様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

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：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2014
課題番号：２６６７００６１

研究課題名（和文）機能改変型IFN-αによるがん幹細胞の抗がん剤抵抗性の打破

研究課題名（英文）Development of mutant IFN-alpha as a drug against the chemo-resistance of cancer stem cells

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）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：がんの薬物治療を前進させるためには、抗がん剤抵抗性であるがん幹細胞（Cancer Stem Cell; CSC）をたたく方法論が必要である。CSCの抗がん剤抵抗性は、細胞周期が静止期に維持されていることに大きく依存するが、近年、CSCの細胞周期静止メカニズムが、IFN-αのシグナル伝達抑制によることが明らかとなってきた。これは、強力なIFN-αのシグナルを加えることができれば、CSCの抗がん剤抵抗性を解除できることを意味する。本研究は、生物活性に優れた機能改変型IFN-αを創製し、それによりCSCの抗がん剤抵抗性を打破するという、シンプルかつ有効ながん治療法の可能性を探った。

研究成果の概要（英文）：For advancement of cancer chemotherapy, development of a novel method to attack the cancer stem cells (CSCs) which are resistant to anticancer drugs is needed. Resistance to chemotherapy of CSCs is depends on their dormant state of cell cycle. Recent study revealed that such a dormant state of cell cycle of stem cells was caused by inhibition of IFN-α signal transduction. This suggests the possibility that potent IFN-α signal may remove the chemo-resistance of CSCs. In order to investigate the above hypothesis, we tried to produce IFN-α mutants of high bioactivity and cell cycling activity for stimulate the cell cycle of CSCs. To this end, we performed a screening of IFN-α8 mutants by our original technology creating functional cytokine mutants using phage display library system. By using our technology, several potential IFN-α8 mutants have been successfully isolated. These IFN-α mutants could be a promising adjuvant for cancer chemotherapy.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：cancer stem cell　IFN-alpha　phage display library

１．研究開始当初の背景

がん組織中には、がん幹細胞（Cancer Stem Cell; CSC）と呼ばれるポピュレーションの細胞が存在すること、そして、CSC が抗がん剤等に抵抗性であり、転移・再発の原因となる細胞であるとのコンセプトが近年の研究の進展によって確実性を増してきた。

がん幹細胞 CSC は、自己複製能と未分化性の維持能力を獲得した細胞である。また CSC は、様々な臓器・組織由来であっても共通した特性（細胞周期の静止期維持、アポトーシスの抑制など）を有し、それが抗がん剤抵抗性などの共通した治療特性の発現につながっている。そのため、これら CSC に共通した特性に関する制御機構は、CSC をたたくための創薬標的として有望である。

近年、上記 CSC の特性に関与する種々の制御機構について研究が進められ、その中で、幹細胞における細胞周期の静止期（G0 期）維持には、IRF2(interferon regulatory factor 2)による IFN-αシグナルの抑制が関わっていることが報告された（Sato T et al. Nat Med 2009、Essers M et al. Nature 2009）。この知見に基づき、G1 期への re-entry 活性に優れた IFN-α シグナル刺激薬を創製できれば、がん幹細胞の細胞周期を効果的にアクティブ状態に移行させ、抗がん剤抵抗性を解除できると考えられる。そこで本申請研究では、申請者らが確立してきたタンパク質機能改変体創製技術（Shibata S, Tsunoda S et al. J Biol Chem 2008 など）を駆使することにより、生物活性を格段に向上させ、細胞周期活性化作用に優れた機能改変型 IFN-αを創製し、白血病 CSC 等の抗がん剤抵抗性解除を可能にする新規がん治療法確立を目指すこととした。

２．研究の目的

上記背景を念頭に、本研究では、これまでに申請者が TNF-αや LT-αなど各種サイトカインの機能改変・活性増強体の創製に成功してきたタンパク質機能改変体創製技術を駆使し、生物活性を野生型よりも格段に向上させた機能改変型 IFN-α（アミノ酸置換体）を創製することを目的とする。レセプター（IFNAR）との親和性を改変することにより、細胞周期活性化作用に優れた IFN-α 改変体の取得が期待できる。

