

## 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 5 月 21 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790180

研究課題名（和文） 機能改変型サイトカインを用いた免疫誘導療法の開発

研究課題名（英文） Development of Immunomodulatory Cytokine mutants.

研究代表者

阿部 康弘 (ABE YASUHIRO)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部バイオ創薬プロジェクト・研究員

研究者番号：20509898

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫応答制御に重要な役割を担う I 型インターフェロン（IFN）に着目し、それらの免疫誘導機序の解析や機能改変型 IFN の創製を通じて、免疫誘導療法の最適化を試みた。まず、独自に作製した構造変異 IFN 提示ファージライブラリを用いて、結合力に基づくセレクションを行った。スクリーニングの結果、抗ウイルス活性に優れた IFN 変異体を単離・同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Type I interferons (IFNs) are pleiotropic cytokines that elicit antiviral and antiproliferative responses. In this study, we attempted to create a mutant IFN with higher anti-viral activity. At first, we constructed a phage library displaying IFN mutants. The phage library was performed to several rounds of panning to concentrate mutant IFN with high affinity to IFN receptor. As the results, some candidates exhibited higher affinity and anti-viral activity compare to wild type IFN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：免疫誘導療法、ファージ表面提示法、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトには本来、外部から侵入した異物を排除して生体を守る免疫システムが備わっているが、一端、免疫バランスに破綻が生じると、感染症や自己免疫疾患など様々な疾患を引き起こすことが知られている。近年、これら免疫疾患の克服に向けて、免疫を正負に自由自在に制御し、免疫応答のバランスを是正し得る“Immuno-modulator”の開発が待望されている。

本観点から我々は、既に蛋白性医薬品として上市され、安全性の点で優れた実績を持つサイトカインに着目し、その粘膜免疫制御薬としての有用性を評価してきた。たとえば、これまでの研究から、腫瘍壊死因子（TNF）を鼻粘膜ワクチンアジュバントとして適用すると、神経毒性や炎症反応といった副作用を呈することなく、効率よく鼻粘膜局所、遠隔の粘膜面および全身免疫を誘導しうることを見出している。しかし一方で、TNF をは

はじめ、多くのサイトカインは複数のレセプターサブタイプを介して、多様な生物活性を發揮してしまうため、投与した際には、目的とする作用以外の他の作用に起因した副作用を招くことが懸念される。そのため、安全かつ有効な“Immuno-modulator”を開発するためには、生物活性の増強やレセプターサブタイプ指向性など新たな機能を付与した機能改変サイトカインの開発が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、免疫応答制御の根幹を担う I 型インターフェロン (IFN) に着目し、それらの免疫誘導機序の解析や独自の機能性人工蛋白質創製システムを駆使した機能改変型サイトカインの創製を通じて、新規“Immuno-modulator”の開発を図ることを目的とする。

IFN は古くから生物学的製剤として利用され、さらに今後の適用拡大も期待されているサイトカインである。しかし一方で、医薬品としての IFN が限定的な作用や大量頻回投与等による副作用のような、多くの問題を抱えていることも事実である。こうした問題を解決するために、他剤との併用や、PEG 化といった分子化学的修飾などが試みられてきた。このようなアプローチは今後さらに発展していくものと思われるが、最大の問題はこうした副作用を含めた IFN $\alpha$  の生理作用の発現機構が、いまだ多く謎に包まれていることである。この生理作用発現機構を明らかにし、制御することができれば、主作用を増強し、副作用を減弱した、医薬品としての価値を劇的に向上させた IFN 製剤の開発も可能になると期待される。

これら各種 IFN を含むサイトカインは、特定のレセプターと結合し、複雑なシグナル伝達経路を経て、その生理作用を發揮する。IFN $\alpha$  のレセプターは IFNAR と称され、IFN $\alpha$  の各サブタイプはもちろん I 型 IFN 全てがこのレセプターを共有するというユニークな特徴を持つ。IFNAR は IFNAR1、IFNAR2 という 2 つのサブユニットから構成されている。IFNAR1 と IFNAR2 には I 型 IFN に対する結合力の点で大きな違いがあり、IFN $\alpha$  2 に対しては 760 倍、IFN $\alpha$  8 に対しては 100 倍、IFNAR2 は IFNAR1 よりも強い結合力を示す。そのため、I 型 IFN はまず IFNAR2 に補足され、その後 IFNAR1 が動員されることでシグナルが伝えられると考えられている。IFNAR1 と IFNAR2 が協同して働いていることが、IFNAR1 ノックアウトマウスは IFN に対し全く反応しないという事実から確かめられている。このように IFN $\alpha$  2 と IFN $\alpha$  8 は異なるレセプター結合特性を有し、共通のレセプターを共有しているにも関わらず異なる生理作用を示す

