

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360370

研究課題名(和文) タンパク質カチオン化技術のがん免疫治療への応用

研究課題名(英文) Application of protein cationization techniques for cancer immunotherapy

研究代表者

二見 淳一郎 (JUNICHIRO, FUTAMI)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：00420498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、化学修飾法を用いた変性タンパク質のタンパク質可溶化技術を活用して、多くが不安定な物性のがん抗原タンパク質を全長・水溶性として調製する技術開発とリソース強化を進めた。本抗原を活用して、高感度な抗体検査試薬のプロトタイプ開発に成功し、がん免疫活性の診断薬となる可能性が示された。これらのリソース整備と周辺技術の組み合わせにより、タンパク質カチオン化技術のがん免疫治療分野への活用に向けた基盤が整った。

研究成果の概要(英文)：This study aimed development of chemical protein cationization techniques for cancer antigens. Since most of cancer antigen proteins are flexible and unstable, solubilization with protein cationization techniques were useful methodology to prepare water-soluble and full-length cancer antigens. Using these cationized antigens, antigen antibodies for cancer antigens raised in cancer patients were successfully detected with a highly sensitive assay. Combining these developed techniques and enhanced cancer antigen production resource, we have successfully developed tools for cancer immunotherapy.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：タンパク質工学 化学修飾 バイオテクノロジー 腫瘍免疫 診断薬 ワクチン

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

特定の立体構造を形成して多彩な生理機能を発現するタンパク質の取り扱い、活性構造の維持が最重要であり、一般に温和な生理条件下で取り扱われる。タンパク質分子の構造安定性は個々に異なるが、ヒト細胞内のタンパク質の多くはフレキシブルで安定性が低い。それ故、細胞内タンパク質を組換えタンパク質として調製する際にも変性・不溶化を防ぐ細心の注意が求められる。これらの問題を解決する1つの手段として、我々はタンパク質のCys残基を利用して正電荷を付加するカチオン化技術を開発してきた。この技術は①変性状態のタンパク質に高い水溶性を付加する技術、②動物細胞表面への静電的な吸着を介した高効率なタンパク質細胞内導入が可能で、本技術を活用した様々な応用展開を進めている。本研究開発ではこの技術を「がん免疫治療」分野へ応用する課題に取り組むこととした。がん患者の体内ではがんに対する免疫応答が誘導され、がん細胞特異的なタンパク質（がん抗原）に対する抗体産生（液性免疫）と、T細胞反応（細胞性免疫）が認められる。がん免疫治療はこれらの免疫応答を活用・強化する治療法で、既存のがん治療との併用により高い治療効果、特に手術後の再発防止効果が確認されており、先進医療としてニーズが高まっている。また、様々なアプローチが考えられるがん免疫治療では、各患者に最も適した治療法の選択や、ワクチン療法に用いる抗原の同定が重要な課題である。がんに対する免疫応答は、血液中出现するがん抗原タンパク質に対する抗体量でモニタリングすることができる。この抗体の出現量から治療指針を見出すことも期待できる。

2. 研究の目的

本研究ではタンパク質カチオン化技術を

活用してがん免疫治療分野に貢献しうる下記の2つの課題に取り組んだ。

(1) 高純度・可溶性がん抗原タンパク質によるがん抗原パネルの作成

正常細胞でありながら無限増殖能を獲得している精巣では、この機能発現に関わる特殊なタンパク質群が特異的に発現している。自分自身の細胞が変化して生じるがん細胞には、これらの無限増殖に関わる特殊タンパク質群を「悪用」している例がある。すなわち、これらのタンパク質群はヒト体内で精巣とがんに限局した発現を示す。これらは同時にヒト由来タンパク質でありながらヒト細胞傷害性T細胞(CTL)や抗体によって認識される抗原性を示すことから、Cancer-Testis抗原(CT抗原)と呼ばれ、現時点で150種類以上が同定・報告されている。本研究ではこのCT抗原に特に着目し、多種類の全長の組換えタンパク質を大腸菌またはヒト由来Hek293細胞を用いて生産し、抗体検査試薬やワクチン開発研究の基盤を整備する。本研究では特に、多種多様な全長がん抗原タンパク質の生産系のリソース整備と、この全長抗原を活用した抗体検査試薬の開発に注力することとした。

(2) がん抗原タンパク質のワクチン化技術の開発

がん抗原タンパク質の多くは、フレキシブルで不溶化しやすい物性である。ほぼすべてのがん抗原タンパク質には反応性と疎水性度が高いCys残基が含まれるが、可逆的なジスルフィド結合を介して正電荷を導入する可逆的変性カチオン化技術を用いれば高い水溶性を付与できる。このカチオン化タンパク質は同時に細胞内導入能も高いため、カチオン化がん抗原を用いたワクチン調製にも応用可能である。この際、効果的ながん免疫誘導には細胞性免疫の誘導が特に重要である。細胞性免疫の誘導には、

