

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240135

研究課題名(和文) 生体高分子間の弱い相互作用を利用したがんシグナル経路のモジュレーター創製

研究課題名(英文) Synthesis of artificial modulator for cancer signalling by motif programming.

研究代表者

芝 清隆 (Shiba, Kiyotaka)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：40196415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「細胞性免疫を効率よく惹起できる人工タンパク質の創製原理」を確立することを「モチーフプログラミング」の手法で創製することを目標とした。この目標達成のために、モデル抗原OVAの既に分かっている、「MHC class Iエピトープ」、「class IIエピトープ」とさらに「二次構造形成能力モチーフ」を小さなマイクロ遺伝子の3つの異なる読み枠に埋め込み、このデザインしたマイクロ遺伝子を、読み枠をずらしながらタンデムに連結させた人工タンパク質ライブラリーの中から、鉱物オイルや水酸化アルミニウムなどの物理アジュバンドなしで強い細胞性免疫を誘導できるクローンを選ぶことに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the establishment of design principle for the creation of artificial antigens for cellular immunity. For this purpose, we prepared the library for artificial proteins from combinatorial polymerization of "MHC class I epitope", "MHC class II epitope" and the "peptide sequences having the propensities to form secondary structures", from which we have successfully selected the clones that can efficiently evoke in vitro and in vivo cellular immunity without the co-addition of physical adjuvant such as mineral oil or aluminum hydroxide.

研究分野：分子生物学

キーワード：合成生物学 信号伝達 細胞性免疫 人工タンパク質 進化学 コンビナトリアル アジュバンド
モチーフ

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から「特定の機能と関連した短いペプチド配列 = モチーフ」を「組合せ的 = コンビナトリアル」に連結した人工タンパク質ライブラリーの中から、狙った機能の組合せをもったクローンを選択することで、特定機能をもった人工タンパク質を創製する「モチーフプログラミング」の技術が開発されていた。蛋白質工学の「合理的設計」と、進化工学の「ライブラリーからのセレクション」といった両方の性質を併せ持つ独自の合成生物学的手法である。この「モチーフプログラミング」の手法を用いることにより、天然には存在しない機能の組合せをもった有用な人工タンパク質を創り出すことができる。用いるモチーフは、天然のタンパク質の中から同定される天然モチーフに限定される必要はなく、アミノ酸配列のもつ物理化学的な性質（二次構造の形成能力など）をモチーフとして用いたり、あるいは人工的に試験管内で人工進化させたペプチド・アプタマーなども用いることができる。

2. 研究の目的

本研究は「モチーフプログラミング」による人工タンパク質創製技術の、医療分野へのトランスレーションを図った展開研究である。特に現在注目を集めている、「がんの免疫療法」を意識し、「細胞性免疫の効率的な誘導」を可能とする人工タンパク質の設計原理を明らかにすることを目的としている。

細胞シグナリングや、細胞間情報伝達は、基本的には生体高分子のもつ「弱い結合」ではあるが「特異性の高い」相互認識に依存した反応である。天然生体高分子に、しばしば「機能性モチーフ」として同定される短いペプチド配列 = モチーフも、その多くはこの「弱くて特異性の高い」生体高分子間相互作用に関わっており、そしてこの相互作用がいろいろな生命反応の基盤をなす。

本研究は、人為的に生体高分子間相互作用をリワイアリングする能力をもつ人工タンパク質を、「モチーフプログラミング」の手法で創製することを目標とした。医療分野での早期トランスレーションを念頭におき、ここでは、「細胞性免疫を効率よく惹起できる人工タンパク質の創製原理」を確立することを目標に設定している。

免疫には抗体分子を中心とした液性免疫と、T細胞を中心とした細胞性免疫の2つのシステムがあるが、がん分野で注目されている、悪性腫瘍に対する免疫反応は、後者の細胞性免疫が中心となる。しかしながら、これまでのところ、効率のよい細胞性免疫の誘導方法が確立されておらず、例えばあるがん抗原エピトープに対する細胞性免疫を誘導するには、エピトープに相当するペプチドだけでは不十分で、かならず「アジュバント」と

総称される非ペプチド（タンパク質性）の免疫賦活剤を同時投与しなければならなかった。

「アジュバント」は、おおざっぱには「物理アジュバント」と「生物アジュバント」の2つが必要で、前者は例えば「鉱物オイル」や「水酸化アルミニウム」といった無機物が用いられ、後者はエンドトキシン由来のリポ多糖などが用いられる。これら「アジュバント」が、どのような機構で細胞性免疫の誘導に必要なものかは、まだその詳細はわかっていないものの、これまでの知見を総合すると、「物理アジュバント」は、抗原の免疫担当細胞への取り込みやプロセッシングに必要とされ、「生物アジュバント」は、免疫担当細胞の分化や増殖を刺激すると考えられている。

