

# タンパク質機能改変体創製技術による 革新的バイオ創薬



研究ノート

角田 慎一\*

Creation of functional artificial proteins and their application for  
novel biodrugs development

Key Words : biodrugs, functional artificial proteins, phage display library

## はじめに

近年のゲノムやプロテオーム解析研究の進展により、様々な疾患に関連する分子が同定され、創薬標的としての可能性の検討が精力的に進められている。また、有望な標的分子に対しては、モノクローナル抗体製剤をはじめとする“バイオ医薬”が次々と開発され、がんや自己免疫疾患、感染症等の難治性疾患において、従来の低分子薬では達成できなかった顕著な治療効果を発揮している。このようなバイオ医薬開発の領域においては、新規な標的分子に対する治療薬の開発が試みられる一方で、先行薬と同じ標的分子に対してでも、付加価値を加え高機能化した新薬、あるいは、改良型医薬である「バイオペター」の開発が積極的に進められている。最近では、抗体医薬に抗がん剤を付加した antibody-drug conjugate (ADC) や、二重特異性抗体といった全くの人工的なフォーマットのバイオ医薬も既に臨床応用されるに至っており、今後、このような有効性に優れたバイオ医薬の創製に資する技術に対するニーズと期待は益々高まるものと予想される。

このような観点から、著者らのグループでは、プロテオミクスやタンパク質工学の手法に基づいたバイオ医薬の創製基盤の確立と、難治性疾患に対する画期的バイオ医薬の開発に取り組んでいる。本稿で

は、著者らのバイオ創薬研究の取組みの一部を紹介させていただきたい。

## タンパク質機能改変体創製技術

がんや自己免疫疾患、感染症といった難治性疾患の病態には、往々にして宿主免疫応答の過不足が関わっている。従って、それら難治性疾患に対する治療には、免疫応答の適切な制御法を確立することが重要となってくる。我々は、免疫応答制御の中心を担うサイトカインに着目し、その活性や安定性、レセプター指向性などの機能を自在に改変・付与可能なタンパク質機能改変体創製技術を確立するとともに、それらを駆使することで免疫応答を制御可能とする新しいタイプのバイオ医薬の開発を試みている。

一般に、サイトカインとそのレセプターは、高分子タンパク質同士の相互作用を介して細胞にシグナルを伝達する<sup>(1)</sup>。そのため、サイトカイン-レセプター相互作用を制御しうる低分子医薬の開発は容易ではない。そこで著者らは、機能を改変したサイトカインを、サイトカインレセプター制御薬として応用することを考案した。すなわち、野生型サイトカインの複数のアミノ酸残基を改変することで、活性の増強や、レセプターサブタイプ選択性、あるいはアンタゴニスト作用等を発揮させる方法論「タンパク質機能改変体創製技術」を確立し、新規カテゴリーのバイオ医薬を自在に創製しようとするものである<sup>(2)</sup>。本技術は、野生型サイトカインをベースに、あたかも低分子化合物のリードジェネレーションのごとく、様々な機能を付与・改変したサイトカインを創製することが可能であり、サイトカインレセプターのシグナルを制御しうるバイオ医薬の開発手法として有望と考えられる(図1)。一例として、免疫応答制御の中心を担うサイトカインである TNF- $\alpha$  の機能改変体の創製を試みたところ、2種類のレ



\* Shin-ichi TSUNODA

1972年1月生  
大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了(1999年)  
現在、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 バイオ創薬プロジェクトプロジェクトリーダー  
大阪大学大学院薬学研究科 連携大学院バイオ創薬学分野 招へい教授(兼任)  
TEL: 072-641-9814  
FAX: 072-641-9817  
E-mail: tsunoda@nibiohn.go.jp

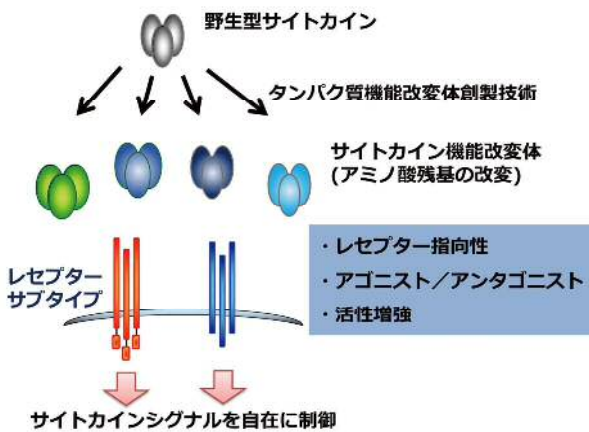


図1 タンパク質機能改変体創製技術

レセプターサブタイプ TNFR1 あるいは TNFR2 選択的に親和性を示す TNF 機能改変体、あるいは、レセプターに結合はするがシグナルを伝達しない、アンタゴニストとして働く TNF 機能改変体などの創製に成功している<sup>(2, 3)</sup> (図2)。次項では、それらの中で、TNFR1 選択的アンタゴニストとして働く TNF 機能改変体と、その難治性疾患治療への応用の試みを紹介する。

### サイトカイン機能改変体の難治性疾患治療薬としての応用

TNF- $\alpha$  は、種々の免疫疾患の病態に関与するこ

とが知られており、慢性関節リウマチやクローン病などにおいて、抗 TNF 抗体が著効を示すことが明らかとなっている<sup>(4)</sup>。一方、神経難病である多発性硬化症 (MS) の病態においては、TNF が関与することが知られているものの、既存の抗 TNF 抗体医薬は無効、あるいは MS の病態悪化を招くことが示唆されており、使用も禁忌となっている<sup>(5, 6)</sup>。MS と抗 TNF 薬の関連について、昨今、分子レベルで研究が進められ、TNF の 2 種類のレセプターサブタイプのうち、TNFR1 が病態悪化に関わる一方、TNFR2 が神経保護など病態の寛解に重要な役割を担うことが動物モデルで示されている<sup>(7)</sup>。すなわち、TNF に対する阻害抗体は、炎症惹起に重要な TNFR1 のみならず、病態抑制に働き、beneficial な TNFR2 のシグナルをも阻害することが副作用の発現につながっている可能性が考えられる。そこで我々は、TNFR1 選択的なシグナルの制御が MS 治療に有効と考え、タンパク質機能改変体創製技術により開発した TNFR1 選択的アンタゴニスト (R1antTNF) の有用性を評価した。

MS の動物モデルとして、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE マウス) を使用した。TNFR1 選択的アンタゴニストである R1antTNF を投与したところ、既存の TNF 抗体医薬のように病態悪化は認めず、炎症・麻痺の症状を顕著に抑制できること

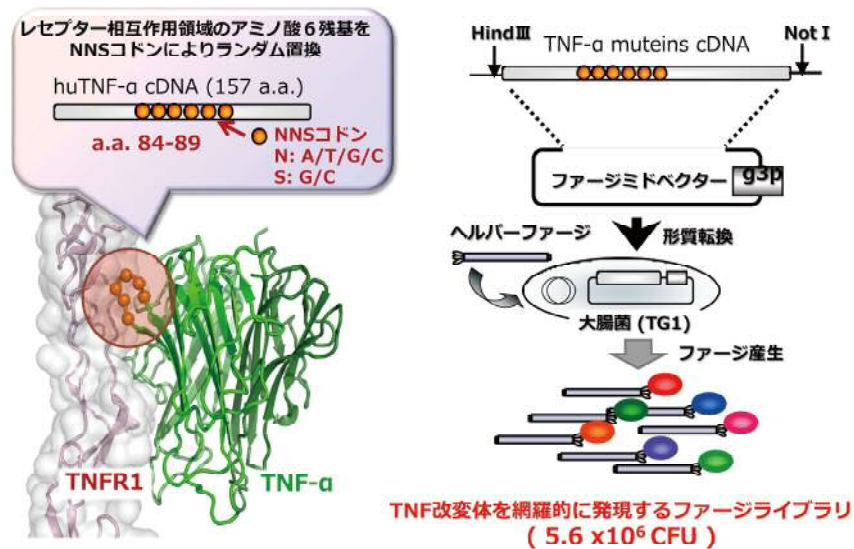


図2 TNF 機能改変体の創製方法

TNF- $\alpha$  のアミノ酸残基の中で、TNF レセプターとの相互作用に関わる 6 残基をランダム化した TNF アミノ酸改変体の cDNA ライブラリを調製し、さらにファージディスプレイライブラリを構築する。ファージディスプレイライブラリを用いると、膨大なレパートリーの TNF アミノ酸改変体のライブラリの中から、目的とする結合特性、活性を有する改変体を迅速に、効率良く単離することができる。

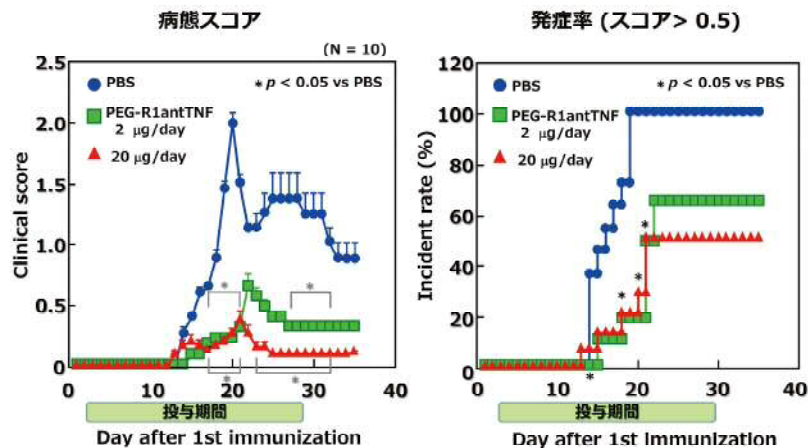


図3  
TNF 改変体 R1antTNF による EAE マウスの病態抑制効果  
EAE モデルマウスに PEG 修飾を施した R1antTNF を投与した (2or 20 µg/day/head, i.p.)。  
左図は四肢の麻痺をスコア化したデータを、右図は病態発症率を示している。コントロール群に比べて有意な病態と発症率の抑制効果が認められた。

が判明した<sup>(8)</sup> (図3)。また、病態局所の脊髄では、R1antTNF 投与群で、炎症細胞の浸潤抑制、脱髄病変の抑制が観察された。したがって、R1antTNF は、未だ治療薬に乏しい MS の新規治療薬になりうると期待される。なお、R1antTNF は関節リウマチ (コラーゲン関節炎モデルマウス) においても、ウイルス感染防御能を低下させることなく、炎症を抑制作用を発揮できることを明らかとしており、現在、実用化を見据えた検証を進めている。

### おわりに

本稿では、タンパク質工学を駆使した新しいカテゴリーのバイオ医薬開発の試みを紹介させていただいた。今後も次々と見出されてくる難治性疾患の有望な治療標的に対して、有効で安全な治療薬の開発が期待され、バイオ創薬の方法論がこれに大きく寄与することに疑う余地はない。抗体医薬の開発では、我が国は欧米に遅れをとったものの、次世代のバイオ医薬開発においては、産官学一体となって巻き返しを図りたい。

### 引用文献

- Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, et al. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal*. 3: ra83, 2010.
- Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, et al. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist. *J Biol Chem*. 283: 998-1007, 2008.
- Abe Y, Yoshikawa T, Inoue M, et al. Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- $\alpha$  using a phage display system with one-step competitive panning. *Biomaterials* 32: 5498-5504, 2011.
- Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*. 343: 1594-1602, 2000.
- Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 325: 467-472, 1991.
- Solomon AJ, Spain RI, Krueger MC, et al. Inflammatory neurological disease in patients treated with tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibitors. *Mult Scler*. 17: 1472-1487, 2011.
- Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J, et al. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 205: 24-33, 2000.
- Nomura T, Abe Y, Kamada H, et al. Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Control Release*. 149: 8-14, 2011.