

I 型 TNF 受容体選択的アンタゴニストの創出とその自己免疫疾患治療薬としての可能性

野村鉄也,^{a,b} 阿部康弘,^b 吉岡靖雄,^{a,b,c} 中川晋作,^{a,c} 角田慎一,^{*,a,b,c} 堤 康央,^{a,b,c}

Creation of TNFR1-selective Antagonist and Its Therapeutic Effects

Tetsuya NOMURA,^{a,b} Yasuhiro ABE,^b Yasuo YOSHIOKA,^{a,b,c} Shinsaku NAKAGAWA,^{a,c}
Shin-ichi TSUNODA,^{*,a,b,c} and Yasuo TSUTSUMI^{a,b,c}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, ^bLaboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio), 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, and ^cThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 29, 2009)

Onset and exacerbation of autoimmune disease, such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease would be regulated with hundreds of disease-related proteins changing in quality and quantity. Recently, tumor necrosis factor- α (TNF- α) comes to be known that is the key molecule for development of the autoimmune diseases and recognized as the drug target which should be inhibited to overcome the diseases using neutralizing antibodies. Because the functions of TNF- α are regulated with the manner binding to two receptors, TNFR1 and TNFR2, unexpected side-effects would happen with complete inhibition or activation of the TNF receptor signaling. Thus, it is essential to develop a novel drug developing technology, which regulates the binding pattern of TNF- α definitely for therapeutic purposes. In this regard, we have aimed to create the TNF- α mutant, which has selectivity for binding TNFR1 or TNFR2 and regulates the onset and exacerbation of inflammatory diseases. Recently, we have succeeded in creating several TNF- α mutants by phage display techniques which can substitute aimed amino acids to the other, randomly. In this review, we introduce our unique TNFR1-selective antagonist, which can only inhibit the function *via* TNFR1 correlating with the onset and exacerbation of autoimmune disease. This TNFR1-selective antagonist does not inhibit the host defense function *via* TNFR2. This mutant TNF- α did not show the increase of virus infection suggested that it may overcome the risk of infectious disease, which is a major side-effect of anti-TNF- α therapy. These results would provide widely the strategy of regulating protein function in molecular level and would show the attractive approach to create safe and effective medical drug reducing side-effects.

Key words—tumor necrosis factor- α (TNF- α); autoimmune disease; TNFR1-selective antagonist; phage display technique

1. はじめに

近年、自己免疫疾患を始めとする種々の難治性免疫疾患の病態に腫瘍壊死因子 (TNF- α) が係わることが明らかとなり、また、これら疾患に対して、TNF を標的とした治療薬が著効を示すことが臨床でも示され、大きく脚光を浴びている。¹⁾ TNF- α は、2 種類のレセプター (TNFR1 及び TNFR2) を介す

るシグナルにより、抗腫瘍作用や細菌・ウイルスに対する感染防御作用等の免疫応答を活性化し、生体の恒常性維持に重要な役割を担うサイトカインである。²⁾ 一方、疾患局所あるいは全身における TNF- α の過剰産生が、自己免疫疾患等の発症・悪化につながるものと考えられている。現在、抗 TNF 中和抗体 (インフリキシマブ、アダリムマブ) や可溶性 TNF レセプター (エタネルセプト) などの TNF- α 阻害薬が関節リウマチ等に対して臨床応用されている。³⁾ これら TNF- α 阻害薬は、TNF- α が関連する様々な生体反応を根本から抑制し得ることから、従来の免疫抑制剤や抗アレルギー薬による対処療法では困難であった、関節リウマチにおける関節破壊にも奏功し得ることが報告されている。しかし、これ

^a大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)、^b独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロジェクト (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8)、^c大阪大学医工学融合研究教育センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

*e-mail: tsunoda@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム GS3 にて発表した内容を中心にとまとめたものである。

ら TNF- α 阻害薬は宿主免疫応答に係わる TNF- α の機能をすべて阻害してしまうため、結果として結核などの感染や発がんリスクの上昇など憂慮すべき副作用を伴ってしまう。^{4,5)} 実際には、TNF- α 阻害薬を投与したリウマチ患者が結核により死亡する事例が少なからず報告されている。また、多発性硬化症のように TNF- α の過剰発現と病態との相関が認められる疾患であっても、TNF 阻害薬を使用することで逆に病態の悪化を招いてしまう臨床結果も報告されている。⁶⁾ したがって、これら副作用の問題を克服し得る自己免疫疾患治療薬の開発が望まれている。

