

令和元年6月21日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08320

研究課題名(和文) 単一受容体特異的レクチンの作製とその有用性についての研究

研究課題名(英文) A study on preparation of single receptor specific lectin and its usefulness

研究代表者

仁木 敏朗 (Niki, Toshiro)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40558508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸ガン特異的に送達される改変ガレクチン9の作製を目標に、ガレクチン9と抗EGFR一本鎖抗体の融合タンパク質を作製した。目的の融合タンパク質は期待通り二つの機能を発揮したが生産性が非常に低く、様々な方法を試みたが改善されなかった。よって同融合タンパク質の薬剤としての開発可能性は高くない。一本鎖抗体の代わりにガンにターゲットするペプチドを融合させた場合には生産性が向上した。今後はこれらの可能性を追求したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガレクチン9は自己免疫疾患やガン等の様々な難治疾患動物モデルで有効性を示すが、複数の受容体・細胞に作用するために薬剤としての開発は難しい。今回の研究は大腸ガン特異的に作用するガレクチン9改変体を作製することで薬剤としての開発ハードルを下げ、新規な抗ガン薬を生み出すことを究極の目標としている。成功すればこれまでのガレクチン9研究成果を最大に社会還元できる。

研究成果の概要(英文)：A fusion protein of Galectin 9 and an anti-EGFR single chain antibody was produced with the goal of generating a modified galectin 9 specifically delivered to colon cancer. The target fusion protein performed two functions as expected, but the productivity was very low even with various trials to improve it. Therefore, the possibility of developing this fusion protein as a drug candidate is not high. However the productivity was improved when a peptide targeting cancer was fused instead of a single chain antibody. I would like to pursue this possibility in the future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ガレクチン9 大腸ガン 一本鎖抗体 融合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガレクチン9はガラクトシド構造をもつ糖鎖に結合する動物レクチンで、様々な生命現象を調節し恒常性の維持に深く関わっている。ガレクチン9は糖鎖を介して複数の受容体に作用することで多彩な作用を発揮する。たとえばリコンビナントガレクチン9の投与は、自己免疫やアレルギーなどの過剰免疫を抑制し、一方でガンや感染症では免疫を活性化する。我々はガレクチン9が自己免疫疾患やガン等の難治性疾患治療薬として理想的であると考え、その開発を目指して研究を積み重ねてきた。その中で顕在化した開発における問題点は、様々な受容体や細胞に作用するガレクチン9本来の動きであった。薬の開発はターゲットが単一であることが基本であり、それが複数存在する場合には製薬会社の開発ひな形を外れる。

### 2. 研究の目的

ガレクチン9を特定の組織・細胞へ送達できるようにすればガレクチン9の薬剤としての開発は容易になると想像される。そこでモデルとして大腸ガンを選択し、同ガンに高発現するEGFRにターゲットする一本鎖抗体とガレクチン9の融合タンパク質を作製する。ガレクチン9は薬剤に抵抗性のKRAS変異大腸ガンに細胞死を誘導するので、この融合タンパク質の合成に成功すればKRAS変異大腸ガンの治療薬シーズとなり得る。

### 3. 研究の方法

ヒトガレクチン9としてこれまで *in vivo* 薬効試験の蓄積がある安定化ガレクチン9 Ver1と *in vivo* 薬効は調べられていないが可溶性の高い Ver2 の2種を用いる。またEGFRにターゲットする一本鎖抗体も2種調べる。ガレクチン9と一本鎖抗体を繋ぐリンカーは細胞に結合した後に分解されるようにMMP2の認識配列とTACE認識配列の2種類を用いる。これらを組み合わせた融合タンパク質の発現コンストラクトを作製し、ガレクチン9の発現で実績のある大腸菌発現系を用いてリコンビナントタンパク質を発現・精製する。一本鎖抗体の大腸菌内での合成にはShuffle株(PDIを共発現する株)が有効であったことより、PDIを大量発現する系も構築し生産性の向上を目指した。

### 4. 研究成果

目的の融合タンパク質発現プラスミドを構築し、大腸菌発現系を用いて発現・精製した。得られた融合タンパク質はガレクチン9と一本鎖抗体の両方の性質を併せ持ち、数回の凍結融解にも安定であり、目的の融合タンパク質合成が可能であることが証明された(図1)。

