リンパ節

(特許第 4097544 号平成 20 年 3 月 21 日)

##### ② 実用新案登録

該当なし

##### ③ その他

該当なし

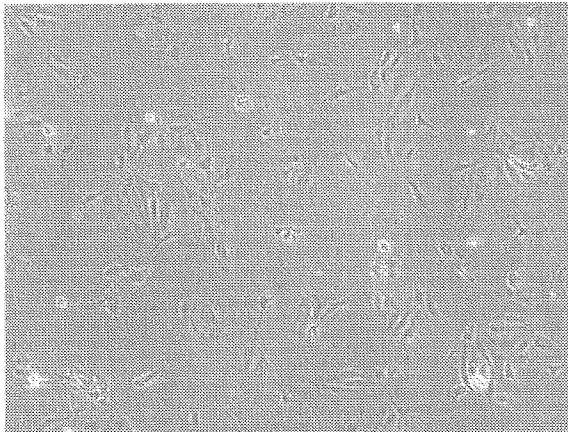
尚、本研究の研究協力者を下記に列挙する

吉川友章、長野一也、橋野のぶよ、山根美紀、今井直、鍋師裕美、野村鉄也、萱室裕之、山下琢矢、赤瀬貴憲、吉田康伸、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、有森亮裕、磯部将彰、東阪和馬、中西亮介、平井敏郎、近藤小百合、金崎聡一郎、古屋剛、森下裕貴

表1 ペプチドライブラリ作製用オリゴDNA配列

Y-oligo22 3'ex	TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
Tat11 (47-57) [5] R	TCATCCTTGTAGTCTGCGGCCGCACGACGACGSNNACGACGSNNSNNA CGSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATGAAAG
P-oligo1	GATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAA AAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCCTTCTATGCGGCCAGCC GGCCATGGCC
P-oligo2	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN
P-oligo4	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN TAGAA

(A) 通常培養dish



(B) matrigel

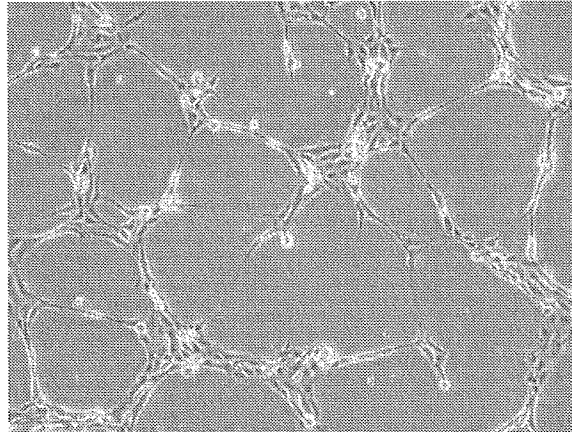
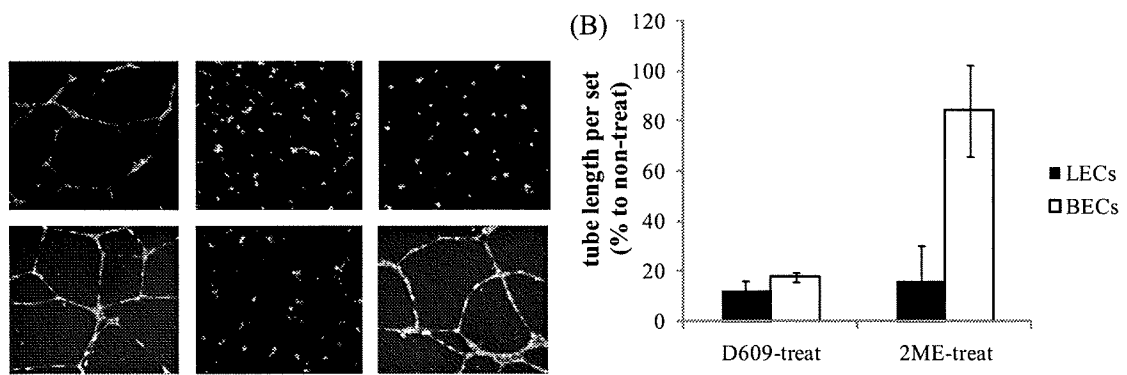