一方で近年、TNF- α 及びその 2 種類のレセプターの機能や病態との関連を解明するために、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いた解析が試みられている。例えば、関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導性関節炎 (collagen-induced arthritis : CIA) マウスを用いた検討により、関節炎の惹起には TNFR1 が主に関与すること、⁷⁾ また多発性硬化症のモデルマウスを用いた検討においては、TNFR1 が疾患発症に係わり、逆に TNFR2 が病態寛解に作用することが報告されている。^{8,9)} これらの結果に基づき、筆者らは、TNF- α の作用のうち、TNFR1 を介したシグナルのみを選択的に阻害できる薬物が開発できれば、先に述べた TNF- α 阻害剤の副作用の問題が克服可能となるうえ、これまで TNF- α 阻害薬を適用できなかった疾患にも応用可能な画期的自己免疫疾患治療薬になるものと考え、独自の機能性タンパク質創製技術により TNFR1 選択的なアンタゴニスト TNF- α の創出を試みた。

2. フェージ表面提示法を用いた TNFR1 指向性アンタゴニストの創製

2-1. TNF- α 構造変異体ライブラリの作製

これまでにわれわれは、フェージ表面提示法を駆使することで、1 億種類以上もの多様性を有する構造変異体 (アミノ酸置換体) ライブラリを構築し、その中から、医薬価値に優れた機能性人工タンパク質を効率良く創出し得る基盤テクノロジーを確立してきた。本テクノロジーを用いると、N 末端アミノ基への部位特異的な高分子バイオコンジュゲーションを可能とするリジン欠損タンパク質や、特定のレセプターへのターゲティング能を付与した機能改変タンパク質を創出可能である。¹⁰⁻¹³⁾ そこで本システム

により、TNFR1 に選択性を有するアンタゴニスト TNF- α を創出することを目的に、まず点突然変異解析の結果よりヒト TNF- α と各ヒト TNF レセプターとの結合に重要であると考えられてきた TNF- α 中のアミノ酸の中から「A84, V85, S86, Y87, Q88, T89」を選択し、各々、他の 20 種類のアミノ酸へ置換したライブラリの構築を試みた。具体的には、上記 6 ヶ所のアミノ酸に対応するコドンを含み 20 種類のアミノ酸をコードし得る NNS 配列を含むプライマーを用いて 2 段階の PCR 法にて置換し、PCR 断片をファージミドベクターに組み込んだ (Fig. 1)。この遺伝子ライブラリを大腸菌に形質転換した結果、 5.6×10^6 もの多様性を有するライブラリを作製することができた。

