

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02004

研究課題名(和文) 血液循環癌細胞の膜表面に特化したプロテオミクスによる抗体標的新規探索

研究課題名(英文) Development of technology to search for novel antibody targets by proteomics specialized on the surface of circulating tumor cells

研究代表者

井上 豪 (Inoue, Tsuyoshi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20263204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗体は分子量の問題から細胞内部には直接侵入できず、疾患組織の細胞表面に存在する膜表在性蛋白質を高精度に分析する技術の開発が必須である。本課題では、膜表在性蛋白質をイミノビオチン化試薬でラベル化し、ラベル化された蛋白質のみに特異性を示す改変型ストレプトアビジンを用いて精製する技術を開発した。

本ラベル化プロテオミクス技術を癌のモデルマウスに適用し、野生型との比較解析により転移癌の血管内皮には膜蛋白質トランスポーターXが有意に高発現することが判り、阻害剤の投与によって悪性リンパ腫の抗腫瘍効果も認められた。本法は抗体医薬品を開発するための新規標的探索技術として優れた技術であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は高い特異性と親和性を有し副作用が低い、アンメットメディカルニーズを満たすほど標的分子は少なく、新規標的探索技術の開発が望まれていた。特に抗体は分子量の問題から細胞内部には直接侵入できず、疾患部位の膜表在性蛋白質を高精度に分析できる技術の開発が必須となる。そこで非天然型ビオチンにのみ特異性を示す改変型ストレプトアビジンを用い、血液循環細胞表面をはじめラベル化された膜表在性蛋白質に特化したプロテオミクスにより新規標的蛋白質を効率よく発見して、アンメットメディカルニーズに応えた新規抗体医薬品を開発できる可能性が高く、非天然型ビオチン化試薬による新規探索技術の開発の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Antibodies cannot penetrate directly into cells due to their molecular weight, and it is essential to develop a technology for the accurate analysis of membrane proteins that exist on the cell surface of diseased tissues. In this project, we established a technology to label membrane proteins with iminobiotinylated reagents and purify them using a modified streptavidin that shows specificity only for the labeled proteins. By applying this labeling proteomics technology to a mouse model of cancer, we found that membrane protein transporter X was significantly upregulated in the vascular endothelium of metastatic cancer by comparison with wild-type mice, and that administration of the inhibitor had an antitumor effect on malignant lymphoma. This method was found to be an excellent technique for the discovery of new targets for the development of antibody drugs.

研究分野：構造生物化学

キーワード：癌 抗体医薬 標的探索 ストレプトアビジン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は標的分子に対する高い特異性と親和性により、副作用低減というメリットを持ちながら、高い薬理活性を示すことで様々な難治性疾患に応用されている。その一方で、抗体医薬品の新規なターゲット分子については、アンメットメディカルニーズを満たすほど十分とは言えない状況にある。従って、新たな創薬ターゲット分子の探索を可能にする探索手法の開発が現在も継続して求められている。

一方、抗体は分子量の問題から細胞内部には直接侵入できない。従って、抗体の開発には疾患組織の細胞表面に存在する膜表在性蛋白質を高精度に分析する技術の開発が必須である。ストレプトアビジン(SA)とビオチン(BTN)ラベル化誘導体の相互作用を用いたプロテオーム解析によって、新規標的蛋白質を探索する技術も生まれていたが、内在性BTN化タンパク質の量が多く、少量であっても優位に高発現している新規標的蛋白質をこの手法では検出することができないという問題があった。

2. 研究の目的

我々は既に非天然型の bis-イミノビオチン(BisBTN)にのみ特異性を示す改変型 SA(MTSA)を開発していたので、ラベル化試薬として利用できるようさらに誘導化し、BisBTNラベル化誘導体の合成に成功した。そこで本研究では、腫瘍血管の内皮細胞に存在する膜表在性蛋白質をこれら新規薬剤でラベル化し、ラベル化された蛋白質のみに特異性を示す MTSA を用いて精製することで内因性のビオチン化蛋白質に阻害されずに新規にラベル化された標的蛋白質が精製できるか、特に疾患部位に特異的な極微量の蛋白質を効率よく精製できるか、さらには、質量分析によってこれらを同定できるか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

