薬 剤 学, **67** (4), 246–249 (2007)

≪若手研究者紹介≫

蛋白質を有効な医薬品として活用するための基盤技術の確立を目指して

吉 川 友 章 Tomoaki Yoshikawa
(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト

1. は じ め に

本誌編集部よりこのコラムへの執筆依頼を頂いた時には，望外なチャンスを頂いた喜びと同時に，研究者としてほんの一歩を踏み出したばかりの私で構わないのだろうかと感じました．一方で厚かましくも，本コラムにおける執筆は多くの諸先生方や先輩の皆さまに御批判，御叱責を頂戴し，私自身を成長させる絶好の機会ではないかと考え，ここに執筆させて頂いた次第です．どうぞ宜しく御願いします．なお本稿では，筆者が学生時代から現在にわたって手がけてきた研究テーマである「ナノ粒子を活用した抗原送達キャリアーの開発」と「機能性抗体の創製と応用」の二つのトピックを紹介させて頂きたいと思っています．

さて筆者は，修士課程への進学を機に，当時，眞弓忠範先生（神戸学院大学学長，大阪大学名誉教授）が主宰されていた大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野に配属され，中川晋作先生（大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授），堤 康央先生（独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダー），岡田直貴先生（大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野講師）のご指導の下，ファージ表面提示法を活用した機能性抗体創製法の開発や，DDS 戦略を駆使した癌ワクチン療法の開発を進めてきた．特任研究員として二年目を迎えた現在でも，堤 康央先生がプロジェクトリーダーを務めておられる基盤研にて抗体分子を活用した創薬技術の開発を目指して研究を進めているなど，一貫して抗原分子や抗体分子といった蛋白質を医薬品として利用するための基盤技術の開発を進めてきた．そこで以降に，筆者の阪大時代の研究から基盤研での研究までを順を追ってご紹介させて頂き，反省と今後の研究の方向づけを出来ればと願っている．

筆者紹介： 2003 年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了．2006 年同大学博士後期課程修了（薬学博士）．同年 4 月より大阪大学大学院薬学研究科特任研究員を経て 2007 年より(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト 特任研究員．専門：遺伝子や蛋白質を有効な医薬品として活用するための DDS 開発．受賞：2005 年，ファーマバイオフォーラム最優秀発表賞（日本薬学会生物系薬学部）．2006 年，日本薬剤学会第 31 回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award.

2. ナノ粒子を活用した癌免疫療法の開発

博士後期課程 3 年の間，筆者は特にナノテクノロジーを応用した微粒子キャリアーの開発を進め，生体の免疫力を効率よく賦活化するための抗原蛋白質送達キャリアーの創製と癌ワクチン療法への展開を図った．近年，次世代の癌治療法として注目を集めている癌免疫療法は，細胞傷害性 T 細胞（CTL）が腫瘍関連抗原（TAA）を認識して癌細胞を特異的に殺傷する機構を利用した治療法である．この CTL を誘導するには，抗原提示細胞（APC）による抗原提示が必須であり，この点に焦点を絞った様々な癌免疫療法研究が推進されている．しかし，外界から侵入してくる病原体（非自己）と比較すると TAA を発現する癌細胞の免疫原性は非常に微弱であることから，単に TAA 蛋白質を投与するだけでは癌細胞排除に至るような強力な腫瘍免疫（TAA 特異的 CTL 活性）の誘導は見込めない．そこで筆者は，近年進展著しいナノテクノロジーを応用することで，

投与したTAA蛋白質を効率よくAPCに送達・認識させ，かつ強力な腫瘍免疫を惹起できる微粒子状抗原蛋白質送達キャリアーの開発を試みた．

これまでに筆者らは，抗原蛋白質を微粒子キャリアーに結合あるいは内包した形状でAPCに添加すると，APC内への抗原取り込み量が圧倒的に増大することを見出している[1~3]．これらの基礎情報を踏まえて，筆者が抗原送達キャリアーの素材として着目したのが，納豆粘質物の主要成分として単離されたpoly-γ-glutamic acid（γ-PGA）である（図1）．このγ-PGAのγ位カルボキシル基に疎水性アミノ酸（フェニルアラニン）を導入した両親媒化γ-PGAは，蛋白質溶液中に分散させるだけで，疎水性残基の自己集積によって直径250 nm程度の均一な蛋白質内包ナノ粒子（γ-PGA NP）を形成する．このγ-PGA NPは，①活性を失うことなく種々の蛋白質を効率よく内包することができる，②内包蛋白質を長期にわたって放出する，③凍結乾燥によって長期保存が可能である，といった特性を持ち，生理活性蛋白質や抗原蛋白質など蛋白質用DDSキャリアーとして優れた特性を有することを明らかとしている．

