

平成 31 年 4 月 29 日現在

機関番号：57103

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07320

研究課題名(和文) 部位特異的脂質化抗原と核酸からなるリポソームによるがんワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of site-specifically lipidated antigen and DNA for cancer vaccine liposome

研究代表者

高原 茉莉 (TAKAHARA, Mari)

北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・助教

研究者番号：40804563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTG)を介した部位特異的抗原脂質化技術を確立するため、親水性の高いMRHKGS配列を脂質(脂肪酸もしくはコレステロール)へと付加した、脂質化ペプチド基質(lipid-G3S-MRHKGS)を新規に合成した。このペプチドは両親媒性であるため、脂質部位を有しながら水へ溶解する。そのため、水溶液中でMTG反応を介したペプチドとタンパク質の架橋反応が進行し、タンパク質の変性を防ぎながら、部位特異的脂質化タンパク質を合成可能な技術を確立した。また、脂質化ペプチドにおける脂質種を変更することで、脂質化タンパク質と細胞膜の相互作用を制御可能なことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクチン効果を高めるために、薬物送達キャリア(リポソーム)に提示可能且つ非変性状態の抗原を調製することに注目する。従来の化学修飾法では、非特異的な結合形成でキャリアに抗原を提示するため、免疫細胞が認識できない抗原が生成する可能性がある。そこで、本研究成果による部位特異的にキャリア提示部位(脂質)を抗原に修飾する技術で、変性させずに抗原を脂質化すれば、薬効が最大限の脂質化抗原が調製可能である。これにより、ワクチン投与量を最小限にし、コスト及び副作用を抑制できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lipid-fused peptide (lipid-G3S-MRHKGS) that contains hydrophilic MRHKGS was synthesized as a new substrate of microbial transglutaminase (MTG) substrates for site-specific lipidation of antigens. This amphiphilic lipid-fused peptides are water-soluble, thus MTG-mediated lipidation of a protein of interest (POI) was performed without impairing POIs. In addition, we found that the lipid moiety of the peptides could control interaction between lipid-POI and cell-membrane.

研究分野：生体分子工学

キーワード：脂質 薬物送達 細胞接着 両親媒性ペプチド トランスグルタミナーゼ バイオコンジュゲーション
部位特異生 酵素反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 部位特異的なタンパク質脂質化技術の開発

近年のがん治療法では、①抗原を投与して抗原特異的に免疫機能（抗原提示細胞）を活性化し、②細胞傷害性 T 細胞（CTL）にがん細胞のみを排除させる、副作用のない「がんワクチン療法」が注目される。がんワクチン療法では、少量で作用可能な、抗原特異的かつ効率的な免疫細胞の刺激が重要である。

そこで、申請者は、ワクチン効果を高めるために、まず、薬物送達キャリア（リポソーム）に提示可能かつ非変性状態の抗原を調製することに注目する。従来の化学修飾法では、非特異的な結合形成でキャリアに抗原を提示するため、免疫細胞が認識できない抗原が生成する可能性がある。そのため、部位特異的にキャリア提示部位（脂質）を抗原に修飾する技術を開発する。具体的には部位特異的かつ穏やかな条件で共有結合を形成可能な、酵素触媒トランスグルタミナーゼを介した脂質修飾法に着目した。

(2) 免疫賦活剤の機能化

免疫細胞を少量のワクチンで活性化するには、免疫賦活剤の併用が有効である。この免疫賦活剤として、CpG DNA もしくは DNA アプタマー（標的分子に対して高い親和性を示す人工 DNA）に着目した。免疫細胞へ結合するアプタマーは、免疫細胞を活性化するというアゴニスト活性が報告されている（A. Nozari *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *6*, 29-44）。この CpG DNA もしくは DNA アプタマーに対しても、抗原を修飾することで、アゴニスト活性及び抗原提示部位として両方機能する DNA-抗原複合体とし、リポソーム内水相に封入することに挑戦する。

