

- HDL は抗動脈硬化作用をもつリポタンパクであり、上昇薬が待望されている。血中 HDL の大部分は肝の膜トランスポーターABCA1 が生産する。肝において特異的に機能するABCA1 遺伝子プロモーターを見だし、肝 ABCA1 発現がコレステロールに対して末梢組織とは異なる応答を示すメカニズムを明らかにした。
- スタチンの HDL 上昇の機序に関して、ピタバスタチンは肝においてアポ A-I 産生亢進、ABCA1 発現促進、CETP 発現を抑制し、これらの変化が HDL 上昇に寄与することが示唆された。
- フェノフィブラートの血糖低下作用に肝の PDK4 発現上昇による解糖系亢進が推察された。
- LXR α 選択的アゴニスト Riccardin C をリード化合物とした誘導体展開を行い、高い受容体親和性や選択性をもつ誘導体開発の基盤ができた。
- ABCA1 による HDL 新生と生体防御反応との関わりについて、1)炎症性蛋白質 SAA が apoA-I と同様に ABCA1 により HDL を形成することが、in vivo で証明された。2)ABCA1 の発現制御に、細胞周期を制御する転写制御因子 AP2 が深く関わることを証明した。
- マウス各組織での ADRP タンパク質発現量及び細胞内局在を検討し、肝においては生理的・病的脂質蓄積時に発現が増加し、膜面分や中間比重の脂肪滴にも存在することがわかった。
- 甲状腺ホルモンが TGF- β 3 およびデコリンの発現調節を介して大動脈血管平滑筋細胞の石灰化抑制に関与することが示唆され、石灰化抑制因子 MGP の発現促進に加えた寄与が考えられた。
- 胆汁酸吸着樹脂コレステリドは高脂肪食負荷した KKAy マウスにおいて、胆汁酸の再吸収を阻害することで肝臓の SHP 発現を低下させ、糖代謝に関係する遺伝子発現に作用する可能性が示された。このことが、体重増加抑制、脂肪重量抑制、インスリン抵抗性改善のメカニズムになっている可能性が考えられた。
- FXR リガンドである胆汁酸の構造活性相関を検討し、母核構造が必須であり、3 β -水酸基の活性低下作用と 3 α -メチル基の活性上昇作用が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Takeya T,

Okuhira KI, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T: Sterol responsive element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABCA1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 2007; 282: 21090-21099

2. 最上(西巻)知子: 核内受容体FXR:胆汁酸と関連代謝物による活性制御と創薬への可能性: 臨床化学 36, 197-204 (2007)
3. Haghghi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, PaterL, Paraskevaidis L, Jones WK, Dorn GW, Kremastinos DT, Kranias EG. A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids. *Hum Mutat.* (in press)
4. Yokoyama U*, Sato Y* (* equal contribution), Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S. Maternal vitamin A altered gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus. *Physiol. Genomics.* 2007; 31:139-57.
5. Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Galph 12/13-mediated upregulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through NFAT activation. *J Biol Chem.* 2007;282:23117-28.
6. Shinozaki Y, Sato Y (correspondence), Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation- mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience.* 2007;147:153-63.
7. Noriyuki Iwamoto, Sumiko Abe-Dohmae, Makoto Ayaori, Nobukiyo Tanaka, Masatoshi Kusuhara, Fumitaka Ohsuzu, Shinji Yokoyama. ATP Binding Cassette Transporter A1 Gene Transcription is Down-Regulated by Activator Protein (AP) 2 α : Doxazosin Inhibits AP2 α and Increases High-Density Lipoprotein Biogenesis being