図1 ヒト由来リンパ管内皮細胞の管腔形成能評価





**図4 LECおよびBECに及ぼす可逆的阻害剤D609と2MEの管腔形成阻害効果**

マトリゲルに各細胞を播種し、管腔形成の阻害効果を tube formation assay にて検討した。A. 各細胞の管腔形成の様子 B.各細胞の管腔形成に及ぼす阻害剤の影響



**図5 二次元電気泳動法 (2D-DIGE) による 2ME の LEC および BEC のタンパク質発現に及ぼす影響**  
各細胞由来のタンパク質を蛍光試薬にてラベル化し、その発現の変化を、2D-DIGE 法にて差分解析した。

表2 Identification of 2ME related proteins by MALDI-TOF/MS

spot	protein name	MW	pI	2ME (+) / 2ME (-) in LECs	2ME (+) / 2ME (-) in BECs
#1	HSP90AA1 protein	68619	5.08	2.0-fold ↓	1.0
#2	Keratin 9	62259	5.14	2.3-fold ↓	1.0
#3	GDP dissociation inhibitor 2	46054	5.91	2.2-fold ↓	1.0
#4	EEF1G protein	50162	6.27	2.0-fold ↓	1.0

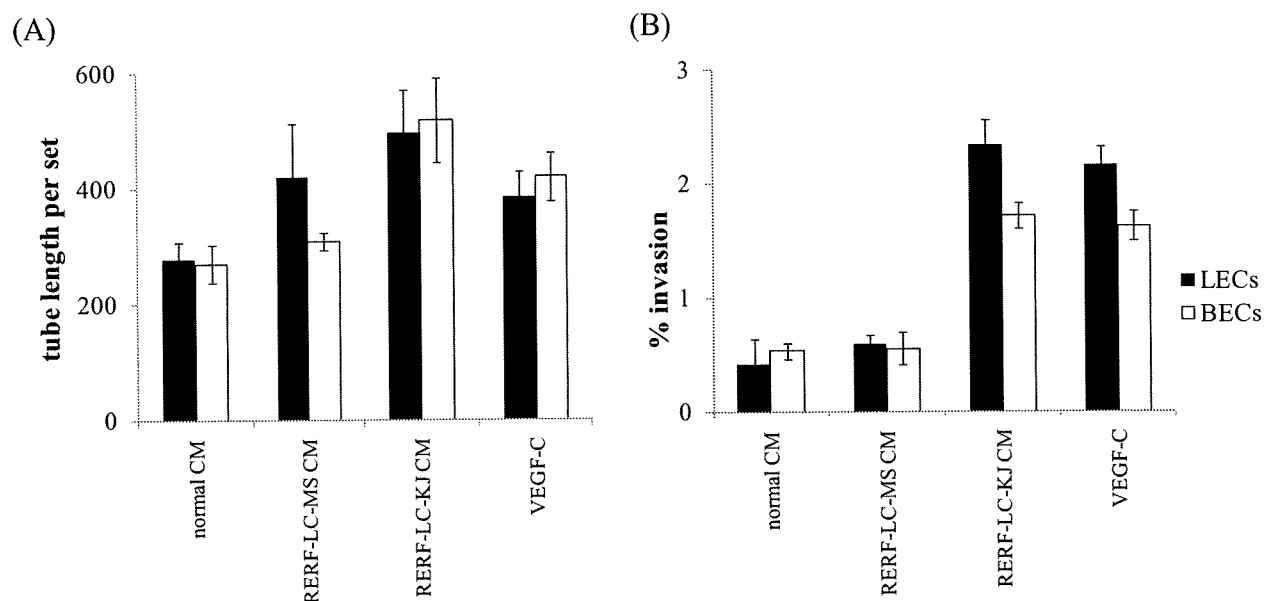


図6 肺がん細胞由来の馴らし培地が及ぼす各細胞に対するリンパ管新生、血管新生に対する影響  