2-2. 構造変異 TNF- α 発現フェージライブラリを用いた TNFR1 指向性アンタゴニスト候補クローンの単離

Figure 2 に示すように、作製した構造

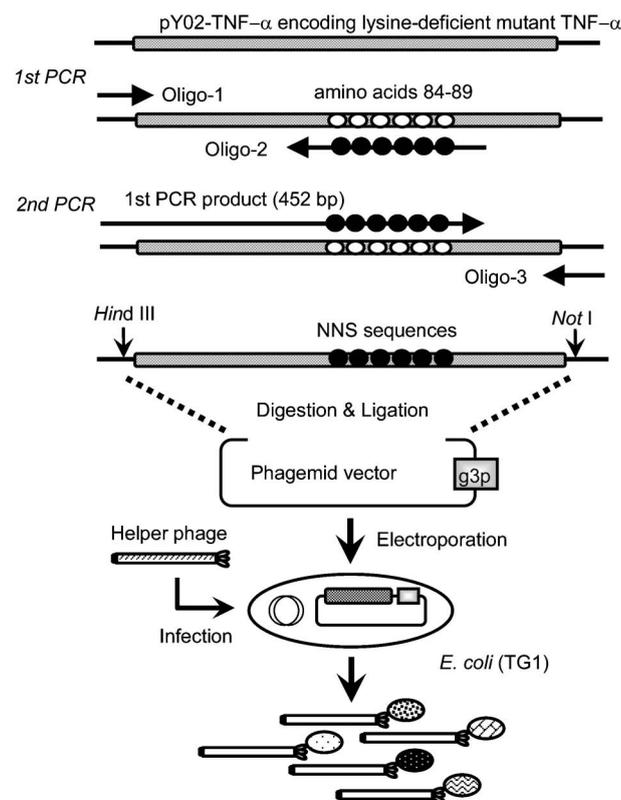


Fig. 1. Construction of Mutant TNF- α Library

Mutant TNF- α library was created by replacing the codon of the amino acid residue at positions 84, 85, 86, 87, 88 and 89 of TNF- α with the randomized codon NNS (where N and S represent G/A/T/C or G/C, respectively) to obtain all twenty amino acid substitutions at each position. NNS encodes all 20 different amino acids. Mutations were introduced by 2-step PCR using the lysine-deficient mutant TNF- α as the template, as we previously reported.

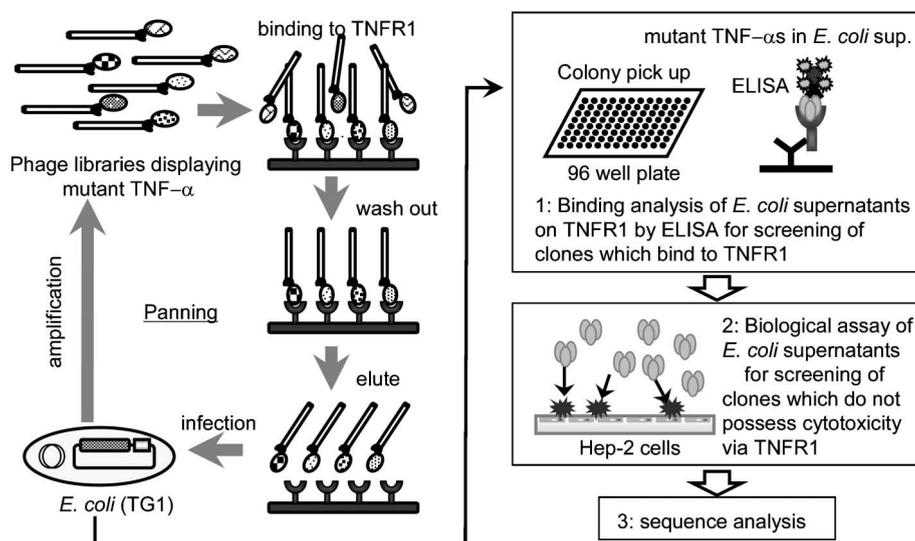


Fig. 2. Scheme for Selection of Mutant TNF- α Antagonist with High Affinity for TNFR1

TNF- α 発現ファージライブラリを用いて TNFR1 への結合親和性に基づくパニング操作を行うことで、TNFR1 に強く結合するファージクローンを濃縮した。さらに濃縮したクローンの中から TNFR1 に対する結合力を ELISA によって、また TNFR1 を介した生物活性を HEp-2 細胞への細胞傷害性を指標に評価し、TNFR1 指向性アンタゴニスト候補クローンをスクリーニングした。その結果、2 回のパニングを行うことで TNFR1 に強く結合するクローンの濃縮が確認され、その中から TNFR1 を介する生物活性が低い、アンタゴニスト候補クローンを選出することができた (Table 1)。これらクローン (TNF-T1~T10) のアミノ酸配列と、これまでにわれわれが獲得している TNFR1 指向性アゴニストのアミノ酸配列を比較した結果、TNFR1 指向性アゴニストでは、すべてのクローンにおいて Y87 が保存されていたのに対し、¹²⁾ 今回のアンタゴニストのクローンにおいては、一部のクローンで Y87 が他のアミノ酸へ置換されていることが判明した (Table 1)。さらに興味深いことに Y87 がそれぞれヒスチジン・イソロイシンに置換されていた TNF-T2 と-T8 は TNFR2 に対する結合力が著しく低下していることが示された。中でも TNF-T2 は、TNFR1 への結合力が wtTNF- α と同程度に保持されつつ、TNFR2 への結合力が 40000 分の 1 以下にまで低下しており、TNFR1 指向性に優れていることが明らかとなった (Table 1)。また、この TNF-T2 の生物活性を評価するため、ヒト細胞株である

Table 1. Amino Acid Sequences and Affinity for TNFR1 of Antagonistic Mutant TNF- α s

	Amino acid sequence						Relative affinity (% K_d) ^{a)}		
	84	85	86	87	88	89	TNFR1	TNFR2	TNFR1 ^{b)} / TNFR2
wtTNF- α	A	V	S	Y	Q	T	100.0	100.0	1.0
TNF-T1	G	H	L	Y	T	T	28.0	7.5	3.7
T2	S	T	T	H	N	Q	40.0	2.3×10^{-3}	1.7×10^4
T3	T	S	V	Y	P	H	116.7	45.7	2.6
T4	T	N	I	Y	S	N	28.0	7.8	3.6
T5	N	G	A	Y	E	T	N.T.	N.T.	N.T.
T6	G	G	P	Y	Q	R	18.4	91.3	0.2
T7	S	P	R	V	S	G	60.9	16.3	3.7
T8	T	P	A	I	N	R	53.8	1.7×10^{-1}	3.2×10^2
T9	A	P	G	Y	S	H	20.6	25.0	0.8
T10	S	P	Q	Y	S	V	27.5	23.9	1.2

N.T.; not tested. ^{a)} Affinity for immobilized TNFR1 and TNFR2 was assessed by SPR using BIAcore3000. The dissociation constant (K_d) of TNF mutants were calculated from their sensorgrams by BIAEVALUATION 4.0 software. ^{b)} TNFR1-selectivity was defined as relative affinity [TNFR1]/relative affinity [TNFR2] for mutant TNF- α .

HEp-2 細胞の細胞傷害活性を指標に TNF-T2 のアンタゴニスト活性を検討したところ、TNF-T2 の作用濃度依存的な拮抗阻害活性が認められた。以上のように、われわれはファージ表面提示法を用いることで、内因性 TNF- α の作用をレセプター選択的に阻害可能なタンパク性アンタゴニストを創出することに成功した。

そこで次に、TNF-T2 がアンタゴニスト活性を示す要因を明らかにするため、X 線結晶構造解析を試みた。wtTNF- α では、Y87 が TNFR1 の L67・

L71のアミノ酸と疎水的に相互作用してポケット構造にはまり込むことで、TNFR1との結合に重要な役割を担っていると考えられている。TNF-T2はチロシンがヒスチジンに置換されることで疎水的相互作用を失い、ポケット構造にははまり込むことが不可能になる一方で、TNFR1中のS63・G64と静電的に相互作用することが予想された。以上のように、Y87の置換に伴う結合様式の変化がアンタゴニスト活性の発現に重要な役割を担っている可能性が示された。現在、これらTNF- α /TNFレセプターの構造活性相関情報を基にして、更なる選択性及び有効性に優れたアンタゴニストの開発や、¹⁴⁾ペプチド性TNFR1阻害剤のドラッグデザインに向けたアプローチも進めている。

3. TNFR1指向性アンタゴニストの炎症疾患モデルにおける抗炎症効果及び安全性評価の検討

上述のように、TNF-T2は、*in vitro*において優れたアンタゴニストタンパク質としての特徴を有することが明らかになったため、次に、TNF関連急性炎症モデルであるGalN/TNF誘発肝炎マウスを用いて*in vivo*抗炎症効果について検討した。投与24時間後のマウスの生存率について観察した結果、GalN/TNFとともにPBSを投与した群では、全例で死亡が確認された。またTNF- α 中和抗体投与群においても、生存率は20%程度であった。一方で、TNF-T2投与群においてはいずれの投与量群でも抗TNF- α 中和抗体投与群よりも高い生存率が認められた。中でも270 μ gを投与した群においては、生存率が50%であり、その後の観察でもこれらマウスは2週間以上生存していた (Table 2)。また、投

与9時間後の血中ALTレベルを測定した結果 (Fig. 3)、PBS投与群においては、ALTの顕著な上昇がみられたものの、TNF-T2の投与により投与量依存的にALT値の抑制が認められ、特に270 μ g投与群においては有意な肝障害抑制効果が発揮された。以上の結果より、GalN/TNF誘発性肝炎モデルにおいてTNF-T2が肝炎抑制効果を示すことが明らかとなった。

