

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号： 35413

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009~2011

課題番号： 21591651

研究課題名 (和文)

IL10-GCSF 融合蛋白の開発による活性化好中球選択的なアポトーシス誘導

研究課題名 (英文)

Induction of activated leukocyte-selective apoptosis by the fusion protein IL10-GCSF

研究代表者

速水 啓介 (HAYAMIZU KEISUKE)

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号： 50363049

研究成果の概要 (和文)：

活性化好中球に対するアポトーシス促進作用を示すインターロイキン 10 (IL10) と半減期が比較的長く高率に好中球に結合する顆粒球コロニー刺激因子 (GCSF) の性質を活かした融合蛋白を遺伝子工学的的手法により作成することで、IL10 の生体内半減期の延長と好中球への効率的な作用を実現することを目的とした。ヒト GCSF cDNA クローンおよび RT-PCR により調整したヒト IL10 cDNA を用い、大腸菌株 DH5 α をコンピテントセルとしてプラスミド pSP73 の MCS 上でサブクローニングを進めた。variant 1 GCSF を作成した後に、サイト III 変異による拮抗型 GCSF を作成した。また、ヘリックス D と E に介在するヒンジ部分遺伝子を inverse PCR で延長することで、安定した構造で生理活性を有する IL10 モノマー (IL10M) の cDNA を得た。これらとリンカーから、野生型 IL10、IL10M、野生型 GCSF-IL10M 融合蛋白、拮抗型 GCSF-IL10M 融合蛋白をコードしたプラスミドを作成した。無細胞系蛋白翻訳システムを用いて蛋白を合成し、GCSF および IL10 に対する抗体を用いたサンドイッチ法による ELISA により、両方のエピトープが検出される融合蛋白を選択した。蛍光標識抗 IL10 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、作製した融合蛋白にヒト好中球への結合性が認められた。野生型 IL10 と IL10M の LPS 刺激白血球における TNF α 分泌抑制能は 80% 以上で同等であり、融合蛋白ではその 2/3 程度であった。IL12 の分泌抑制能はいずれも 90% 以上で同等であった。本研究により、GCSF とモノマー化した IL10 で構成された融合蛋白が好中球結合能を持ち、白血球からの炎症性サイトカイン分泌を抑制することが実証され、新たな抗炎症薬となりうる可能性が強く示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

I genetically synthesized the fusion proteins of interleukin 10 (IL10) which facilitates apoptosis of the activated neutrophils and granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) which highly binds neutrophils and is retained with longer half-lives in blood. cDNA of a human GCSF clone and that of human IL10 prepared from a volunteer by RT-PCR were subcloned into the plasmid pSP73 and propagated in DH5 α as competent cells. The cDNA of antagonistic GCSF was synthesized by mutation at the site III, and that of IL10 was monomerized by elongation of the hinge between the helix D and E. I designed cDNAs of such wild-type IL10, monomerized IL10 (IL10M), a fusion protein of wild-type GCSF and IL10M, and a fusion protein of antagonistic GCSF and IL10M, then translated them using a cell-free protein synthesis system. Sandwich ELISA with antibodies to IL10 and GCSF detected both epitopes on those synthesized fusion proteins. Flow cytometry using an anti-IL10 antibody demonstrated binding of the fusion proteins to human leukocytes. The wild-type IL10 and IL10M strongly suppressed production of inflammatory cytokines as IL12 and TNF α by LPS-stimulated leukocytes, and the degree of IL12 suppression by the fusion proteins was comparable to the IL10s. These results strongly suggest that the synthesized fusion proteins of IL10M and GCSF are promising candidates for new anti-inflammatory drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：サイトカイン、融合蛋白、アポトーシス、炎症、好中球、GCSF、IL10、DIC

1. 研究開始当初の背景

外科領域において、全身性炎症反応症候群(SIRS)から播種性血管内凝固症候群(DIC)を発症し、多臓器不全により死に至る過程は、手術侵襲、ARDS、敗血症、熱傷に共通する重大な問題として治療法の開発が強く望まれている。DICの共通病態は細小血管内に形成された微小血栓による臓器の機能不全である。SIRSの段階でのマクロファージによる炎症性サイトカインの分泌、および好中球による好中球エラスターゼや活性酸素の放出に伴う血管内皮細胞の障害がDICの誘因として広く認められている。我々はインターロイキン10(IL10)のみでなく顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)も単球とマクロファージの細胞表面レセプターに結合し転写因子Stat3を介して炎症性サイトカインの産生を抑制することを動物実験モデル(心移植、炎症性腸疾患、劇症肝炎、ARDS)を用いて実証してきた。

