

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19204

研究課題名(和文)膜貫通型人工受容体の化学修飾法の開発とがん免疫治療への適用

研究課題名(英文)Chemical modification of artificial transmembrane receptors aiming at cancer immunotherapy

研究代表者

森 健(Mori, Takeshi)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70335785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膜透過型分子の開発と、それによるシグナル伝達誘導を目指した。将来的には、がん免疫治療のために免疫細胞を改変する技術となりうる。以下のことを明らかとした。1. クリック反応による膜貫通分子の高収率での合成法を確立した。2. 二分子膜を用いた膜透過の評価系を構築し、膜貫通分子が、膜電位の有無にかかわらず、膜透過することを示した。3. 間接法および直接法で、ストレプトアビジンと反応させた膜貫通分子は、細胞膜上に留まることがわかった。しかし、シグナル伝達のモデルとして設計したeDHFR-GFPの細胞膜への移行は見られなかった。このことから、膜貫通領域の分子設計を改善する必要があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝子組み換えを行うことなく、外部から膜貫通分子を添加することで、膜タンパク質様の構造を作ることを目的とした。遺伝子組み換えによる細胞改変は、遺伝子変異のリスクがあり、細胞治療が高コストとなる原因であるため、これを解決できれば、大きなインパクトを与えうる。難易度の高いこの挑戦に対して、本研究により、膜貫通分子の高収率な合成法の確立、膜透過の証明を行うことができた。しかしながら、膜貫通状態にあると思われる分子が、細胞内タンパク質と結合せず、膜貫通領域の分子設計をより長くしたり、剛直にするなどの改善が必要であるという知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop transmembrane molecules and induce signal transduction. In the future, it may be a technology to modify immune cells for cancer immunotherapy. The following was clarified. 1. We established a high yield synthesis method of transmembrane molecules by click reaction. 2. An evaluation system for membrane permeation using a bilayer membrane was constructed, and it was shown that transmembrane molecules permeate through the membrane regardless of the presence or absence of the membrane potential. 3. Indirect and direct modification methods showed that the transmembrane molecules reacted with streptavidin remained on the cell membrane. However, no translocation of eDHFR-GFP, which was designed as a signal transduction model, to the cell membrane was observed. This indicates that there is a need to improve the molecular design of the transmembrane domain.

研究分野：医用化学、バイオ分析

キーワード：膜貫通タンパク質 シグナル伝達 がん免疫療法

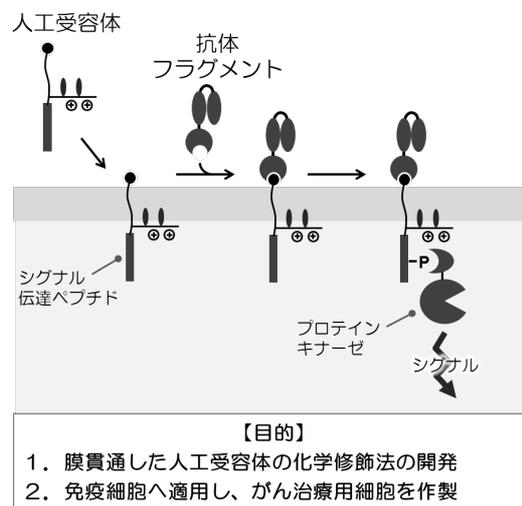
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞治療などを目的として、遺伝子組み換えにより細胞に対してキメラの受容体タンパク質を発現させ、任意の標的分子に対して望みの応答を引き出す研究が盛んになされている。これはキメラ型抗原受容体 (Chimeric antigen receptor: CAR) の成功が契機となっている。数多くの臨床研究が行われているが、患者由来の細胞に対して遺伝子組み換えを行うこれまでの方法は、作製の手間とコスト、そして予期せぬ細胞のがん化の問題がボトルネックであった。もし、遺伝子組み換えによらず、簡便な細胞表面の化学修飾によって、これが達成できれば、これらのボトルネックをすべて解消できる。しかし、これまでの細胞表面に対する化学修飾は、膜貫通した構造ではないため、細胞外で標的分子を認識したことを細胞内に伝えて、シグナル伝達による細胞応答を引き起こすことができなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず、シグナル伝達を誘導できるような膜貫通型の人工受容体の修飾法を開発する(図)。二通りの方法を試みる。一つは直接の膜透過により膜貫通構造を達成するものであり、申請者が最近、成功させた方法である。もう一つは一旦、膜融合性のリポソームの膜に人工受容体を膜貫通させて、これを細胞膜に融合することで、膜貫通を実現するものである。次に、これらの方法により免疫細胞に人工受容体を修飾することで、抗原を発現するがん細胞に対して細胞傷害を引き起こすことを目的とする。



3. 研究の方法

当初の研究計画は以下の4つである。ただし、予想に反して、膜貫通を証明することが困難であることが判明し、その達成に目的を切り替えた。

人工受容体の修飾のための二つの方法の比較検討

低分子リガンドのNK細胞への提示と細胞傷害性の評価

細胞傷害性の向上のためのラフト移行の評価と、二つのシグナル伝達ドメインの導入

抗体フラグメントのNK細胞への提示と細胞傷害性の評価

本研究では、まず、シグナル伝達ペプチド (ITAM 領域と呼ばれる 10~20 量体のペプチド) を細胞内ドメインとして持つ人工受容体の細胞膜への修飾法を確立する。上述の通り、直接法と間接法のどちらが適しているかを で評価する。次に、実際にがん細胞に結合できる低分子リガンドを本法により、NK (ナチュラルキラー) 細胞へ提示させ、これによるがん細胞の傷害を で評価する。細胞傷害性を発現するためには、人工受容体がん細胞表面の抗原に結合することで、免疫シナプスと呼ばれる膜ドメイン(ラフトとも呼ばれる)に集積する必要がある。そこで、 ではこの移行を促進するような人工受容体の膜貫通領域の構造を探索する。また、細胞傷害性を向上するためには、二種の異なるシグナル伝達ペプチドを利用することが望まれるので、これを検討する。最後に では、抗体フラグメントである一本鎖可変領域 (scFv) をタグテクノロジー (SNAP-tag、アビジンダイマー) を用いて、NK 細胞に修飾する方法を確立し、in vitro および担がんモデルマウスによる in vivo での細胞傷害性を評価する。

4. 研究成果

間接法による膜貫通分子の修飾

膜融合リポソームを用いる方法である。膜貫通可能な分子を作製し、文献に倣って膜融合リポソームに組み込んで、これを細胞に添加した。細胞表面に膜貫通分子に由来する蛍光が確認されたものの、細胞内で発現させている eDHFR-GFP の細胞膜への集積は見られなかった。うまく行かなかった原因として、(1) 細胞膜上に蛍光は見られるものの膜を貫通した状態で存在していない、(2) リンカー長が短く、細胞内の eDHFR-GFP と結合できないなどが考えられる。

直接法のための膜貫通分子の合成

これは膜電位を利用して、分子を膜貫通させるオリジナルの方法である。分子の合成は可能であるが、大変収率が低く、詳細な検討することが困難であることが分かった。そこで改めて合成法を検討し、さらにより単純な分子で膜透過が可能であるかを検討した。単純な分子として、これまでの胆汁酸を2つ含む分子から、一つに減らしたところ、膜電位感受部の合成収率が大きく改善した。したがって、胆汁酸を無保護で修飾することが大きく収率を低下させていると考えられた。この新しい膜電位感受部に対してオリゴエチレングリコールのリンカーを縮合したところ、収率が大きく低下した。この部分も収率の低下の原因であることが分かった。得られた分子を細胞に修飾したが、細胞への修飾率が従来分子よりも大きく低下することが分かった。すなわち、胆汁酸は2つ以上ないと、修飾が困難であることが分かった。

膜貫通評価系の構築

膜貫通分子が膜透過することを人工二分子膜を用いて評価する系を二つ構築した。一つは蛍光の消光を利用する方法であり、従来の膜電位感受部が、2時間以内という短時間で膜電位の掛かっていない膜を透過できることを明らかにした。また、平板膜を用いて膜電位を生じさせた場合の透過をK⁺電流の計測から示す系を構築した。その結果、膜電位感受が膜透過することを明らかにした。

クリックケミストリーを用いる膜貫通分子の合成

膜貫通分子を二つの部分に分断し、クリックケミストリーを用いて連結したところ、高い収率で得られた。得られた分子は従来法で合成した分子と同様に、膜透過性を有し、またストレプトアビジンを複合化することにより、膜透過性がなくなり、膜上にとどまった。そこで、eDHFR-GFP に対するリガンドを細胞質部に相当する箇所修飾した膜貫通分子を作製し、eDHFR-GFP の細胞膜への移行を評価した。しかしながら、添加条件を変えたり、膜貫通領域のリンカー長を延長するなど、種々の検討を行ったが、eDHFR-GFP の膜移行を示すデータは得られなかった。この原因として、リンカー長の不足が考えられた。細胞膜には糖質が修飾された膜タンパク質が存在し、その厚みは細胞種に依存するが、本研究で用いた上皮細胞であれば、数十 nm と言われている。一方、膜貫通分子の膜透過領域は、伸び切りの状態で 15 nm である。細胞膜厚の 5 nm よりも十分長いものの、糖脂質タンパク質の厚みよりは短い。したがって、この糖質タンパク質により、膜貫通分子/ストレプトアビジン複合体の膜貫通が妨げられたと考えられる。

本研究は、外部から膜貫通分子を添加することで、膜タンパク質様の構造を作るといふ本研究は難易度の高い挑戦である。遺伝子組み換え不要になるという意義は大きいので、今回の成果をもとにして、今後も継続して挑戦していく予定である。

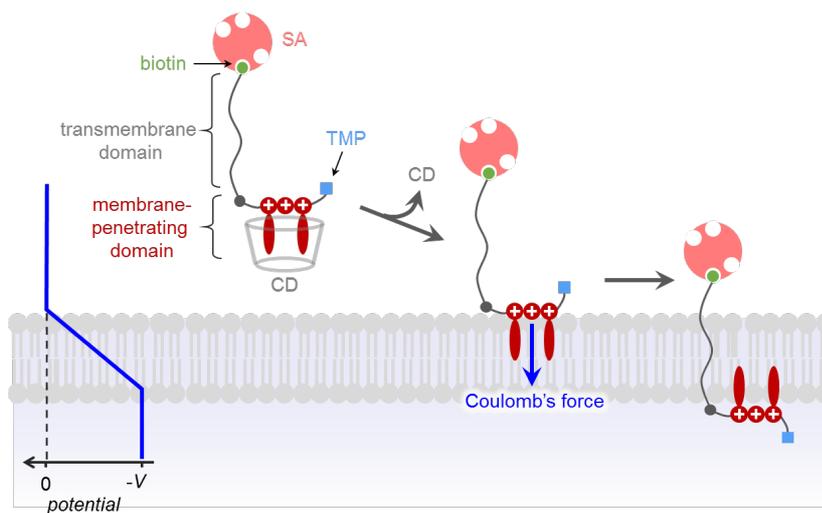


図2．細胞膜の膜貫通分子による修飾メカニズム

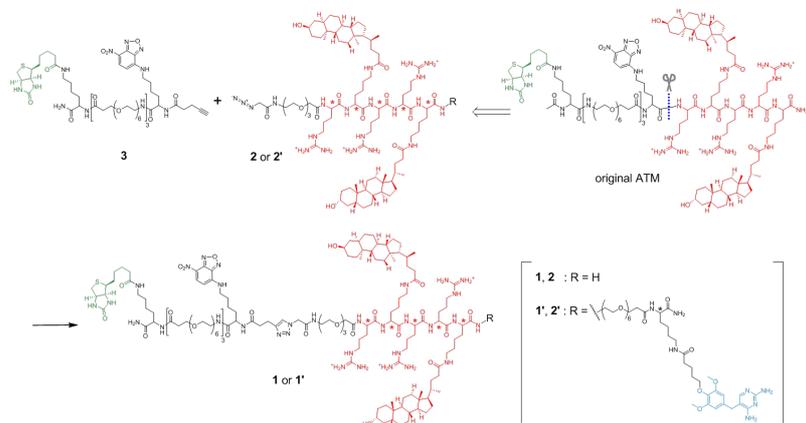


図3 . 膜貫通分子 1, 1' の合成スキーム

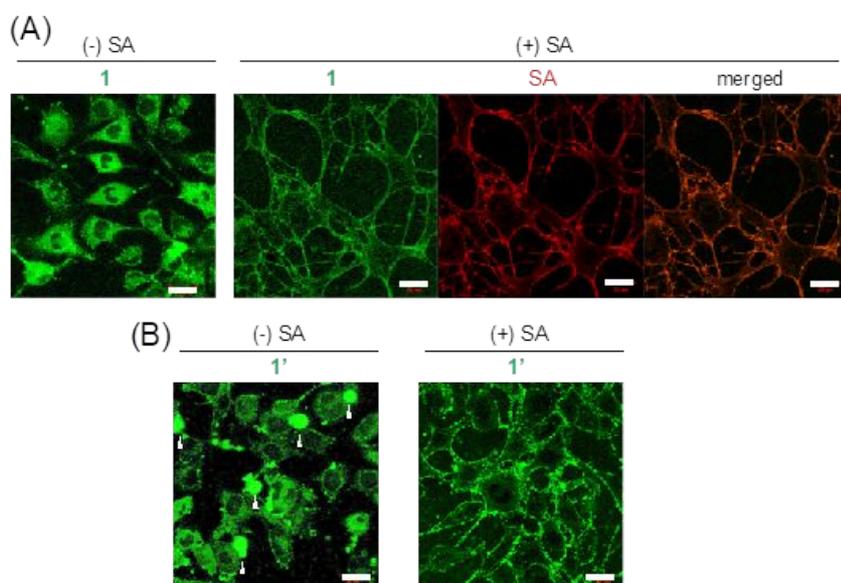


図4 . (A) 1 は膜透過するが、SA と複合化すると細胞膜に留まる。(B) 1' も同様。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. W. Hatanaka, M. Kawaguchi, X. Sun, Y. Nagao, H. Ohshima, M. Hashida, Y. Higuchi, A. Kishimura, Y. Katayama, T. Mori, Use of membrane potential to achieve transmembrane modification with an artificial receptor, *Bioconjugate Chemistry*, 査読有、28, 2019, 296-301.
DOI:10.1021/acs.bioconjchem.6b00449
2. Hatanaka Wataru, Takeuchi Hiroki, Koga Minaho, Ryujin Taka-aki, Kishimura Akihiro, Katayama Yoshiki, Tsukiji Shinya, Mori Takeshi, Synthesis of Transmembrane Molecules by Click Chemistry, *Chemistry Letters*, 査読有、48, 2019, 433-436.
DOI:10.1246/cl.190009

〔学会発表〕(計7件)

1. 畠中 渉, 岸村 顕広, 森 健, 片山 佳樹、膜貫通タンパク質を模倣した細胞膜修飾分子の開発、第3回細胞生物若手交流会、2017年
2. 畠中 渉, 岸村 顕広, 森 健, 片山 佳樹、膜透過ペプチドを利用した膜貫通タンパク質ミメティクスの開発、第49回若手ペプチド夏の勉強会、2017
3. W. Hatanaka, A. Kishimura, Y. Katayama and T. Mori, Design of Artificial Transmembrane Receptor for Cell Surface Engineering, *Biomaterials international 2017*, 2017年、福岡
4. 畠中 渉・岸村 顕広・森 健・片山 佳樹、細胞膜電位を利用した膜貫通タンパク質模倣分子の開発、第66回高分子討論会、2017年、松山

5. 竹内博紀、畠中渉、森 健、片山佳樹、岸村 顕広、高収率かつ性能の向上を目指した新規膜貫通分子の開発、第 55 回化学関連支部合同九州大会、2018、福岡
6. 畠中 渉、岸村 顕広、築地 真也、片山 佳樹、森 健、膜貫通型タンパク質を模倣した分子の合成と細胞膜上での機能の評価、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018、大阪
7. Wataru Hatanaka, Hiroki Takeuchi, Akihiro Kishimura, Yoshiki Katayama, Takeshi Mori, Modification of Transmembrane Protein Mimics on Living Cells, The 79th Okazaki Conference, 2018、岡崎

〔図書〕(計 1 件)

森 健、シーエムシー、ドラッグデリバリーシステム - バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発 -、2018、5

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：築地真也

ローマ字氏名：Tsukiji Shinya

研究協力者氏名：川野 竜司

ローマ字氏名：Kawano Ryuji

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。