高転移がん細胞あるいは低転移がん細胞の馴らし培地をリンパ管内皮細胞、あるいは血管内皮細胞に作用させ、その影響を tube formation assay ならびに invasion assay にて検討した。なお、陽性コントロールとして、VEGF-C (10  $\mu$ g/ml)を用いた。A. tube formation assay、B. invasion assay

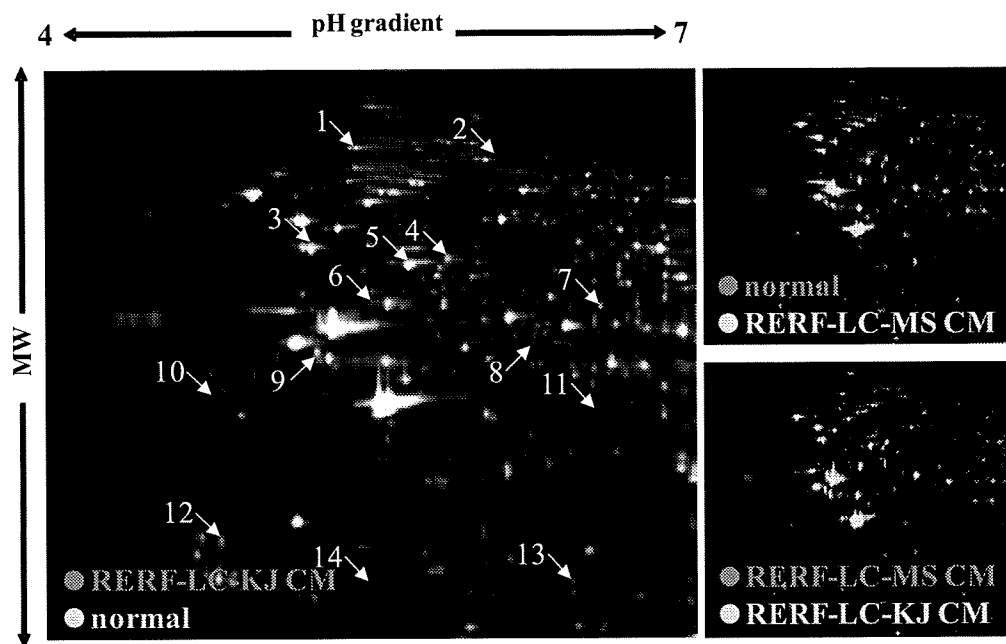


図7 肺がん細胞由来の馴らし培地 (CM) を作用させたリンパ管内皮細胞の2次元蛍光電気泳動像

表3 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 ↑

**表4 mutant TAT library-1 のアミノ酸配列**

clone	position										
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Tat	Y	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R
1	T	L	R	T	R	R	R	N	R	R	R
2	N	Y	R	T	G	R	R	K	R	R	R
3	L	T	R	W	T	R	R	M	R	R	R
4	Y	P	R	I	D	R	R	P	R	R	R
5	S	K	R	T	W	R	R	N	R	R	R
6	K	E	R	H	L	R	R	H	R	R	R
7	D	R	R	N	S	R	R	N	R	R	R
8	H	R	R	P	V	R	R	F	R	R	R
9	N	K	R	R	Q	R	R	K	R	R	R
10	A	P	R	D	W	R	R	A	R	R	R

