

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01792

研究課題名(和文)細胞内創薬プラットフォーム技術の開発

研究課題名(英文)Development of a platform technology for intracellular drug discovery

研究代表者

河原 正浩 (KAWAHARA, Masahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：50345097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では受容体やその下流のシグナル伝達分子を用い、細胞内のタンパク質間相互作用に伴う細胞の増殖の有無を検出する新しい細胞内タンパク質間相互作用検出技術を開発した。本手法では、タンパク質間相互作用の検出感度を小分子の添加によって調節可能であった。本手法を用いて、ペプチド-タンパク質ドメイン間相互作用を汎用的に検出でき、高親和性細胞内抗体をライブラリーからスクリーニングすることもできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガンや感染症などの疾患は現代社会における脅威であるが、種々の疾患に対する効果的な治療薬は未だ確立されていないのが現状である。一方で、生体内のプロセスはほぼ全てがタンパク質間相互作用に支配されており、タンパク質間相互作用を標的とした創薬は無数の可能性がある。本研究では、種々の疾患の原因となるタンパク質間相互作用を標的として、生きた細胞内での治療薬のスクリーニング技術を開発したことから、学術的・社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a new intracellular protein-protein interaction detection technology that detects cell proliferation associated with intracellular protein-protein interactions using a receptor or a signaling molecule downstream of receptors. In this method, the detection sensitivity of protein-protein interactions could be adjusted by adding a small molecule. Using this method, peptide-protein domain interactions could be detected generally, and high-affinity intracellular antibodies could be screened from a library.

研究分野：細胞工学

キーワード：蛋白質 相互作用 スクリーニング シグナル伝達 動物細胞

1. 研究開始当初の背景

ガンや感染症などの疾患は現代社会における脅威である。ガンは日本人の死因の約3割にもなる一方、種々のガンに対する効果的な治療法は未だ確立されていない。また、近年のデングウイルス・エボラウイルス・コロナウイルスの蔓延に代表されるように、世界ではたびたび高病原性ウイルス・細菌が出現し、多くの感染症死者が出ている。グローバル社会である現在、我が国にもこれらの脅威が到達する可能性は高く、感染症の予防法や治療法の開発は喫緊の課題である。

従来のこれらの疾患の治療薬は、それぞれの疾患に特異的なタンパク質、主に酵素を分子標的として選び、それに作用して活性を阻害する薬剤をスクリーニングするという戦略が主体である。しかし、内在性の他の類縁タンパク質にも作用する場合、これらの薬剤は副作用を示してしまうため、限界がある。一方、新しい創薬の概念として、タンパク質間相互作用を標的とした阻害剤探索が最近注目されてきている。生体内のプロセスはほぼ全てがタンパク質間相互作用に支配されていることから、タンパク質間相互作用を標的とした創薬は無限の可能性がある。しかし、タンパク質間相互作用の結合界面は一般的に広く扁平であるため、その阻害剤の合理的設計や探索は、従来の酵素阻害剤探索と比べてはるかに困難である。また、*in vitro* の環境は、多くの分子が共存する細胞内環境と大きく異なっているため、スクリーニング手法としては、生体内での薬効をできるだけ正確に予想できるという観点から、細胞を用いたアッセイ系が望ましい。従って、生きた細胞内の **crude** な環境下でタンパク質間相互作用を検出し、かつ有用な阻害剤を簡便にスクリーニングできる手法の開発が求められている。さらに、阻害剤として低分子化合物のみならず、結合界面がより大きくなる「ペプチド」をベースとしたライブラリースクリーニングも可能な手法であることが望ましい。

2. 研究の目的

以上で述べたように、タンパク質間相互作用を標的とした創薬は近年新しい概念として注目されており、生きた細胞内の **crude** な環境下で創薬の候補ペプチドや化合物を簡便にスクリーニングできる手法の開発が求められている。そこで本研究ではレポーター分子として受容体やその下流のシグナル伝達分子を用い、細胞内のタンパク質間相互作用に伴う細胞の「増殖」の有無をリードアウトとして検出する新しいプラットフォーム技術を確立する。このとき、タンパク質間相互作用の検出感度が調節可能であるように分子デザインを行い、検出されるアフィニティーに閾値を設けながらスクリーニングを行うことで、優れた親和性を持つ創薬分子を親和性成熟によって合理的に得る手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) KIPPIS 法の汎用性の検証

増殖因子受容体の一種である幹細胞因子受容体 (c-Kit) を用い、c-Kit の細胞内ドメインを相互作用タンパク質ペア (bait と prey) の C 末端側にそれぞれ連結したキメラタンパク質を構築する。また、bait、prey キメラの N 末端側にヘルパーモジュールとして FKBP12 の変異体 (F36V) をそれぞれ連結する。このヘルパーモジュールは、小分子リガンドである AP20187 を添加する