ことが、IFN $\alpha$  2 と比較して IFN $\alpha$  8 の方がより高い抗ウイルス活性を持つことが報告されている。

以上の報告は、IFN の両 IFN レセプターに対する結合力とその生理活性との連関を明らかにすることができれば、IFN の作用を自在に制御することができ、さらには有用な IFN 製剤の開発につながることを示唆している。そこで本研究では、“Immuno-modulator”開発パイロットスタディとして、抗ウイルス活性の増強した機能改変 IFN $\alpha$  8 の創製を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) インターフェロン改変ライブラリの構築

以下に示す PCR によって、IFN $\alpha$  8 の 26、27、145、146、149 番目の計 5 箇所のアミノ酸をコードするコドンで 20 種類全てのアミノ酸をコードするランダムな配列、NNS 配列 (N: A/T/G/C, S: G/C) に置換したライブラリを作製した。まず、KOD-plus DNA Polymerase (TOYOBO)、IFN $\alpha$  8 - NNS (26, 27) - Forward (5' - CCG GCC ATG GCC ATG TGT GAT CTG CCT CAG ACT CAC AGC CTG GGT AAC AGG GGA GCT CTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG CGA AGA ATC TCT NNS NNS TCC TGC CTG AAG GA -3') および IFN $\alpha$  8 - NNS (145, 146, 149) - Reverse (5' - A GTC TGC GGC CGC GGA TCC ACC ACC ACC TTC CTT ACT CTT CAA TCT TTT TTG CAA GTT GAT TGA TAA AGA GAA AGA TCT SNN GAT TTC SNN SNN GAC AAC CTC CCA GGC -3') を用い、95°C 1 分、65°C 1 分、68°C 1 分の PCR を 35 サイクル行った。得られた PCR 産物は、Nco I および Not I (TOYOBO) で制限酵素処理し、pCANTAB を改変した pY03' phagemid vector へとライゲーションした。予め滅菌精製水で洗浄しておいた 10% グリセロール含有大腸菌 TG1 株 (Stratagene) に対し、先ほどの遺伝子ライブラリを混合し、Gene purser II (Bio-Rad) を用い、2.5 kV、0.25  $\mu$ F でエレクトロポレーションを行った。その後、2% グルコース含有 2YT 培地 (Invitrogen) を添加し、1 時間、37°C、250 rpm で振盪培養した。エレクトロポレーション後のサンプルから 50  $\mu$ L を取って 10 倍希釈で段階希釈し、各段階のサンプル 450  $\mu$ L に対して 800  $\mu$ L の 50  $\mu$ g/mL ampicillin (Sigma-Aldrich)、2% グルコース含有 2YT 培地を添加し、ペトリフィルム TM 培地 (3M) に播種、一晚培養し、得られたコロニー数からライブラリサイズを概算した。ライブラリサイズの算出は、10 の n 乗希釈したところで計数したコロニー数 m から、ライブラリサイズ =  $m \times 1000 / 50 \times 500 / 450 \times 10^n / 10$  CFU/mL として計算した。

### (2) 構造変異 IFN $\alpha$ 8 提示ファージライブラリの作製

(1)で作製した大腸菌グリセロールストックを、37°C の 50  $\mu\text{g/mL}$  ampicillin、2% グルコース含有 2YT 培地へと添加し、37°C、250 rpm で  $\text{OD}_{600}=0.3-0.6$  になるまで振盪培養した。培養液に対し、M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、37°C、110 rpm、30 分間、次いで、37°C、250 rpm、30 分間培養した後、1700 x g で 15 分間遠心し、得られたペレットに対し 50  $\mu\text{g/mL}$  ampicillin、100  $\mu\text{g/mL}$  kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養することで、ファージを産生させた。次いで、ファージ粒子を含む TG1 培養液を 4°C、1,700 x g、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 20,000 x g で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-8,000 (Wako)、2.5 M NaCl (Wako) を溶液の 1/5 volume 量加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。次いで 20,000 x g で 15 分間遠心して得られたファージペレットを NTE Buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、精製ファージ溶液とした。

