

平成22年 6月14日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890300  
 研究課題名（和文） 自己免疫疾患治療を目指した新規蛋白性アンタゴニストの創製  
 研究課題名（英文） Development of functional mutant protein with antagonistic activity as an anti-inflammatory drug  
 研究代表者  
 阿部 康弘（ABE YASUHIRO）  
 独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部バイオ創薬プロジェクト・研究員  
 研究者番号：20509898

研究成果の概要（和文）：本研究は、リウマチや多発性硬化症などの自己免疫疾患の克服を目指し、腫瘍壊死因子（TNF）の2種類の異なるレセプター（TNFR1 および TNFR2）のうち、特に炎症反応の惹起に深く関わる TNFR1 に選択的結合能を有した構造変異 TNF アンタゴニスト（TNFR1 指向性アンタゴニスト）の改良と治療効果の検討を通じて、画期的自己免疫疾患治療薬の開発に有用な知見を集積した。

研究成果の概要（英文）：Blocking the binding of TNF to TNF receptor subtype 1 (TNFR1) is believed to be a promising strategy for the treatment of autoimmune disease. Recently, we generated the TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity (RlantTNF) using phage display technique. In this study, the anti-inflammatory effects of RlantTNF have been investigated. First, to improve the *in vivo* stability, polyethylene glycol-modified RlantTNF (PEG-RlantTNF) was prepared. In the autoimmune disease model, the clinical score of the mice given PEG-RlantTNF was improved. These results suggest that selective blocking of TNFR1 by PEG-RlantTNF could be an effective therapeutic strategy against autoimmune disease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：蛋白質、自己免疫疾患、アンタゴニスト

## 1. 研究開始当初の背景

現在、関節リウマチ・多発性硬化症といった難治性の自己免疫疾患に対する画期的な

治療法の開発に向けて、疾患の発症や悪化のメカニズム解明、さらにそのメカニズムに応じた治療薬・治療方法の早期開発が待望され

ている。以上の背景のもと、昨今の国内外の研究から、自己免疫疾患などの広範な炎症の惹起・悪化における疾患関連蛋白質として、TNF が Key molecule として認識されつつあり、TNF を創薬ターゲットとした医薬品開発が進められている。既に本邦において、慢性関節リウマチに対する特効薬として、TNF 中和抗体や可溶性 TNF レセプターといった「TNF 阻害剤」を用いた、抗 TNF 療法が臨床に供され、リウマチ患者の QOL を格段に向上させるなど、切れ味鋭い治療成績を發揮している。しかし、これら「TNF 阻害剤」は生体防御機構に重要な TNF の TNFR1 および TNFR2 を介した機能を全て阻害してしまうため、免疫力の低下から感染症の発症率や発癌率の上昇といった副作用を招いてしまうことが問題となっている。一方で、動物モデルを使った検討から、炎症反応の惹起には TNFR1 を介した作用が重要であること、多発性硬化症など一部の疾患においては TNFR2 を介した機能が炎症反応の終結、即ち病態の寛解に関与していることが示唆されている。つまり、TNFR1 にのみ選択的に結合し、かつアンタゴニスト活性を有する TNF 変異体 (TNFR1 指向性アンタゴニスト) は、炎症性疾患に対して副作用の少ない新たな治療戦略を提示できるものと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、リウマチや多発性硬化症といった自己免疫疾患の発症や悪化に関わると考えられている TNF に着目し、2 種類の異なる TNF レセプター (TNFR1、TNFR2) のうち、特に炎症反応の惹起に深く関わる TNFR1 に選択的結合能を有した構造変異 TNF アンタゴニスト (R1antTNF) の創製を通じて、種々自己免疫疾患に対する画期的治療薬の開発研究を 2 年間で行うものである。

また、慢性炎症性疾患を対象とした検討においては、往々にして、血中濃度の維持を目的とした、薬物の長期的な投与が必要であるが、R1antTNF も例外でない。抗体などの蛋白質を除き、蛋白性薬物の最大の問題点は、その生体内安定性の低さであると考えられる。そのため、慢性の疾患に対し R1antTNF を用いる場合、この問題を克服し、長期投与にも耐えうる戦略が必要となる。