**表5 mutant TAT library-2 のアミノ酸配列**

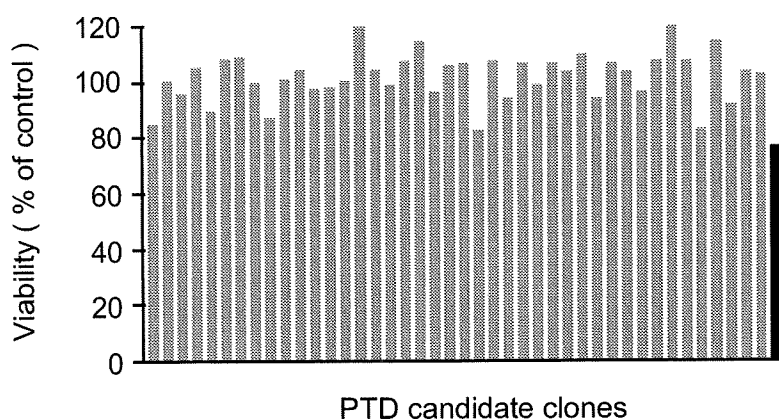
clone	position												
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Tat	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R	P	P	Q
1	G	M	H	I	N	G	Q	S	N	P	P	H	A
2	G	G	M	H	E	S	Q	S	H	M	P	G	D
3	G	T	Q	A	F	L	Q	Q	F	E	P	W	I
4	G	I	K	H	S	P	Q	Q	I	S	P	R	W
5	G	I	L	C	I	Q	Q	D	H	Q	P	L	G
6	G	F	K	L	S	S	Q	A	V	A	P	L	Q
7	G	S	I	R	A	P	Q	G	D	S	P	W	P
8	G	T	R	H	G	I	Q	T	Q	P	P	N	N

**表6 random 18mer peptide library のアミノ酸配列**

clone	sequence																	
1	Y	A	Q	Y	K	I	T	T	A	S	P	G	D	V	K	T	S	N
2	T	Y	A	W	Q	Y	C	Q	R	T	G	R	A	L	P	N	T	K
3	R	K	H	D	A	M	D	S	T	R	R	C	W	P	H	A	P	C
4	H	N	Q	R	H	V	K	N	W	P	D	G	F	Q	R	N	W	S
5	K	E	Q	K	N	P	Q	K	Q	F	S	S	R	G	P	A	P	N
6	Y	P	R	Y	K	L	Q	D	T	V	Q	D	R	L	R	H	R	H
7	P	K	D	A	Q	A	S	Y	T	P	N	N	F	N	L	S	T	T
8	M	R	Q	P	K	P	D	T	S	N	Y	K	D	R	V	K	S	S
9	M	F	K	G	A	F	T	Q	Y	H	S	T	H	E	S	T	E	N