### (3) IFNAR2 に対するパンニング

IFNAR2 を固相化したイムノプレートに 25% glycerol 含有 4% Block Ace (大日本住友製薬) を 300  $\mu\text{L}$  添加し、37°C で 2 時間ブロッキングした。構造変異 IFN $\alpha$ 8 提示ファージライブラリ溶液に終濃度 0.8 $\cdot$  になるように Block Ace を混合し、4°C で 1 時間静置することでブロッキングした。ブロッキング液を捨て、PBS 300  $\mu\text{L}/\text{well}$  で 1 回洗浄後、ファージ溶液を添加し、4°C で 1 時間、静置した。添加後残ったファージはインプットファージ溶液として再度 TG1 に感染させた。添加したファージ溶液を捨て、0.05% Tween 含有 PBS (以下 PBST) 300  $\mu\text{L}/\text{well}$  で 3 回洗浄することで、非特異的に吸着したファージを除去した。10 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 150  $\mu\text{L}$  添加し、4°C で 10 分静置した。glycine-HCl 溶出液を回収し、75  $\mu\text{L}$  の Tris-HCl buffer (pH 8.0) に加え中和した。この溶液をアウトプットファージ溶液とした。インプット、アウトプットファージ溶液ともに 2% glucose 含有 2YT 培地を 450  $\mu\text{L}$  添加し、その 50  $\mu\text{L}$  を用いてタイターチェックを行った。残りのファージ溶液は再度、TG1 に感染、増幅させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、同様の操作により 2nd~4th パンニングを行った。

### (4) IFNAR2 に対する結合力の評価

Goat anti-human IgG Fc (Cappel) (以下 aFc) を B buffer で 1  $\mu\text{g/mL}$  に希釈し、96 穴イムノプレートに 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、一晚 4°C で静置して固相した。aFLAG も同様に 2.5  $\mu\text{g/mL}$  に希釈し、固相した。aFc を固相化したウェルのうち半数のウェルに

0.4% Block Ace で 0.2  $\mu\text{g/mL}$  に希釈した IFNAR2-Fc を添加し、室温で 2 時間反応させた。PBS で 1 回洗浄後、4% Block Ace-25% glycerol を 300  $\mu\text{L}/\text{well}$  加えて 4°C で 8 時間ブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、Block Ace を終濃度が 0.4% になるように添加したファージ溶液を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、室温で 2 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄操作を行った後、0.4% Block Ace-2.5% glycerol で 1000 倍に希釈した Biotinylation anti-M13 (g8p) (PROGEN) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加した。室温で 2 時間反応後、同様の洗浄操作を行い、0.4% Block Ace + 2.5% glycerol で 1000 倍に希釈した Streptavidin/HRP (Invitrogen) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、さらに 1 時間反応させた。同様の洗浄操作を行い、基質溶液 (TMBZ) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加し反応停止を行った。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。

### (5) 抗シンドビスウイルス活性の評価

5% FCS を含む E-MEM medium で継代培養した FL5-1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調整し、96 穴平底プレート (NUNC) に 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加して、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 48 時間前培養を行った。各ファージを前述の Medium で希釈し、細胞プレートに 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加した。18 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した後、上清を吸引し、10mM HEPES (Invitrogen) および E-MEM 培地で 10 倍希釈したシンドビスウイルス培養上清液を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加した。22 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した後、生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク) を添加し、30 分、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で静置後、培養液の吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) をマイクロプレートリーダーで測定することで、細胞の生存率を判定した。

## 4. 研究成果

### (1) 構造変異 IFN $\alpha$ 8 提示ファージライブラリの作製

IFNAR に対し、多様な結合バランスを有する複数の構造変異 IFN $\alpha$ 8 を創製するために、点突然変異解析や立体構造解析から IFNAR2 との結合に重要といわれてきた複数のアミノ酸を、一挙かつ同時に他のアミノ酸へ網羅的置換した構造変異 IFN $\alpha$ 8 発現遺伝子ライブラリを設計した。過去の検討では、1 個もしくはせいぜい数個のアミノ酸を特定のアミノ酸 1 種もしくは数種に置換した構造変異 IFN $\alpha$  が作製されてきたに過ぎないが、IFN $\alpha$ 8 中の 5 個のアミノ酸を他の 20 種類のアミノ酸へ一挙かつ同時置換した場合、その理論的多様性 (ライブラリサイズ) は実に 20<sup>5</sup>

(3.2×10<sup>6</sup>種類)となる。このライブラリサイズを達成する構造変異 IFN $\alpha$ 8 ライブラリを構築することを目標に、標的とするアミノ酸に対応するコドン、20種類のアミノ酸をコードする NNS 配列(N; G, C, A, Tに相当; S; G, Cに相当)に置換し、PCR断片をファージミドベクターに組み込んだ。このベクターを用いて大腸菌 TG1 を形質転換した後、作製したライブラリのサイズを評価したところ、2.1×10<sup>8</sup> 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おり、独立したクローンで構成されたライブラリであることが確認された。

