

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18918

研究課題名(和文)新規自己免疫疾患治療としての機能性人工タンパク質の創製とその最適化

研究課題名(英文)A trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor-alpha mutant enhances molecular stability

研究代表者

井上 雅己 (Inoue, Masaki)

神戸学院大学・薬学部・助手

研究者番号：80757097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、難治性自己免疫疾患の治療薬の開発を目指し、我々が創製したTNFR1指向性アンタゴニストTNF変異体(R1antTNF)の高機能化を目的とした。まず、フェージR1antTNF改変体ライブラリを作製し、アンタゴニスト活性が増強した変異体の探索を試みた結果、R1antTNFの配列は最適化されていた。さらに、体内安定性の向上のため、R1antTNFの3量体構造を一本鎖化したscR1antTNFを創製した結果、TNFR1結合選択性や生物活性を維持したまま、熱安定性が高まった。分岐型40-kDa PEG修飾を施すことで血中半減期も延長した。従って、本高機能化は治療応用に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have been investigating the use of TNFR1-selective antagonistic TNF mutant (R1antTNF) to reveal the pharmacological effect of TNFR1-selective inhibition as a new therapeutic modality. This study aimed to further improve and optimize the activity and behavior of this mutant protein both in vitro and in vivo. Especially, we examined a trimeric structural fusion of R1antTNF, formed via the introduction of short peptide linkers, as a strategy to enhance bioactivity and molecular stability. The trimeric fusion, referred to as single-chain R1antTNF (scR1antTNF), was found to retain in vitro molecular properties of receptor selectivity and antagonistic activity but displayed a marked increase in thermal stability. Furthermore, molecular modification of scR1antTNF using polyethylene glycol (PEG) significantly prolonged the residence time in vivo. Therefore, scR1antTNF is considered useful for therapeutic drug application.

研究分野：創薬化学

キーワード：腫瘍壊死因子 TNF アンタゴニスト TNFR1 自己免疫疾患 一本鎖化 構造最適化

## 1. 研究開始当初の背景

がんや自己免疫疾患などの難治性疾患の治療薬として、原因分子に特異的に作用し、効果を発揮する分子標的薬が使用されている。中でも、抗体を活用したバイオ医薬品は、高い治療効果を発揮し、これまで治療が困難であった関節リウマチや潰瘍性大腸炎などの難治性・自己免疫性疾患の寛解を可能にしてきた。とりわけ、体内で炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) の過剰発現が発症原因として明らかとなっており、TNF を標的とした医薬品開発が世界中で活発に進められている。

これまでに、TNF の阻害を目的として、中和抗体や可溶性レセプター、PEG 化抗体フラグメントなどの様々な分子フォーマットをもつ医薬品が続々と登場し、優れた治療効果を発揮している。しかし一方で、不奏効者の存在や予期せぬ副作用などの克服すべき課題も存在する。多発性硬化症がその一例である。本疾患は、中枢神経の脱髄を要因として視神経や脊髄に障害をきたす難治性の自己免疫疾患であり、発症原因は未だ特定されていない。当初、他の自己免疫疾患と同様に、インフリキシマブなどの TNF 中和抗体による TNF 阻害が有効であると考えられたものの、実際には病態を悪化させた (Tanno M, Clin Rheumatol 2006)。従って、個々の自己免疫疾患の病態発症・悪化メカニズムに応じたバイオ医薬品開発が重要視されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、難治性自己免疫疾患の治療薬の開発を目指し、病態悪化の主要因である腫瘍壊死因子 (TNF) の作用のなかでも、TNFR1 を介した反応を特異的に阻害できる分子として我々がこれまでに開発してきた TNFR1 指向性アンタゴニストの高機能化を目的とした。

現在上市されている抗体医薬を中心とする TNF 阻害薬は、TNF に結合し、その作用を中和するが、TNF が伝達する TNFR1/TNFR2 シグナルの両者を阻害する。そのため、多発性硬化症のように、TNFR2 を介した神経保護作用まで抑えてしまい、症状を悪化させる疾患が存在する。そこで、我々は、TNF 関連疾患の病態悪化メカニズムに着目し、TNFR1 指向性アンタゴニスト能を有する TNF 変異体タンパク質 (R1antTNF) の高機能化と構造最適化を図ることで、免疫疾患治療薬の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### R1antTNF アミノ酸改変体の取得

