

令和 3 年 10 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19406

研究課題名(和文)免疫寛容によるAnti-Drug Antibodies産生を抑制する基盤的研究

研究課題名(英文)Fundamental study on depression of Anti-Drug Antibodies by use of immune tolerance

研究代表者

植田 正(Tadashi, Ueda)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：90184928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究室で既に見出されていた多量体ニワトリリゾチーム(HELと記載)に対する免疫寛容誘導法が、抗体医薬品使用の際に生じるADAs(Anti-Drug Antibodies)の抑制に応用できるかを調査した。HEL(塩基性蛋白質)、 $\gamma$ -ラクトグロブリン(酸性蛋白質)、ヒト型Fab(中性蛋白質)の多量体を生理食塩水に溶解しマウスに投与した。その一週間後にそれぞれの単量体をアジュバンドと混合して免疫した。同様の免疫操作を行うとともに、一週間毎にマウスから採血し、血中の各蛋白質特異的な抗体の産生量をELISA法により評価した。その結果、 $\gamma$ -ラクトグロブリン、ヒト型Fabでは免疫寛容誘導が起きなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリリゾチームの多量体が免疫寛容(マウスにとって異物と認識されない)を引き起こすが、 $\gamma$ -ラクトグロブリンやヒト型Fab(抗体の一部)の多量体では引き起こさないという結果を得ることができた。この結果から、マウス体内で塩基性蛋白質であるニワトリリゾチーム多量体が正電荷のクラスターを形成し、マウス体内で表面に負電荷を持つ細胞に効率的にデリバリーされ、免疫寛容誘導が起こった可能性がある。さらなる検証が必要であるが、この仮説が実証できれば、細胞へ人為的に蛋白質をデリバリーする方法の開発ができるのではないかと。については、ヒトの免疫応答を調節可能な生体材料の創製につながる。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project was to examine whether induction of the immune tolerance obtained in my laboratory using polymeric hen egg-white lysozyme (HEL) could be applicable to the depression of Anti-Drug Antibodies or not. One week after the preinjection of polymeric HEL, polymeric beta-lactalbumin and polymeric humanized Fab dissolved in phosphate buffer-saline in mice, respectively, an emulsion of each protein monomer (HEL, beta-lactalbumin and humanized Fab) dissolved in phosphate buffer-saline with adjuvant was injected in mice. The amounts of specific antibody against each protein monomer were evaluated every week. As a result, the immune tolerance against polymeric HEL was observed. However, the immune tolerance against polymeric beta-lactalbumin and polymeric humanized Fab were not observed.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ADAs 免疫寛容 蛋白質デリバリー法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年当時の統計では、抗体医薬品は世界の医薬品売り上げのトップ10の中に6品目が入る程使用され、現在も300以上の臨床試験が実施されている。現在市販されているヒト型抗体医薬品(以下抗体医薬品と記す)は抗原結合部位以外はヒト由来のアミノ酸配列である。しかしながら、市販されているヒト抗体医薬品(panitumab など数種)に対して臨床試験の段階で一部の患者がAnti-Drug Antibodies (ADAs)を産生することが報告されている(Hardingら MABs, 2010)。臨床現場では、ADAsが産生された場合に抗体医薬品の投与量をあげることで、薬効維持を試みる。その結果は必然的に医療費の増大にもつながる。副作用としては、ADAsが免疫複合体等を形成して腎疾患などを引き起こす。さらに、重篤な免疫応答が生じると抗体医薬品の使用ができなくなる。従って、抗体医薬品の利用には、ADAsの発現を限りなくゼロにすることが理想である。しかし、ADAs低下に着目した基礎研究はほとんど報告されていない。

### 2. 研究の目的

植田が主宰する研究室で、化学修飾で4~6量体にした混合物(多量体HEL)を調製し、実験動物に投与した。1週間後から毎週末修飾のHELを投与すると、多量体HELを前投与していない実験動物群との間にHELに対する抗体産生に有意差が見られた。また、多量体HELを前投与した動物群に、オボアルブミン(OVA)を投与するとOVAに対しては、抗体産生が生じた。すなわち、HELの多量体を実験動物(マウス)に前投与し、その後単量体のHELを実験動物に投与すると、抗原特異的(HELに対してだけ)に免疫寛容(免疫応答を起こさない)現象が誘導されることを見出している。本研究目的は、この免疫寛容現象が普遍的かどうかを明確にし、ADAsを抑制する方法として適応可能かどうか、研究基盤を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多量体HELの調製

本研究室、佐藤健治氏(九州大学薬学府修士論文2008)の方法に沿って、30mgのHELをリン酸緩衝液(pH7)に溶解し、二価性架橋試薬(ビススルフォサクシニミジルスルベート:BS3)をHELの同じmol量用いて、室温で1時間反応した。その後硫酸塩析によりHEL等を沈殿し、少量の水に溶かしたのち、10%酢酸水溶液に対して透析した。10%酢酸水溶液で平衡化したSephadex G-100(1.5x150cm)を用いて多量体HELを分離した。280nmの波長で蛋白質の溶出を確認し、SDS-PAGE後、CBB染色によって、多量体の生成を確認した。

#### (2) 多量体HEL前投与において免疫寛容は誘導されるか(再現性の確認)

本研究室、弓削奈津子氏(九州大学薬学府修士論文2006)および佐藤健治氏(九州大学薬学府修士論文2008)の免疫実験プロトコールは現在では使用できないことから、免疫実験の標準プロトコールを用いて、弓削氏、佐藤氏の実験結果が再現できるかどうかを評価した。リン酸緩衝液-食塩水(PBSを記す)に溶解した多量体HEL 1mg/マウス1匹(100 $\mu$ L)を前投与した。1週間後にアジュバンドと混合した単量体HEL(50 $\mu$ g)をマウス1匹に投与し、1週間毎に同量の単量体HELをマウスに免疫した。1週間毎に採血をし、HEL単量体に対する抗体価をELISAの標準プロトコールにて評価した。対照は、HEL単量体を免疫する1週間前にPBSのみを投与するマウス群とした。

#### (3) 多量体HELのマウスでの体内動態の解析

多量体HEL 10mg/mL濃度のPBS溶液を、100 $\mu$ Lマウス1匹に投与し、2、4、16時間後(確認のため7日後)に採血した。血清中に存在する多量体HELの量をサンドイッチELISA(HELに強く結合するモノクローナル抗体LKS103研究室で確立済を使用)の標準プロトコールにて評価した。

#### (4) オボアルブミンの多量体化

(1)に記載している方法に準じて行った。すなわち、30mgのオボアルブミンをリン酸緩衝液(pH7)に溶解し、トータル5倍mol量のBS3を加え、室温で6時間反応した。その後、反応液の一部を脱塩、濃縮し、SDS-PAGE後、CBB染色によって、多量体の生成を評価した。

#### (5) $\beta$ ラクトグロブリンの多量体化

$\beta$ ラクトグロブリン100mgをリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、N-スクニド-3-(2-ピリジリチオ)プロピネート(SPDP)を $\beta$ ラクトグロブリンの3倍mol量加え、30分室温で反応した。その後、さらにSPDPを $\beta$ ラクトグロブリンの3倍mol量加え、30分室温で反応した。pH4.5酢酸緩衝液で平衡化した脱塩カラム(Hitrapカラム)にて、脱塩と緩衝液の置換を行った。溶出液( $\beta$ ラクトグロブリンとSPDPが反応したもの)の半分をDTTにより還元し、PBSで平衡化したHitrapカラムで還元剤を除いた。カラム残りの半分も同様にPBSで平衡化したHitrapカラムにかけて、緩衝液の置換を行なった。これらの溶液は混合し、室温で24時間反応した。その後、10%酢酸水溶液で平衡化したSephadex G-100(1.5x150cm)を用いて、多量体 $\beta$ ラクトグロブリンを分離した。280nmの波長で蛋白質の溶出を確認し、非還元状態でSDS-PAGE後、CBB染色によって、多量体の生成を確認した。

## (6) ヒト型 Fab の多量体化

ヒト型 Fab は、我々の研究室で、その形質転換株：酵母 (*Pichia pastoris*) を確立しているので (Ohkuri ら J. Biochem. 2014)、定法に従って培養し、この論文の精製方法にしたがって蛋白質を得た (詳細は割愛)。調製したヒト型 Fab の 60mg をリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、SPDP をヒト型 Fab の等 mol 量加え、30 分室温で反応した。その後、さらに SPDP をヒト型 Fab の等 mol 量加え反応した。反応液は酢酸緩衝液 (pH4.5) で平衡化した SP-Toyopearl (1.6 x 1 cm) に吸着し、NaCl を含む同緩衝液で溶出した。この操作により生成したヒト型 Fab を濃縮した。この生成物の半分を DTT により還元し、PBS で平衡化した Hitrap カラムで還元剤を除いた。カラム残りの半分も同様に PBS で平衡化した Hitrap カラムにかけて、緩衝液の置換を行った。これらの溶液は混合し、室温で 2 時間反応させた。その後、10%酢酸水溶液で平衡化した Sephadex G-100 (1.5x 150cm) を用いて、多量体ヒト型 Fab を分離した。280 nm の波長で蛋白質の溶出を確認し、SDS-PAGE 後、CBB 染色によって、多量体の生成を確認した。

## (7) 多量体蛋白質前投与における免疫寛容実験

(2) の方法に準じて行った。PBS に溶解したそれぞれの多量体蛋白質 1 mg/マウス 1 匹 (100  $\mu$ L) を前投与した。1 週間後にアジュバンドと混合したそれぞれの単量体蛋白質を投与し、1 週間毎に単量体蛋白質をマウスに免疫した。1 週間毎に採血をし、それぞれの単量体に対する抗体価を ELISA の標準プロトコールにて評価した。対照は、それぞれの単量体を免疫する 1 週間前に PBS のみを投与するマウス群とした。

## 4. 研究成果

### (1) 多量体 HEL の調製

研究の方法 (1) に従って調製した多量体 HEL は、10%酢酸水溶液で平衡化した Sephadex G-100 (1.5x 150cm) を用いて多量体 HEL を分離した (図 1 A)。280nm の波長で蛋白質の溶出を確認し、SDS-PAGE 後、CBB 染色によって、多量体の生成を確認した (図 1 B)。SDS-PAGE 上で 3 量体以上の画分 4~6 を集め、凍結乾燥し、免疫実験のサンプルとした。

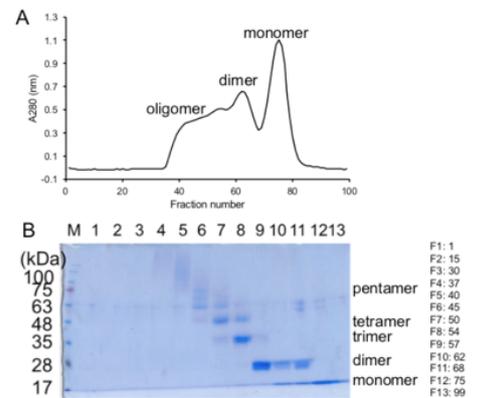


図 1 多量体 HEL の調製

### (2) 多量体 HEL 前投与において免疫寛容は誘導されるか (再現性の確認)

研究成果 (1) で得た、多量体 HEL 1mg を PBS に溶解しマウスに前投与した。1 群 5 匹で実施した。対照は PBS のみを投与する群とした。それぞれの群ごとに、1 週間後にアジュバンドと混合した単量体 HEL を投与し、1 週間毎に単量体 HEL をマウスに免疫した。1 週間毎に採血をし、HEL 単量体に対する抗体価を ELISA の標準プロトコールにて評価した。図 2 に多量体 HEL 前投与群と対照群 (PBS のみ) を投与した群の 1 週間毎の抗体価 (5 匹の平均と標準誤差) を示した。誤差検定を実施したが、42 日後は有意差があることがわかった。また、免疫寛容誘導が起こっていない場合は、図 6 に示すように、PBS 投与群より早く抗体が産生されることから、本研究結果は、多量体 HEL を前投与することによって免疫寛容が誘導されていることを示唆しており、現在の免疫の標準プロトコールでも免疫寛容が誘導されることがわかった。

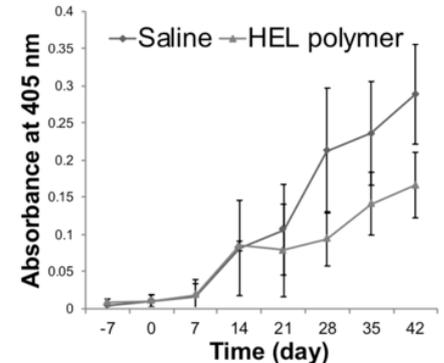


図 2 多量体 HEL 前投与の抗体産生への影響

### (3) 多量体 HEL のマウスでの体内動態の解析

So らは、ポリエチレングリコールで化学修飾した蛋白質を未修飾投与 1 週間前にマウスに前投与すると、未修飾体をマウスに免疫しても、抗体が産生されないことを示した (Protein Eng. 1999 など)。この機構解析から、ポリエチレングリコール修飾蛋白質はマウスの血清中に長時間滞留 (約 3 ケ月) することで、免疫寛容を誘導していることを示唆した (Cell. Mol. Life Sci. 1999)。(2) で観察された免疫寛容誘導の理由は、多量体 HEL がマウスの血清中に長時間滞留することに由来するかどうかを調べるため、多量体 HEL をマウスに投与した後、経時的に採血し、サンドイッチ ELISA 法により、多量体 HEL の濃度を評価した。その際の対照として、PBS を投与した群とした。

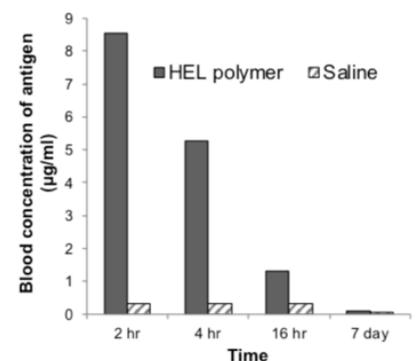


図 3 多量体 HEL の血清中の濃度の経時変化

図 3 から、1 日以内に検出限界以下となることから、多量体 HEL の前投与による免疫寛容誘導の機構として、多量体 HEL が血清中の長時間滞留しているという結果 (ポリエチレングリコール修飾蛋白質の結果) とは異なる機構であることが示唆された。

#### (4) 多量体蛋白質の調製

多量体 HEL をマウスに前投与し、その後アジュバンドと単量体 HEL を混合して免疫すると免疫寛容を誘導する機構として、(3) の結果から血清中に多量体 HEL が長時間滞留するわけではないことがわかった。HEL は総電荷は約 11 の強塩基性蛋白質である。この免疫実験スケジュールで免疫寛容を誘導する理由として、HEL の高い塩基性によるのではないかと考えた。そこで、等電点が酸性である、オボアルブミン、 $\beta$ ラクトグロブリン、等電点が中性付近にあるヒト型抗体の Fab の多量体化を試みた。

##### ① オボアルブミン

オボアルブミンは酸性蛋白質であるが、BS3 が反応するリジン残基は 20 残基含まれている。そこで、研究の方法 (1) に記載した、HEL 多量体を調製した同様の方法により、多量体の調製を試みた。反応液を脱塩、濃縮し、サンプルを非還元状態で SDS-PAGE し、CBB 染色を行い、多量体が生成しているかどうかを評価した。その結果、オボアルブミンよりも分子量が大きなものは生成していなかった (data not shown)。