以上の観点から、我々が独自に創出したリジン欠損 TNFR1 指向性アンタゴニストである R1antTNF の体内安定性を高める目的で、N 末端への部位特異的高分子 (Polyethylene glycol; PEG) 修飾を試みるとともに、PEG 化 R1antTNF (PEG-R1antTNF) の自己免疫疾患に対する有用性について、慢性関節リウマチのモデルであるコラーゲン関節炎 (CIA) モデルと多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおける R1antTNF の治療効果を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) PEG-R1antTNF (PEG 化 R1antTNF) の作製  
R1antTNF の PEG 化には mPEG-SPA, MW 5,000 (the succinimidyl ester of methoxy poly (ethylene glycol) propionic acid, molecular weight 5,000, shearwater corporation) を用いた。mPEG-SPA, MW5,000 は R1antTNF に対して、10 倍モル量の PEG を添加し、37°C、15 分間反応させた。ε-アミノカプロン酸 (Sigma-Aldrich, Inc) を PEG の 10 倍量添加することにより、反応を競合停止させた。得られた PEG-R1antTNF は PBS で平衡化した Superose 12 カラムを用い、PEG 鎖が一分子結合したフラクションをモノ PEG 化体として分取精製し、以降の実験に供した。

(2) TNFR1 を介した生物活性の評価 (L-M 細胞に対する細胞傷害性試験)  
あらかじめ、96 well plate にて 1% FCS 含有 MEM にて recombinant mouse TNF 存在下 (5 ng/mL) で R1antTNF を段階希釈して加えたサンプル 100 μL に、1% FCS-MEM で  $1 \times 10^4$  cells/100 μL/well に希釈した L-M 細胞を添加した。細胞播種後、48 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドで生細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、plate を洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、比活性を評価した。

## (3) DBA/1J マウス II 型コラーゲン関節炎 (CIA) 感作

DBA/1J マウス (オス、6~7 週齢、日本 SLC) を用いた。ウシ由来 II 型コラーゲン (Chondrex) を等量の CFA (Chondrex) と氷冷下で高速ホモジナイザー (IKA) を用いて混合し、エマルジョンとした。これをコラーゲン量として 100 μg/mouse となるように、マウス尾根部皮内に数か所に分けて投与した (1 次免疫)。3 週間後 (day 21) にフロイント不完全アジュバント (IFA; Chondrex) とウシ由来 II 型コラーゲンを用いて、同様の方法で、エマルジョンを作製し、100 μg/mouse となるようにマウス尾皮下に追加免疫を行った (2 次免疫)。2 次免疫の次の日 (day 22) に眼底採血を行い、血清中のコラーゲン抗体価を測定し、IgG1 が 250 μg/mL、IgG2a 50 μg/mL、IgG2b 15 μg/mL 以上のマウスを実験に用いた。

## (4) 関節炎発症の評価

クリニカルスコアは 2 次免疫 2 日後の day 23 より毎日観察し、以下のようにスコア化した。  
0: 変化なし

- 1: 指の関節が 1, 2 本腫脹発赤
  - 2: 指の関節が 3 本以上、または手首や足首などの大きな関節の腫脹発赤
  - 3: 一本の手や足全体の腫脹発赤
  - 4: 一本の手や足全体の腫脹が最大限に達しているときと認められた時
- これらの評価を四肢に対して毎日行い、そのスコアの合計をクリニカルスコアとして記録した。なお、統計学的なサンプル間の比較は、Mann-Whitney  $U$  test あるいは  $\chi^2$ -test により解析した。

#### (5) CIA モデルにおける PEG-R1antTNF 及び Etanercept の投与

PEG-R1antTNF の投与量については 3  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  とし、投与方法は R1antTNF の血中動態を参考に腹腔内投与で 1 日 2 回行った。投与期間は 3 週間とした。2 次免疫後クリニカルスコアが 1.5 以上に達した後に投与を開始する治療的プロトコルにおいて、既に承認されている代表的な抗 TNF 阻害薬 Etanercept を 25  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  で 1 週間に 2 回投与することで、PEG-R1antTNF と関節炎抑制効果を比較した。

(6) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 感作 C57BL/6 (雄性、6~8 週齢) マウスに対してミエリン構成蛋白質由来ペプチド Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG ペプチド) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, 株式会社バイオロジカ) を PBS に溶解後、5 mg/mL となるように結核菌の死菌 (Difco Lab.) を加えた Incomplete Freund Adjuvant (IFA; Difco Lab.) と等量を混合し、エマルジョンとした。これを MOG ペプチド量として 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  となるようにマウス両脚のそ頸部および背部の 3 箇所皮下投与した。さらに、免疫直後および 48 時間後に 400 ng/mouse となるように百日咳毒素 (和光純薬株式会社) を腹腔内投与した。なおクリニカルスコアは免疫後 1 日目より毎日観察し、以下のようにスコア化した。

- 0.0 ; 変化なし
- 0.5 ; 尾の反射が低下
- 1.0 ; 尾の麻痺
- 1.5 ; 歩行異常
- 2.0 ; 1 本の後肢の不全麻痺
- 2.5 ; 後肢の不全麻痺
- 3.0 ; 1 本の後肢の完全麻痺
- 3.5 ; 後肢の完全麻痺

EAE の発症率評価に関しては、各群それぞれ全 10 例の内、クリニカルスコア  $\geq 0.5$  のマウスを EAE 発症マウスとして評価した。経日的に評価した結果をもとに、各群の発症率を算出してプロットした。なお発症率は、以下

に示す式にて算出した。  
 発症率 (%) = (スコア  $\geq 0.5$  のマウスの例数) / (各群の全例数 10)  $\times$  100

#### (7) EAE モデルに対する PEG-R1antTNF 及び Etanercept の投与

PEG-R1antTNF は、マウス全体のクリニカルスコアの平均が 1 以上に達した日より、1 あるいは 10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  で 1 日 2 回、Etanercept の投与量は 25  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  で 1 週間に 2 回腹腔内投与した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PEG-R1antTNF の作製

体内安定性の向上を目的に R1antTNF の部位特異的バイオコンジュゲーションを行うため、一般に広く用いられている直鎖型で分子量 5,000 の PEG を用いた。TNF は三量体形成しており、一分子中 3 個存在している N 末端アミノ基のうち、1 個の N 末端アミノ基に対し、PEG を一分子導入したモノ PEG 化 R1antTNF (PEG-R1antTNF) を作製した。この PEG-R1antTNF の TNFR1 に対する結合力を BIAcore を用いて評価した結果、結合力の指標である KD が PEG 化していない R1antTNF とほぼ同等であり、そのセンサーグラムからも同等の結合力を有していることが確認された。次に、アンタゴニスト活性について、L-M 細胞を用いて検討した結果、PEG 化していない R1antTNF のグラフと PEG-R1antTNF が、ほぼ同等のアンタゴニスト活性を有していた。即ち、R1antTNF に対して N 末端部位特異的に PEG を導入することで、アンタゴニスト活性の低下を伴うことなく、その血中滞留性を向上させ得ることが判明した。

##### (2) CIA モデルにおける PEG-R1antTNF の関節炎抑制効果

CIA モデルに対する PEG-R1antTNF の関節炎抑制効果を検討するため、クリニカルスコアが 1-1.5 に達した後に投与する治療的プロトコルにて評価した。PBS 投与群は、1 次免疫後、day 26 程度からクリニカルスコアの上昇が認められ、その後 day 30 前後からマウス四肢関節の著しい腫脹が観察され、急激なスコアの上昇が確認された。一方で、PEG-R1antTNF 投与群は Etanercept 投与群とほぼ同程度の関節炎抑制効果を発揮することが判明した。また PEG-R1antTNF 投与群の病理切片を作製し、HE 染色を行った。その結果、PBS 投与群においては関節滑膜への炎症性細胞の顕著な浸潤が確認されたのに対し、PEG-R1antTNF 投与群においては顕著に炎症性細胞の浸潤が抑制されていることを確認した。以上の結果から、PEG-R1antTNF は、既存の抗 TNF 阻害薬 Etanercept と同程度の関節炎抑制効果を発揮し、有効な関節リ

ウマチ治療薬となり得る可能性が示唆された。さらに R1antTNF は炎症の悪化に関与する TNFR1 の作用を選択的に阻害し、ウイルス感染防御に重要と考えられている TNFR2 の作用は阻害しないために、既存の抗 TNF 療法で致命的問題点であった副作用を低減できるものと期待される。

### (3) EAE モデルにおける PEG-R1antTNF の関節炎抑制効果

EAE の病態形成後 (day 13) から PEG-R1antTNF の投与を開始し、PEG-R1antTNF の治療効果について検討した。1, 10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  で投与した PEG-R1antTNF 群は、PBS 投与群と比較して優位な差は認められなかったが、クリニカルスコアが低くなる傾向が認められた。一方で、Etanercept 投与群においては、3, 4 回目に投与した翌日に突然死が認められ、全例が死亡した。この原因として、Etanercept 投与により EAE の寛解作用に関与する TNFR2 の作用を遮断したことによる急激な病態の悪化、ヒト由来蛋白質投与によるアナフィラキシーショックの誘導などが予想される。これらの仮説を実証すべく、EAE 病変部位である脊髄における脱髄の有無、血中サイトカインや IgE、ヒスタミンなどの血中ケミカルメディエーターの測定をお来ぬ予定である。今後より詳細な検討が必要ではあるが、PEG-R1antTNF は、EAE の病態を悪化させることなく、症状を緩和できる可能性が示された。即ち、TNFR1 への作用選択性を付与したアンタゴニストは、安全性の観点から有望であり、TNF 阻害薬の適用範囲拡大に繋がるものと期待される。

## 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 11 件)

- ① Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology., *Pharmazie.*, 65(2):93-96, 2010. 査読有.
- ② Nomura T., Abe Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : *Yakugaku Zasshi.*, 130(1):63-8, 2010. 査読無.
- ③ Abe Y. : Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity., *Yakugaku Zasshi*, 129(8):933-939, 2009. 査読無.
- ④ Shibata H., Yoshioka Y., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Taniyai M., Ohta T., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., *Biomaterials.*, 30(34):6638-6647, 2009. 査読有.
- ⑤ Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniyai M., Ohta T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388(4):667-71, 2009. 査読有.
- ⑥ Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Abe Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials*, 30(19):3318-23, 2009. 査読有.
- ⑦ Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniyai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.*, 385:1221-1229, 2009. 査読有.
- ⑧ Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells., *Pharmazie.*, 64(3):214-6, 2009. 査読有.
- ⑨ Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniyai M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsutsumi Y. : The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF- $\alpha$  in murine hepatitis models., *Cytokine*, 44(2):229-233, 2008. 査読有.
- ⑩ Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380(5):777-782, 2008. 査読有.
- ⑪ Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H.,

Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity., J. Immunol. Methods., 335(1-2):71-8, 2008. 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: アンタゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価., 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009 年 10 月
- ② Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity., HUP0 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Tronto (Canada), 26-30 September, 2009.
- ③ Tsunoda S., Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Shibata H., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis with a novel TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
- ④ 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央: 創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬., CphI Japan 2009, 東京, 2009 年 4 月 21 日.
- ⑤ Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of safety and efficacy of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF as a novel anti-inflammatory drug., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U.S.A.), 15-19 March, 2009.
- ⑥ 阿部康弘, 野村鉄也, 柴田寛子, 吉岡靖雄, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: アンタゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価., 第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 神戸, 2008 年 10 月 25 日.
- ⑦ Abe Y., Shibata H., Nomura T., Kayamuro H., Mukai Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tani ai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- $\alpha$  using a phage display system with one-step competitive-subtractive panning., 7th Joint Conference of the

International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Montréal/Québec (CANADA), 12-16 October, 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 康弘 (ABE YASUHIRO)  
医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員  
研究者番号: 20509898

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し

尚、本研究の研究協力者を下記に列挙する  
角田慎一、鎌田春彦、井上雅己、山根美紀、  
長野一也、野村鉄也、萱室裕之、河原倫之、  
有田修平、古屋剛