樹状細胞内へ抗原の導入経路と細胞内輸送経路の選択が重要なことが知られているが、本研究では、がん抗原を細胞内に導入するための経路として次の2点の検討を行うこととした。

①マンノース受容体を介した抗原導入法の開発

樹状細胞の表面に存在するマンノース受容体を介して細胞内に抗原を送達すれば、クロスプレゼンテーションにより効率的に細胞性免疫を誘導の促進が期待される。組換え体がん抗原タンパク質の Cys 残基に可逆的にマンノースを付加する試薬を合成し、可逆的マンノース化抗原の調製法を検討した。

②がん抗原ベクター細胞調製技術の開発

アポトーシスにより死滅したがん細胞は、生体内の樹状細胞に貪食されやすい。さらにこの経路で貪食された抗原は、細胞性免疫誘導に有利とされる。本研究では組換えタンパク質として調製する多種多様のがん抗原を効率的にヒト培養細胞内に導入し、がん抗原ベクター細胞を調製するための基礎検討を行った。

3. 研究の方法

(1)高純度・可溶性がん抗原タンパク質によるがん抗原パネルの作成

①全長・水溶性がん抗原タンパク質の調製法の確立

17 種類の代表的ながん抗原タンパク質を選択し、N 末端側に HisTag を付加させた各全長タンパク質を、大腸菌を宿主とした T7 発現系で生産させた。一部の抗原 (MAGE-A4 など) は可溶性として発現・精製することが可能であったが、大半の抗原は不溶性として発現された。溶菌・破碎後によく洗浄した不溶性抗原は、変性剤中で

溶解・還元し、Cys 残基に対して TAPS-Sulfonate を用いて SS 結合を介して 4 級アンモニウム基を付加し、酸性条件下で純水に対して透析することで水溶性の可逆的変性カチオン化抗原を調製した。これをさらに逆相 HPLC を用いて高純度に精製し、溶媒を純水に置換することで各サンプルを取得した。

②カチオン化全長がん抗原タンパク質を用いた抗体検査試薬の開発

がん患者の血清中にはがん抗原タンパク質に対する複数の抗体が出現することが知られている。上記①で調製した各種のがん抗原を用いて抗体検査試薬の開発に取り組んだ。まず、Cys 残基に対して付加されたカチオン基の影響を調べるため、ELISA 法を用いてカチオン基の有無での抗体検出感度を測定した。次に、各種の水溶性・全長カチオン化がん抗原タンパク質をマルチプレックスアッセイ用の磁気ビーズに固定化し、がん患者由来血清中の抗体検出感度の測定を行った。

③多種類がん抗原タンパク質の生産系の整備

より広範な全長がん抗原の生産リソースを強化するため、CT 抗原を中心に生産系の拡充を進めた。ヒト精巣由来 cDNA を鋳型として CTDatabase (<http://www.cta.lncc.br/>) に登録されている CT 抗原の各 cDNA を PCR 法で増幅し、新規に開発した HEK293 細胞で高発現が可能な SGE ベクター (Sakaguchi *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 2014) に N 末端側に HisTag を、C 末端側に StrepTagII をそれぞれ付加させて全長 CT 抗原を発現させる発現プラスミド DNA を網羅的にクローニングした。これらを FreeStyle293F 細胞にトランスフェクションし、各 CT 抗原の生産を進めた。また、PCR

法で遺伝子断片の増幅が困難であったものや、FreeStyle293F 細胞での発現量が低かった抗原については、人工合成遺伝子を作成し、大腸菌を宿主とした生産系の整備を進めた。

(2) がん抗原タンパク質のワクチン化技術の開発

①マンノース受容体を介した抗原導入法の開発

酵母由来マンナンをタンパク質中の Cys 残基に対して SS 結合を介してタンパク質を可逆的にマンナン化できる試薬を合成し、その有効性を検証した。

②がん抗原ベクター細胞調製技術の開発

メラノーマ抗原である gp100 をモデルとして、各種のカチオン化 gp100 を調製した。このサンプルを各種の条件でヒト培養細胞に添加し、細胞内へのタンパク質導入を行い、高効率なタンパク質導入条件を検討した。

4. 研究成果

(1)高純度・可溶性がん抗原タンパク質によるがん抗原パネルの作成

17 種類のがん抗原をモデルとして抗体検査試薬に用いる抗原として評価を進めた。一部の抗原は可溶性として精製することが可能であったが、大半の抗原は大腸菌で不溶性として生産された。これらのタンパク質は SS 結合を介してカチオン化した状態で高純度・水溶性抗原として調製することに成功した。さらに、実際のがん患者血清を用いて ELISA 法により抗体との結合実験を行ったところ、還元状態のがん抗原(Cys 残基が未修飾)とカチオン化がん抗原の反応性はほとんど変化せず、取り扱いが容易なカチオン化抗原がそのまま抗体検査試薬に適用できることが確認された。さらにこれらの抗原をマルチプレックスアッセイ用

