

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名 : (日本語) TGF- β シグナル伝達阻害機構を応用した腫瘍免疫活性化法の開発
(英語) Activation of tumor immunity through the inhibition of TGF- β signaling
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 特任准教授 江幡 正悟
(英語) Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo. Project Associate Professor. Shogo Ehata
- 実施期間 : 平成 28 年 9 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名 : (日本語) 潜在型 TGF- β の生成機構と腫瘍免疫における役割の研究
(英語) The mechanism for the activation of latent TGF- β and its role in tumor immunity
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 特任准教授 江幡 正悟
(英語) Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo. Project Associate Professor. Shogo Ehata
- 分担研究 開発課題名 : (日本語) Treg 特異的活性型 TGF- β 産生経路の遮断法開発
(英語) Inhibition of TGF- β signaling in regulatory T cells
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 准教授 鯉沼 代造
(英語) Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo. Associate Professor. Daizo Koinuma

II. 成果の概要（総括研究報告）

Treg 特異的活性型 TGF- β 産生経路の遮断法開発では、コンストラクトの最適化などを通じて、組換え型 Glycoprotein A repetitions predominant (GARP、別名 Leucine rich repeat containing 32 (LRRC32)) 大量調製のシステム構築を樹立した。潜在型 TGF- β の生成機構と腫瘍免疫における役割の研究では、各細胞における GARP の発現解析、機能解析を行った。

Treg 特異的活性型 TGF- β 産生経路の遮断法開発：ヒト由来の組換え型 GARP 細胞外ドメインを組換えタンパクとして Sf21 細胞 に大量発現させる系を構築した。当初使用していた Expi293F システムでは充分量のタンパク質を確保できないため、Baculovirus system に変更した。こちらでは発現タンパク質量を十分に確保できたが、His 精製の際にタンパク質が凝集することが判明し、細胞外ドメインのみのコンストラクトに変更した。最終的に培養上清から充分量の組換えタンパク質を調製することができたため、これを年度明け早々に技術支援班に送付し、Random non-standard peptide integrated discovery (RaPID) システムを応用して、結合する特殊環状ペプチドの作成を依頼する。

潜在型 TGF- β の生成機構と腫瘍免疫における役割の研究：293T 細胞、Hs578T 細胞での GARP 過剰発現系もしくは GARP ノックダウン系を樹立した。また ELISA や、PAI-1 luc などの TGF- β 応答性レポーターを用いた実験を行い、GARP の機能解析を行った。また、癌細胞における GARP 発現の意義を調べた。本年度は GARP 高発現と予後不良の相関が明らかであった胃癌細胞に焦点をあて、Intestinal-type のヒト胃癌細胞 MKN28、および diffuse-type のヒト胃癌細胞 OCUM2-MLN をもちいて、それぞれの GARP 過剰発現株を樹立した。

In “The mechanism for the activation of latent TGF- β and its role in tumor immunity”, large scale preparation of recombinant Glycoprotein A repetitions predominant (GARP, also known as Leucine rich repeat containing 32 (LRRC32)) was established through the optimization of a construct.

Inhibition of TGF- β signaling in regulatory T cells : Preparation of recombinant GARP was attempted to build in Sf21 cells. Although Expi293F system was not useful due to low yield of proteins, large scale preparation was achieved using Baculovirus system. Constructs which only expressed extracellular domain of GARP was also utilized in order to avoid the coagulation of recombinant proteins. Nonstandard peptides will be determined by Random non-standard peptide integrated discovery (RaPID) screening system in collaboration with P-DIRECT technical support in a subsequent year.

The mechanism for the activation of latent TGF- β and its role in tumor immunity: Overexpression or knock down of GARP were performed in HEK293T cells and Hs578T cells. Then, the role of GARP expression for TGF- β , was tried to examine using EKISA and TGF- β reporter assay. The effect of GARP on gastric cancer cells was also assessed. Intestinal-type or diffuse-type gastric cancer cells in which GARP was overexpressed were established.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
該当なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし。

(4) 特許出願
該当なし。