R1antTNF の 30 番台及び 140 番台の 9 箇所のアミノ酸を網羅的に変異させたファージ R1antTNF 改変体ライブラリを構築した。R1antTNF を競合させた条件でアフィニティ

セレクションを行い、TNFR1 に対して R1antTNF より高い親和性をもつファージクローンを濃縮した。この TNFR1 結合性クローン集団の中からランダムに選択したモノクローンのアミノ酸配列を調べた。

### scR1antTNF タンパク質の発現・精製

scR1antTNF の配列は、R1antTNF の配列に基づいて作製した。3 つの R1antTNF の N 末端と C 末端が交互になるように GGGSGGG ペプチドリンカーで連結し、さらに N 末端に分泌シグナル配列、C 末端に His-tag が連結されるように設計した。scR1antTNF の遺伝子は人工合成により作製した。哺乳類発現用プラスミド (pcDNA3.1) に挿入し、発現ベクターとして、pcDNA3.1-scR1antTNF を作製した。タンパク質は、Expi293F 細胞 (Invitrogen) を用いて発現させた。発現ベクターをリポフェクション (ExpiFectamine 293 reagent) によって遺伝子導入した後、37°C で 7 日間培養した。培養上清を回収し、アフィニティクロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィー (GE ヘルスケア) の 2 段階精製を行った。

### I 型/II 型 TNF レセプターへの結合性

表面プラズモン共鳴法 (SPR) によるキネティクス解析は、BIAcore T200 (GE ヘルスケア) を用いて行った。ヒト TNFR1 もしくは TNFR2 の Fc 融合タンパク質 (R&D systems) を CM5 センサーチップに固定化した。HBS-EP ランニングバッファーで希釈した野生型ヒト TNF (wtTNF) 及び R1antTNF, scR1antTNF (1.2, 3.6, 10.9, 32.7, 98.0 nM) を用いて、2 分間の結合状態と 2 分間の解離状態を測定した。BIAevaluation T200 を用いて、1:1 結合モデルにおける結合解離パラメーターを算出した。

### TNFR1 を介したアンタゴニスト活性

マウス繊維芽細胞 (LM 細胞) は、D-MEM (10% FCS 含有) を用いて培養した。96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  cells/well の細胞を播種し、野生型マウス TNF (5 ng/ml) とともに、段階希釈した scR1antTNF 及び 40-kDa PEG-scR1antTNF を加えて、37°C で培養した。48 時間後、メチレンブルーアッセイにて細胞生存率を測定した。

### scR1antTNF の熱安定性

熱安定性の評価は、示差走査熱量測定 (MicroCal VP-Capillary DSC, Malvern) により行った。PBS 溶液をリファレンスとし、wtTNF 及び R1antTNF, scR1antTNF の熱量変化を 15°C から 90°C まで 1°C/min で測定した。測定データは、MicroCal software を用いて、非二状態モデルにて解析した。

### 熱に対する scR1antTNF の活性保持効果

37°C, 3 週間および 50°C, 1 週間保存した wtTNF 及び R1antTNF, scR1antTNF を用いて、

TNFR1 に対する結合力を SPR で測定した。タンパク質濃度を横軸、各濃度で得られたセンサーグラムの最大結合量 (Rmax) 値を縦軸としてプロットし、回帰直線を作成した。この直線の傾きから、TNFR1 への結合力の変化を評価した。

#### 部位特異的 PEG 修飾効率の検討

反応温度による PEG 修飾の違いを調べるため、scR1antTNF に 10 倍量(モル比)の methoxy polyethylene glycol (10-kDa) succinimidyl carbonate (日油株式会社) を加えて、4°C 及び 25°C、37°C の条件下で 10 分間反応させた。また、PEG 分子量による修飾効率の違いを調べるため、5, 10, 20, 40-kDa の直鎖状 PEG 鎖をもつ methoxy polyethylene glycol succinimidyl carbonate を scR1antTNF に対して 10 倍量(モル比) 加えた後、25°C で 10 分間反応させた。反応液は、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex) 及び Native-PAGE/ウエスタンブロットによって解析し、PEG 化に最適な条件を調べた。