３．研究の方法

本研究項目では、ファージ表面提示法に基づく独自の手法により、IFN-α改変体（アミノ酸置換体）の網羅的ライブラリを構築し、その中から高機能な改変体を迅速に取得することを試みた。

（１）　IFN-α８機能改変体ファージライブラリの構築

まず、ヒト IFN-α８のアミノ酸残基の中で、レセプター（IFNAR2）との相互作用に関わるアミノ酸残基を他の 20 種のアミノ酸にランダマイズした IFN-α８機能改変体の遺伝子ライブラリをファージミドに構築した。それを大腸菌 TG1 に導入し、ファージを産生させることで、IFN-α８ 改変体を網羅的に表面提示したライブラリを構築した。

（２）　IFNAR2 高親和性クローンのスクリーニング

次に、上記ライブラリ中から、IFN レセプターに対する親和性を保持した IFN-α８改変体発現ファージを濃縮・単離を試みた（アフィニティパンニング）。取得したファージから IFN-α８改変体の遺伝子配列を解析したうえで、大腸菌発現系にて IFN-α８リコンビナントタンパク質を作製した。

（３）　IFNAR2 機能改変体の特性評価

精製した IFN-α８タンパク質を用いて、SPR 法によるレセプター親和性評価、バイオアッセイ（シンドビスウイルス感染）による活性評価を行い、生物活性（比活性）に優れ、細胞周期活性化能を発揮すると考えられる機能改変型 IFN-αを選択した。

４．研究成果

（１）IFN-α８ 機能改変体ファージライブラリの構築

最初に、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ることで IFNα８ 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 IFNα８ ライブラリの作製を試みた。

これまでの点突然変異解析、立体構造解析により IFNα２ 中の L26、F27、R144、A145、M148 が IFNＡR2 の結合に重要であることが示唆されてきた。そこで、IFNα８構造変異体の創製にあたり、wtIFNa8 cDNA をテンプレートとし、IFNＡR2 との結合に重要であると考えられる IFNα８ 中のアミノ酸 L26、F27、R145、A146、M149 の計 5 個を 20 種類のアミノ酸へ網羅的に置換したライブラリ（ライブラリ 2）の構築を試みた。

置換するアミノ酸残基に対応するコドンを、NNS コドン(N; G,C,A,T に相当:S; G,C に相当)に置換したプライマーを設計し、PCR 断片をファージミドベクターに組み込んだ。大腸菌 TG1 を形質転換した後、得られたライブラリのサイズを評価したところ、2.1 × 10^8 CFU であった。また、ライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シークエンスを解析した結果、レセプター結合に重要なアミノ酸残基がランダムに置換されていることが確認できた。

（２）IFNAR2 高親和性クローンのスクリーニング

IFNα８ 構造変異体を網羅的に表面提示したファージライブラリの中から IFNAR2 に高親和性のクローンを濃縮するため、リコンビナント huIFNAR2-Fc キメラに対するアフィニティ濃縮（パンニング）を 4 サイクル繰り返

した。濃縮したファージを大腸菌に感染させることでモノクローン化し、180 クローンをピックアップして、産生される IFNα8 変異体発現ファージを用いてスクリーニングを行った。生物活性を抗ウイルス活性（シンドビスウイルス感染細胞の生存率により評価）により、レセプター親和性を ELISA により評価した。

スクリーニングの結果、野生型 IFN-α8 よりも高い IFNAR2 結合性、同等以上の抗ウイルス活性を示す４クローン(clone 4-10, 4-15, 4-29, 4-10)に絞り込んだ。

（３）IFNAR2 機能改変体の特性評価

上記で絞り込んだ IFN-α8 変異体について、大腸菌発現系にてリコンビナントタンパク質を調製し、レセプターとの親和性および生物活性を詳細に評価した。

SPR(Biacore)による解析の結果、各変異体で速度論的特性が異なるが、いずれも野生型 IFNα8 よりも遅い結合速度、遅い解離速度を示す傾向が認められた（図１, Table 1)。

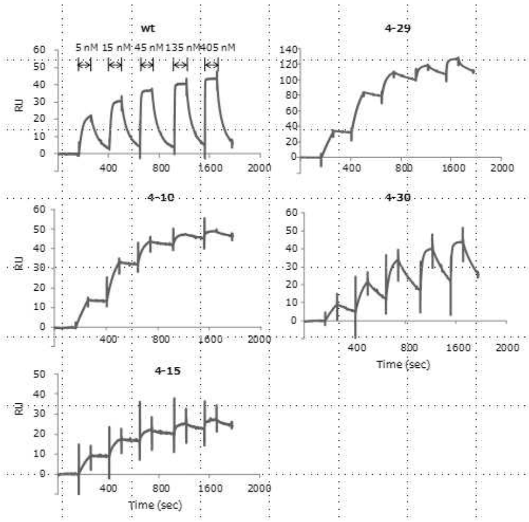


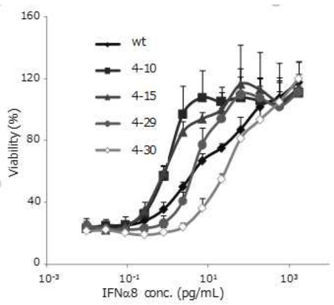
図１ IFN-α8 変異体の SPR センサーグラム

Table 1 IFNα8変異体のIFNAR2との親和性(SPR解析)

	k_a 1) (×10^5 M^{-1}s^{-1})	k_d 2) (×10^{-4} s^{-1})	K_D 3) (×10^{-9} M)
wtIFNα8	43	200	4.6
mIFNα8-4-10	5.7	3.8	0.67
mIFNα8-4-15	7.2	8.4	1.2
mIFNα8-4-29	6.4	5.9	0.92
mIFNα8-4-30	4.2	32	7.6

1) Association rate constant, 2) Dissociation rate constant, 3) Equilibrium dissociation constant [KD=kd/ka]

生物活性について、抗ウイルス活性を指標に評価した。LS174T 細胞にシンドビスウイルスを感染させ、細胞生存率に対する EC70 値を算出した。クローン 4-10, 4-15, 4-29 は野生型 IFNα8 よりも高い活性を示し、クローン 4-10 では約 10 倍高い活性を発揮しうることが判明した（図 2)。

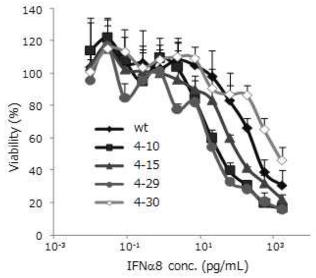


	EC_{70} * (pg/mL)
wtIFNα8	11.9
mIFNα8-4-10	1.0
mIFNα8-4-15	1.4
mIFNα8-4-29	6.1
mIFNα8-4-30	44.8

* 70% effective concentration

図 2 IFN-α8 変異体の生物活性（抗ウイルス活性）

一方で、生物活性を抗腫瘍作用でも評価した。Jurkat 細胞に IFN-α8 変異体を作用させ、72 時間後の生存率に対する EC50 値を測定した。その結果、クローン 4-10, 4-15, 4-29 は野生型 IFNα8 よりも高い活性を示し、4-10, 4-29 は 10 倍以上高活性であることが判明した（図３)。



	EC_{50} * (pg/mL)
wtIFNα8	361
mIFNα8-4-10	36.6
mIFNα8-4-15	116
mIFNα8-4-29	28.2
mIFNα8-4-30	1430

* 50% effective concentration

図 3 IFN-α8 変異体の生物活性（抗腫瘍活性）

以上の結果より、タンパク質機能改変体創製技術によって、生物活性が約 10 倍向上した IFNα8 変異体を得ることに成功した。これら IFNα8 変異体は、CSC の細胞周期 G1 re-entry 活性を発揮しうると期待される。本研究の中では、細胞周期に与える影響や CSC に対する影響を評価することはできていないため、今後の研究でそれらを評価する予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　１　件）

① Inoue M, Kamada H, Abe Y, Higashisaka K, Nagano K, Mukai Y, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S. 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）
DOI:10.1242/jcs.149385

〔学会発表〕（計　１　件）

① 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.

〔図書〕(計　　件)

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