抑制作用はIL10の方がGCSFよりも強力であるが、IL10の生体内半減期は1時間未満とGCSFよりも短い。GCSFレセプターは好中球に高発現しており、末梢血中ではGCSFは選択的に好中球に結合する。一方、循環血液中の好中球はリンパ球や単球と異なりIL10レセプターを発現していないが、LPS刺激後にこれを表出しIL10シグナルを細胞内に伝達するようになる(Crepaldi L, et al. J Immunol 167:2312-22, 2001)。LPS刺激により好中球のアポトーシスは抑制されるが、IL10はこの効果を阻害して好中球に細胞死を誘導する(Ward C, et al. Eur J Immunol 35:2728-2737, 2005)。

IL10には獲得免疫における抗原提示細胞やTh1細胞の機能抑制作用が知られており、臓器移植(Tashiro H, et al. Transplantation 70:336-9, 2000)や自己免疫疾患(Barbara G, et al. Gut 46:344-9, 2000)での慢性炎症における免疫抑制作用が遺伝子導入技術を用い

た動物実験で我々を含む研究者により確認されている。しかしながら、急性炎症を発症後に遺伝子導入により制御することは事実上不可能であり、IL10による好中球アポトーシス誘導を応用したin vivoでの急性炎症制御の報告は未だみられない。

IL10はホモ二量体として生理活性を示すが複雑なintertwining構造であるため融合蛋白開発には極めて不利となる。しかし、ドメイン・スワッピングを応用したモノマー化IL10が生理活性を保持することが報告されているので(Josephson K, et al. J Biol Chem 275:13552-7, 2000)、これを応用して融合蛋白の構造を単純化するとともに安定化させることが可能であると思われる。

IL10とは対照的に、GCSFは好中球のアポトーシス制御作用を有している(Hareng L, et al. J Biol Chem 383:1501-1517, 2002)。GCSFは細胞表面のGCSFレセプターとまずサイトIIで結合し、次いで他の1:1複合体とサイトIIIで結合して2:2複合体を形成して初めて細胞内にシグナル伝達が可能となるため(Layton JE, et al. J Biol Chem 276:36779-87, 2001)、サイトIII変異GCSFはレセプターに結合するがシグナル伝達をしない拮抗型GCSFとなることが予想される。活性化好中球におけるIL10レセプターの発現誘導とは対照的に、放出される好中球エラスターゼによりGCSFとGCSFレセプターは分解されるが(Ouriaghli FL, et al. Blood 101:1752-8, 2003)、これらは合理的なフィードバック機構と考えられる。

2. 研究の目的

強力な抗炎症性サイトカインであるIL10をSIRS-DIC治療に臨床応用するためには、(1)IL10の生体内半減期の延長、および、(2)IL10の好中球への効率的作用を検討する必要がある。本研究では、活性化好中球に対するアポトーシス促進作用を示すIL10と

半減期が比較的長く高率に好中球に結合する GCSF の性質を活かした融合蛋白を遺伝子工学的的手法により作成することで上記の 2 つの問題の同時解決を図る。

IL10 と GCSF の融合蛋白を開発するに際して下記の 3 点の改良を加えることにより、好中球に対し GCSF と拮抗的に結合し IL10 を炎症部位に運搬し、そこで安定した生理機能を保持した IL10 を遊離することで、活性化した好中球のみを細胞死に至らせる「拮抗型 GCSF とモノマー化 IL10 の融合蛋白を開発し、好中球制御における有効性のみでなく、活性化好中球選択性を基盤とした安全性に關しても当該薬剤の優位性を確保する。

【改良点 1】IL10 の機能的モノマー化：融合蛋白の IL10 部分の IL10 レセプターへの結合サイトの確保、および NE による融合蛋白分解に対抗する構造安定化のために、intertwining 型のホモ二量体として生理活性を示す IL10 を機能温存しつつモノマー化した IL10 (IL10M) を遺伝子工学的に作製する。

【改良点 2】拮抗型 GCSF の作製：GCSF は IL10 とは逆に好中球をアポトーシスから保護する作用を持つため、GCSF レセプターへの結合のみ可能であり細胞内にシグナルを伝達しない拮抗型 GCSF (GCSFa) を遺伝子工学的に作製し、融合蛋白の GCSF 部分として使用する。

【改良点 3】リンカーの NE に対する感受性：GCSF 部分と IL10 部分のリンカーに活性化好中球から分泌される蛋白分解酵素 NE で切断可能な配列を挿入し炎症部位において IL10 部分が遊離するように工夫して、オートクライン様の好中球制御およびパラクライン様のマクロファージ制御を可能とする。

3. 研究の方法

拮抗型 GCSF とモノマー化 IL10 の融合蛋白 (GCSFa-IL10M) の遺伝子を組込んだプラスミドを作製し、合成した蛋白の機能判定によるスクリーニングを行った。GCSFa-IL10M の好中球結合能および好中球アポトーシス促進能を確認した。

