

令和3年3月31日

## 令和2年度研究実績報告書

一般財団法人日本産業科学研究所

宮地 尚 理事長殿

### 申請者

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻

真壁 幸樹

### 研究課題

蛋白質連結反応による多様な CAR-T の作製

### 研究内容

キメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) によるがん治療はがん組織特異的な免疫反応を誘導し、高い治療効果を持つと期待されている。本研究では、連結酵素を用いた蛋白質工学技術によって、標的に対する多様な CAR-T 細胞を 1 種類の遺伝子導入 T 細胞から作り出す基盤技術の実現を目指す。汎用的な CAR-T 細胞の作製方法は効果の高い CAR-T の選択など幅広い応用が可能となる。

### 研究結果

本研究で用いる、scFv と細胞上に発現させる CD3 をそれぞれ作り出した。

抗 HER2 抗体 4D5 の抗原結合領域である Fv を一本鎖化した一本鎖 Fv (scFv) と連結要素蛋白質を融合させたプラスミドベクターを構築した。また、CD3 細胞内領域、膜貫通領域、蛍光蛋白質をタンデムに連結させたプラスミドベクターを構築した。これらの遺伝子はすべて人工遺伝子として作製し動物細胞発現ベクターに組み込んだ。

精製のためのポリヒスチジンタグが融合している scFv 発現ベクターを動物細胞に遺伝子導入し、培養後の培地上清を Ni-NTA カラムを用いて精製を行った。動物細胞として HEK 系細胞を数日間浮遊培養し、組換え体蛋白質を発現させた。SDSPAGE による蛋白質精製の確認から目的の組換え蛋白質が 1 ステップで精製されていることを確認した。

CD3 の細胞上での発現は融合させた蛍光蛋白質を用いて確認をすることができる。発現ベクターを動物細胞に導入し、培養後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。数日間培養した遺伝子導入動物細胞を用いて、観察した結果、細胞膜上で蛍光が観察され、目的の CD3 が細胞膜上に発現していることを確認した。

これまでの結果を踏まえて、培養条件などの検討を更に進め、より効率の高い発現条件を検討していく。これまでの研究によって 2 種類の蛋白質が正しく作り出せることがわかったので、今後、両者を酵素的に連結させる反応を進めていく予定である。