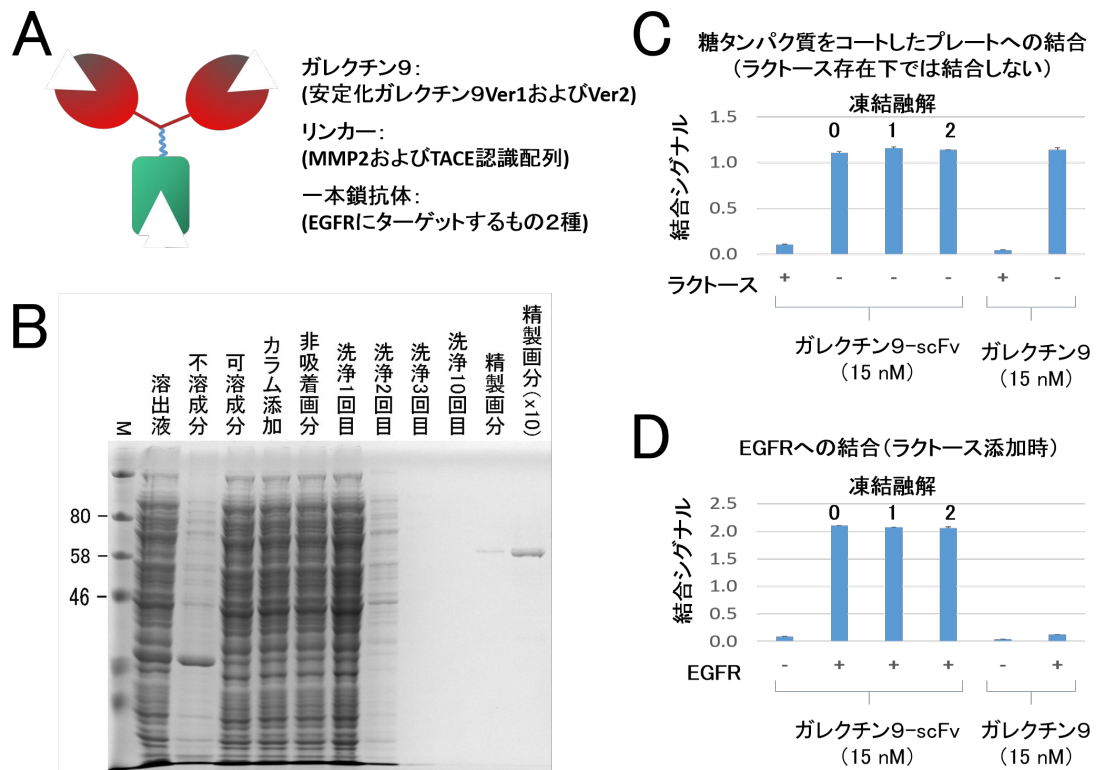


図1 ガレクチン9と一本鎖抗体の融合タンパク質の発現と活性

A.融合タンパク質の構造 B.ラクトースカラムによる精製 C.レクチン活性。糖タンパク質への結合力はガレクチン9と同等で、凍結融解後も活性を保持する D.抗EGFR抗体活性。レクチン活性を抑制する為にラクトース存在下で測定。抗EGFR抗体活性も凍結融解に安定

しかし発現レベルは非常に低く収量は1L培養あたり0.3mgであった。タンパク質薬として開発する際の一次判断基準は100mg/Lであることより、根本的な発現改善が要求される。また in vivo 薬効試験を行うためにも発現量上昇が必要であるため研究期間を通して様々な試行を行ったが、十分な改善は見られなかった(表1)。

表1 発現上昇のために行った実験

発現コンストラクト	宿主	全発現量	可溶性発現量	結果
G9-scFv(1)	Shuffle	+	+	ガレクチン9 Ver1 および Ver2 と一本鎖抗体(1)と(2)で調べると一本鎖抗体(1)とShuffleの組合せのみ可溶性の融合タンパク質が合成。MMP2とTACEリンカーによる発現量に大きな差は無し
G9-scFv(2)	Shuffle	+	-	
G9-scFv(1)	BL21Star	+++	-	
G9-scFv(2)	BL21Star	+++	-	
G9-scFv(1)+PDI 共発現	BL21Star	+++	+/-	PDIの共発現でBL21でも可溶性発現が確認されたが、その量はShuffleが勝った
G9-scFv(1)+PDI 共発現、プロモーター強度を3種	BL21Star	+++	- ~ +/-	T7プロモーターが強すぎるために不溶性になる可能性を考え、プロモーター活性を段階的に低下させたが、可溶性発現量はプロモーター強度に比例した
G9-scFv(1)+PDI 共発現、Chemical chaperon	BL21Star	+++	+/-	低可溶性のタンパク質発現に実績のあるエタノール、エチレングリコール、DMSO、アルギニン、ソルビトールを培地に添加したが効果なし
G9-scFv(1)+PDI 共発現	Shuffle	++	- ~ ++	Shuffle株にPDIを高発現させると一過的に発現の高いクローンが出現したが直ぐに発現が消失
G9-scFv(1)+PDIを一つのプラスミドで発現	Shuffle	++	-	上記で見られた発現を安定させるために融合タンパク質とPDIを一つのプラスミドで発現させたが可溶性発現はむしろ減少
G9-scFv(1)の動物細胞での一過的発現系	HEK293T	++	+	糖鎖が負荷される状態では可溶性発現は高かったが融合タンパク質に活性は無かった。一方N-結合糖鎖の結合部位を無くすと融合タンパク質の分泌量が激減した