## (2)パンニングによる IFNAR2 結合性クローンの濃縮

ファージ表面提示法を駆使して目的に合う構造変異体を創製するうえで最も重要なポイントは、膨大な構造変異体ライブラリの中から目的機能を有した機能性人工蛋白質を如何に選択・同定するかということにある。即ち、膨大な構造変異体の多くは標的分子に対する結合力を失っていると考えられるため、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目的とする機能性人工蛋白質を提示したファージ集団を効率よく選別するためには、標的分子に対し結合力を有する分子を単離する方法（パンニング）が必要となる。パンニングとは、固定化された標的蛋白質に対してファージライブラリを添加し、結合性を有するクローンのみを大腸菌に感染させ、増幅するというステップを繰り返す手法である。

そこで、作製した構造変異 IFN $\alpha$ 8 提示ファージライブラリを用いて、IFNAR2 に対してパンニング操作を4回繰り返し行った。パンニングの濃縮率の指標である ratio を算出したところ、1回目のパンニング時に比べ、2回目のパンニング時で52倍、3回目のパンニング時で180倍、4回目のパンニング時は233倍と大きく上昇していた。続いて、実際に IFNAR2 親和性ファージが濃縮されているかを確認するため、パンニングを行う前のライブラリ (Input) および各パンニングラウンド終了後のライブラリから、ランダムに単クローン化したクローンの IFNAR2 親和性を ELISA により評価した。その結果、パンニングを繰り返すにつれて、wtIFN $\alpha$ 8 と同等以上の IFNAR2 親和性を示すクローン数が増大しており、パンニングにより効率よく濃縮されていることが判明した。

## (3)機能改変型 IFN $\alpha$ 8 のスクリーニング

本研究において使用しているファージミ

ドベクターは、ファージ外殻蛋白質 g3p との融合蛋白質としてターゲット分子と相互作用可能かつ生物活性を保持した状態で提示できるという利点を有している。従って、パンニング後に回収したファージ集団を大腸菌 TG1 に再度感染させた後、個々のコロニーをピックアップすることでモノクローン化し、96穴プレートを用いた ELISA や Bioassay により、個々クローンのレセプター結合性や機能性 (活性) をハイスループット・スクリーニングすることが可能となる。

そこで、ELISA によるスクリーニングで IFNAR2 結合親和性が認められたファージクローンについて、生物活性をシンドビスウイルスに対する抗ウイルス活性を指標に評価した。シンドビスウイルスはトガウイルス科 アルファウイルス属の RNA ウイルスであり、水疱性口内炎ウイルスと並んで、IFN $\alpha$  の代表的な生理作用である抗ウイルス活性を評価するために一般的に利用されるウイルスである。本実験では IFN $\alpha$  をヒト由来細胞に前処理することで、シンドビスウイルスの感染による致死毒性をどれほど回避できるかを抗ウイルス活性として評価した。その結果、wtIFN $\alpha$ 8 よりも強い抗ウイルス活性を示す IFN $\alpha$ 8 変異体を複数、単離・同定した。

以上のように、本研究では抗ウイルス活性の増強した IFN $\alpha$ 8 変異体の創製することに成功した。今後は、これら活性増強型変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価を行うとともに、これら情報を活用することで、免疫誘導制御能に優れた新規 “Immuno-modulator” の開発に大きく貢献することが期待される。

## 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3件)

- ① Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- $\alpha$  using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials*, 32(23):5498-504. 査読有.  
[DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.04.018](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.018)
- ② Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Nomura T., Yoshikawa T., Kubota-Koketsu R., Ikuta K., Okamoto S., Mori Y.,

Kunisawa J., Kiyono H., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The IL-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvant for the induction of protective immunity against influenza virus., J Virol., 84(24):12703-12, 2010. 査読有.

DOI: 10.1128/JVI.01182-10

- ③ Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Mukai Y., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., Biomaterials., 32(1):162-169, 2010. 査読有.

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.030

[学会発表] (計 3 件)

- ① Abe Y., Inoue M., Furuya T., Mukai Y., Nakamura T., Yamagata Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Biological and structural characterization of human TNFR2-selective TNF mutants., 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (Cytokines2011), Florence (Italy), 9-12 October, 2011.
- ② Abe Y., Nomura T., Inoue M., Furuya T., Arita S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Selective inhibition of TNFR1 by mutant TNF with antagonistic activity is effective in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis., 13th International TNF Conference, Awaji (Japan), 15-18 May, 2011.
- ③ 阿部康弘, 井上雅己, 野村鉄也, 有田修平, 古屋 剛, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: レセプター特異性に優れた機能性人工質蛋白質創出システムの開発., 第 26 回日本 DDS 学会学術集会, 大阪(大阪), 2010 年 6 月.

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 康弘 (ABE YASUHIRO)

医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員  
研究者番号: 20509898

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し