#### 40-kDa 分岐型 PEG による scR1antTNF の部位特異的 PEGylation

20-kDa PEG 鎖を 2 分子(合計 40-kDa) もつ分岐型 PEG を用いて、scR1antTNF を修飾した。scR1antTNF に 10 倍量(モル比)の methoxy polyethylene glycol (40-kDa) succinimidyl carbonate (日油株式会社) を加えて、25°C で 10 分間反応させた。反応液は、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex) を用いて精製した。

#### 40-kDa PEG-scR1antTNF の体内動態

BALB/c マウス (8 週齢、雌性) は日本 SLC より購入した。BALB/c マウス (5 匹/群) に、scR1antTNF 及び 40-kDa PEG-scR1antTNF を 50  $\mu$ g 腹腔内投与した後、尾から経時的に採血した (投与後 6, 24, 48, 72, 96, 168, 192 時間)。陽性コントロールとして、エタネルセプトを同様に投与した。採血は、尾先端 1-2 mm を解剖ハサミにて切断後、ヘパリンコート処理したヘマトクリット管に血液を回収することで行った。キャピラリー遠心機にて 12,000rpm 15 分間遠心した後、血漿を回収し、ヒト TNF に対する ELISA により、scR1antTNF の濃度を測定した。

## 4. 研究成果

#### R1antTNF アミノ酸改変体の取得

作製したファージ R1antTNF 改変体ライブラリは、約 5 千万種類の配列多様性をもつことがわかった。アフィニティセレクションにより得られた TNFR1 結合性クローンの配列をランダムに調べた結果、すべて R1antTNF と同じであったことから、30 番台及び 140 番台のアミノ酸は、TNFR1 結合選択性の点では最適化されていると推察された。

#### scR1antTNF タンパク質の発現・精製

分子量 17kDa の単量体 3 つが会合した R1antTNF は、従来、大腸菌発現系を用いて作製してきた。しかし、scR1antTNF は、一本鎖化により約 51kDa のタンパク質として発現させる必要があるため、大腸菌での発現が困難であることが予想された。そこで、哺乳類発現系を用いたタンパク質作製を試みた。ゲルろ過クロマトグラフィー精製の結果、scR1antTNF は、R1antTNF とほぼ同じ溶出時間にピークが認められ、同じ分子量のタンパク質を得ることができた。また、タンパク質の凝集などはないと考えられた。従って、哺乳類発現系を用いて、問題なく発現できることが分かった。

#### scR1antTNF の I 型/II 型 TNF レセプターへの結合性

一本鎖化により、R1antTNF がもつ TNFR1 選択的結合能に影響がないかを確認した。SPR 測定の結果、wtTNF は、TNFR1 (KD: 0.8 nM)、TNFR2 (KD: 6.0 nM) の両方に結合した。一方で、R1antTNF は、TNFR1 (KD: 3.0 nM) だけに結合し、TNFR2 には結合しなかった。scR1antTNF は、TNFR1 (KD: 2.9 nM) に結合するものの、TNFR2 には結合しなかった。従って、scR1antTNF は、R1antTNF と同等の選択性・結合親和性をもつことがわかり、一本鎖化した場合も TNFR1 結合能は保持された。

#### scR1antTNF の TNFR1 を介したアンタゴニスト活性

一本鎖化により、R1antTNF がもつ TNFR1 アンタゴニスト活性に影響がないかを確認した。細胞アッセイの結果、scR1antTNF は、R1antTNF と同様に、濃度依存的に細胞生存率を上昇させた。従って、scR1antTNF の TNF 阻害活性は R1antTNF と同等であり、一本鎖化した場合でもアンタゴニスト活性は保持されることがわかった。