現在、何種類かのアジュバントが、細胞性免疫の誘導の際に、必須因子として用いられているが、同時にこれらのアジュバントの副作用が強く、迅速なワクチン開発の障害となっていることも事実である。

そこで、本研究では、まず第1ステップとして、「物理的アジュバント」と「生物アジュバント」のうち、「物理アジュバント」の機能を内包した人工タンパク質ワクチンを合成する設計原理の確立を目指した。すなわち、プログラムするモチーフとして「エピトープペプチド」と「タンパク質の構造機能形成モチーフ」を選ぶことで、いろいろなタンパク質の分子コンテキストの中で、「エピトープペプチド」が提示される人工タンパク質のライブラリーを作製し、その中から、「物理アジュバント」の助けを借りることなく、細胞性免疫を誘導できる人工タンパク質クローンを選んだ。「物理アジュバント」の機能が抗原タンパク質の細胞への取り込みやプロセッシングのモジュレートであるならば、いろいろな構造をもったタンパク質ライブラリーの中には、「物理アジュバント」の機能を内包したものが含まれているはずだ、との仮説証明研究とも位置づけることができる。

3. 研究の方法

モデル抗原としては、免疫研究ツールが豊富に揃っている OVA(ovalbumin)を用いた。OVAの既に分かっている、「MHC class I エピトープ」、「class II エピトープ」とさらに「二次構造形成能力モチーフ」を小さなマイクロ遺伝子の3つの異なる読み枠に埋め込み、このデザインしたマイクロ遺伝子を、読み枠をずらしながらタンデムに連結させることで、MHC class I エピトープ、「class II エピトープ」、「二次構造形成能力モチーフ」の3つのモチーフが「組合せ的」に重合した人工タンパク質ライブラリーを調製した（本手法は、MolCraftとして過去に完成済み）。

この人工タンパク質ライブラリーの中か

ら32種類について、大腸菌を用いて精製し、免疫実験を進める上で問題のないレベルにまでエンドトキシンを除去し(エンドトキシンは細菌由来の強い免疫誘導物質で、免疫実験をおこなう際には十分に除去しておかないといけない)、抗原提示細胞(樹状細胞)に添加し、OVA 特異的エピトープを認識するT細胞と共培養し、IL-2産生能を測定し、細胞性免疫の誘導能を評価した。ここで選ばれた強い細胞性免疫誘導能力をもつ人工タンパク質について、さらにマウスを用いた *in vivo* 評価系で、細胞性免疫が誘導されていること、またOVAを発現したモデル腫瘍細胞の *in vivo* での成長に対する抑制能力を評価した。

4. 研究成果

OVAのMHC class I エピトープ、class II エピトープ、ヘリックス構造配列を異なる読み枠にコードするように、マイクロ遺伝子設計ソフト(CraftGen)を用いてマイクロ遺伝子を設計し、「マイクロ遺伝子重合法」を用いて、様々な組み合わせ、長さを有した人工タンパク質遺伝子を合成し、大腸菌内でタンパク質に翻訳、人工タンパク質のライブラリーを構築した。

この中から、人工タンパク質32種類を精製し、抗原提示細胞(樹状細胞)に添加し、OVA 特異的エピトープを認識するT細胞と共培養し、IL-2産生能を測定し、細胞性免疫の誘導能を評価した。その結果、10 μ g/mlの濃度でクローンF182AおよびF37Aで細胞性免疫誘導が認められた。OVAでは、1mg/ml以上の濃度でないと細胞性免疫誘導能は認められなかった。このことから、人工タンパク質は、OVAよりも100倍低い濃度で、細胞性免疫を誘導できる能力があることがわかった。

人工タンパク質が、抗原提示細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションを介して、エピトープを抗原提示している事を確認するために、クロスプレゼンテーションに参与するプロテアソームの阻害剤、epoxomicinとMG132で処理して、細胞性免疫誘導能を評価した。その結果、F182AとF37Aの細胞性免疫誘導能が抑制された。さらに、クロスプレゼンテーションを促進する効果のあるリソソーム阻害剤(Chloroquine)を処理して、細胞性免疫誘導能を評価したところ、F182AとF37Aの細胞性免疫誘導能が増強した。これらの知見から、F182AとF37Aは、抗原提示細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションを介して、抗原提示している事が確認された。