2. 研究の目的

薬物送達実績のあるリポソーム（両親媒性分子である生体由来のリン脂質で構成される二重膜）をキャリアとして選択し、(1) 部位特異的に脂質化した抗原をリポソーム表面に係留し、(2) CpG DNA もしくは DNA アプタマー（もしくは DNA-抗原複合体）を免疫活性化剤として封入し、少量で高い治療効果を示すがんワクチン（DNA-抗原-リポソーム複合体）開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脂質化ペプチドにおける G_nS リンカーの検討

部位特異的な脂質化タンパク質合成は、微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）の触媒機能を利用して行った。MTG は、特定のグルタミン（Q）とリジン（K）の側鎖間を架橋する酵素で、イソペプチド結合を形成する。まずは、MTG の K 側基質となる脂質化ペプチドを合成し、MTG を介してモデルタンパク質の高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）への脂質化を行う。脂質化ペプチドは、C14（ミリスチン酸）と MTG の K 側基質配列 MRHKGS を、G_nS リンカーを介して縮合した、C14-G_nS-MRHKGS と設計する。ここで、モデル EGFP には MTG 高反応性の Q を含むアミノ酸配列（Q-tag; LLQG, FYPLQMRG）を遺伝子工学的手法で導入する。

合成した脂質化ペプチド、EGFP の同定後、C14-G_nS-MRHKGS と EGFP の MTG 反応性評価を行った。MTG 反応では、C14-G_nS-MRHKGS を EGFP に対して 5 当量過剰に添加して、EGFP に対して脂質ペプチドが 100% 修飾される条件を模索した。MTG 反応の評価は、逆相（RP）-HPLC 及び質量分析により評価する。MTG 反応で生成した脂質化 EGFP（C14-G_nS-EGFP）の立体構造は、発光スペクトルから非変性状態であることを確認した。最適化した条件で得られた C14-G_nS-EGFP は精製せずに細胞膜へと相互作用させ、細胞膜係留挙動を観察した。

(2) 脂質化ペプチドにおける脂質種の検討

ミリスチン酸（C14）以外の、他の脂質種を用いて脂質化した場合の細胞膜（リポソーム）係留挙動を評価するため、アルキル鎖長を伸ばしたパルミチン酸（C16）もしくはステアリン酸（C18）、短くしたラウリン酸（C12）、高脂質種としてコレステロール（Chol）、脂溶性ビタミンのトコフェロール（Toco）を脂質部位として設計した lipid-G₃S-MRHKGS を合成した。(1) の検討にて、MTG が認識可能な Q 側基質としては LLQG 配列が最適ながことが判明した。そのため、以後の検討では、Q 側基質のモデルタンパク質として LLQG 融合緑色蛍光タンパク質（LQ-EGFP）を用いた。LQ-EGFP と lipid-G₃S-MRHKGS との MTG 反応による複合化では、疎水性の高い Chol や C18 の場合 PBS 中で十分に反応が進行しなかったため、界面活性剤を添加して、LQ-EGFP が 90% 以上脂質化される条件を模索した。本検討では、MTG 反応液には界面活性剤が含まれ、高い細胞毒性が予測されるため、既報に従って脂質化 EGFP を精製して、細胞膜係留能力を評価した。

(3) 免疫賦活剤機能化に向けた DNA-抗原複合化の検討

申請者が確立した部位特異的な DNA-タンパク質複合化技術（M. Takahara *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, *116*, 660-665）を用いて、免疫賦活剤である CpG とエピトープペプチド、もしくはアプタマーと抗原タンパク質の組み合わせで複合化を行った。主に検討したのは DNA アプタマーと抗原タンパク質の複合化で、ポリメラーゼにより MTG の Q 側基質 Z-QG ジペプチドを DNA アプタマーに導入し、抗原タンパク質の末端 K との部位特異的な複合化を行った。これにより得られ

