

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390264

研究課題名 (和文) 副作用の少ない人工的インターフェロンの開発

研究課題名 (英文) Development of a novel interferon with mild adverse effects

研究代表者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70324762

研究成果の概要：

新規インターフェロン(IFN-zeta/Limitin)は IFN-alpha と同等の免疫調節作用・抗腫瘍作用・抗ウイルス作用を持つものの骨髄抑制作用が軽微である。我々は、受容体結合部位で IFN-alpha や IFN-beta と一致し IFN-zeta/Limitin とは異なるアミノ酸に変異を加え、骨髄抑制作用減弱(m3 変異)・抗ウイルス活性増強 (m1 変異)に関わる責任アミノ酸を決定した。さらに、変異ヒト IFN-alpha1 を作製し、それらの生理活性を野生型 IFN-alpha1 と比較した。ヒト IFN-alpha においても m1、m3 各変異部位が生理活性に影響を及ぼすことが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：インターフェロン、サイトカイン、Limitin、ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

我々は、白血病細胞株増殖を抑制することを指標とした発現クローニングを行い、新規サイトカイン Limitin (EMBL/GenBank/DDBJ: AB024521) を同定した。Limitin は、(1) IFN-alpha や IFN-beta と相同性を有すること (2) IFN-alpha/beta 受容体と結合すること (3) 抗ウイルス作用を有することから、Nomenclature Committee of the International Society for Interferon and Cytokine Research により新種の I 型 IFN で

あると認められ、IFN-zeta と命名された。既に、IFN-zeta/Limitin の生理活性として、(1) 細胞障害性 T リンパ球に対しキラー活性を増強させること (2) 抗原提示細胞に対して MHC class I 抗原発現を誘導すること (3) 多くの細胞株に対して細胞周期停止やアポトーシスを誘導すること (4) マウス脳心筋炎ウイルス・マウス肝炎ウイルス・単純ヘルペスウイルスの感染に対して抗ウイルス作用を示すことなどを明らかにしている。しかし、IFN-zeta/Limitin は、(1) 骨髄球系コロニー

形成 (CFU-GM) や赤芽球系コロニー形成 (BFU-E) には影響せず、長期骨髄培養における骨髄球産生も抑制しない (2) マウスに IFN-alpha を腹腔内投与すると濃度依存性に骨髄中の CFU-GM/M や BFU-E の減少が認められるが、IFN-zeta/Limitin 投与では CFU-GM や BFU-E の減少は認められない (3) B リンパ球コロニー形成や巨核球コロニー形成に対して IFN-alpha と同等の抑制作用を発揮するためにはより大量の IFN-zeta/Limitin が必要であるなど、IFN-zeta/Limitin は IFN-alpha と比較して骨髄抑制作用が軽微であることが、我々の検討により明らかとなっている。即ち、IFN-zeta/Limitin は、IFN-alpha や IFN-beta と同等の免疫調節作用・抗腫瘍作用・抗ウイルス作用を持つものの、骨髄抑制作用が少ないという特徴を有していた。骨髄抑制が少ない点において、IFN 治療に関する副作用軽減や IFN 治療成績の向上が期待できる IFN-zeta/Limitin であるが、残念ながら、そのヒト型遺伝子は未だ同定されていない。そこで我々は、IFN-zeta/Limitin 様ヒト IFN を人工的に開発することに着手した。

2. 研究の目的

IFN 治療における薬理効果と考えられる抗ウイルス活性・抗腫瘍活性・免疫調節作用に関して、IFN-zeta/Limitin は IFN-alpha とほぼ同等の生理活性を示す。一方、副作用と考えられる骨髄抑制作用や発熱惹起作用に関して、IFN-zeta/Limitin は IFN-alpha と比較して著明に減弱している。本研究の目的は、「IFN-zeta/Limitin の作用特性を保持した新しい人工ヒト IFN の開発」することである。我々が開発を進める人工ヒト IFN により副作用の軽減が可能になれば、大量投与や長期投与による IFN 治療成績向上および治療対象患者の拡大などが期待できる。