- Independent of α 1-Adrenoceptor Blockade. *Circulation Research*. (2007) 101: 156-165.
8. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Kuniko Okumura-Noji, Rui Lu, Tomo Nishida, Yutaka Miura, Kiyofumi Asai, Alireza Kheirollah, Seiichi Nakaya and Shinji Yokoyama. Mechanism for FGF-1 to Regulate Biogenesis of Apolipoprotein E-High Density Lipoprotein in Astrocytes. *J. Lipid Res*. (2007) 48: 2020-2027.
 9. Shinji Yokoyama. HDL Biogenesis and Cellular Cholesterol Homeostasis. *Annals of Medicine* (2008) 40: 29-38.
 10. Mohammad Anwar Hossain, Maki Tsujita, Frank J. Gonzalez, and Shinji Yokoyama. Effects of Fibrate Drugs on Expression of ABCA1 and HDL Biogenesis in Hepatocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. In press.
 11. Wei Hu, Sumiko Abe-Dohmae, Maki Tsujita, Noriyuki Iwamoto, Osamu Ogikubo, Takanobu Otsuka, Yosataka Kumon, Shinji Yokoyama. Biogenesis of High Density Lipoprotein by Serum Amyloid A is Dependent on ATP-Binding Cassette Transporter A1- in the Liver in vivo. *J. Lipid Res*. (2008) 49: 386-393.
 12. Yuko Nagayasu, Jin-ichi Ito, Tomo Nishida, and Shinji Yokoyama. Fibroblast Growth Factor-1 for Biogenesis of Apolipoprotein E-High Density Lipoprotein is Down-Regulated by Long-Time Secondary Culture. *J. Biochem*. (2007) in press.
 13. Komatsu T, Hirano T, Songkram C, Kawachi E, Kagechika H. Novel Thyroid Hormone Receptor Antagonists With An N-Alkylated Diphenylamine Skeleton. *Bioorg. Med. Chem*. 15: 3115-3126, 2007.
 14. Matsumoto A, Mizukami H, Mizuno S, Umegaki K, Nishikawa J, Shudo K, Kagechika H, Inoue M. β -Cryptoxanthin, a novel natural RAR ligand, induces ATP-binding cassette transporters in macrophages. *Biochem. Pharmacol*. 74: 256-264, 2007.
 15. Akagi M, Kanata S, Mori S, Itabe H, Sawamura T, Hamanishi C.: Possible Involvement of the Oxidized Low-density Lipoprotein/Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 System in Pathogenesis and Progression of Human Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007, 15: 271-290
 16. Fujimoto Y, Itabe H, Kinoshita T, Homma KJ, Onoduka J, Mori M, Yamaguchi S, Makita M, Higashi Y, Yamashita A, Takano T.: Involvement of long chain acyl-CoA synthetase in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. *J Lipid Res*. 2007, 48:1280-1292
 17. Kamei M, Yoneda K, Kume N, Suzuki M, Itabe H, Matsuda K, Shimaoka T, Minami M, Yonehara S, Kita T, Kinoshita S. Scavenger receptors for oxidized lipoprotein in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007, 48:1801-1807.
 18. Obama T, Kato R, Masuda Y, Takahashi K, Aiuchi T, Itabe H.: Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS. *Proteomics*. 2007, 7:2132-2141.
 19. Yamashita H, Ehara S, Yoshiyama M, Naruko T, Haze K, Shirai N, Sugama Y, Ikura Y, Ohsawa M, Itabe H, Kataoka T, Kobayashi Y, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M.: Elevated plasma levels of oxidized low-density lipoprotein relate to the presence of angiographically detected complex and thrombotic coronary artery lesion morphology in patients with unstable angina. *Circ. J*. 2007, 71:681-687.
 20. Suzuki M, Kamei M, Itabe H, Yoneda K, Bando H, Kume N, Tano Y.: Oxidized phospholipids in the macula increase with age and in eyes with age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 2007, 13:772-778
 21. Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Itabe H, Nakayama KI, Nakayama K, Nakamura K, Tanaka S.: Negative feedback loop in bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. *J. Bone Miner. Res*. 2007, 22:1631-1639.
 22. Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H.: Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II PAF-acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *J. Biol. Chem*. 2008:283:1628-1636

23. Kajimoto S, Horie M, Manabe H, Masuda Y, Shibayama-Imazu T, Nakajo S, Xiang Feng Gong, Obama T, Itabe H, Nakaya K.: A tyrosine kinase inhibitor, β -hydroxyisovalerylshikonin, induced apoptosis in human lung cancer DMS114 cells through reduction of dUTP nucleotidohydrolase activity. *BBA-Mol. Basis Dis.* 2008, 1782: 41-50
24. Kobayashi K, Tada K, Itabe H, Ueno T, Liu PH, Tsutsumi A, Kuwana M, Yasuda T, Shoenfeld Y, de Groot PG, Matsuura E.: Distinguished effects of antiphospholipid antibodies and anti-oxidized LDL antibodies on oxidized LDL uptake by macrophages. *Lupus.* 2007;16(12):929-938.

学会発表

1. Tamehiro, N., Shigemoto-Mogami, Y., Okuhira, K., Nishimaki-Mogami, T.: SREBP-2- and LXR-driven dual promoter regulation of hepatic ABCA1 gene expression: Mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. XVI International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism (2007.10)
2. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Okuhira K, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T: SREBP-2- and LXR-driven dual promoter system mediates unique response of hepatic ABCA1 gene expression to cellular cholesterol status. 5th International Atherosclerosis Society-Sponsored HDL Workshop (2007.10)
3. 為広紀正、最上-重本由香里、掛谷知志、奥平桂一郎、鈴木和博、佐藤隆一郎、長尾拓、最上(西巻)知子: SREBP, LXR依存の二つのプロモーターによる肝ABCA1遺伝子発現の制御—特異なコレステロール応答の分子機構— 第39回日本動脈硬化学会総会シンポジウム (2007.7)
4. Yanagino S, Satoh M, Suzuki K, Sato Y. Thyroid hormone regulates genes associated with vascular smooth muscle calcification. 第81回日本薬理学会年会(平成20年3月17日、横浜)
5. Itabe H., Masuda Y., Sasabe N., Kitazato K., Takahashi K., Aoki J., Arai H. and Takano T.: Induction of intracellular lipid droplet proteins by lipids in pathological conditions. 3rd International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2007, Sorrento, Italy
6. Itabe H.: Behavior of plasma oxidized LDL level during the early stage of atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. Oxidative Stress Summit, 2007, Osaka, Japan
7. Kato R., Mori C., Kitazato K., Arata S., Obama T. and Itabe, H.: The plasma oxidized LDL levels increased prior to atherosclerosis lesion development in apoE-knockout mice. 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australia and Japan, 2007, Kyoto University, Kyoto
8. Obama T., Kato R., Takahashi K. and Itabe, H.: Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS. 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australia and Japan, 2007, Kyoto University, Kyoto
9. 影近弘之「Synthetic Retinoids: Biological Functions and Clinical Utilities」第4回武田科学振興財団薬科学シンポジウム(2007年12月、東京)
10. 影近弘之「Retinoids: Structural Evolution and Clinical Utilities」4th International Chemical Biology Frontier Symposium(2007年12月、東京)
11. 影近弘之「核内受容体の医薬化学: 合成レチノイドの医薬品化と今後の展開」第一回熊本創薬シンポジウムプログラム(2008年2月、熊本)

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

ライソゾーム病の酵素製剤の適正使用法の確立と遺伝子・細胞治療法の開発

所属 国立成育医療センター
臨床検査部
研究者 奥山 虎之

研究要旨

本研究の目的は、ライソゾーム病の代表的疾患であるムコ多糖症について、酵素補充療法の日本人患者における効果と安全性の評価を行う臨床研究を行い、さらに、遺伝子細胞治療の有効性について、モデル動物を用いた前臨床試験を行うことである。本年度は、臨床研究開始後、3ヶ月の効果について検討する。また、遺伝子細胞治療については、その前段階として、肝臓移植による治療効果の評価をムコ多糖症 I V型モデルラットを用いて行いその効果を検討した。

分担研究者

ジェンザイム・ジャパン株式会社臨床開発部
丸橋康弘

A. 研究目的

ムコ多糖症に代表されるライソゾーム病の治療には、先天的に欠損している酵素を体外から定期的に供給する酵素補充療法が注目されている。日本人ムコ多糖症 II 型患者を対象とした酵素製剤イデュロサルファーゼの投与試験を開始した。また、体内に欠損酵素の供給源となる細胞集団を移植生着させることにより、治療効果を期待する方法として、遺伝子細胞治療が注目されている。われわれは、これまで、ムコ多糖症 VII 型モデルマウスを用いた遺伝子治療前臨床試験を多数報告してきた。今回、あらたに導入したムコ多糖症 VI 型ラットを用いて、肝臓移植の効果について検討した。

B. 研究方法

(1) ムコ多糖症 II 型患者 10 名に対して、

イデュロサルファーゼを 1 年間投与し、その効果と安全性について詳細に検討するためのフォローアッププロトコールを作成し、多施設共同研究（成育医療、大阪市大、岐阜大、慈恵医大）を開始した。

(2) ムコ多糖症 VI 型モデルラット MPR ラットに対して、肝臓移植とその治療効果を検討した。生後 3 ヶ月のラットを用いて、ムコ多糖症 VI 型である遺伝子型正常の MPR ラットをドナーとして、罹患ラットへの肝臓移植を実施した。

肝臓移植後ラットの治療効果を評価するために、尿中ウロン酸を定量した。

C. 研究結果

(1) イデュロサルファーゼ臨床研究
欧米で実施された臨床試験と同様の結果が得られた。とくに、尿中ウロン酸値の急激な低下（正常化）と肝臓サイズの正常化がほぼ全例で確認された。また、投与中止を

余儀なくされるような重篤な副作用はなく、日本人患者にも安全に適応できる可能性が示された。

(2) 前臨床試験

ムコ多糖症では、尿中に分解できないウロン酸が大量に排出される。MPRラットの場合、 135.3 ± 28.7 mg/gcr (正常ラット 57.3 ± 10.3) である。これに対して、肝臓移植を行ったラットの術後 30 日での尿中ウロン酸排泄量は、 48.1 ± 20.2 mg/gcr と有意に低下していることが示された。

D. 考察

ムコ多糖症Ⅱ型治療薬イデュロサルファーゼは、2007年10月に承認されたが、海外での臨床試験のデータをもって迅速審査した結果であり、日本での臨床試験は実施されず、日本人での有効性・安全性を評価するデータに乏しい。今回開始した臨床研究の継続により、このデメリットを克服できるものと期待される。

ムコ多糖症の細胞治療法としては、骨髄移植などの造血幹細胞移植が主流であるが、移植に適したドナーが必ず見つかるとは限らず、また、移植に伴う副作用は場合によっては重篤となり、死にいたる場合もまれではない。これに対して、生体肝移植の場合、拒絶反応も少なく、また、両親のいずれかがドナーとなる場合が多く、ドナー確保の問題も少ない。今回の結果は、今後のライソゾーム病の新しい治療法として期待されるものである。

E. 結論

ムコ多糖症Ⅱ型治療薬イデュロサルファーゼの日本人を対象とした投与試験を開始した。また、ムコ多糖症モデルラットに肝臓移植を行い、有効性を示唆する結果を得た。今後、長期的な治療効果について検討する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

TOWARDS CLINICAL GENE THERAPY FOR CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE: OPTIMIZATION OF GENE TRANSDUCTION INTO HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS. Yasuomi Horiuchi, Makoto Otsu, Nobutaka Kiyokawa, Osuke Migita, Tsutomu Ogata, Xiao-Kang Li, Masafumi Onodera, Akihiro Kume, Torayuki Okuyama, Junichiro Fujimoto, Hiromitsu Nakauchi, Tadatoshi Kuratsuji. 第13回日本遺伝子治療学会 平成19年6月28日～30日 名古屋。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

