

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成23年度～平成23年度

課題番号：23659061

研究課題名（和文） 活性増強・副作用軽減を目指した機能性インターフェロン $\alpha$ 構造変異体の創製

研究課題名（英文） Creation of functional mutant interferon-alpha for increase of bioactivity and decrease of side-effects

研究代表者

鎌田 春彦（KAMADA HARUHIKO）

独立行政法人 医薬基盤研究所・サブプロジェクトリーダー

研究者番号：00324509

研究成果の概要（和文）：本研究では、活性に優れ副作用が軽減した新規インターフェロン（IFN）製剤の開発に向け医薬品シーズ候補分子を創製した。作製した IFN $\alpha$ 8 構造変異体ライブラリから IFN 受容体への結合活性を有するクローンをスクリーニングした結果、結合親和性が異なる 38 クローンを回収し、そのうちの 4 つのクローンが野生型よりも優れた活性を持っていた。今後、これらのクローンを用いて、活性増強メカニズムの解析を行うとともに、新規バイオ医薬品としての応用に関する研究を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on lead discovery for new interferon (IFN) therapy using structural mutant, which increase the activity and decrease the side-effects *in vivo*. We obtained 38 IFN $\alpha$ 8 mutants, which have different binding activities for IFN receptor to perform the screening from IFN mutant library. Among these mutants, we found 4 mutant IFNs have superior activities than wild-type IFN $\alpha$ 8. In future, we will utilize these mutant IFNs to create a new biopharmaceuticals by analyzing the mechanisms of increasing activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計, バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

抗 C 型肝炎ウイルス（HCV）薬として高い実績を持つ I 型 IFN は、幾つかのサブタイプに分かれており、中でも IFN $\alpha$  は上記 C 型肝炎以外でも、その抗腫瘍活性を利用して腎臓がん、多発性骨髄腫、ヘアリー細胞白血病、皮膚悪性黒色腫、さらに免疫難病の一つである多発性硬化症にも臨床応用されている。現在本邦で認可されている遺伝子組換え型製剤である IFN $\alpha$ 2 を筆頭に、I 型 IFN はバイオ医薬品の代表として臨床応用されている。IFN 製剤は C 型肝炎で高い治療効果を示すとはいえ、約半数の患者では治療効果を示さず、HCV の排除が認められない患者においては、根本治療の断念を余儀なくされて

いる。従って、IFN 治療の無効例患者に対しても優れた治療効果を示す IFN 製剤の開発が待ち望まれている。さらに、IFN 製剤の投与時にはいくつかの副作用を示すことが知られており、発熱・全身倦怠感・頭痛・悪寒・めまい・関節痛・筋肉痛といったインフルエンザ様症状などがほぼすべての IFN 治療時に観察される上、消化管障害、血球減少、脱毛などが高頻度で起こる。さらに抑うつ、間質性肺炎といった重篤な副作用も報告されており、これらの副作用は患者の QOL を低下させるばかりか、場合によっては IFN 療法の中止を余儀なくされる主な要因となっている。従って、上記の副作用を軽減し、さらに高活性な次世代型 IFN 製剤の開発が喫

緊の課題といえる。

これまで申請者らは、抗がんサイトカインの一種である腫瘍壊死因子 TNF に着目し、その受容体結合特性を変化させることで、野生型 TNF よりも優れた抗腫瘍活性を持ち、それに加えて副作用の軽減した TNF 構造変異体の開発に成功してきた (Shibata H. et al., JBC, 2008)。すなわち活性の増強と副作用の軽減を同時に達成することが可能な TNF 変異体の開発に世界に先駆けて達成してきた。これは、TNF 分子中に存在する受容体結合ドメイン中のアミノ酸を網羅的に置換した TNF 構造変異体ライブラリの中から、目的の活性を持つ TNF 構造変異体を見出す技術を確立した成果である。そこで本研究では、本技術を IFN 製剤の開発に応用し、高い抗ウイルス効果と副作用の軽減を同時に達成した IFN 製剤の候補となる医薬品シーズの開発を行った。本研究では IFN 受容体と IFN との結合が見られる分子間のインターフェイスに着目し、受容体への結合特性が変化した IFN $\alpha$  構造変異体の中から、活性に優れた次世代型 IFN 製剤候補分子の創製を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では IFN $\alpha$  が結合しうる 2 種類の受容体 (IFNAR1、IFNAR2) への結合性を変化させた構造変異 IFN $\alpha$  を作製し、その結合特性の変化を検討するとともに、既存の IFN 製剤で利用されている野生型 IFN よりも優れた活性を持つ新規 IFN $\alpha$  変異体の作製を行った。本検討に用いる構造変異体の作製には、我々独自に開発したファージ表面提示法を利用し、極めて独自性が高いと言える。さらに、IFN $\alpha$  の活性の向上を受容体との結合性の変化に基づいて行う研究は世界でも例がなく、非常に斬新かつ新規性が高いアプローチである。

## 3. 研究の方法

### 1. IFNAR1 および IFNAR2 結合部位改変ファージライブラリ遺伝子の構築

IFN $\alpha$ のうち現在臨床応用されている IFN $\alpha$ 2 よりも活性に優れたサブタイプとして IFN $\alpha$ 8 が知られている。そこで、IFNAR1、IFNAR2 に対する結合力を様々に変化させた構造変異体を作製することを目的に、ファージ表面提示法を用いて IFN $\alpha$ 8 のレセプターとの結合に関与しているアミノ酸残基を網羅的に他のアミノ酸に置換した構造変異 IFN $\alpha$ 8 をコードする遺伝子ライブラリを作製した。これまでの報告から、IFN $\alpha$ 2 中の IFNAR1 の結合に重要であるアミノ酸 5 つと、同じく IFN $\alpha$ 2 中の IFNAR2 の結合に重要なアミノ酸 5 つをランダムなアミノ酸をコードする遺伝子に改変した遺伝子ライブ