3. 研究の方法

(1) マウス IFN-alpha のアミノ酸変異部位の決定

IFN-zeta/Limitin は、182 個のアミノ酸残基 (うち 21 アミノ酸残基はシグナルペプチド) からなる分泌糖蛋白であり、5 個の alpha-ヘリックス (A-E) とその間に存在する 4 個のループからなる小球様構造をとる。IFN-zeta/Limitin は、ほぼ全長にわたり IFN-alpha や IFN-beta とアミノ酸レベルで約 30% の相同性が認められ、受容体との結合に重要である領域 (ヘリックス A とヘリックス B の間のループ AB やヘリックス C およびヘリックス D・E 周辺) では特に高い相同性が認められる (図 1)。受容体結合部位に対応するアミノ酸の中で IFN-alpha や IFN-beta と一致し IFN-zeta/Limitin だけが異なるアミ

ノ酸を選びだし、該当する IFN-alpha1 アミノ酸を IFN-zeta/Limitin のものに置換した変異 IFN-alpha1 を作製した。

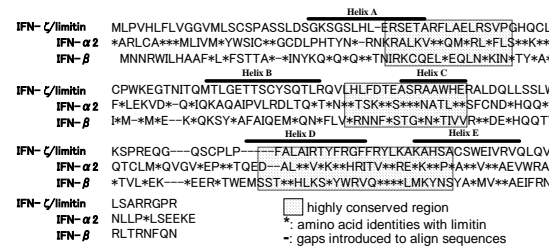


図 1 IFN-gamma/Limitin と IFN-alpha/beta のアミノ酸配列の相同性

(2) アミノ酸変異蛋白の作製

Site-directed mutagenesis の手法で IFN-alpha1 cDNA に置換を加え、変異 IFN-alpha1 cDNA をヒト免疫グロブリン (Ig) との融合蛋白を産生する Ig/pEF-BOS vector に組み込んだ。各変異 IFN-alpha1-Ig を産生するプラスミドを 293T 細胞に遺伝子導入した後に、培養情勢を回収し、proteinA カラムを用いて精製した。

(3) マウス変異 IFN-alpha1 の生理活性の検討

抗ウイルス活性測定：標的細胞として L929 細胞を使用し、マウス脳心筋炎ウイルスに対する感染抑制作用を CPE dye uptake 法にて評価した。

骨髄抑制作用の評価：骨髄球系コロニー形成と赤芽球系コロニー形成に及ぼす影響を比較した。

(4) ヒト IFN-alpha1 における、m1, m3 領域のアミノ酸置換

骨髄抑制作用を減弱させる m3 変異や抗ウイルス作用を増強させる m1 変異に対応するヒト IFN-alpha1 分子内アミノ酸を、マウスとヒト IFN-alpha 間のアミノ酸配列 alignment から決定した。

(5) ヒト変異 IFN-alpha1 の生理活性の検討
抗ウイルス活性測定：標的細胞として MDBK 細胞を使用し、Getah ウイルスに対する感染抑制作用を CPE dye uptake 法にて評価した。骨髄抑制作用の評価：骨髄球系コロニー形成と赤芽球系コロニー形成に及ぼす影響を比較した。

4. 研究成果

(1) マウス IFN-alpha におけるアミノ酸変異による生理活性に及ぼす影響

受容体結合部位 (ループ AB やヘリックス C およびヘリックス D・E 周辺) に対応するアミノ酸の中で IFN-alpha や IFN-beta と一致し IFN-zeta/Limitin だけが異なるアミノ酸を選びだし、該当する IFN-alpha1 アミノ酸を IFN-zeta/Limitin のものに置換した変異 IFN-alpha1 を作製した。作製した 7 つの変異 IFN-alpha1 のうちの 1 つ (m3-IFN-alpha1) は、変異を持たない IFN-alpha1 と同等の抗

ウイルス活性を示すものの骨髄抑制作用（コロニー形成抑制作用）が著明に減弱していた（表1）。また、このような作用特性を示すためには、m3-IFN-alpha1 に含まれる3個のアミノ酸変異全てが必要であることも判明した。m1-IFN-alpha1 は、変異を持たないIFN-alpha1 と比較してより強い抗ウイルス活性を示すとともに同等の骨髄抑制作用を示した。また、このような作用特性を示すためには、m1-IFN-alpha1 に含まれる4個のアミノ酸変異のうち2アミノ酸置換が重要であることも判明した。m6-IFN-alpha1 は、抗ウイルス活性と骨髄抑制作用ともにIFN-alpha1 と比較して部分的に減弱していた。また、他の変異IFN-alpha1 (m2-, m4-, m5-, m7-IFN-alpha1) は、全ての生理活性を消失していた。