冠・脳血管攣縮の抑制薬としてのS1P3受容体拮抗薬の開発

所属 国立循環器病センター研究所 循環器形態部
研究者 望月直樹

研究要旨 新規S1P(スフィンゴシン1-リン酸)受容体拮抗薬TY-52156の血管収縮抑制効果を摘出血管で確認した。血管発生には影響のないことがわかった。血管内皮細胞ではS1P依存性の転写をTY-52156が抑制することがわかった。さらにS1P3が平滑筋・内皮細胞以外の中枢系・消化管でも発現していることを明かにした。

分担研究者

- (1) 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター
澤 洋文
(2) トーアエイヨー株式会社 東京研究所 村上 晶
(3) 国立循環器病センター研究所 福原茂朋

A. 研究目的

本研究の目的はS1P3特異的受容体拮抗薬を創薬して、臨床適応と考える血管攣縮を予防あるいは阻害することである。スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、活性化血小板から分泌され、S1P受容体(これまでにS1P1-S1P5の5つの受容体が明らかにされている)を発現する血管内皮細胞と血管壁細胞に作用することで生物学的作用を示すと考えられている。

本研究ではS1P3の拮抗薬を開発し、血管攣縮に対するこの薬剤の効果を判定して、臨床使用に発展させる。まず、血管攣縮に対しての抑制効果を①ex vivoの実験で確認すること②薬剤の生体の血管以外への作用③S1P3が発現する内皮細胞への影響④他の組織・臓器でのS1P3の発現を検討して、副作用の発現予想をおこなえるようにしたいと考えた。

B. 研究方法と材料

1) ラット摘出心 Langendorff 灌流標本

ペントバルビタールナトリウムを用いてラットを麻酔後、速やかに心臓を摘出し、ADInstruments ラングENDORFFシステム (ADInstruments Japan Inc.) に取り付けた。灌流には Krebs-Henseleit 溶液 (mM: NaCl 118.0, NaHCO₃ 25.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 3.0, glucose 11.0, EDTA 0.5) を用い、70 mmHg の灌流圧下で定圧灌流を行った。灌流液温は 37±0.2°Cとし、酸素分圧が 550 mmHg 以上となるように 95%O₂ ± 5%CO₂ の混合ガスでバブリングした。灌流量 (冠血流量)

(CF) の変化は、循環系の途中に装着した電磁血流プローブを介して測定した。約 20 min の通常灌流による安定化の後、化合物 (0.1 μM) 又は溶媒を循環系に約 5 分程度灌流し、灌流状態が安定した後に S1P (0.1 μM) 及び化合物 (0.1 μM) を含む溶液を負荷して灌流量の変化を測定した。CF 値

は解析ソフト PowerLab Chart (ADInstruments Japan Inc.) 上で演算処理を行い (1/3 最大値 + 2/3 最小値の数値を算出)、CF 値を示すデータとして採用した。

2) 脳底動脈を用いた血管収縮能への評価

体重 9.30kg~10.95kg のビーグル犬を使用し、ペントバルビタールナトリウムの静脈内投与にて麻酔を行った。後頭部を切開して頭蓋骨を切り取り、脳を取り出して脳幹部の脳底動脈をていねいに摘出し、氷冷 Krebs-bicarbonate 液 (mM; NaCl:118.0, KCl:4.7, CaCl₂:2.5, KH₂PO₄:1.2, MgSO₄:1.2, NaHCO₃:25.0, Glucose:11.0, pHは7.2) に浸漬させた。摘出した脳底動脈は実体顕微鏡下で結合組織を取り除いた後、長さ約 3 mm のリング標本とした。リング標本は、混合ガス (95%O₂, 5%CO₂) が通気された温度 37 °C の Krebs-bicarbonate 液 10 mL を満たしたオルガンバス中に、輪状筋方向の収縮が測定できるように三角形の二対の金具を介して固定した。発現する収縮は歪圧力計 (AP-621G, 日本光電) を介してマルチコーダー (MC6621, GRAPTEC) 上に記録した。標本には初期負荷として約 1.5g の張力を与え、約 0.5g ~1g の安定した静止張力が得られた段階から実験に使用した。なお、S1P 又はアンタゴニストを添加する前に 最終濃度が 60 mM となるように KCl 溶液を添加して標本の反応性を確かめた。S1P は適切な濃度 (0, 1, 5, 10 μM) となるように、Krebs-bicarbonate 液を満たしたオルガンバス中に添加した。なお、S1P による血管収縮強度は、60 mM KCl 溶液による収縮反応に対する比として算出した。S1P (5 μM) による収縮反応がプラトーに達した後、TY-52156 を所定濃度 (1, 3, 10 μM) となるようにオルガンバス中に累積添加し抑制率を算出した。