ラリ、ライブラリとライブラリ 2 をそれぞれ構築した。

### 2. 機能改変型 IFN $\alpha$ 8 構造変異体提示ファージの探索

作製したライブラリ遺伝子を用い、ファージ外殻タンパク質 g3p との融合タンパク質として発現しうるファージミドベクターに組み込み、構造変異体発現ライブラリを作製した。IFN $\alpha$ 8 の受容体である IFNAR1 および IFNAR2 を固相化した BIAcore チップに対してパンニングを実施した。パンニング後に回収されたファージを大腸菌 TG1 に再度感染させ、コロニーを 96 穴プレートにピックアップすることでモノクローン化した。回収された IFN $\alpha$ 8 構造変異体の結合特性を解析するために、以下の手法により評価した。

### 3. 機能改変型 IFN $\alpha$ 8 構造変異体の結合力評価

上記の検討で見いだしたクローンの精製リコンビナントタンパク質を作製し、その詳細な結合特性を解析した。具体的には、機能改変型 IFN $\alpha$ 8 構造変異体の遺伝子を、T7 プロモーター下に発現するベクターに組み込み、大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL に導入し、これらのタンパク質を inclusion body として大腸菌内に発現させた。回収した inclusion body を可溶性し refolding 操作をイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによる各変異体を精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーにより回収した溶出ピークを SDS-PAGE 解析した。この精製 IFN $\alpha$  を用いて、表面プラスモン共鳴法を利用した解析 (BIAcore) にて、リガンドとして IFNAR1 あるいは IFNAR2 をセンサーチップ表面上に固定化し、構造変異 IFN $\alpha$ 8 を含む試料をマイクロ流路系を介して添加し、構造変異体とターゲット間の結合強度や結合特性をモニタリングした。

## 4. 研究成果

上述したアミノ酸をそれぞれ変化させた二種類の IFN 構造変異体ライブラリを作製した。作製したライブラリのサイズを評価したところ、ライブラリ 1 は  $8.0 \times 10^5$  CFU、ライブラリ 2 が  $2.1 \times 10^8$  CFU であった。

本研究において使用しているファージミドベクターは、ファージ外殻蛋白質 g3p との融合蛋白質としてターゲット分子と相互作用可能かつ生物活性を保持した状態で提示できるという利点を有している。この構造変異体発現ライブラリを用い、IFNAR1 および IFNAR2 に対してパンニングし、回収されたファージ集団を大腸菌 TG1 に再度感染させた後、コロニーを 96 穴プレートにピック

アップした。この操作を行うことで IFNAR1 および IFNAR2 に親和性を持つ数多くのファージクローンを一挙に単クローン化した。さらにこれらの特性を 96 穴プレート単位で評価し、効率的かつハイスループットに機能性 IFN 構造変異体をスクリーニングした。

ELISA によるレセプター親和性を評価した結果、パンニング後に回収したファージをそれぞれ 180 クローンずつ単クローン化し、IFNAR2 に対する結合能力評価を行った。

野生型 IFN $\alpha$ 8 と比較して ELISA により IFNAR2 親和性が失われていると考えられるクローンを除き、抗ウイルス活性評価により野生型 IFN $\alpha$ 8 と同等以上の活性を持つと考えられるクローン、あるいは活性は弱いものの IFNAR2 親和性は高いと考えられるクローンの計 38 クローンを選出した。

上記 38 クローンのうち結合活性に優れた 4 種のクローンの精製リコンビナント蛋白質を作製し、その詳細な結合特性の解析を試みた。結合能力の評価は、BIAcore を用いて行った。BIAcore とは表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) を利用したバイオセンサーであり、相互作用する分子のうち一方 (リガンド) をセンサーチップ表面上に固定化し、他方 (アナライト) を含む試料をマイクロ流路系を介して添加し、センサー表面上で起こる分子の結合、解離によって生じる微量な質量変化を、SPR シグナルの変化としてリアルタイムにモニターできる装置であり、これを用いることで構造変異体とターゲット間の結合強度や結合特性をモニタリングできる。

機能改変型 IFN $\alpha$ 8 構造変異体の遺伝子を、T7 プロモーター下に発現するベクターに組み込み、大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3) -RIL に導入することで、これらの蛋白質を inclusion body として大腸菌内に大量誘導した。IPTG で各変異体の発現を誘導した後、回収した inclusion body を SDS-PAGE 解析し、その誘導を確認したところ、いずれも野生型 IFN $\alpha$ 8 と同様に 25 kDa 付近にバンドが観察された。次に、回収した inclusion body を可溶化させ、refolding 操作を行った後にイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによる各変異体の精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーにより回収した溶出ピークを SDS-PAGE 解析したところ、単一のバンドとして観察され、高い純度で精製されたことが確認できた。

現在上記結果に関する研究成果を投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

鎌田 春彦ほか、イオンモビリティ質量分析装置を用いたバイオ医薬の安全性・品質評価法に関する基礎検討. 第 9 回 日本ヒトプロテオーム機構学術集会. 新潟 (新潟) 2011 年 7 月

[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]

ホームページ等

<http://www.nibio.go.jp/bio-r/index.htm>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 春彦 (KAMADA HARUHIKO)

研究者番号 : 00324509

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし