

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390022

研究課題名(和文) タンパク質機能改変技術による自己免疫疾患の分子病態解明と画期的治療法の開発

研究課題名(英文) Drug target discovery for autoimmune diseases by using a technology creating functional mutant proteins

研究代表者

角田 慎一 (Tsunoda, Shin-ichi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90357533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、腫瘍壊死因子(TNF-)が種々自己免疫疾患における創薬ターゲットとして注目を集めている。しかしTNFのレセプターにはTNFR1とTNFR2の二つのサブタイプが存在し、それらの機能の違い、特にTNFR2の機能は十分明らかにされていない。そこで本研究では、我々が創製したTNFR2指向性TNF変異体を活用することで、TNFR2の機能を解明し、創薬標的としての可能性を探ることを目的とする。本研究では、TNFR2の細胞内アダプター分子としてAPP3を同定し、その機能の一端を明らかとした。本研究成果は、今後のTNFR2の機能の解明や創薬標的の可能性を探るうえで有用な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumor necrosis factor- (TNF-) and its receptors (TNFR1 And TNFR2) play important roles for progression of autoimmune diseases. Therefore, they are considered to be promising drug targets for such diseases. However, differences of the function of TNFR1 and TNFR2, especially, the role of TNFR2 in diseases have not been understood well. In order to clear the possibility of the TNFR2 as a novel drug target, functions of TNFR2 must be well-investigated. This study aimed for clear the function of TNFR2 by using TNFR1/TNFR2 specific TNF mutants developed by our laboratory. Here, we identified a protein APP3 as a novel cytoplasmic adaptor molecule of TNFR2. We also found that APP3 played an important role for signal transduction from TNFR2 to JNK/MAP kinase pathway activation. These findings would be valuable for understanding the function of TNFR2.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：TNF TNFR2 aminopeptidase P3

## 1. 研究開始当初の背景

昨今の国内外の研究から、自己免疫疾患をはじめとする広範な炎症の病態において、TNFがkey moleculeの一つ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。既に本邦においても、TNF中和抗体や可溶性TNFレセプターといったTNF阻害薬が慢性関節リウマチに対する治療薬として臨床に供され、リウマチ患者の完治も可能にするなど、切れ味鋭い治療効果を発揮している。しかし、これら抗TNF療法では、宿主の生体防御機構に重要な役割を担うTNFの2種類のレセプター(TNFR1及びTNFR2)を介した作用を同時に阻害するため、免疫力の低下に伴う感染症のリスクや発癌率の上昇といった副作用が問題となっている。さらに投与患者の一部に脱髄症状が認められたことから、多発性硬化症等の脱髄性疾患患者へのTNF阻害薬の使用は禁忌になっている。したがって、未だ不明な点が多いTNFR1及びTNFR2の役割分担と病態との連関を分子レベルで明らかにするとともに、それら情報をフィードバックすることで、TNFの特定の機能のみを選択的に活性化あるいは阻害できる新たなアプローチがまさに待望されている。しかし、これまで低分子メディエーターのレセプターにおいては、種々のレセプター選択的アゴニスト/アンタゴニストといった低分子医薬品が開発されているものの、高分子サイトカインのレセプターにおいて、そのような医薬品の開発は難しく、成功した例はほとんど無い。このような背景から、本研究は、サイトカインシグナルの適切な制御による疾患治療を念頭に、未だ不明な点が多いTNFとそのレセプターサブタイプの連関と機能解明を目指し、特にTNFR2にフォーカスして解析を試みることにした。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでにファージ表面提示法に基づいた独自の機能性人工タンパク質創製法を確立し、それを駆使することで1億種類以上もの多様性を有したTNF構造変異体の網羅的ライブラリの中からTNFR1あるいはTNFR2指向性を有するTNF変異体(アゴニスト及びアンタゴニスト)を取得できることを示してきた。さらにこれらレセプター指向性変異体を機能解析ツールとして活用することで、これまで困難であった機能の解析ができることを示してきた。これらTNFレセプター指向性アゴニスト・アンタゴニストを機能解析ツールとして用いれば、TNFR1及びTNFR2のシグナル伝達制御機構の解明、新規自己免疫疾患治療薬としてのTNFR2アゴニストの創製が期待できる。そこで本研究では、各TNFレセプターと病態との連関解明、とりわけ創薬標的として未開拓なTNFR2に着目し、その機能やシグナルを解析し、将来的に自己免疫疾患の治療薬