##### ② $\beta$ ラクトグロブリン

$\beta$ ラクトグロブリンは、酸性蛋白質であるが、オボアルブミンに比べて分子量が小さい (約 18kDa)。HEL (分子量約 14kDa) に比較的近い分子量であるので、総電荷の違いが及ぼす免疫寛容誘導について解析するには都合が良い。しかしながら、 $\beta$ -ラクトグロブリンは中性付近では 2 量体を形成することが報告されている。そこで、BS3 を用いた多量体の形成は、必ずしも有効ではないと判断した。そこで、1) SPDP を用いて、 $\beta$ ラクトグロブリンのリジン残基を修飾する。2) SPDP を酸性条件下 (pH4.5) でジチオスライトールで還元し、遊離のチオールを生成し、SPDP の 2-ピリジルチオ基と交換反応させ、多量体の形成を試みた。研究の方法 (5) に沿って実験し、生成物を Sephadex G-100 カラムにかけ、カラムからの溶出を 280nm でモニターした (図 4A)。溶出フラクション毎の一部を、非還元状態で SDS-PAGE で分析した。その後 CBB で染色した (図 4B)。泳動されていない部分に CBB 染色があるが、フラクション画分 58 から 70 は多量体が生成していることが示唆された。これらのフラクションを凍結乾燥して免疫実験のサンプルとした。

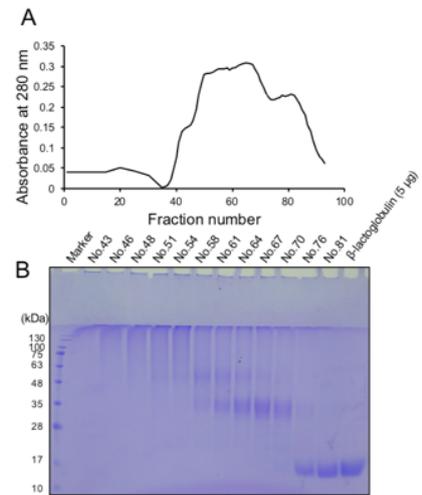


図 4  $\beta$ ラクトグロブリンの多量体化

##### ③ ヒト型 Fab

本研究のゴールは、多量体化蛋白質の生体への前投与による免疫寛容誘導である。特に、不都合な免疫応答 (anti-Drug Antibodies:ADAs など) の抑制ができないかという点である。そこで、抗体の中で中和活性を持つ Fab (ヒト型 Fab) において、その多量体を実験動物に前投与して、免疫寛容を誘導できるかどうかを評価した。

ヒト型 Fab の酵母 (*Pichia pastoris*) の形質転換株は、既に研究室で確立している (Ohkuri ら J. Biochem. 2014)。定法に従い、10 数 L 単位での培養、精製し、約 60mg のヒト型 Fab を得た。研究の方法 (6) に沿って実験し、多量体形成を試みた。生成物を Sephadex G-100 カラムにかけ、カラムからの溶出を 280nm でモニターした (図 5A)。溶出フラクション毎の一部を、非還元状態で SDS-PAGE で分析した。その後 CBB で染色した (図 5B)。フラクション画分 29 から 35 は多量体が生成していることが示唆された。これらのフラクションを凍結乾燥して免疫実験のサンプルとした。