(A) Before cell panning



(B) After 3<sup>rd</sup> cell panning

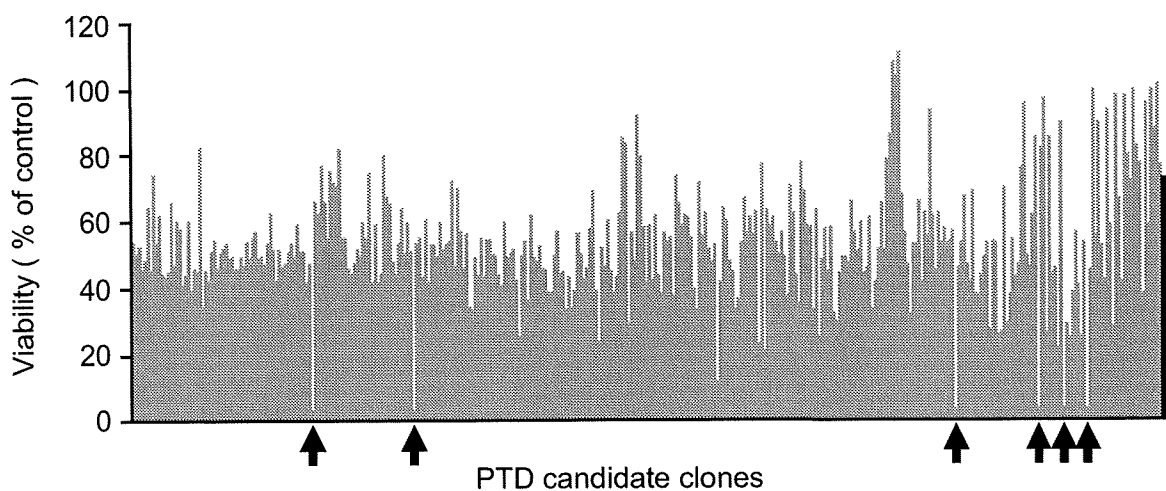


図8 モノクローン化した Tat-PSIF 融合タンパク質の細胞内移行能評価

表7 細胞内移行活性に優れた Tat 改変体アミノ酸配列

clone	position										
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Tat	Y	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R
mT1	W	A	R	N	R	R	R	Q	R	R	R
mT2	E	R	R	R	T	R	R	S	R	R	R
mT3	P	Y	R	H	Q	R	R	S	R	R	R
mT4	R	N	R	A	R	R	R	Q	R	R	R
mT5	P	V	R	R	P	R	R	R	R	R	R
mT6	T	H	R	L	P	R	R	R	R	R	R

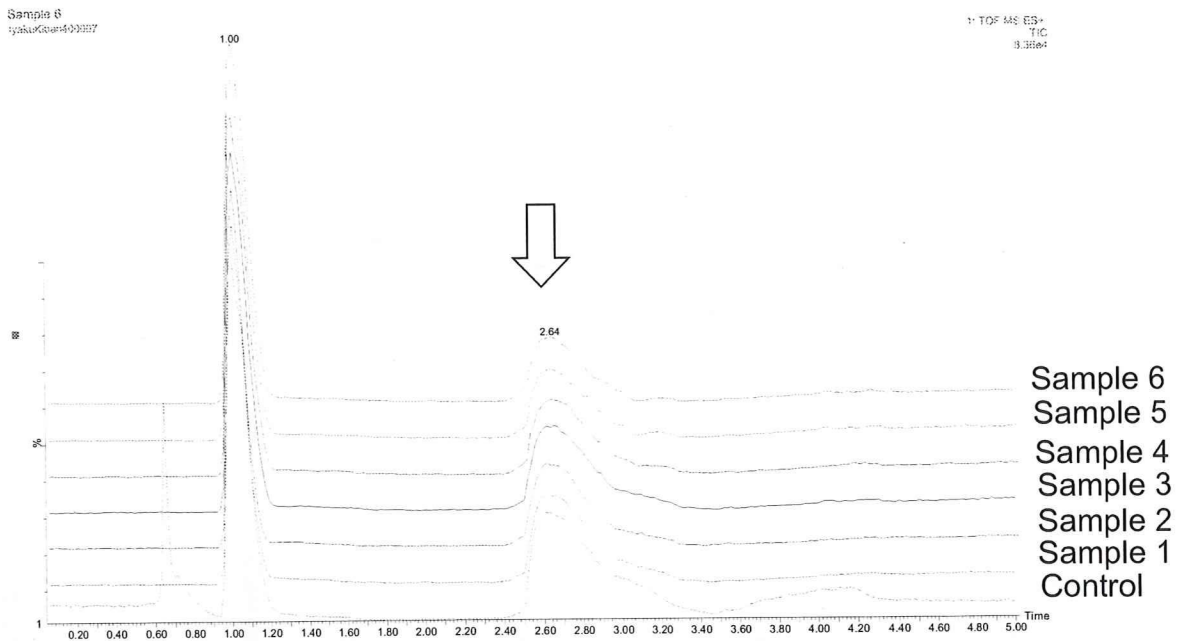


図9 トータルイオンクロマトグラム (コントロール、熱変性サンプル1 - 6)