開発に役立つ基盤情報の集積を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス TNFR2 指向性アゴニスト TNF の作製

ヒト TNFR2 指向性の TNF 変異体は既に取得済みであるが、*in vivo*での TNFR2 の機能解析を念頭に、マウス TNFR2 (mTNFR2) 指向性の TNF 変異体(アゴニスト)の創出を試みた。マウス TNF- $\alpha$  (mTNF)中のレセプター結合領域に位置する6箇所のアミノ酸残基(Q31, R32, A33, A144, E145, S146)をランダムに置換した構造変異 mTNF を網羅的に発現するファージライブラリを構築した。続いて作製したライブラリの中から結合力に基づくセレクションを行い、mTNFR1には結合せず、mTNFR2 のみに親和性を有し、さらに、各レセプターを介した生物活性を指標にスクリーニングを行った。

### (2) TNFR2 細胞内アダプター分子の探索

*In vitro*における TNFR のシグナル伝達メカニズムの解明、および TNFR1 と TNFR2 の違いを解明する目的で、TNFR2 指向性アゴニスト TNF 変異体を細胞に作用させ、免疫沈降法により、レセプター複合体を回収し、質量分析装置を用いてアダプター分子の同定を試みた。

### (3) APP3 の機能解析

APP3 の機能解析の一環として、細胞内局在および挙動を蛍光顕微鏡イメージングにより解析した。また、シグナル伝達経路の解析のため、主要な細胞内シグナル伝達分子との関連を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス TNFR2 指向性アゴニスト TNF の作製

wtTNFにおける、TNFレセプターとの結合に関わるアミノ酸残基をランダムに他のアミノ酸へ網羅的に置換した構造変異 TNF 発現ファージライブラリを構築した。ライブラリは、配列中に20種類のアミノ酸をコードするNNS配列(N; A,T,G,C, S; G,C)を挿入したプライマーを用いたPCRにより構築した。PCRテンプレートはwtTNFを用いた。 $4 \times 10^7$ のライブラリサイズを有するTNF変異体ファージライブラリが作製できた。続いて、mTNFR2に結合性を保持したクローンを濃縮するため、mTNFR1-Fcを共存させて、コンペティティブパンニングを行った。濃縮したクローンのTNF変異体発現ファージを用いて、mTNFR1及びmTNFR2に対する結合力をELISAにより評価した。その結果、mTNFR1に対して殆ど親和性を示さず、mTNFR2に選択的に結合するmTNFR2指向性の候補クローンを複数種類獲得することができ、中でもc2-9(以降FB1と称する)が最も有望と考えられた。

上記機能性人工タンパク質創製技術によ

り所得した TNF 変異体 FB1 の特性を解析するため、SPR(Biacore)を用いて結合速度論的解析を試みた。その結果、FB1 はマウス TNFR1 には結合性を示さず、マウス TNFR2 にのみ結合することが判明した (図 1)。