表1 変異IFN-α1 (m1-m7)とIFN-α1の生理活性の比較

変異IFN-α1	変異部位(変異数)	IFN-α1活性との比較		
		抗ウイルス活性	コロニー形成抑制	MHC class I誘導
m1-IFN-α1	helixC (4アミノ酸)	亢進	同等	同等
m2-IFN-α1	helixD (3アミノ酸)	消失	消失	消失
m3-IFN-α1	loopDE (3アミノ酸)	同等	著明に減弱	同等
m4-IFN-α1	loopAB (4アミノ酸)	消失	消失	消失
m5-IFN-α1	loopAB (3アミノ酸)	消失	消失	消失
m6-IFN-α1	loopAB (4アミノ酸)	部分的減弱	部分的減弱	部分的減弱
m7-IFN-α1	helixC (5アミノ酸)	消失	消失	消失
m3a-IFN-α1	loopDE (1アミノ酸)	同等	部分的減弱	同等
m3b-IFN-α1	loopDE (1アミノ酸)	同等	部分的減弱	同等
m3c-IFN-α1	loopDE (1アミノ酸)	同等	部分的減弱	同等

(2) m1, m3 領域のアミノ酸置換を持つヒトIFN-alpha1 の作製・精製
マウス m1, m3 各変異部位に対応するヒトIFN-alpha1 分子内のアミノ酸を決定した。各変異ヒトIFN-alpha1 cDNA をヒト免疫グロブリンの融合蛋白を産生する Ig/pEF-BOS

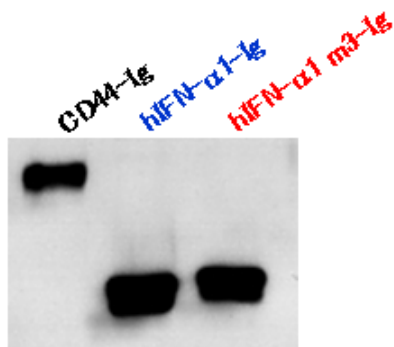


図2 変異ヒトIFN

vector に組み込んだ(hIFN-alpha1 m1-Ig/pEF-BOS と hIFN-alpha1 m3-Ig/pEF-BOS および野生型コントロールとして hIFN-alpha1-Ig/pEF-BOS)。hIFN-alpha1 m1-Ig/pEF-BOS, hIFN-alpha1 m3-Ig/pEF-BOS, hIFN-alpha1-Ig/pEF-BOS を 293T 細胞株に遺伝子導入し、培養上清中に存在する各変異IFN と Ig 融合蛋白を protein A カラムを用い

て精製した。各 Ig 融合蛋白の蛋白量は、SDS-PAGE で電気泳動した後に、抗ヒト Ig 抗体による Western blot にて確認した（図2）。

(3) ヒト IFN-alpha1 上の m1, m3 各アミノ酸変異の影響

①抗ウイルス活性: Getah ウイルスの MDBK 細胞への感染抑制作用に関し、hIFN-alpha1 m3-Ig と hIFN-alpha1-Ig は同等の濃度依存性を示した。一方、hIFN-alpha1 m1-Ig は、hIFN-alpha1-Ig と比較して、約2~3倍の増強した抗ウイルス活性を示した（図3）。

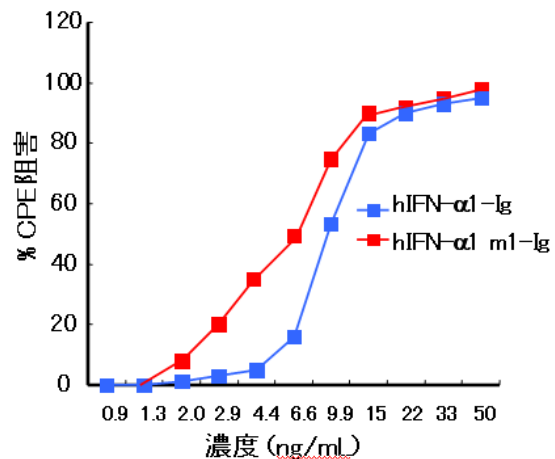


図3 m1変異を持つヒトIFN-α1は抗ウイルス活性が亢進する。

②骨髄抑制作用: 骨髄球系コロニー形成や赤芽球系コロニー形成を抑制する作用に関し、

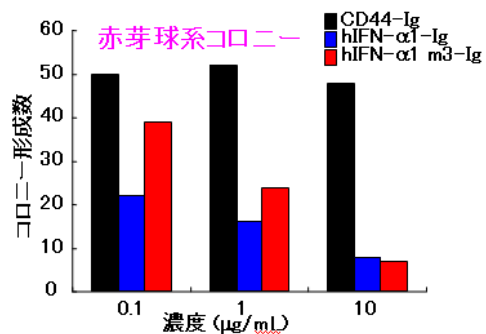
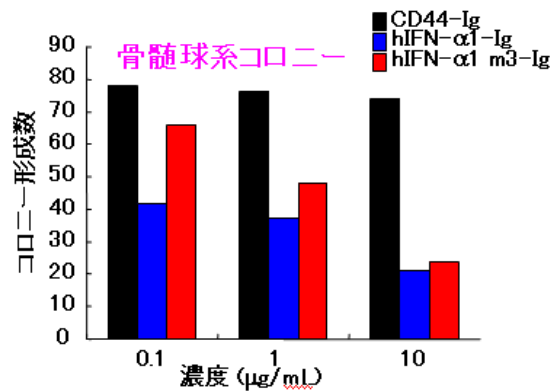


図4 m3変異を持つ変異IFNは骨髄抑制作用が減弱する。hIFN-alpha1 m1-Ig と hIFN-alpha1-Ig は同等の濃度依存性を示した。一方、hIFN-alpha1

m3-Ig は、hIFN-alpha1-Ig と比較して、増強したコロニー形成抑制作用を示した (図4)。

(4) 今後の展望

m1 変異による抗ウイルス作用増強効果がヒト IFN では2~3倍程度であった。マウス IFN において認められた約10倍の増強と比較すると、この抗ウイルス活性増強効果は小さかった。同様に、m3 変異による骨髄抑制作用減弱効果もマウス IFN の結果と比較するとヒト IFN での効果が小さかった。今回は、対応する各アミノ酸を IFN-zeta/Limitin のアミノ酸に置換したヒト IFN を作製した。マウスとヒトでは、アミノ酸置換部位周辺のアミノ酸も微妙に異なっており、置換するアミノ酸を工夫する必要があるのでは、と考えられた。臨床使用時に効果的な生理活性 (抗ウイルス作用増強、骨髄抑制作用減弱) をさらに際立たせるために、現在、m1, m3 各領域周辺のアミノ酸変異を追加し検討している。最終的には、m1 と m3 両変異を持つヒト IFN-alpha1 について解析する予定である。

IFN は、慢性骨髄性白血病・慢性リンパ性白血病・多発性骨髄腫などの悪性血液疾患や腎がん・悪性黒色腫などの固形がんの治療薬として用いられている。また、IFN は、B 型・C 型ウイルス性肝炎はじめ AIDS 関連カポジ肉腫などのウイルス関連疾患の治療薬としても重要である。最近の IFN 治療に関する進展は、PEG 化 IFN やコンセンサス IFN などの強い生理活性を持つ IFN の開発や IFN とリバビリンの併用療法である。しかし、依然として骨髄抑制作用や精神作用などの副作用に関する難題は解決されていない。IFN には骨髄抑制作用が存在するために、時に IFN の減量や中止が必要となる。申請者らが目指すように、IFN による副作用軽減が可能になれば、大量投与や長期投与可能となり治療成績の向上が期待できる。特に、IFN 治療抵抗性を示すジェノタイプの C 型肝炎ウイルスに感染した患者の治療において、申請者らが目指す新しい IFN 治療戦略は有力である。さらに、白血球減少や血小板減少を伴う症例や他の抗腫瘍剤との併用時には、骨髄抑制が少ないことは治療選択や治療安全性において重要である。IFN による骨髄抑制作用を減弱し治療成績向上に貢献しようとする本研究は極めて独創性に飛んだ新しい試みである。