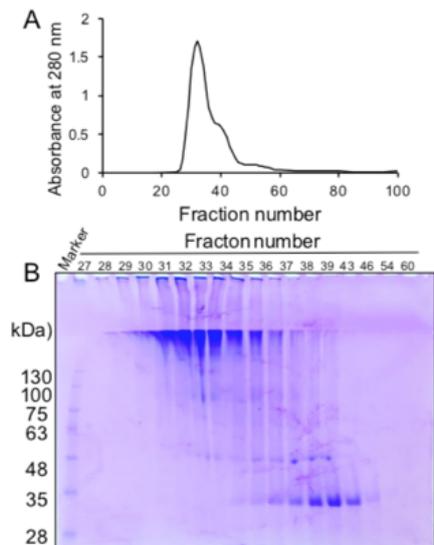


図 5 ヒト型 Fab の多量体化

#### (5) 多量体蛋白質の前投与による抗体産生に与える影響

研究成果（4）で得た、 $\beta$ ラクトグロブリンとヒト型 Fab 1mg を PBS100  $\mu$ L に溶解しマウスに前投与した。1群 5匹で実施した。対照は PBS のみを投与する群とした。それぞれの群ごとに、1週間後にアジュバンドと混合した単量体蛋白質を投与し、1週間毎に単量体蛋白質をマウスに免疫した。1週間毎に採血をし、それぞれの蛋白質単量体に対する抗体価を ELISA の標準プロトコールにて評価した。図 6 に多量体蛋白質前投与群と対照群（PBS のみ）を投与した群の 1週間毎の抗体価（5匹の平均と標準誤差）を示した。いずれも PBS 対照群に比べ、早い日数で抗体価の上昇が観測された。この結果は、いずれの蛋白質においても、単量体投与の前に多量体化蛋白質を前投与しても免疫寛容が誘導されないことがわかった。

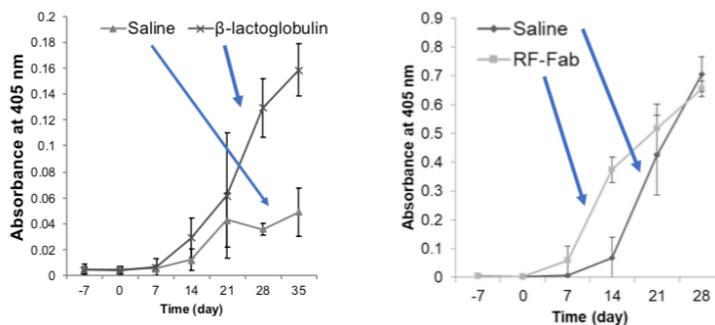


図 6  $\beta$ ラクトグロブリン、ヒト型 Fab の前投与の抗体産生に与える影響

#### (6) 考察

我々の研究室で HEL の多量体を前投与した後、1週間後にアジュバンドと単量体 HEL を混合して免疫すると、HEL 特異的な免疫寛容が誘導されることが示唆されていた。この研究では、現在用いられている、免疫実験の標準プロトコールでもこの結果が再現することがわかった。しかしながら、免疫寛容の誘導は、酸性蛋白質の  $\beta$ ラクトグロブリンや中性蛋白質のヒト型 Fab では起きなかった。研究成果（3）から、多量体 HEL は、マウスへの投与 1 日以内に、血清中から消失することが示唆されたので、ポリエチエングリコールのようにマウス体内滞留することにより免疫寛容を誘導していないことがわかった。

塩基性ペプチドなどは、細胞内へ取り込まれる性質が知られており、多量体 HEL も同様に、なんらかの細胞に取り込まれて、免疫誘導を起こしている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件(うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件)

1. 著者名 Takatoshi Ohkuri, Natsuko Yuge, Kenji Sato, Tadashi Ueda	4. 巻 20
2. 論文標題 A method to induce hen egg lysozyme-specific humoral immune tolerance in mice by pre-exposition with the protein's oligomers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小山浩輔、大栗誉敏、弓削奈津子、植田 正
2. 発表標題 ニワトリリゾチーム多量体前投与による免疫寛容誘導に関する考察
3. 学会等名 第7回生命分子科学研究会(亀岡市)(新型コロナウイルス感染拡大により中止)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宗 孝紀 (So Takanori) (60294964)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授  (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------