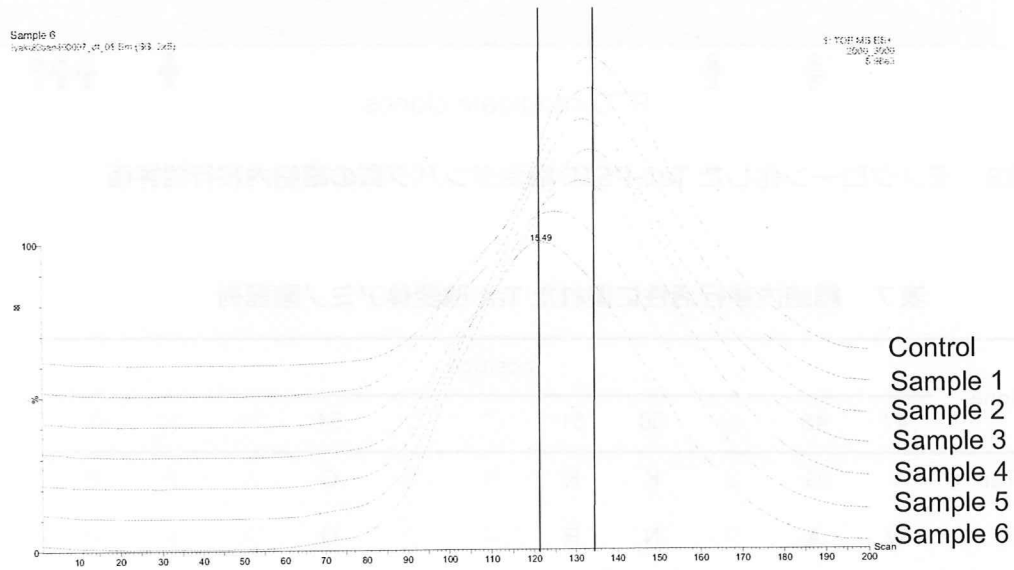


図10 熱変性がエンブレルに及ぼすイオンモビリティへの影響

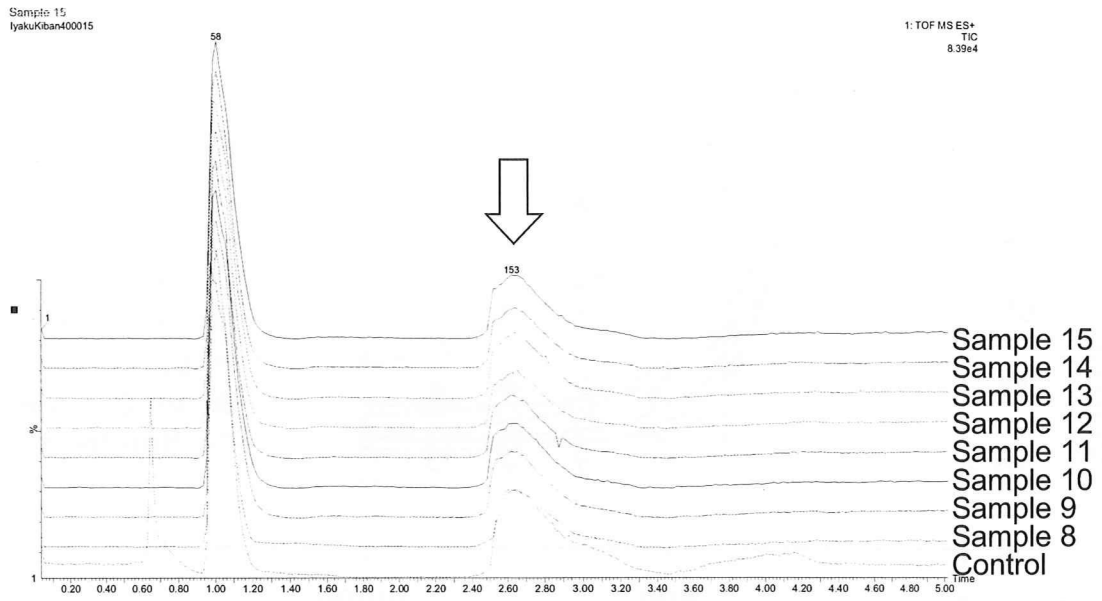


図 11 トータルイオンクロマトグラム (コントロール、酸変性サンプル 1 - 6)

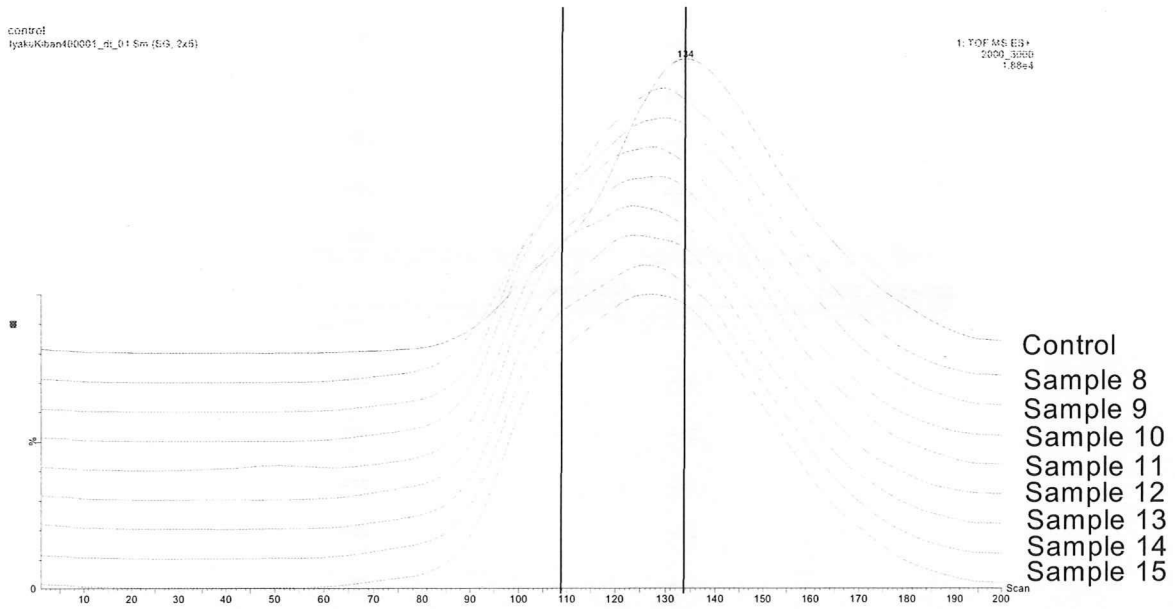


図 12 酸変性がエンブレルに及ぼすイオンモビリティへの影響

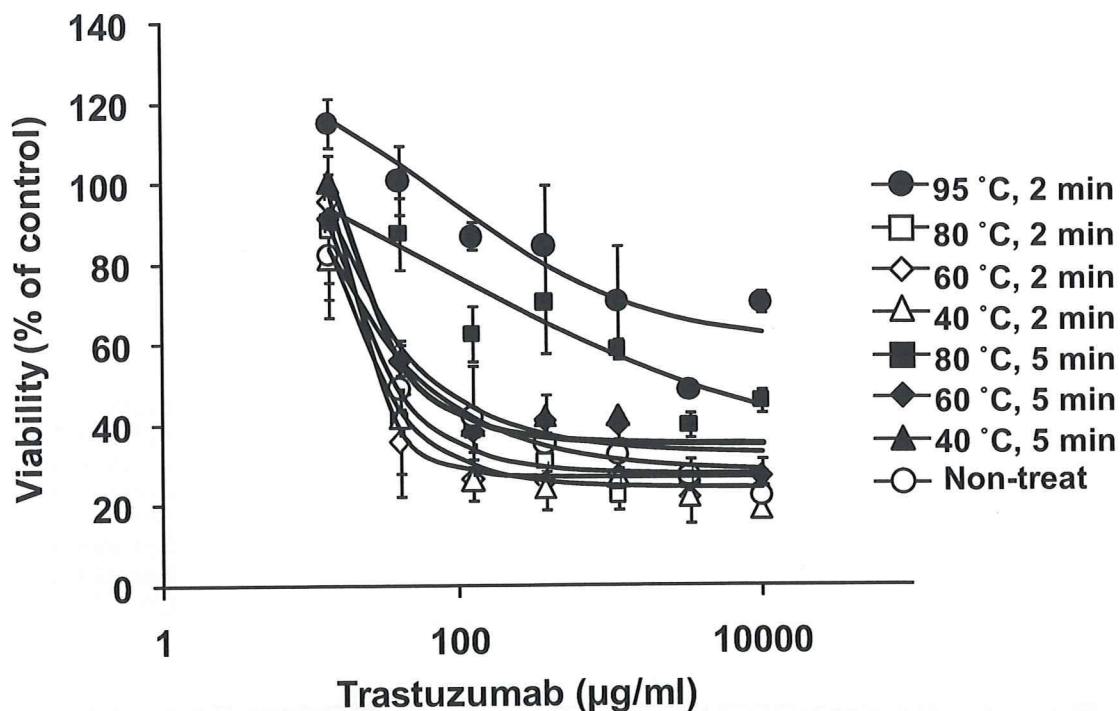


図 13 トラスツズマブの活性低下

トラスツズマブを各温度で 2 あるいは 5 分間加熱し、その活性を BT-474 細胞を用いたバイオアッセイにて検討した。