ガレクチン9と融合させた一本鎖抗体は15kDaまたは30kDaであり比較的小さいタンパク質であるが、分子内でS-S結合の形成が必要なため細胞内での発現には不向きである。一方でガレクチン9は細胞内においてのみ十分な発現が得られる。多機能分子であるガレクチン9と一本鎖抗体の融合は、抗体を変えると別疾患に応用できる可能性があるため魅力的であったが、発現の難しさから実際の応用には向かないと考えられる。短いペプチドならばガレクチン9と融合した際に生産をそれほど悪化させない可能性があり、適当なペプチドがあればガレクチン9を組織特異的に送達できるかもしれない。特許出願の可能性があるのでペプチドの内容は伏せるが、ホルモンとして働くペプチドで、ある種のガンに受容体が高発現しているペプチドに可能性を見出した(表2)。未だ予備検討の段階ではあるが、ガレクチン9とそのペプチドとの融合タンパク質は大腸菌の発現系で活性のある融合タンパクとして合成でき、可溶性発現量はガレクチン9単体の1/3に達した。この融合タンパク質には応用の可能性があると考えており今後の展開を計画している。

表2 大腸ガンターゲット用に用いたタンパク質

ターゲット用タンパク質	分子量(リンカーを含む)
scFv(1)	29643
scFv(2)	14805
ペプチド	7564

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 18 件)