このγ-PGA NPを抗原送達キャリアーとして応用する目的で，まず，抗原内包γ-PGA NPのAPCへの取り込みを*in vitro*培養系にて評価した．その結果，エンドサイトーシス経路により効率よく取り込まれることを明らかにした．さらにAPCに取り込まれたγ-PGA NPは，エンドソームから細胞質へと移行して内包抗原を細胞質内に放出すること，さらにその抗原情報（エピトープペプチド）がAPCの細胞膜上に効率よく提示されることを確認した．さらに，γ-PGA NPのワクチンキャリアーとしての有用性を，TAAとしてニワトリ卵白アルブミン（OVA）を用いたマウスモデルで検討した結果，OVA内包γ-PGA NPは，現存する最強のCTL誘導アジュバントとであるフロイント完全アジュバントより強力なCTLを誘導し，さらにそのCTL誘導を反映して顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した．それに加えて，γ-PGA NPを投与した皮下組織の病理組織学的検査においては全く副作用が認められなかった．以上のことから，γ-PGA NPは安全性と有効性の両者を兼ね備えた優れた抗原送達キャリアーであることが示唆された．

このテーマは筆者が博士後期課程に進学して初めて手掛けた研究テーマである．いわゆるナノテクの医療応用という雲をつかむかのごとく壮大なテーマの下で研究を進めたわけであるが，自己組織化ナノ粒子を適用した抗原送達キャリアーの開発を通して，筆者としては自分なりに研究戦略を具体化し，前に進めることが出来たのではないかと振り返っている．筆者は博士課程の3年間は阪大工学部の明石　満教授，赤木隆美研究員と共同でγ-PGA NPを活用したワクチン開発に携わり，さらに大阪大学薬学研究科にて特任研究員として過ごした1年間は同工学部の山本孝夫教授，清野智史講師と共同で磁性ナノ粒子を活用した腫瘍造影剤や遺伝子導入法の開発を進めた．この数年間にわたって工学部の先生方と共に研究する機会が多かったが，筆者にとって異分野の先生方とのディスカッションは得るものが多く，非常に刺激的であった．こういった分野を超えた共同研究においてイノベーションが生まれる瞬間を度々体験し，今ではこの経験が自身にとって大変大きな財産となっている．

3. 高機能化抗体分子の創製

筆者は大阪大学薬学部薬剤学分野にて博士後期課程を卒業した後に，同研究室の特任研究員を経て今年度より，(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト(Laboratory of Pharmaceutical Proteomics: LPP）に勤務しており，堤　康央プロジェクトリーダー，角田慎一主任研究員，鎌田春彦主任

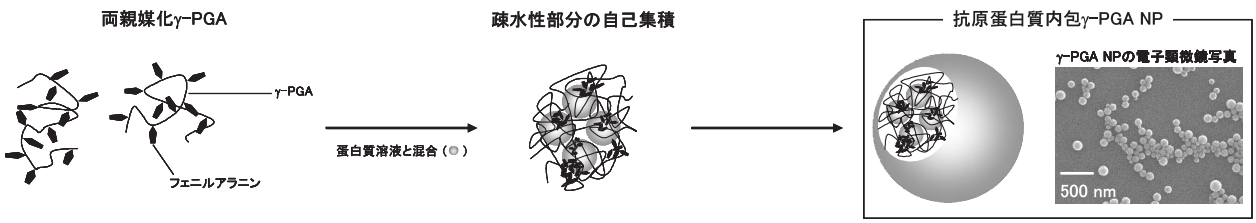

図1　両親媒化γ-PGAを用いた抗原蛋白質内包ナノ粒子の作成方法

研究員のご指導の下，プロテオミクスによる疾患関連蛋白質の同定と，それらの蛋白質を有効な医薬品，あるいは創薬ターゲットとして活用するための基盤技術の開発を進めている．特に筆者は，ファージ表面提示法を武器に一本鎖抗体ライブラリの作製や抗体の高機能化・探索法の開発研究に参画している．