#### scR1antTNF の熱安定性

一本鎖化による R1antTNF の熱安定性の変化を確認した。DSC 測定の結果、wtTNF と R1antTNF に比べ、scR1antTNF のピークは高温側にシフトし、ピーク幅も狭かった。また、wtTNF と R1antTNF の Tm 値は、それぞれ 66.5°C、64.7°C であるのに対して、scR1antTNF の Tm 値は 74.7°C であり、約 10°C 高かった。従って、scR1antTNF は熱安定性が高くなっており、wtTNF や R1antTNF が低温域から徐々に変性し始めると考えられるのに対し、scR1antTNF は高温側まで変性が起こりにくい状態と考えられた。また、エンタルピー変化から算出される  $\Delta H - \Delta HV$  値は、低値であるほど遷移状態を経た変化を生じにくいとされる。wtTNF、R1antTNF、scR1antTNF の  $\Delta H - \Delta HV$  値はそれぞれ 152、95、81 (kcal/mol) であり、この点でも、scR1antTNF は構造安定化が促進されたことが示唆された。

#### 熱に対する scR1antTNF の活性保持効果

熱安定性の向上が活性に与える影響について調べた。温度毎の回帰直線を比較した結果、wtTNF と R1antTNF は、50°Cにおいて結合力が低下し、直線の傾きが低下した。一方、scR1antTNF は 50°Cにおいても結合力の低下はみられなかった。従って、一本鎖化により熱による活性低下が抑制された。一本鎖化による構造安定化により、熱安定性が向上したことで、高温においても scR1antTNF の活性は低下しなかったと推定された。

#### 部位特異的 PEG 修飾効率の検討

タンパク質の PEG 化において、反応温度や試薬の種類は、修飾効率に大きく影響する。そこで、scR1antTNF の最適な PEG 化条件の検討を行った。ゲルろ過クロマトグラフィー解析から、従来の 3 量体型の R1antTNF は 3 か所の N 末端が存在するため、モノ PEG 化体・ジ PEG 化体・トリ PEG 化体の 3 つのピークが検出された。さらに 4°C 条件下でもトリ PEG 化体のピークが認められ、PEG 修飾数の制御が困難であった。一方で、修飾部位が N 末端の 1 か所である scR1antTNF では、モノ PEG 化体及び未反応体のピークが検出された。未反応体が残るものの、修飾反応の速い 37°C 条件下でも、モノ PEG 化体を効率的に得ることができた。また、PEG 分子量の違いによる修飾効率にも差は認められず、高分子量 PEG であっても scR1antTNF の修飾に影響はなかった。これらの反応は、非還元条件下で電気泳動を行う Native-PAGE においても PEG 修飾数に応じたバンドのシフトが観察されたことから確認できた。従って、一本鎖化により、簡便かつ効率的な N 末端特異的 PEG 修飾が可能になると考えられた。

#### 40-kDa 分岐型 PEG による scR1antTNF の部位特異的 PEGylation

現在、関節リウマチの治療薬として、TNF に対するモノクローナル IgG 抗体由来の低分子 (Fab) 抗体医薬であるセルトリズマブペゴルが使用されている。セルトリズマブペゴルは、低分子化による体内滞留性の低下を高分子 PEG 化によって克服している。そこで、scR1antTNF での血中半減期延長の効果を調べるため、セルトリズマブペゴルと同様の分子量を持つ分岐型 PEG の修飾を施した。ゲルろ過クロマトグラフィー解析の結果、scR1antTNF のピークよりも高分子量側に 40-kDa PEG-scR1antTNF の単一ピークが認められた。このピーク部分を単離・精製し、以降の実験に用いた。

#### 40-kDa PEG-scR1antTNF のアンタゴニスト活性

PEG 化による分子表面の修飾は、生理活性タンパク質が従来もつ活性を低下させる懸念がある。そこで、40-kDa PEG-scR1antTNF の TNF 阻害活性 (アンタゴニスト) 活性への

影響を調べた。40-kDa PEG-scR1antTNF の TNFR1 を介したアンタゴニスト活性は、scR1antTNF と同等であり、濃度依存的に野生型 TNF を阻害した。従って、PEG 修飾によるアンタゴニスト活性の低下はないと考えられた。