の磁気ビーズに固定化して抗体検査を行ったところ、極めて高感度に抗体検出が可能ながん抗原が確認された。これらの成果を特許出願（特願 2012-082735）し、実用化研究を進める基盤が整った。次に本技術を用いて実際に診断薬開発を進めるためには、より広範な全長がん抗原の生産リソース強化が重要課題となった。本研究では腫瘍免疫マーカーとして有望な CT 抗原を中心にクローニング作業を進めた結果、本研究の終了時にはヒト培養細胞（FreeStyle293）での生産系として 77 クローン、大腸菌での生産系として 32 クローンの構築をそれぞれ完了し、以前からの研究リソースを総合すると、約 120 種類のがん・CT 抗原の生産系を整備した。また、FreeStyle293 細胞を宿主とした各 CT 抗原の生産系で発現確認を実施したところ、実に 80%もの抗原タンパク質が細胞内で不溶化していることが判明した。これは不安定な物性である CT 抗原の特徴をよく表している。CT 抗原の詳細な機能は未解明な部分が多いが、主に細胞内で様々なタンパク質と相互作用するハブ機能が推定されており、それ故、大半が天然変性タンパク質であることが推定されている。本結果は CT 抗原の物性を示す結果と考えられる。

(2) がん抗原タンパク質のワクチン化技術の開発

樹状細胞表面に存在するマンノース受容体を介した抗原タンパク質の細胞内送達を検討するため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をマンナン化したサンプルを調製したところ、マンノース受容体を発現する細胞に対し有意な取り込み促進が観察された。同様に、変性状態のタンパク質の Cys 残基に対して SS 結合を介してマンナン化したタンパク質の調製と細胞内導入にも成功した。

以上の結果から、可逆的変性カチオン化法により可溶性・精製された各種のがん抗原タンパク質を材料として、カチオン性基を適宜マンナンに置換することで、原理的にワクチン化が可能ながん抗原タンパク質を示唆された。また、可逆的変性カチオン化 gp100 をモデルとしてヒト培養細胞内に導入を試みたところ、一過的な遺伝子発現法を上回る gp100 を細胞内に送達することが可能であった。

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 4 件)

Midori Futami, Yasuyoshi Watanabe, Takashi Asama, Hitoshi Murata, Hiroko Tada, Megumi Kosaka, Hidenori Yamada, Junichiro Futami. “ Uniformly cationized protein efficiently reaches the cytosol of mammalian cells “ *Bioconjug Chem.* (2012) 23, 2025-2031.
doi: 10.1021/bc300030d.

二見淳一郎, “タンパク質の物性を制御するカチオン化技術と工学的応用” *生化学* 85 巻 (2013) 21-25
www.jbsoc.or.jp/old/event/magazine/pdf/85-01-04.pdf

Endy Widya Putranto, Hitoshi Murata, Ken Ichi Yamamoto, Ken Kataoka, Hidenori Yamada, Junichiro Futami, Masakiyo Sakaguchi, Nam Ho Huh “Inhibition of RAGE signaling through the intracellular delivery of inhibitor peptides by PEI cationization. “ *Int. J. Mol. Medicine* (2013) 32, 938-944.
doi: 10.3892/ijmm.2013.1467.

Masakiyo Sakaguchi, Masami Watanabe, Rie Kinoshita, Haruki Kaku, Hideo Ueki, Junichiro Futami, Hitoshi Murata, Yusuke Inoue, Shun-Ai Li, Peng Huang, Endy Widya Putranto, I. Made, Winarsa Ruma, Yasutomo Nasu, Hiromi Kumon, Nam-ho Huh “Dramatic Increase in Expression of a Transgene by Insertion of Promoters Downstream of the Cargo Gene” *Mol. Biotechnol.* (2014)
DOI 10.1007/s12033-014-9738-0

[学会発表] (計 21 件)

二見淳一郎, 山口慎二, 近藤信次, 山田秀徳 凍結乾燥保存が可能な細胞内導入型転写因子
第 11 回日本蛋白質科学会年会
2011. 6. 8 大阪ホテル阪急エキスポパーク

二見淳一郎, 山口慎二, 近藤信次, 山田秀徳 可逆的変性カチオン化法を用いた変性タンパク質の高度精製と in cell folding
第 63 回日本生物工学会大会
2011. 9. 27 東京農工大