水溶性に優れた BisBTN 化試薬を B 細胞リンパ腫肝転移モデルのマウスに尾静脈から直接投与し、血管内皮に発現する膜表在性蛋白質を BisBTN 誘導体で *in vivo* BisBTN 化することでラベル化し、次いで MTSA を固定化したビーズを用いたアフィニティー精製により回収した。質量分析およびバイオインフォマティクス分析を駆使したプロテオーム解析を実行し、リンパ腫肝転移組織において 1.5 倍以上発現が上昇したものを探索した。これらを生新規標的蛋白質の候補として上位の新規標的蛋白質について免疫染色実験も行い、実際のヒトの疾患組織標品でも高発現しているか確認を行い、本手法によって新規標的探索が可能か実証実験を行った。

4. 研究成果

予備実験として行った野生型マウスを用いた *in vivo* BisBTN 化実験では、図 1 の青色で示した内在性 BTN 化タンパク質のコンタミネーションを大きく低減させることができ、膜表在性蛋白質(ピンク色)や膜蛋白質(緑色)を多数同定できることが判明した(図 1)。これにより疾患マウスと比較解析すれば創薬標的になりうる膜表在性タンパク質に関する情報を同定できることが示唆された。

次に、悪性リンパ腫を播種した担癌マウスの肝臓を摘出し、ラベル化した膜表在性蛋白質を MTSA を担持したビーズで精製を行い、質量分析に供した。プロテオミクス解析の結果としては正常マウスと比べ転移した周囲の血管内皮で約 4 倍亢進したと考えられる膜蛋白質トランスポータ X を筆頭に、69 種類の新規標的の候補蛋白質が得られた。

上位 4 種の標的蛋白質について免疫染色実験を行った結果、2 種で亢進し、他の 1 種もこれらの亢進している蛋白質と連結していることも判明した。ヒト由来のトランスポータ X の阻害剤が得られていたので、*In vitro* 細胞増殖アッセイを行った。また、ヒトの *In vivo* 異種移植腫瘍アッセイも行ったが、いずれも良好な抗腫瘍効果が認められ、特に 15 mg/kg 投与群では 7 匹中 6 匹のモデルマウスで腫瘍が消失するという良好な結果を得た(図 2)。

WTSA-BTN 法 (従来法)

Protein name	Area
Pyruvate carboxylase, mitochondrial	6.3E+11
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	1.3E+11
Serum albumin	1.2E+11
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha mitochondrial	1.0E+11
Acetyl-CoA carboxylase 1	3.5E+10
Acetyl-CoA carboxylase 2	3.4E+10
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	2.6E+10
H-2 class I histocompatibility antigen, K-D alpha chain	1.7E+10
Collagen alpha-1(I) chain	1.7E+10
Isoform 2 of Collagen alpha-1(XIV) chain	1.3E+10
Arf-GAP with SH3 domain	9.1E+09
Insulin receptor-related protein	8.7E+09
Isoform PLEC-1 of Plectin	8.3E+09
Fatty acid synthase	7.3E+09
Collagen alpha-2(I) chain	5.1E+09

MTSA-BisBTN 法 (新規法)

Protein name	Area
Collagen alpha-1(I) chain	2.3E+11
Collagen alpha-2(I) chain	5.1E+10
Serum albumin	1.7E+10
Glutathione S-transferase A3	8.6E+09
Glutathione S-transferase A1	4.3E+09
Monocarboxylate transporter 1	3.7E+09
Isoform 3 of Collagen alpha-1(II) chain	2.9E+09
Elastin	3.5E+09
Isoform Short of Collagen alpha-1(XI) chain	2.0E+09
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	2.6E+09
Collagen alpha-2(IV) chain	1.8E+09
Collagen alpha-1(III) chain	2.4E+09
Fibronectin	1.5E+09
Solute carrier organic anion transporter family member 1B2	1.4E+09
60S ribosomal protein L6	1.3E+09