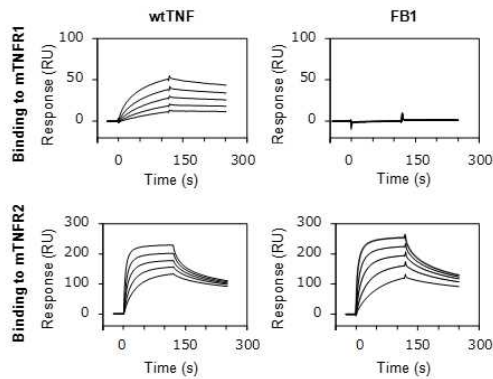


図 1 TNF 変異体 FB1 の TNFR2 選択的結合性

TNF 変異体 FB1 の生物活性は、mTNFR1 アッセイ細胞 LM および独自に作製した mTNFR2 アッセイ細胞 mTNFR2/mFas-PA で行った。苑結果、FB1 は mTNFR1 には作用を示さず、mTNFR2 に対してのみ、野生型 TNF に比べるとやや活性は低いものの作用を発揮することが示された (図 2)。以上の結果から、マウス TNFR2 指向性のアゴニスト TNF 変異体が取得できたことが示された。

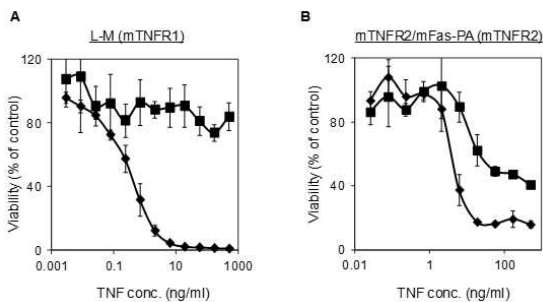


図 2 TNF 変異体 FB1 の TNFR2 選択的生物活性  
(A) LM 細胞 (B) mTNFR2/mFas-PA 細胞

## (2) TNFR2 細胞内アダプター分子の探索

TNFR2 の機能解析の一環として、TNFR2 細胞内アダプター分子の同定を試みた。ヒト TNFR2 発現 293T 細胞に対して、wtTNF-FLAG 及び R2-7-FLAG (ヒト TNFR2 指向性アゴニスト TNF 変異体) を作用させ、細胞可溶化および免疫沈降したタンパク質を質量分析法により解析した。その結果、TNFR2 関連分子としては知られていなかった新規アダプター分子の候補の一つとして APP3 (aminopeptidase P3) を同定することができた。APP3 は TNFR1 には結合せず、TNFR2 に TNF が結合することではじめて相互作用することも判明した。APP3 は TNFR2 特異的なシグナル伝達に関わることが予想されたこと

から、さらに詳細に機能解析を試みた。

## (3) APP3 の機能解析

機能未知の TNFR2 相互作用タンパク質 APP3 の機能解析の一環として、蛍光顕微鏡イメージングによる細胞内挙動解析を試みた。なお、APP3 にはミトコンドリア局在型 APP3m および細胞質型 APP3c の存在が報告されており、本研究中で同定された APP3 は APP3m であった。

C 末端に蛍光タンパク質である Venus を融合した APP3m (APP3m-Venus) 及び APP3c (APP3c-Venus) を一過性に発現させた HEK293T-TNFR2 細胞を用いて、MitoTracker Red によるミトコンドリア染色を行った後、R2-7 刺激に伴う APP3 の細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。APP3 (緑色)、ミトコンドリア (赤色)、細胞核 (青色) の蛍光をそれぞれ検出した画像を重ね合わせたものを (図 3) に示した。APP3m-Venus を強制発現した細胞 (HEK293T-TNFR2-APP3m 細胞) では、R2-7 非刺激時においては、APP3m はミトコンドリアに局在し、共局在を示す黄色を呈したが、刺激後 10 分、30 分と細胞質の緑色が増加しており、APP3m のミトコンドリアから細胞質への移行が観察された。一方、APP3c-Venus を強制発現した細胞 (HEK293T-TNFR2-APP3c 細胞) では、APP3c は細胞質に広く分布して発現しており、R2-7 刺激による APP3c の局在変化は観察されなかった。よって、リガンドである TNF の結合により TNFR2 が活性化すると、ミトコンドリアに局在する APP3m が細胞質へと移行し、TNFR2 に結合すること、一方で、細胞質に局在する APP3c は TNF のシグナルには関与していないと考えられた。