二見淳一郎 (招待) タンパク質カチオン化技術を活用した細胞機能制御
日本高分子学会・バイオ・高分子研究会
2011. 10. 1 岡山市苫田温泉

榎原将紘, 山口慎二, 近藤信次, 山田秀徳, 二見淳一郎 細胞内導入型転写因子と両親媒性ペプチドの併用による機能発現の向上
日本生物工学会西日本支部・日本農芸化学会中四国支部合同講演会
2012. 1. 21 鳥取大

二見淳一郎 (招待) タンパク質カチオン化技術を用いた高純度・可溶性がん抗原タンパク質の調製技術の開発
第 34 回東大病院 22 世紀医療センター：産学連携メディカルフロンティアセミナー
2012. 2. 3 東京大学病院

榎原将紘, 山口慎二, 近藤信次, 山田秀徳, 二見淳一郎 両親媒性ペプチドの併用による可逆的変性カチオン化タンパク質の in cell folding 技術の改善
日本生物工学会西日本支部第 2 回講演会
2012. 7. 7 岡山大

万袋木麻子, 藤原健剛, 木戸桃子, 藤田佳那, 本荘知子, 山田秀徳, 二見淳一郎 TAPS-sulfonate を用いた高純度・水溶性がん抗原タンパク質の調製方法
日本生物工学会西日本支部第 2 回講演会
2012. 7. 7 岡山大

村田等, Endy Widya Putranto, 阪口政清, 二見淳一郎, 許南浩 細胞内導入型 RAGE 阻害ペプチドの開発
日本生物工学会西日本支部第 2 回講演会
2012. 7. 7 岡山大

二見 翠, 渡邊 泰宜, 村田 等, 多田 宏子, 山田 秀徳, 二見 淳一郎 カチオン化アビジンを介したビオチン化タンパク質細胞導入法における導入効率の最適化

第 64 回日本生物工学会大会
2012. 10. 26 神戸

二見淳一郎、藤山晴菜、藤原健剛、山田秀徳
変性状態の細胞内総タンパク質が示す
溶解性に関する研究
第 64 回日本生物工学会大会
2012. 10. 26 神戸

榎原将紘、山口慎二、近藤信次、山田秀徳、
二見淳一郎 転写因子タンパク質の in
cell folding 法による機能発現技術の開
発
第 64 回日本生物工学会大会
2012. 10. 26 神戸

万袋木麻子、藤原健剛、木戸桃子、藤田佳
那、本荘知子、山田秀徳、二見淳一郎 可
逆的変性カチオン化法を活用した高純度・
水溶性がん抗原タンパク質の調製
第 64 回日本生物工学会大会
2012. 10. 26 神戸

Junichiro Futami Protein Cationization
Techniques for Biomedical Engineering,
Young Asian Biochemical Engineers'
Community (YABEC)
2012. 10. 27 徳島大

二見淳一郎 (招待) 用途に応じたタンパ
ク質の効率的生産
中性子利用研究セミナー
2013. 1. 8 茨城県東海村 日本原子力機構

藤田佳那、木戸桃子、本荘知子、万袋木麻
子、二見淳一郎 ヒト全長 CT 抗原の効率
的生産システムの開発
第 13 回 日本蛋白質科学会年会
2013. 6. 13 鳥取

二見淳一郎 タンパク質カチオン化技術に
よる物性制御と工学的応用
第 13 回 日本蛋白質科学会年会
2013. 6. 13 鳥取

二見淳一郎 変性状態のタンパク質の高度
利用と診断薬への応用
化学工学会 第 45 回秋季大会
2013. 9. 16 岡山大学

藤田佳那、木戸桃子、本荘知子、二見淳一
郎 多種類ヒト CT 抗原の効率的な生産系
システムの開発
第 65 回 日本生物工学会大会
2013. 9. 19 広島国際会議場

木戸桃子、藤田佳那、本荘知子、二見淳一

郎 全長・水溶性がん抗原タンパク質を用い
た抗体検査法の開発
第 65 回 日本生物工学会大会
2013. 9. 19 広島国際会議場

二見淳一郎 (招待) 変性状態のタンパク質
の高度利用: 細胞機能制御と診断薬への応
用
INCHEM TOKYO 2013 産学官マッチングフォ
ーラム 2013. 10. 30 東京

二見淳一郎 (招待) 変性状態のタンパク質
の高度利用
第 14 回生命分子ダイナミクスセミナー
2014. 3. 19 東北大学

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗体検出用試薬の製造方法、及びそ
の用途
発明者: 二見淳一郎, 垣見和宏, 前川隆司,
白木正人
権利者: 岡山大学、メディネット
種類: 特許
番号: 特願2012-082735
PCT/JP2013/059692

出願年月日: 2012年03月30日
国内外の別: 国内、海外

[その他]

6. 研究組織
<記入例>

(1) 研究代表者

二見 淳一郎 (FUTAMI JUNICHIRO)
岡山大学・大学院自然科学・准教授
研究者番号: 00420498

(2) 研究分担者

垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 80273358