#### 40-kDa PEG-scR1antTNF の体内動態

アンタゴニスト活性は保持されていたことから、in vivo で血中半減期を延長させることができれば、TNFR1 アンタゴニストとしての有効性を向上させることができる。そこで、40-kDa PEG-scR1antTNF をマウスに投与し、血中半減期を調べた。scR1antTNF の半減期が約 4 時間であったのに対し、40-kDa PEG-scR1antTNF の半減期は約 32 時間であった。40-kDa PEG-scR1antTNF の血中半減期は、scR1antTNF に比べて大きく延長しており、40-kDa 分岐型 PEG による修飾は、TNFR1 アンタゴニストの有効性向上に有用であると考えられた。一方、エタネルセプトの半減期 (187 時間) に比べ、40-kDa PEG-scR1antTNF の半減期は短いとも考えられ、PEG の種類や分子量を検討する余地があった。

#### まとめ

本研究で検討した、一本鎖構造安定化技術及び部位特異的 PEG 修飾による R1antTNF の高機能化・構造最適化は、TNFR1 アンタゴニストとしての治療薬応用に有用であると考えられた。

#### 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 2 件)

1. Inoue M, Ando D, Kamada H, Taki S, Niiyama M, Mukai Y, Tadokoro T, Maenaka K, Nakayama T, Kado Y., Inoue T, Tsutsumi Y, Tsunoda S: A trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- $\alpha$  mutant enhances molecular stability and enables facile modification., *J. Biol. Chem.*, 292(16):6438-51, 2017.
2. Ando D, Inoue M (contributed as first author), Kamada H, Taki S, Furuya T, Abe Y, Nagano K, Tsutsumi Y, Tsunoda S: Creation of mouse TNFR2-selective agonistic TNF mutants using a phage display technique., *Biochem. Biophys. Rep.*, 7:309-15, 2016.

[学会発表] (計 7 件)

1. Inoue M, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S: Trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- $\alpha$  mutant enhances molecular stability and enables facile modification.,

- 2018 Controlled Release Society Annual Meeting, New York, July 2018.
2. 大崎奈都喜, 井上雅己, 國重将大, 三木望稔里, 小野寺章, 河合裕一, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 免疫制御薬としての TNFR1 選択的アンタゴニストの有効性・安全性の検討 - 一本鎖化技術による構造最適化 -, 第 34 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 那覇 (沖縄), 2018 年 1 月.
  3. 國重将大, 井上雅己, 大崎奈都喜, 三木望稔里, 小野寺章, 河合裕一, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 免疫制御薬としての TNFR1 選択的アンタゴニストの有効性・安全性の検討 - 部位特異的 PEG 修飾による構造最適化 -, 第 34 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 那覇 (沖縄), 2018 年 1 月.
  4. Inoue M, Ando D, Kamada H, Niiyama M, Tsutsumi Y, Tsunoda S: A trimeric structural fusion of an antagonistic TNF- $\alpha$  mutant enhances molecular stability., 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会, 神戸 (兵庫), 2017 年 12 月.
  5. 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 新山真由美, 堤 康央, 角田慎一: 機能改変 TNF 変異体タンパク質の免疫疾患治療薬としての応用に向けた最適化の試み, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 京都 (京都), 2017 年 7 月.
  6. 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 新山真由美, 堤 康央, 角田慎一: 免疫疾患治療薬の開発を目指した TNFR1 選択的アンタゴニスティック TNF 変異体タンパク質の構造最適化の試み, 第 64 回日本生化学会近畿支部例会, 豊中 (大阪), 2017 年 5 月.
  7. 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 一本鎖構造と PEG 修飾に基づく TNF 受容体アンタゴニストの高機能化, 日本薬学会第 137 年会, 仙台 (宮城), 2017 年 3 月.

[図書] (計 2 件)

1. 井上雅己, 角田慎一: 難病の克服に向けた先端バイオ医薬の創出, 化学工業, 68(5):317-23, 2017.
2. 井上雅己, 角田慎一: 第 2 章 2 節 PEG 修飾による薬物動態特性の向上技術, DDS 先端技術の製剤への応用開発, 85-94, 2017.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 雅己 (INOUE Masaki)  
神戸学院大学, 薬学部, 助手  
研究者番号: 80757097

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

角田 慎一 (TSUNODA Shinichi)  
鎌田 春彦 (KAMADA Haruhiko)