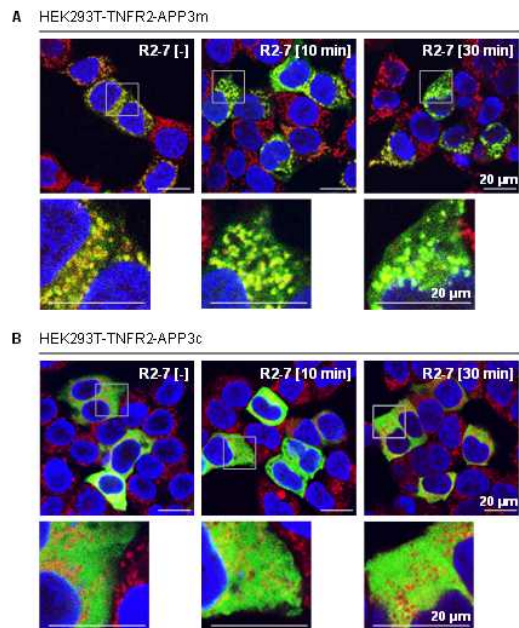


図 3 TNF 刺激に伴う APP3 の局在変化  
(A) APP3m 発現細胞 (B) APP3c 発現細胞  
緑色 : venus-APP3, 赤色 MitoTracker, 青色 : DAPI

そこで次に、APP3m が TNF/TNFR2 を介した細胞内シグナル伝達経路にどのように関与しているのかを調べるため、APP3 をノックダウンした際の主要シグナル伝達分子のリン酸化をウエスタンブロットにより解析した。その結果、NFkB や Akt は変化が認められず、JNK のリン酸化のみ抑制された。すなわち、TNFR2 と APP3 を介するシグナルは JNK を介する経路 (MAP kinase) に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、本研究で得られた知見を含め、より詳細な解析を行うことにより、TNFR2 のシグナル伝達の全容や、機能が解明できるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kitagaki M, Tsunoda S, et al. Novel TNF- $\alpha$  receptor-1 antagonist treatment attenuates arterial inflammation and intimal hyperplasia in mice. *J Atheroscler Thromb*, 19: 36-46, 2012. (査読有)  
DOI:10.5551/jat.9746  
DOI:10.1242/jcs.149385
- ② Morishige T, Tsunoda S, et al. Mutants of lymphotoxin- $\alpha$  with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy. *Cytokine*, 61: 578-584, 2013. (査読有)  
DOI:10.1016/j.cyto.2012.11.005
- ③ 角田慎一, タンパク質工学を駆使した自己免疫疾患に対する革新的バイオ医薬の開発. *ビオフィリア*, 7: 14-20, 2013 (査読無)
- ④ Inoue M, Tsunoda S, et al. Aminopeptidase P3, a new member of the TNF-TNFR2 signaling complex, induces phosphorylation of JNK1 and JNK2. *J Cell Science*, 128: 656-69, 2015. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 角田慎一, タンパク質工学による DDS を駆使した免疫応答制御法に関する研究, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012 年 7 月 5 日.
- ② 井上雅己, 角田慎一ほか, TNFR2 シグナル伝達に関わる X-prolyl aminopeptidase 3 の機能解析, 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月 30 日.
- ③ 井上雅己, 角田慎一ほか, APP3 が介在する TNFR2 シグナルの炎症保護作用に及ぼす影響, 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 29 日.
- ④ 鎌田春彦, 機能性サイトカイン変異体の創製による次世代バイオ医薬品の開発, 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 29 日.
- ⑤ 角田慎一, サイトカインとタンパク質工

学による粘膜ワクチンアジュバント開発, 日本 DDS 学会シンポジウム, 東京, 2014 年 7 月 31 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角田慎一 (TSUNODA Shin-ichi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号: 90357533

### (2) 研究分担者

鎌田春彦 (KAMADA Haruhiko)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・サブプロジェクトリーダー

研究者番号: 00324509