さて関節リウマチのような慢性炎症性疾患に対してTNF-T2を適用する場合には、より持続的な作用が必要となる。そこで、体内安定性を向上させる目的で、TNF-T2に水溶性高分子ポリエチレングリコール (PEG) を用いたバイオコンジュゲーションを適用した。なお、一般にタンパク質のバイオコンジュゲーションでは、高分子によるアミノ基の修飾がランダムに生じるため、著しい比活性低下を招いてしまう。その点われわれは、野生型タンパク質と同等以上の活性を保持したりジン欠損体を作製することで、N末端選択的にバイオコンジュゲーションを行い、活性低下を招くことなく、体内安定性

Table 2. Survival Rate in GalN/TNF-induced Hepatitis Mouse Model

PBS	Survival rate (%)			Anti-TNF- α antibody (20 μ g)
	10 μ g	30 μ g	270 μ g	
0% (0/7)	33.3% (2/6)	33.3% (2/6)	50.0% (3/6)	20.0% (1/5)

After a period of 24 h, survival rates of the mice in the GalN/TNF-induced hepatitis model were measured ($n=5-7$). Data represent the mean \pm S.E.

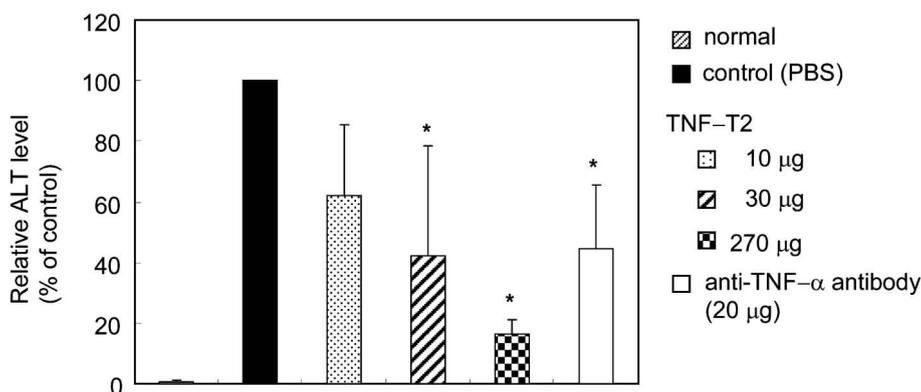


Fig. 3. Therapeutic Effect of TNFR1-selective Antagonist in GalN/TNF-induced Hepatitis Mice

Blood samples were collected 9 h after the challenge. Serum concentration of ALT (alanine aminotransferase) was measured ($n=3-5$). Data represent the mean \pm S.E. Statistical significance versus control mice was calculated by unpaired student's *t* test ($p<0.05$).

を向上させる手法を確立している。¹⁰⁾ 本手法を用いて作製した PEG-T2 は、TNF-T2 と同等の *in vitro* におけるアンタゴニスト活性を保持しつつ、血中安定性が向上していることを確認している。作製した PEG-T2 を用いて CIA モデルに対する予防的及び治療的効果の検討を行ったところ、既存の TNF 阻害薬であるエタネルセプトと同等の抗炎症効果を示し、さらに関節破壊も抑制可能であったことから関節リウマチに対する優れた治療薬になり得るものと期待される。また前述したように、TNF- α は生体が持つ感染防御機能に必須のサイトカインであるため、TNF- α 阻害薬の使用においては免疫力の低下に伴う感染症などの副作用を招いてしまう。特にノックアウトマウスを用いた検討から、少なくともウイルスに対する免疫反応の誘導には、TNFR2 を介した TNF- α の作用が重要であることが示されている。¹⁵⁾ 以上の点からわれわれは、アデノウイルス感染 1 週間後の肝臓中のウイルス量を測定することで、T2 及び既存の TNF- α 阻害薬が生体防御機構に対して及ぼす影響を比較検討した。その結果、エタネルセプト投与群では、PBS 投与群と比較して顕著にウイルス排除能が抑制されていることが示唆された。一方で、PEG-T2 投与群では、PBS 投与群とほぼ同値を示しており生体防御機能に与える影響は極めて少ないことが予想される。以上のように、われわれは内因性 TNF- α の TNFR1 を介した作用のみを選択的に阻害し、既存の TNF- α 阻害薬と同等の抗炎症効果を示し得るほかに類をみないタンパク性アンタゴニスト TNF-T2 を創出することに成功した。さらに TNF-T2 は、生体が有する感染防御機能を阻害しないことから既存の治療薬にかわる安全かつ有効な自己免疫疾患治療薬となる可能性が示された。

4. おわりに

近年、サイトカインや抗体を利用したタンパク質医薬品が注目を集め、これらの生物学的利用能や薬理効果の増強を目指した DDS 研究が各方面で行われている。われわれは、このようなタンパク質医薬品候補分子そのものに、標的指向性を付与する“分子レベルの生物学的 DDS”と、機能性変異体に体内安定性を付与する“全身レベルの高分子化学的 DDS”の融合開発が、タンパク質医薬品開発の目指すべき 1 つの方向性であると確信している。本稿

では特に、炎症性疾患の発症に係わる TNF- α をモデルとして、ファージ表面提示法を駆使した独自の機能性人工タンパク質の創製システムを応用することで、“分子レベルの生物学的 DDS”として特定レセプターへの指向性を有したアンタゴニストタンパク質の創出を行った。本研究によって、疾患に応じて特定レセプターへのアンタゴニストを使い分けることで主作用の向上並びに副作用の軽減が可能であること、さらに“生体レベルの高分子化学的 DDS”としてバイオコンジュゲーションを適応することで、機能性人工タンパク質の医薬品としての安定性・有効性を増強できる可能性を示した。さらに、このような機能性人工タンパク質の創製テクノロジーは、タンパク質の立体構造情報の解析を通じて、レセプターなど特定分子をターゲットとした低分子化合物を設計するための試みにも貢献できると期待される。今後、本研究で行ってきた機能性人工タンパク質の作製基盤技術によって、レセプターのシグナル伝達機構や活性中心となるアミノ酸配列などが明らかになり、これらの情報を利用した、より安全かつ有効な医薬品開発が可能になるものと期待している。

謝辞 本研究の遂行に際し、多くのアドバイスを頂きました。榊林原生物化学研究所 研究センター 医薬研究部門 太田恒孝先生、谷合まどか先生に感謝申し上げます。また本研究では、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究(No. 20015052)、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B 一般(No. 21390046)、厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(No. H19-医薬一般-010)、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究(HS)事業(No. KHC1017)、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業(No. H21-バイオ-指定-005)の支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Feldmann M., Maini R. N., *Nat. Med.*, **9**, 1245-1250 (2003).
- 2) Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P., *Cell Death Differ.*, **10**, 45-65 (2003).

- 3) Feldmann M., *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 364–371 (2002).
- 4) Brown S. L., Greene M. H., Gershon S. K., Edwards E. T., Braun M. M., *Arthritis Rheum.*, **46**, 3151–3158 (2002).
- 5) Gomez-Reino J. J., Carmona L., Valverde V. R., Mola E. M., Montero M. D., *Arthritis Rheum.*, **48**, 2122–2127 (2003).
- 6) Chun E. S., Packer M., Lo K. H., Fasanmade A. A., Willerson J. T., *Circulation*, **107**, 3133–3140 (2003).
- 7) Mori L., Iselin S., De Libero G., Lesslauer W., *J. Immunol.*, **157**, 3178–3182 (1996).
- 8) Kassiotis G., Kollias G., *J. Exp. Med.*, **193**, 427–434 (2001).
- 9) Liu J., Marino M. W., Wong G., Grail D., Dunn A., Bettadapura J., Slavin A. J., Old L., Bernard C. C., *Nat. Med.*, **4**, 78–83 (1998).
- 10) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata K., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **100**, 4831–4836 (2003).
- 11) Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandenabeele P., Aggarwal B. B., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y., *J. Biol. Chem.*, **283**, 998–1007 (2008).
- 12) Mukai Y., Shibata H., Nakamura Y., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y., *J. Mol. Biol.*, **385**, 1221–1229 (2009).
- 13) Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 667–71 (2009).
- 14) Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Pharmazie*. (in press)
- 15) Chan F. K., Shisler J., Bixby J. G., Felices M., Zheng L., Appel M., Orenstein J., Moss B., Lenardo M. J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 51613–51621 (2003).