た複合体 (DNA-(タンパク質)_n複合体) の機能は、特定の細胞 (DNA アプタマーの標的分子が発現した細胞) に対して特異的にタンパク質を送達できるか否かで、評価した。

4. 研究成果

上記計画に基づき研究を遂行し、以下の成果を得た。

特許を 1 件出願し (特願 PCT/JP2019/003695)、査読付き国際学術論文として 3 件発表した (論文① : M. Takahara *et al.*, *Chem. Euro. J.*, **2019**, accepted (Inside Cover)、論文② : M. Takahara *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2018**, *1*, 1823-1829、論文③ : M. Takahara *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, *28*, 2954-2961)。また、本成果に関しては 7 件の学会発表を行なった。

(1) 部位特異的なタンパク質脂質化技術の開発

部位特異的な脂質化タンパク質調製法の確立に向けた、MTG 基質脂質ペプチドの合成と MTG 反応の最適化を行った。まず、MTG 基質脂質ペプチド (K 側) として、C14-MRHKGS 及び C14-G_nS-MRHKGS を合成し、種々の Q 側基質融合 EGFP と MTG 反応させることで、MTG 反応性を評価した。結果として、EGFP の C 末端に LLQG 配列を融合した、LQ-EGFP が最も脂質化ペプチドと反応性が高く、脂質化ペプチド C14-G_nS-MRHKGS へと反応させるための最適アミノ酸配列は、LLQG と判明した。

脂質化ペプチドと LQ-EGFP の複合体 (脂質化 EGFP) の細胞膜係留能力を比較すると、C14-MRHKGS と C14-G₃S-MRHKGS で脂質化した場合には、C14-G₃S-MRHKGS で脂質化した EGFP の方が細胞膜への係留能力が高い結果が得られた。このことから、申請者は、細胞膜への係留には、G₃S 部位が重要と考え、G₃S 近傍のアミノ酸と細胞膜係留能力との関係を、新規脂質化ペプチド C14-G_nS-MRHKGS を合成して検証した。検証した結果、G_nS におけるグリシン (G) 数が増えるほど細胞膜係留能力が増大し、 $n=5$ の時最大となった (図 1)。また、G_nS の代わりに PG_nS として、プロリン (P) を導入して分子間の水素結合を緩和すると、細胞膜係留能力が大幅に低下した。以上より、LQ-EGFP に対する MTG 反応性を十分に示す C14-G_nS-MRHKGS ($n=3-5$) が、自己組織化による細胞膜係留を十分に有し、グリシンの数により細胞膜係留挙動を制御できることが判明した。また、細胞膜係留能力、脂質ペプチドの臨界ミセル濃度 (CMC)、細胞毒性には相関があり、CMC が低く毒性が高いペプチドほど、細胞膜係留能力が高いことも示された。特に、最大の細胞膜係留能力を示した C14-G₅S-MRHKGS は PBS 中で β -シート形成割合が高く、この二次構造が細胞膜係留及び毒性に関与していると推定される。