なお、サンプル未処理の細胞のバイアビリティを 100%とした。

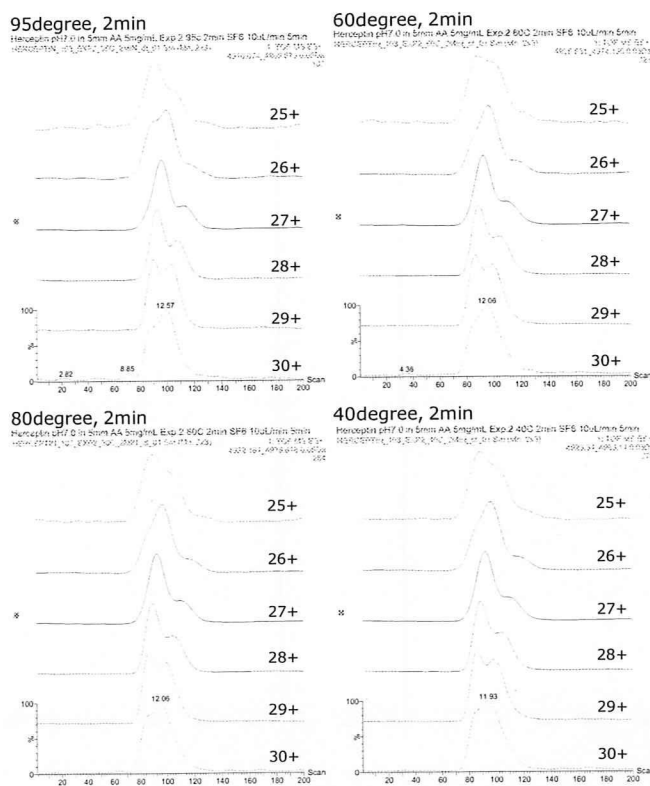


図 14 イオンモビリティ-質量分析機による加熱変性トラスツズマブのドリフトシフトパターン

トラスツズマブを各温度で 2 分間加熱し、加熱変性したサンプルをイオンモビリティ質量分析装置にて測定した