とホモ二量体を形成し、bait-prey 間相互作用をアシストする。加える AP20187 の濃度を変化させることで、相互作用検出感度を制御することが可能となる。これまでに、モデルとなるタンパク質間相互作用ペアを用いて KIPPIS 法の基本原理は実証済みであったが、それが汎用的であるかについては未解明であった。そこで、本手法がペプチドとタンパク質ドメイン間相互作用の検出に適していることを鑑み、がんや感染症の原因タンパク質のうち6つのペプチドとタンパク質ドメインのペアを選び、これらの相互作用を検出できるかを検証した。

(2) SOLIS 法による細胞内抗体スクリーニングの実証

相互作用を検出したいタンパク質ペアを bait, prey とし、SOS を bait の C 末端側に連結する。prey は C 末端側に赤色蛍光タンパク質 mCherry を介し膜アンカリング配列と融合して膜に局在させる。bait と prey の間で相互作用があると、これらはヘテロ二量体を膜近傍で形成することが予想されるが、bait-prey 間相互作用がない場合、SOS が十分に膜に近接せず、内在性の Ras を活性化できない。一方、bait-prey 間相互作用があれば SOS は十分に膜に局在し、内在性の Ras を活性化できると考えられる。Ras が活性化されると、下流の MAP キナーゼカスケードが働くことによって細胞増殖が誘導される。本研究では、bait として緑色蛍光タンパク質 (GFP)、prey として抗 GFP 抗体とその相互作用界面のアミノ酸残基をランダム化したライブラリーを用いて、SOLIS 法による細胞内抗体スクリーニングが可能であることを検証した。

4. 研究成果

(1) KIPPIS 法の汎用性の検証

6種類のペプチド、またはタンパク質ドメインと受容体チロシンキナーゼ c-Kit の細胞内ドメインを連結し、さらに小分子 AP20187 依存的に相互作用を補助するヘルパーモジュールを連結したキメラ受容体遺伝子を構築した。これらと抗生物質耐性遺伝子をレトロウイルスベクターに搭載し、IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に遺伝子導入して抗生物質選択後、安定発現株を得た。増殖アッセイの結果、6つのペアいずれにおいても、ペプチド-タンパク質ドメイン間相互作用に応じた細胞増殖が見られた。このとき、相互作用しないペプチド-タンパク質ドメインペアを導入したネガティブコントロールでは全く細胞増殖が見られなかったことから、特異性が担保された検出系であることが示された。さらに、その相互作用検出感度をヘルパーモジュールに結合する小分子 AP20187 の濃度で制御することが可能であった。以上より、本法によってペプチド-タンパク質ドメイン間相互作用を汎用的に検出可能であることを実証した。

(2) SOLIS 法の開発と細胞内抗体スクリーニングの実証

まず、GFP と SOS を融合したキメラタンパク質、および細胞内抗体ライブラリーを mCherry を介して細胞膜局在モチーフ配列と融合したキメラタンパク質をコードする遺伝子を設計した。抗体の抗原認識に関わるアミノ酸残基をアラニン置換したネガティブコントロールを用意し、そのアラニンにランダム変異を導入した抗体ライブラリーを構築した。得られた抗体ライブラリーキメラタンパク質をコードするレトロウイルスライブラリーを作製した。これを、抗原である GFP と SOS との融合タンパク質を発現させた IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に遺伝子導入し、安定発現細胞ライブラリーを取得した。得られた細胞をマルチウェルプレートに播種し、IL-3 非存在下で培養することで生き残り増殖してくる細胞クローンをスクリーニングした。得られた細胞クローンからゲノム PCR により、各クローンにおけるランダム化部位の配列を同定した。各