近年の抗体作製技術の発展は目覚しく，基礎科学分野のみならず，診断・治療薬など臨床応用も含めて幅広い分野での応用が期待されている．抗体医薬は癌や自己免疫性疾患といった種々の難治性疾患に対して画期的な治療法をもたらすものと期待され，既に20品目が実用化，150品目以上が臨床試験段階にあるといわれている．したがって，様々な抗原に対する優れた分子認識能を持つ抗体の多様性を“ライブラリ化”する手法は，望みの抗体をハイスループットにスクリーニングする上で必要不可欠な技術といえよう．その点，先述したように筆者らが抗体の作製や改変に活用しているファージ表面提示法は，抗体ライブラリから目的の抗体を迅速かつ網羅的に選択できる優れた手法である．この方法では，ファージ粒子上に提示した抗体分子（主に一本鎖抗体：scFv）とファージ粒子内に含まれる塩基配列情報が一体化されており，結合親和性に基づくスクリーニング（パンニング）を複数回繰り返すことで，目的抗原に対して結合するscFvを迅速に入手できる（図2）．既に上市されているアダリムマブ（抗TNF抗体）をはじめ臨床試験段階にある複数の抗体医薬が本手法により作製されたものであることからも，ライフサイエンス研究における本手法の重要性は今後ますます高まって行くものと考えられる．このような背景の下，筆者らはこのファージ表面提示法を改良して独自に最適化することにより，目的の抗体を効率よく単離できる種々の方法論の開発，ならびにそれらの手法を活用した抗体医薬の開発や機能未知蛋白質の機能解析を試みている．本項では，LPPで進めている研究の内，筆者が携わっている霊長類遺伝子バンクとscFvライブラリを活用した創薬研究について紹介する．

近年のゲノム解析研究の成果として，これまでに種々の動物由来のcDNAライブラリを活用した創薬の推進が期待されている．しかしながら，これらDNA資源のみでは，創薬研究を十分に推進することができていないのが現状である．その理由として第一に，遺伝子の機能を具現するのは蛋白質であり，その発現や機能を解析するためには，蛋白質ご

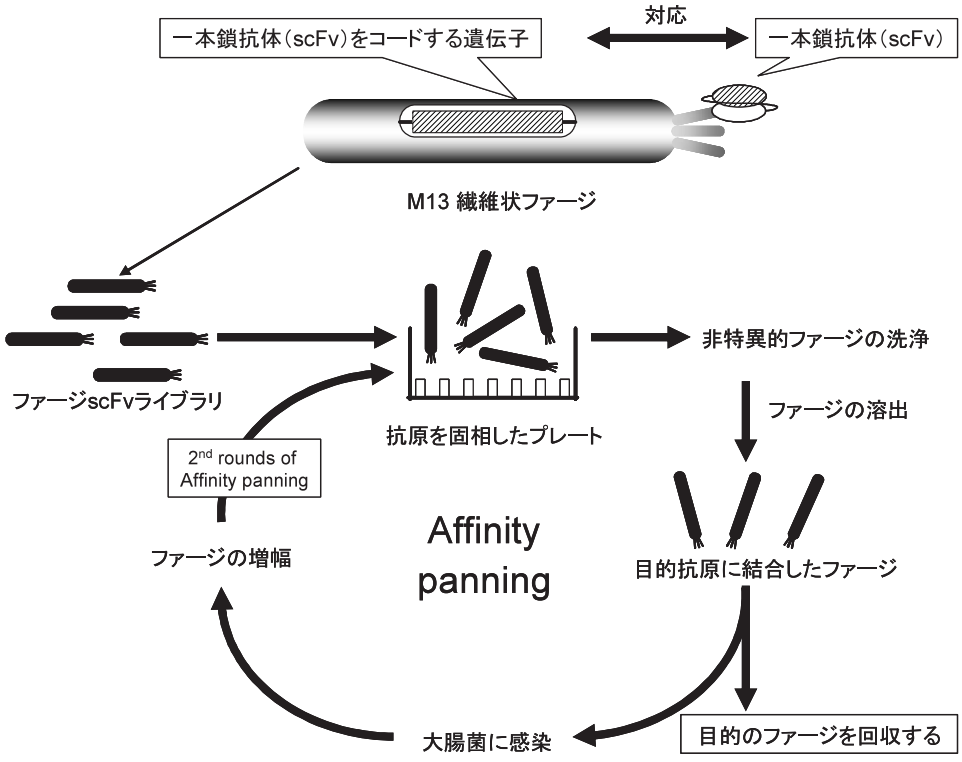

図2　ファージ表面提示法による一本鎖抗体のスクリーニング方法

とに適切な解析ツール（抗体など）を用意する必要があるためである．第二は，創薬研究を行いうる実験モデル動物が制限されていることである．一般に医薬品の探索・評価の過程においては，モデル動物を用いた解析が必要であるが，齧歯類のようにヒトと遺伝的背景が大きく異なるモデル動物を用いた場合，とりわけ脳機能や生殖機能などの高次機能においては，ヒトを含む霊長類と齧歯類とで蛋白質の機能や発現プロファイル，およびそれによる医薬品の効果が大きく異なることが容易に予想される．したがって，医薬品シーズの探索，および有効性・安全性評価を迅速かつ適切に行うためには，ヒトと遺伝子相同性が高く，かつ実験動物として *in vivo* での研究も可能な実験霊長類を用いた解析が重要視されている．本観点から筆者らは，LPP（独自のファージ抗体作製技術），基盤研生物資源研究部（カニクイザル脳および精巣由来 cDNA バンク），基盤研霊長類医科学研究センター（カニクイザル細胞・個体を利用した実験施設）の連携の下，カニクイザル遺伝子産物に対する抗体のバンク化とこれら抗体を用いたカニクイザル蛋白質の機能解明を目指したプロジェクトに着手した．具体的にはまず①ファージ表面提示法などを駆使することで迅速かつ簡便に有用抗体を作製できる基盤技術を確立し，②遺伝子バンクが見出した機能未知の蛋白質（約 300 種類以上）をコードした cDNA を活用し，特に脳あるいは精巣特異的発現を示すカニクイザル機能未知蛋白質に対する抗体セットを取得・バンク化するとともに，得られた抗体を用いて霊長類由来の細胞・組織切片・個体での蛋白質発現プロファイル情報をデータベース化することを目指している．さらに，筆者らのグループでは，この他にも特定のレセプターに結合することによって細胞内浸入活性や細胞透過性を発揮する機能性抗体，細胞内蛋白質に結合する細胞内抗体（イントラボディ）を創出するための新しい方法，わずか数 ng という微量蛋白質に対しても効率よく抗体を単離できる技術など，独自に改良した抗体作製技術の開発[4]を進めている．とりわけ今回紹介した霊長類レベルでの創薬研究は緒についたばかりであるが，将来的に以上の研究を統合して創薬ターゲットの同定や優れた抗体医薬の開発を霊長類レベルで進めることができれば，創薬プロセスの迅速化や画期的医薬品の開発に繋がるものと期待している．

4. お わ り に

記憶を 10 年程さかのぼってみると，筆者は生物機能を応用すること，いわゆるバイオテクノロジーに対して漠然とした興味を持って大学に進学した記憶がある．その後，恩師の先生方のあたたかいご指導を賜り，今振り返ってみると蛋白質を医薬品として利用するための DDS 開発というテーマを通して研究者としての第一歩を踏み出したように思う．現在は，抗体分子の高機能化に加えて未知蛋白質の機能解明という基礎的な研究にも挑戦している．将来的には，生命現象や疾患発症の分子機構の解明から得られた情報を基盤として，蛋白質を医薬品シーズあるいは創薬標的として捉えた新たな治療戦略の確立に繋げていきたいと大きな夢を抱いている．

引 用 文 献

1) T. Yoshikawa, S. Imazu, J.-Q. Gao, K. Hayashi, Y. Tsuda, M. Shimokawa, T. Sugita, T. Niwa, A. Oda, M. Akashi, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, S. Nakagawa, Augmentation of antigen-specific immune responses using DNA-fusogenic liposome vaccine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 500–505 (2004).
2) T. Yoshikawa, N. Okada, M. Tsujino, J.-Q. Gao, A. Hayashi, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, A. Yamamoto, S. Nakagawa, Vaccine efficacy of fusogenic liposomes containing tumor cell-lysate against murine B16BL6 melanoma, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 100–104 (2006).
3) 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作, ウイルス・細胞機能を基盤とした DDS, Bio テクノロジージャパン, **6**, 557–562 (2006).
4) S. Imai, Y. Mukai, K. Nagano, H. Shibata, T. Sugita, Y. Abe, T. Nomura, Y. Tsutsumi, H. Kamada, S. Nakagawa, S. Tsunoda, Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1325–1330 (2006).