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 12 件)

① Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D,

Kanakura Y: The endothelial antigen ESAM marks hematopoietic stem cells throughout life. Blood, in press (査読: 有)

- ② Muromoto R, Ikeda O, Okabe K, Togi S, Kamitani S, Fujimuro M, Harada S, Oritani K, Matsuda T: Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation. Biochem Biophys Res Commun, in press (査読: 有)
- ③ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, Ezoe S, Saitoh N, Tanigawa R, Kincade PW, Kanakura Y: Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. Exp Hematol 36: 587-597, 2008 (査読: 有)
- ④ Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Satoh Y, Kincade PW, Kanakura Y: Soluble Frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. J Immunol 181: 6061-6072, 2008 (査読: 有)
- ⑤ Ikeda O, Sekine Y, Yasui T, Oritani K, Sugiyama K, Muromoto R, Ohbayashi N, Yoshimura A, Matsuda T: STAP-2 negatively regulates both canonical and noncanonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein 1. Mol Cell Biol 28: 5527-5542, 2008 (査読: 有)
- ⑥ Tsuruma R, Ohbayashi N, Kamitani S, Ikeda O, Sato N, Muromoto R, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T: Physical and functional interactions between STAT3 and KAP1. Oncogene 27: 3054-3059, 2008 (査読: 有)
- ⑦ Murayama Y, Shinomura Y, Oritani K, Miyagawa J, Yoshida H, Nishida M, Katsube F, Shiraga M, Miyazaki T, Nakamoto T, Tsutsui S, Tamura S, Higashiyama S, Shimomura I, Hayashi N: The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. J Cell Physiol 36: 135-143, 2008 (査読: 有)
- ⑧ Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, Kanakura Y: AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in

- hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 283:30045-30056, 2008 (査読:有)
- ⑨ Matsumura I, Mizuki M, Kanakura Y: Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. *Cancer Sci* 99:479-485, 2008 (査読:有)
- ⑩ Masaie H, Oritani K, Yokota T, Takahashi I, Shirogane T, Ujiie H, Ichii M, Saitoh N, Maeda T, Tanigawa R, Oka K, Hoshida Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Adiponectin binds to chemokines via the globular head and modulates interactions between chemokines and heparan sulfates. *Exp Hematol* 35: 947-956, 2007 (査読:有)
- ⑪ Sekine Y, Tsuji S, Ikeda O, Sugiyama K, Oritani K, Shimoda K, Muromoto R, Ohbayashi N, Yoshimura A, Matsuda T: Signal-transducing adaptor protein-2 regulates integrin-mediated T cell adhesion through protein degradation of focal adhesion kinase. *J Immunol* 179: 2397-2407, 2007 (査読:有)
- ⑫ Ikeda O, Sekine Y, Kakisaka M, Tsuji S, Muromoto R, Ohbayashi N, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T: STAP-2 regulates c-Fms/M-CSF receptor signaling in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 931-937, 2007 (査読:有)
- [学会発表] (計 18 件)
- ① Matsumura I: Effects of iron overload on hematopoiesis. The 8th International Porphyrin-Heme Symposium (2008.10.16-17, Shimane, Japan)
- ② Yokota T, Oritani K, Butz S, Kokame K, Kincade PW, Miyata T, Vestweber D, Kanakura Y: The endothelial antigen ESAM marks hematopoietic stem cells throughout life in mice. The American Society of Hematology 50th Annual meeting (2008.12.6-9, San Francisco, USA)
- ③ Ezoe S, Matsumura I, Tanaka H, Satoh Y, Yokota T, Oritani K, Kanakura Y: NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. The American Society of Hematology 50th Annual meeting (2008.12.6-9, San Francisco, USA)
- ④ Satoh Y, Tanaka H, Yokota T, Ezoe S, Oritani K, Kanakura Y: Roles for the AML1/RUNX1 point mutation in the pathogenesis of MDS/AML. The American Society of Hematology 50th Annual meeting (2008.12.6-9, San Francisco, USA)
- ⑤ 横田貴史, 織谷健司, 小亀浩市, 宮田敏行, 金倉 讓: 新規造血幹細胞表面マーカー-ESAM1 の同定 第 6 回幹細胞シンポジウム (2008.5.16-17, 東京)
- ⑥ 川本晋一郎, 織谷健司, 横田貴史, 高橋功, 金倉 讓: NUP98-HOXA10 および Meis1 の共発現によるマウス ES 由来血液細胞の白血病化モデル 第 70 回日本血液学会総会 (2008.10.10-12, 京都)
- ⑦ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Takahashi I, Shirogane T, Saitoh N, Tanigawa R, Kanakura Y: Regulation by the TGF β superfamily of human B lymphopoiesis by in a newly established lymphocyte culture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. The 12th Congress of the European Hematology Association (2007.6.7-10, Vienna, Austria)
- ⑧ Tanaka H, Matsumura I, Itoh K, Nakahata T, Kanakura Y: Wnt/beta-catenin pathway modulates multipotency of hematopoietic stem/progenitor cells regulating the activity of various essential transcription factors. The 12th Congress of the European Hematology Association (2007.6.7-10, Vienna, Austria)
- ⑨ Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Matsumura I, Kincade PW, Kanakura Y: SFRP1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. American Society of Hematology 49th Annual meeting (2007.12.8-11, Atlanta, USA)
- ⑩ Ichii M, Oritani K, Yokota T, Takahashi I, Shirogane T, Saitoh N, Tanigawa R, Kasai S, Kanakura Y: Establishment of stroma-free cultures for human B lymphopoiesis: Roles of high cell density condition and mesenchymal stem cell-secreted factors. American Society of Hematology 49th Annual meeting (2007.12.8-11, Atlanta, USA)