クローンの抗原結合親和性や結合カイネティクスを表面共鳴エネルギー法によって定量的に解析した結果、本法によって高親和性細胞内抗体をスクリーニングすることが可能であることを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 河原正浩	4. 巻 98
2. 論文標題 治療・創薬を指向した機能性細胞創製技術の現状	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 406-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河原正浩	4. 巻 51
2. 論文標題 細胞の生死を指標とした抗膜タンパク質抗体選択法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオ部会ニュースレター（化学工学会バイオ部会）	6. 最初と最後の頁 3-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Tasuku, Sogo Takahiro, Ueyama Tomoe, Nakao Shu, Harada Yukihiro, Ihara Dai, Akagi Yuka, Kida Yasuyuki S., Hasegawa Koji, Nagamune Teruyuki, Kawahara Masahiro, Kawamura Teruhisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Chimeric G-CSF Receptor Mediated STAT3 Activation Contributes to Efficient Induction of Cardiomyocytes from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1900052 ~ 1900052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201900052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河原正浩	4. 巻 97
2. 論文標題 人工受容体発現細胞でがん治療？！細胞創製時代の幕開け	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishizuka Shuta, Lai Chen-Yi, Otsu Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Nagamune Teruyuki, Kawahara Masahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Designing Motif-Engineered Receptors To Elucidate Signaling Molecules Important for Proliferation of Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1709 ~ 1714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen Thuy Duong, Nagamune Teruyuki, Kawahara Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 A Suicide Switch Directly Eliminates Intracellular scFv Oligomers in the Cytoplasm of Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1800350 ~ 1800350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201800350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eguchi Akihiro, Nakakido Makoto, Nagatoishi Satoru, Kuroda Daisuke, Tsumoto Kouhei, Nagamune Teruyuki, Kawahara Masahiro	4. 巻 116
2. 論文標題 An epitope directed antibody affinity maturation system utilizing mammalian cell survival as readout	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1742 ~ 1751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.26965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河原正浩	4. 巻 82
2. 論文標題 細胞応答シグナルの自在な制御を可能にする受容体改変技術	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 287 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 河原 正浩、江口 晃弘
2. 発表標題 動物細胞株の生存を指標としたエピトープ特異的抗体親和性成熟法の開発
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原 正浩
2. 発表標題 細胞創製時代のバイオ計測
3. 学会等名 バイオ計測サイエンス研究部会2020 シンポジウム～次世代のバイオ計測はこれだ！！～（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Kawahara
2. 発表標題 Drug discovery platforms utilizing mammalian cell fate signaling
3. 学会等名 TSlGS-UT Joint Workshop on Biomedical and Health Engineering（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Kawahara
2. 発表標題 Reprogramming signal transduction by receptor engineering
3. 学会等名 Young Asian Biological Engineers' Community 2019 (YABEC 2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Kawahara
2. 発表標題 Synthetic engineering of signalobodies for versatile regulation of cellular fates
3. 学会等名 Tsinghua University & The University of Tokyo Forum on Health Biotechnology and Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Kawahara
2. 発表標題 A rational design of synthetic receptors that activate defined signaling molecules
3. 学会等名 Asian Congress on Biotechnology (ACB-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原 正浩, 江口 晃弘
2. 発表標題 細胞死受容体を利用した結合部位特異的抗体選択系の構築
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原正浩、石塚周太
2. 発表標題 造血幹細胞の増殖誘導を目指した人工シグナル伝達受容体の開発
3. 学会等名 第32回 日本動物細胞工学会2019年度大会 (JAACT2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原 正浩
2. 発表標題 受容体工学の創成と再生医療・創薬・合成生物学への展開
3. 学会等名 新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会反応分科会講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原 正浩
2. 発表標題 細胞創製工学の創成と疾患治療への展開
3. 学会等名 基盤研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kirato Umene, Masahiro Kawahara
2. 発表標題 Screening of Tyrosine Motifs Which Can Induce Efficient Cell Proliferation and Its Development
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatphon Kongkrongtong, Masahiro Kawahara
2. 発表標題 Optogenetic Control of Target Signaling Molecule by Engineering Receptor Tyrosine Kinase
3. 学会等名 Asian Congress on Biotechnology (ACB-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kirato Umene, Masahiro Kawahara
2. 発表標題 Generation and Screening of Tyrosine Motif Library Which Can Induce Efficient Cell Proliferation
3. 学会等名 Asian Congress on Biotechnology (ACB-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 コンクロントーン タットポーン, 河原 正浩
2. 発表標題 シグナル伝達分子特異的に活性化するカスタマイズ可能な受容体の開発
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅根 輝来人, 河原 正浩
2. 発表標題 受容体モチーフライブラリのスクリーニングによる効率的な細胞増殖誘導の実現
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 コンクロントーン タットポーン, 長棟 輝行, 河原 正浩
2. 発表標題 光感受性受容体を利用した標的シグナル伝達分子の光応答的活性化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Kawahara
2. 発表標題 A receptor-engineering approach for arbitrarily controlling cell fates
3. 学会等名 The University of Tokyo-Tsinghua University Joint Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原 正浩
2. 発表標題 ゲノム編集ツールを用いた細胞運命変換系の構築
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原 正浩、石塚周太、坂晃一郎
2. 発表標題 モチーフ改変受容体を用いた造血幹細胞増殖シグナルの解明
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原 正浩
2. 発表標題 受容体ライブラリーによる機能性細胞の創製
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kawahara, M.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 26
3. 書名 Biomedical Engineering Challenges: A Chemical Engineering Insight	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------