■ 内在性BTN化タンパク質 ■ 細胞膜タンパク質 ■ 細胞外マトリクス構成タンパク質

図1. ビオチン(従来法)および非天然型ビオチン(新手法)を用いて得られる野生型マウスの血管内皮蛋白質の違い

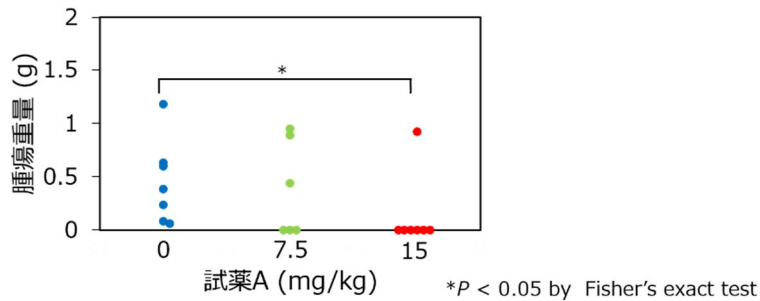
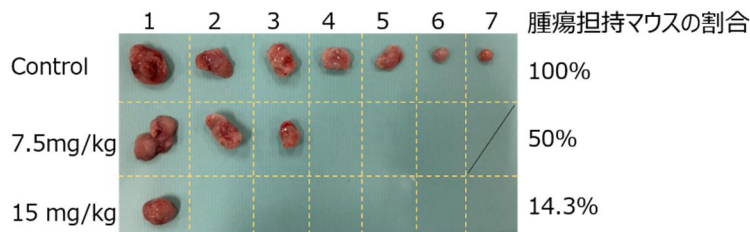
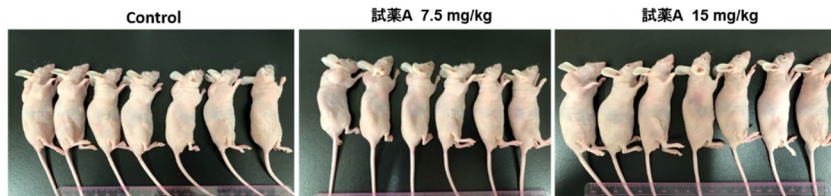
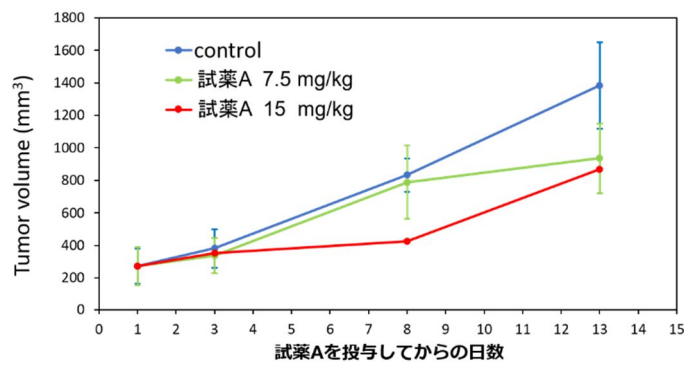


図2. 新規標的トランスポーターXに対する阻害剤の効果. 腫瘍体積および重量の有意な減少が認められた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鎌田春彦
2. 発表標題 革新的創薬に向けた治療薬シーズ抗体探索技術の開発
3. 学会等名 彩都産学官連携フォーラム2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ウテログロピンを構造基盤とする二重特異性ポリペプチド	発明者 新山真由美、ほか11名	権利者 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-044364	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗体医薬の開発に資する創薬標的タンパク質の同定方法及び標的タンパク質に対する抗体の製造方法	発明者 鈴木常司、ほか8名	権利者 三井化学株式会社、ほか2社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018005814	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	鎌田 春彦 (KAMADA HARUHIKO) (00324509)	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 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー (84420)	

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
---------	---------