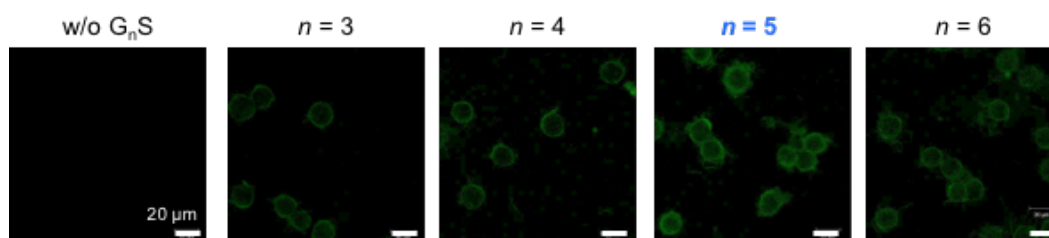


図 1. C14-G_nS-EGFP (C14-G_nS-MRHKGS 修飾 EGFP) の細胞膜係留挙動。

さらに、脂質化ペプチドの脂質種を変更して、lipid-G₃S-MRHKGS を合成し、MTG 反応により LQ-EGFP と複合化条件を最適化した結果、いかなる脂質種においても、界面活性剤添加により、lipid-G₃S-MRHKGS:LQ-EGFP = 5:1 で LQ-EGFP がほぼ 90%以上脂質化されることを見出した。このようにして得た脂質化 EGFP を精製し、細胞膜と相互作用させると、コレステロールを脂質種と選択した場合、最も細胞膜係留能力が最大となることが判明し、C18 が時点の係留能力であることが示された (図 2)。C14-G_nS-MRHKGS の検討では、CMC と細胞膜係留能力に相関があることが示されたが、Chol-G₃S-MRHKGS の場合、比較的 CMC が高い値を示した。これは、コレステロールが細胞膜に自然に存在する脂質種で、細胞膜におけるリン脂質と安定な複合体を形成するためと推定している。

以上の知見を生かして、得られた脂質化 EGFP の性質について、*in vivo* で評価中である。

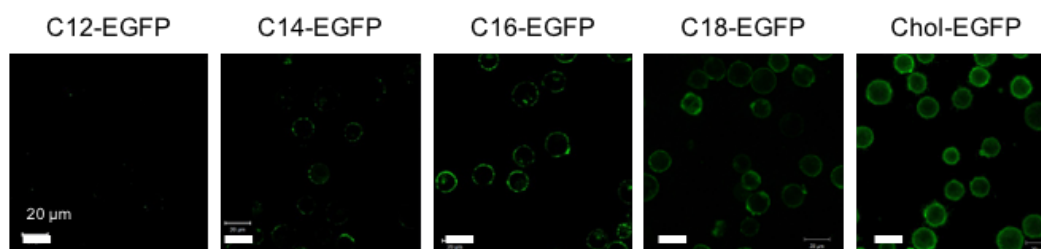


図 2. Lipid-EGFP (lipid-G₃S-MRHKGS 修飾 EGFP) の細胞膜係留挙動。

(2) 免疫賦活剤の機能化

免疫細胞を少量のワクチンで活性化するには、免疫賦活剤の併用が有効である。この免疫賦活剤として、CpG DNA もしくは DNA アプタマー (免疫細胞表面の受容体と結合) と抗原タンパク質の複合体を行なった。当初の計画では、DNA-抗原タンパク質を 1:1 で複合体化することを試みたが、DNA 上に提示したアミノ基とタンパク質の Q との MTG 反応性が不足したため、DNA 上に Z-QG を複数導入し、タンパク質の特定の K を MTG により架橋することで、部位特異的な DNA-(タンパク質)_n 複合体の合成を行なった。得られた DNA-(タンパク質)_n 複合体を、モデルとして受容体 c-Met を過剰発現した SNU-5、c-Met を発現していない SNU-1 にふりかけると、SNU-5 のみ特異的に DNA-(タンパク質)_n 複合体が結合し、受容体特異的にタンパク質を送達可能なことが示された (図 3)。現在、免疫細胞に発言している Toll 様受容体に結合する CpG と抗原タンパク質の複合体を行い、*in vitro* で DNA-(タンパク質)_n 複合体により免疫細胞を活性化できるか検証中である。