*In vitro*で細胞性免疫誘導能を示した人工タンパク質F182AとF37Aをマウスのフットパット(後ろ足)に1週置きに3回投与(600pmol/mouse)し、免疫した。免疫後、OVAを発現する腫瘍細胞EG7-OVA(1 \times 10⁶)を皮下投与し、腫瘍の成長を測定した。その結果、F182AおよびF37A投与群では、非免疫群と比

較して、腫瘍増殖の抑制が認められた。さらに、免疫マウスの脾臓細胞を取り出し、EG7-OVAに対する細胞障害性をクロムリリーシングアッセイにより評価したところ、F182AとF37Aで細胞障害性が認められた。

免疫マウスの血清を採取し、ELISA法にて抗OVA抗体の誘導能について評価した。その結果、F182AおよびF37A人工タンパク質の投与により、抗OVA抗体の誘導が認められた。OVA MHC class II エピトープを含有しない人工タンパク質(F36C)では、抗OVA抗体は誘導されなかった。従って、人工タンパク質F182AおよびF37Aは、抗原提示細胞に取り込まれ、OVA MHC class I エピトープを、MHC class I 分子上に提示できるだけでなく、MHC class II エピトープをMHC class II 分子上に提示させる能力がある事が明らかとなった。

以上のようにOVAのMHC class IとMHC class II エピトープ配列、タンパク質安定化配列などのペプチドモチーフ配列からなり、タンパク質のみで強く細胞性免疫を誘導できる人工タンパク質(F182AおよびF37A)を創製することに成功した。通常、OVAなどの水溶性蛋白質は、抗原提示細胞にとりこまれにくいことから、抗原を細胞に効率よく導入するためには、リポソームなどの蛋白質導入試薬や、膜透過性ペプチド(HIV TATなど)の利用が必須である。これに対して、ここで合成された人工ワクチンは、膜透過性ペプチドやリポソームを用いずに、抗原提示細胞に入り込んでいることが分かる。

外来抗原は一般に液性免疫を誘導し、細胞性免疫を誘導につながらない。しかしながら、ここで合成された人工タンパク質は、外来抗原でありながら、タンパク質のみでクロスプレゼンテーションを介して、細胞性免疫を誘導できる事が、*in vitro*、*in vivo*の実験で明らかとなった。

現在、大きな注目を集めているがん免疫療法では、がん抗原エピトープペプチドとアジュバンドを混合し、患者に注射している。現在、臨床で用いられているアジュバンドは高価で、またアジュバンドによる皮膚の炎症反応(しこり)が問題となっている。また、効果的なアジュバンドが開発されていないのが現状である。本研究で確立された設計原理にしたがい、今後いろいろな人工ワクチンが、アジュバンドの使用を前提とせず合成されることが期待される。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Ito M, Hayashi K, Adachi E, Minamisawa T, Homma S, Koido S, Shiba K. Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity.

〔学会発表〕(計4件)

伊藤正紀、林 和美、南澤宝美后、小井戸薫雄、本間 定、芝 清隆、ペプチドエpiteopeのコンピナトリアルコンテクスチュアリゼーションによる抗原の細胞性免疫誘導能の増強、第73回日本癌学会学術総会、平成26(2014)年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

伊藤正紀、林 和美、小井戸薫雄、本間 定、南澤宝美后、芝 清隆、細胞性免疫を誘導する人工抗原の作用メカニズムの解析、第18回日本がん免疫学会総会、平成26(2014)年7月31日、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

伊藤正紀、林 和美、本間 定、芝 清隆、抗原エpiteopeの分子コンテクストを最適化した人工タンパク質は、がん免疫療法のための細胞性免疫を誘導する、第72回日本癌学会学術総会、平成25(2013)年10月3日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

伊藤正紀、林 和美、本間 定、小井戸薫雄、芝 清隆、人工タンパク質を用いた抗原ペプチドの分子コンテクストの最適化は細胞性免疫を強力に誘導する、第17回日本がん免疫学会総会、平成25(2013)年7月4日、ANAクラウンプラザホテル宇部(山口県・宇部市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：細胞性免疫誘導ワクチン
発明者：伊藤正紀、芝 清隆
権利者：公益財団法人がん研究会、
学校法人慈恵大学
種類：特許
番号：特願 2013-138688
出願年月日：2013年(平成25年)7月2日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝 清隆 (SHIBA, Kiyotaka)
公益財団法人がん研究会・がん研究所蛋白
創製研究部・部長
研究者番号：40196415

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

伊藤 正紀 (ITO, Masaki)