- ⑪ 佐藤友亮, 松村 到, 江副幸子, 織谷健司, 金倉 讓: 骨髄異形成症候群における E2F1 の役割 第 104 回日本内科学会総会 (2007. 4. 3-5, 大阪)
- ⑫ 横田貴史, 織谷健司, Paul W. Kincaide, 高橋 功, 一井倫子, 松村 到, 金倉 讓: Estrogen が誘導する骨髄間質細胞分泌蛋白 sFRP1 はリンパ球初期分化を負に制御する 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜)
- ⑬ 一井倫子, 織谷健司, 横田貴史, 高橋功, 白銀隆宏, 齋藤則充, 松村 到, 金倉 讓: ヒト CD34 陽性細胞からの B リンパ球産生: ストローマ細胞非存在下での培養系の確立と支持因子の性状解析 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜)
- ⑭ 江副幸子, 松村 到, 徳永正浩, 安見正人, 田中宏和, 織谷健司, 金倉 讓: 造血幹細胞の増殖・分化におけるエネルギー代謝制御 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜)
- ⑮ 佐藤友亮, 松村 到, 江副幸子, 織谷健司, 金倉 讓: 骨髄異形成症候群における E2F1 の役割 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜)
- ⑯ 福島健太郎, 松村 到, 江副幸子, 佐藤友亮, 水木満佐央, 田中宏和, 織谷健司, 金倉 讓: 腫瘍性チロシンキナーゼによる病型決定機構:FIP1L1/PDGFR α による好酸球系細胞への選択的誘導 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜)
- ⑰ Yokota T, Oritani K, Kouro T, Ichii M, Kincaide PW, Kanakura Y: SFRP1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. 第 37 回日本免疫学会総会 (2007. 11. 20-22, 東京)
- ⑱ 一井倫子, 織谷健司, 横田貴史, 金倉 讓: ストローマ非依存性ヒト B リンパ球培養には細胞密度が重要である 第 37 回日本免疫学会総会 (2007. 11. 20-22, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)
大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 70324762

(2) 研究分担者

金倉 讓 (KANAKURA YUZURU)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20177489
松村 到 (MATSUMURA ITARU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 00294083
横田 貴史 (YOKOTA TAKAHUMI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 60403200

(3) 連携研究者

なし