ヒト GCSF variant 2 cDNA クローン (IMAGE 5759022) を Invitrogen 社から購入した。ヒト IL10 cDNA については、LPS 刺激ヒト白血球から抽出した RNA を逆転写して得た cDNA から制限酵素サイトを組み込んだプライマーを用いて PCR により増幅した。大腸菌株 DH5 α をコンピテントセルとしてプラスミド pSP73 の MCS 上でサブクローニングした。シーケンシングは外注とした。融合蛋白の基本構造は、N 端：[c-Myc タグ]-[GCSF]-[リンカー]-[IL10]-[HA タグ]；C 端とした。S-S 結合形成用無細胞系蛋白翻訳システム (RTS 100 E. coli Disulfide Kit) を用いて必要量の融合

蛋白を合成し簡易精製した。融合蛋白上の GCSF および IL10 のエピトープ検出は ELISA キットにより行い GCSF と IL10 のモル比が 1 に近いものを選択した。ヒト好中球への結合能は合成蛋白と白血球をインキュベートした後に蛍光ラベルした抗 IL10 抗体、抗 GCSF 抗体および抗サブセット抗体で染色しフローサイトメトリーで多色解析した。生理活性についてはヒト白血球を LPS 刺激した際の TNF α および IL12 蛋白分泌を ELISA で定量しその抑制能を検討した。

4. 研究成果

(1) IL10 の機能的モノマー化

5 アミノ酸から成るリンカーで連結された野生型 GCSF と野生型 IL10 の融合蛋白から GCSF および IL10 に対する抗体を用いたサンドイッチ法による ELISA では、GCSF エピトープは検出できたが IL10 エピトープは十分に検出できなかった。また、LPS 刺激ヒト白血球からのサイトカイン分泌抑制能は IL10 には及ばなかった。

次いで、リンカーを 34 アミノ酸まで延長し、さらに IL10 部分のモノマー化により機能的な融合蛋白を開発した。モノマー化については、Josephson らの方法を基本としヘリックス D と E に介在するヒンジ部分遺伝子を inverse PCR で延長することで、凍結融解に対して安定した構造の IL10M を得た。GCSF および IL10 に対する抗体を用いたサンドイッチ法による ELISA により、GCSF と IL10M の融合蛋白には両方のエピトープが検出された。

(2) 拮抗型 GCSF の作製

好中球アポトーシス誘導能を達成するために、GCSF の好中球への結合能のみ残りシグナル伝達によるアポトーシス抑制作用を除去するためにサイト III 変異により拮抗型 GCSF をデザインした。サイト II およびサイト III の変異導入については、GCSF-IL10M 融合蛋白遺伝子の野生型 GCSF 部分に E20A および E47A に相当する点変異を inverse PCR により挿入した。無細胞系蛋白翻訳システムを用いて蛋白を合成した。

以上の遺伝子操作により、炎症制御薬の候補として次の 4 つが作製できた。

- 【1】野生型 IL10
- 【2】IL10M
- 【3】野生型 GCSF-IL10M 融合蛋白
- 【4】拮抗型 GCSF-IL10M 融合蛋白 (GCSFa-IL10M)

(3) GCSFa-IL10M 融合蛋白の好中球結合能の検討

蛍光標識抗 IL10 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、未刺激のヒト好中球への結合性を検討したが、上記の 4 つの蛋白のう

ちで【3】と【4】でのみ有意な結合が確認された。

(4) GCSFa-IL10M 融合蛋白の炎症性サイトカイン抑制能における他の合成蛋白に対する優位性の検討

IL10 単位モル当たりのLPS 刺激後のヒト白血球からの炎症性サイトカイン (TNF α および IL12) 分泌の抑制効果を比較した。【1】と【2】の TNF α 分泌抑制能は 80% で同等であり、【3】と【4】ではその 2/3 程度であった。IL12 の分泌抑制能はどれも 90% 以上で同等であった。

以上より、GCSF とモノマー化した IL10 から成る融合蛋白が好中球結合能を持ち、白血球からの炎症性サイトカイン分泌を抑制することが本研究で証明された。拮抗型 GCSF-IL10M 融合蛋白の優位性については、今後、白血球のアポトーシス誘導や生体内半減期の延長などにより、さらに検討されるべきであると考えます。

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)

Matsumoto T, Hayamizu K, Marubayashi S, et al. Relationship between the cAMP levels in leukocytes and the cytokine balance in patients surviving gram negative bacterial pneumonia. Journal of Biochemistry and Nutrition 48:134-141, 2011

Yamaguchi T, Miyata Y, Hayamizu K, et al. Preventive effect of G-CSF on acute lung injury via alveolar macrophage regulation. Journal of Surgical Research 2012

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

速水 啓介 (HAYAMIZU KEISUKE)

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50363049

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし