

平成23年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 3 2 6 9 2      2. 研究機関名 東京工科大学
3. 研究種目名 基盤研究(C)      4. 研究期間 平成22年度～平成24年度
5. 課題番号 2 2 5 6 0 7 7 6
6. 研究課題名 経口投与可能なタンパク質医薬品の創製
7. 研究代表者

| 研究者番号           | 研究代表者名          | 所属部局名  | 職名 |
|-----------------|-----------------|--------|----|
| 2 0 3 6 7 1 9 7 | サトウ アツシ<br>佐藤 淳 | 応用生物学部 | 教授 |

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

| 研究者番号 | 研究分担者名 | 所属研究機関名・部局名 | 職名 |
|-------|--------|-------------|----|
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |
|       |        |             |    |

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

本研究では、ラクトフェリン(LF)をキャリア分子として使用し、他のタンパク質医薬品(ここではG-CSF)をLFに結合させた融合タンパク質は、LFと同様の腸管吸収動態を示して腸管から吸収されると考えた。ラクトフェリン(LF)全長/G-CSF、G-CSF/LF全長、LF N-lobe/G-CSF、G-CSF/LF N-lobe融合タンパク質の他に、本年度新たに、LFのN末端側アミノ酸配列1-90と251-332(以下N1領域と呼ぶ)とG-CSFとの融合タンパク質を安定発現するdhfr遺伝子欠損CHO細胞株を樹立した。各融合タンパク質は、陽イオン交換担体であるMacroCap SPを用いて精製した。上記融合タンパク質の中で安定的に発現、精製することが可能だったのは、LF全長/G-CSF、LF N-lobe/G-CSF、LF N1/G-CSF、G-CSF/LF N1であった。これら融合タンパク質のG-CSF活性はほぼ保たれていた。次に、ラクトフェリンの腸管からの吸収モデルとして使用されている小腸上皮細胞であるCaco2を用いて、各融合タンパク質の細胞内取り込みを調べた。精製した各融合タンパク質は、そのアミノ基を用いて蛍光試薬であるAlexa Fluor 488で標識した。まず、陽性コントロールであるウシLFと陰性コントロールであるG-CSFを用いて、Caco2細胞への取り込み条件を検討した。1週間培養して分化したと考えられるCaco2に対して、ウシLFは37℃では取り込まれたが、4℃では取り込まれなかった。37℃での取り込みは、ATP阻害剤であるNaN<sub>3</sub>やsucroseで阻害されたことから、特異的なものと考えられる。一方、G-CSFは温度に関係なく取り込まれることはなかった。この確立した条件で、各融合タンパク質のCaco2細胞への取り込みを評価していく予定である。

10. キーワード

- (1) ラクトフェリン      (2) G-CSF      (3) 融合タンパク質      (4)
- (5)      (6)      (7)      (8)

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。  
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。  
 (理由) 融合タンパク質を調製することができ、その G-CSF 活性はほぼ保たれていた。また、ラクトフェリンの腸管からの吸収モデルとして使用されている小腸上皮細胞である Caco2 への細胞内取り込みの条件を確立することができた。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

作製した融合タンパク質の Caco2 への細胞内取り込みを調べていく。この系で細胞内取り込みが確認できた融合タンパク質を大量調製して、動物実験で実際に腸管から吸収されるか調べる予定。

13. 研究発表（平成 23 年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

【雑誌論文】 計 (0) 件      うち査読付論文 計 (0) 件

|                           |       |   |       |         |
|---------------------------|-------|---|-------|---------|
| 著者名                       | 論文標題  |   |       |         |
|                           |       |   |       |         |
| 雑誌名                       | 査読の有無 | 巻 | 発行年   | 最初と最後の頁 |
|                           | □     | □ | □ □ □ | □ □ □   |
| 掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) |       |   |       |         |
|                           |       |   |       |         |

|                           |       |   |       |         |
|---------------------------|-------|---|-------|---------|
| 著者名                       | 論文標題  |   |       |         |
|                           |       |   |       |         |
| 雑誌名                       | 査読の有無 | 巻 | 発行年   | 最初と最後の頁 |
|                           | □     | □ | □ □ □ | □ □ □   |
| 掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) |       |   |       |         |
|                           |       |   |       |         |

|                           |       |   |       |         |
|---------------------------|-------|---|-------|---------|
| 著者名                       | 論文標題  |   |       |         |
|                           |       |   |       |         |
| 雑誌名                       | 査読の有無 | 巻 | 発行年   | 最初と最後の頁 |
|                           | □     | □ | □ □ □ | □ □ □   |
| 掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子) |       |   |       |         |
|                           |       |   |       |         |

【学会発表】計(2)件 うち招待講演 計(0)件

| 発表者名                                      | 発表標題                                    |                     |
|---|---|---------------------|
| 矢野和義、柳田奈那美、佐々木典子、坂口菜央、平塚淳典、佐藤 淳、横山憲二、軽部征夫 | 全自動二次元電気泳動装置を用いたタンパク質の分離とリン酸化タンパク質の免疫検出 |                     |
| 学会等名                                      | 発表年月日                                   | 発表場所                |
| 日本化学会 第5回関東支部大会                           | 2011年8月30日                              | 東京農工大学・工学部<br>(東京都) |

| 発表者名                    | 発表標題                   |                     |
|-------------------------|------------------------|---------------------|
| 野木大樹、立岡孔明、西田龍虎、石原克彦、佐藤淳 | 固相化細胞を用いたフェージELISA法の構築 |                     |
| 学会等名                    | 発表年月日                  | 発表場所                |
| 第63回 日本生物工学会大会          | 2011年9月27日             | 東京農工大学・農学部<br>(東京都) |

【図書】計(0)件

| 著者名 | 出版社 |       |       |
|-----|-----|-------|-------|
|     |     |       |       |
| 書名  |     | 発行年   | 総ページ数 |
|     |     | ■ ■ ■ |       |

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出願】計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 出願年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             |       |         |

【取得】計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 取得年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
|          |     |     |             | 出願年月日 |         |
|          |     |     |             |       |         |

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

|  |
|--|
|  |
|--|