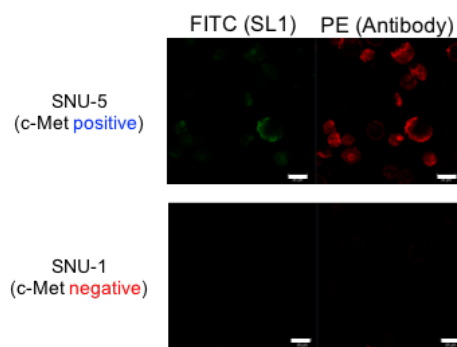


図 3. 受容体 c-Met 特異的な DNA (SL1) 及びタンパク質 (抗体で染色) の送達。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Mari Takahara, Rie Wakabayashi, Naoki Fujimoto, Kosuke Minamihata, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, “Enzymatic cell - surface decoration with proteins using amphiphilic lipid - fused peptide substrates”, *Chemistry A European Journal*, Accepted (Inside Cover) 2019 年 3 月査読有

② Mari Takahara, Rie Wakabayashi, Kosuke Minamihata, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, “Design of Lipid-Protein Conjugates Using Amphiphilic Peptide Substrates of Microbial Transglutaminase”, *ACS Applied Bio Materials*, **1**(8), 1823-1829, 2018 年 10 月査読有

③ Mari Takahara, Rie Wakabayashi, Kosuke Minamihata, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, “Primary amine-clustered DNA aptamer for DNA-protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase”, *Bioconjugate Chemistry*, **28**(12), 2954-2961, 2017 年 12 月査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 高原 茉莉、藤本 直樹、若林 里衣、南畑 孝介、後藤 雅宏、神谷 典穂、
“Enzymatic cell-surface decoration with a functional protein using amphiphilic lipid-fused peptide substrates”、日本化学会第 99 春季年会、2019 年 3 月 16 日

② 高原 茉莉、若林 里衣、南畑 孝介、後藤 雅宏、神谷 典穂、
“Design of Amphiphilic Lipid-fused Peptide Substrates for Enzymatic Protein Lipidation”
第 28 回日本 MRS 年次大会、2018 年 12 月 18 日

③ 高原 茉莉、若林 里衣、南畑 孝介、後藤 雅宏、神谷 典穂
“ドラッグデリバリー材料を指向した部位特異的タンパク質脂質化法の開発”
化学工学会第 50 回秋季大会、2018 年 9 月 18 日

④ 高原 茉莉、若林 里衣、南畑 孝介、後藤 雅宏、神谷 典穂
“両親媒性ペプチド基質によるタンパク質疎水化制御”
第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年 9 月 9 日

⑤ 高原 茉莉、若林 里衣、南畑 孝介、後藤 雅宏、神谷 典穂
“Design of lipid-protein conjugate with a self-assembling ability on a cell membrane by using microbial transglutaminase reaction”
第 256 回アメリカ化学会国際会議、2018 年 8 月 18 日

⑥ 高原 茉莉、南畑 孝介、若林 里衣、後藤 雅宏、日下部 宜宏、李 在萬、神谷 典穂
“抗体定常領域との複合体を介した高機能化核酸アプタマーの設計”
日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 21 日

⑦ 高原 茉莉、南畑 孝介、若林 里衣、後藤 雅宏、日下部 宜宏、李 在萬、神谷 典穂
“抗体定常領域との部位特異的複合体による DNA アプタマーの高機能化”
化学工学会第 83 年会、2018 年 3 月 14 日

〔図書〕(計1件)

高原 茉莉, 神谷 典穂, (株)シーエムシー出版, “細胞・生体分子の固定化と機能発現”
第5章セルロース結合性アダプターを用いた人工セルラーゼの設計, 2018年1月

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 脂質化タンパク質の製造方法、及び脂質化タンパク質

発明者: 神谷典穂、若林里衣、南畑孝介、高原茉莉

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 PCT/JP2019/003695

出願年: 2019年

国内外の別: 国外

〔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: 神谷 典穂

ローマ字氏名: KAMIYA Noriho

研究協力者氏名: 後藤 雅宏

ローマ字氏名: GOTO Masahiro

研究協力者氏名: 望月 慎一

ローマ字氏名: MOCHIZUKI Shinichi

研究協力者氏名: 櫻井 和朗

ローマ字氏名: SAKURAI Kazuo

※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。