- Galectin-9 Mediates HIV Transcription by Inducing TCR-Dependent ERK Signaling. Colomb F, Giron LB, Premeaux TA, Mitchell BI, **Niki T**, Papasavvas E, Montaner LJ, Ndhlovu LC, Abdel-Mohsen M. *Front Immunol* 10(267) Feb 2019
- Plasma Galectin-9 Concentrations in Normal and Diseased Condition. **Niki T**, Fujita K, Rosen H, Hirashima M., Masaki T., Hattori T., Hoshino K. *Cell Physiol Biochem* 50(5) 1856-1868 Nov 2018
- Characterization of neutralizing antibodies reacting with the 213-224 amino-acid segment of human galectin-9. Lhuillier C, Barjon C, Baloche V, **Niki T**, Gelin A, Mustapha R, Cla?r L, Hoos S, Chiba Y, Ueno M, Hirashima M, Wei M, Morales O, Raynal B, Delhem N, Dellis O, Busson P. *PLoS One* 13(9) e0202512 Sep 2018
- Role of Lgals9 Deficiency in Attenuating Nephritis and Arthritis in BALB/c Mice in a Pristane-Induced Lupus Model. Zeggar S, Watanabe KS, Teshigawara S, Hiramatsu S, Katsuyama T, Katsuyama E, Watanabe H, Matsumoto Y, Kawabata T, Sada KE, **Niki T**, Hirashima M, Wada J. *Arthritis Rheumatol* 70(7) 1089-1101 Jul 2018
- Correlation between serum galectin-9 levels and liver fibrosis. Fujita K, **Niki T**, Nomura T, Oura K, Tadokoro T, Sakamoto T, Tani J, Yoneyama H, Morishita A, Kuroda N, Arai T, Nishimoto N, Himoto T, Hirashima M, Masaki T. *J Gastroenterol Hepatol* 33(2) 492-499 Feb 2018
- Galectin-9 Changes Its Function to Maintain Homeostasis. Hirashima M, **Niki T**, Masaki T. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 30(172) 109-118 Jan 2018
- MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. Okura R, Fujihara S, Iwama H, Morishita A, Chiyo T, Watanabe M, Hirose K, Kobayashi K, Fujimori T, Kato K, Kamada H, Kobara H, Mori H, **Niki T**, Hirashima M, Okano K, Suzuki Y, Masaki T. *Oncol Lett* 15(1) 407-414 Jan 2018
- Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Inflammation Induced by DR3 Signaling Is Dependent on Galectin-9. Madireddi S, Eun SY, Mehta AK, Birta A, Zajonc DM, **Niki T**, Hirashima M, Podack ER, Schreiber TH, Croft M. *J Immunol* 199(8) 2721-2728 Oct 2017
- Induction of apoptosis by Galectin-9 in liver metastatic cancer cells: In vitro study. Tadokoro T, Fujihara S, Chiyo T, Oura K, Samukawa E, Yamana Y, Fujita K, Mimura S, Sakamoto T, Nomura T, Tani J, Yoneyama H, Morishita A, Himoto T, Iwama H, **Niki T**, Hirashima M, Masaki T. *Int J Oncol* 51(2) 607-614 Aug 2017
- Galectin-9 ameliorates fulminant liver injury. Tadokoro T, Morishita A, Sakamoto T, Fujihara S, Fujita K, Mimura S, Oura K, Nomura T, Tani J, Yoneyama H, Iwama H, Himoto T, **Niki T**, Hirashima M, Masaki T. *Mol Med Rep* 16(1) 36-42 Jul 2017
- Effects of galectin-9 on apoptosis, cell cycle and autophagy in human esophageal adenocarcinoma cells. Akashi E, Fujihara S, Morishita A, Tadokoro T, Chiyo T, Fujikawa K, Kobara H, Mori H, Iwama H, Okano K, Suzuki Y, **Niki T**, Hirashima M, Masaki T. *Oncol Rep* 38(1) 506-514 Jul 2017
- Protective effect of Galectin-9 in murine model of lung emphysema: Involvement of neutrophil migration and MMP-9 production. Horio Y, Ichiyasu H, Kojima K, Saita N, Migiyama Y, Iriki T, Fujii K, **Niki T**, Hirashima M, Kohrogi H. *PLoS One* 12(7) e0180742 Jul 2017
- Secretion of IFN- Associated with Galectin-9 Production by Pleural Fluid Cells from a Patient with Extrapulmonary Tuberculosis. Zhao J, Shiratori B, Chagan-Yasutan H, Matsumoto M, **Niki T**, Tanaka M, Takahashi Y, Usami O, Ashino Y, Hattori T. *Int J Mol Sci* 18(7) E1382 Jun 2017
- Galectin-9 as a Predictive Marker for the Onset of Immune-Related Adverse Effects Associated with Anti-CCR4 MoAb Therapy in Patients with Adult T Cell Leukemia. Mohammed TO, Chagan-Yasutan H, Ashino Y, Nakayama W, Takahashi Y, Shimomura T, Fujimoto T, Watanabe Y, **Niki T**, Suzushima H, Hattori T. *Tohoku J Exp Med* 241(3) 201-208 Mar 2017
- Plasma levels of Galectin-9 reflect disease severity in malaria infection. Dembele BP, Chagan-Yasutan H, **Niki T**, Ashino Y, Tangpukdee N, Shinichi E, Krudsood S, Kano S, Hattori T. *Malar J* 15(1) 403 Aug 2016
- Human Galectin-9 Is a Potent Mediator of HIV Transcription and Reactivation. Abdel-Mohsen M, Chavez L, Tandon R, Chew GM, Deng X, Danesh A, Keating S, Lanteri M, Samuels ML, Hoh R, Sacha JB, Norris PJ, **Niki T**, Shikuma CM, Hirashima M, Deeks SG, Ndhlovu LC, Pillai SK. *PLoS Pathog* 12(6) e1005677 Jun 2016
- Association Between Plasma Level of Galectin-9 and Survival of Patients With Drug-Induced Acute Liver Failure. Rosen HR, Biggins SW, **Niki T**, Gralla J, Hillman

H, Hirashima M, Schilsky M, Lee WM; Acute Liver Failure Study Group. Clin Gastroenterol Hepatol 14(4) 606-612 Apr 2016  
Development of Point-of-Care Testing for Disaster-Related Infectious Diseases. Hattori T, Chagan-Yasutan H, Shiratori B, Egawa S, Izumi T, Kubo T, Nakajima C, Suzuki Y, Niki T, Alisjahbana B, Telan E. Tohoku J Exp Med 238(4) 287-293 Apr 2016

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。