3) Zebrafish を用いた TY-52156 の発生への影響の検討

野生型 AB strain, transgenic zebrafish として Tg (fli:GFP) Tg (cmlc:RFP) を使用した。飼育は通常の

28度で行い、EmbryoはE3mediumをもちいた。

4) S1P 刺激により血管内皮細胞で誘導される遺伝子の同定

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)を用いた。8時間の血清飢餓後にS1P 1 mMで1、3、と6時間刺激した。それぞれの細胞からRNAを抽出してcDNAとした後に、DNAarray解析を行った。TY-52156の処理は刺激前30分間行って、処理の有無によって遺伝子発現を検討した。microarray解析:Agilent社のmicroarrayを用いて調べた。Quality controlとしては二つのサンプル以上で一貫した結果の得られたものを採用した。さらに誘導率が2倍以上あるいは、0.5倍(半分に低下した)ものを誘導による有意差があると判断した。

5) S1P3の生体での発現部位の検討

対象:剖検により作製されたヒト全身臓器のパラフィン切片を用いて、以下の方法により免疫組織学的方法を行った。

抗体:S1P₃/Edg3に対する抗体は現在入手できる抗体の中からparaffin blockを用いた免疫染色に使用可能であるMBL社(MA)から販売されている抗体を用いた。

免疫染色方法:

i) 切片の作成:臓器は中性緩衝ホルマリン溶液(マスクドホルム:日本ターナー)にて固定し、エタノールで脱水した後、パラフィン包埋し、薄切し、シランにてコートしたスライドグラスに乗せ、以下の染色を行なった。

ii) 脱パラフィン:切片はキシレンにて脱パラフィンを行い、その後アルコールで段階的に水和化し、蒸留水で洗浄を行った。

(倫理面への配慮)

Zebrafishを用いた動物実験は申請を行い、遺伝子組み換えの許可も得たのちに動物実験の取扱い指針に従って実験を行った。

トーアエイヨー株式会社における実験動物の飼育管理及び動物実験(動物を利用する試験研究)の計画・実施に際し、科学的及び動物福祉の観点からも遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき実施した。

ヒト材料を用いる病理学的検討は、日本病理学会の指針に沿って、またヒト組織の扱いについては病理解剖時に承諾された検体のみを本研究に使用させていただいた。標本の匿名化になるように、組織には個人名は一切わからないものを用いた。

C. 研究結果

TY-52156のin vitroにおける薬効プロフィール
(1) 冠血管への効果:

S1P添加群(0.1 μM)では劇的に冠血流量が低下するのに対してS1P₃受容体拮抗薬であるTY-52156処理群(0.1 μM)では明確にその作用

を抑制した(Figure 1)。一方、他のS1P受容体拮抗薬であるVPC23019(S1P₁受容体拮抗薬)及びJTE013(S1P₂受容体拮抗薬)(各0.1 μM)ではこれらの冠血流量に対する拮抗作用は観察されなかった。

また、TY-52156のS1Pに対する拮抗作用の特異性を確認すべく、トロンボキサンA2の類似体であるU-46619(0.1 μM)を用いた冠血流量低下作用に対するTY-52156の拮抗作用を確認したところ、明確な拮抗作用を示さなかった。

(2) 脳底動脈への効果

さらにS1Pによる血管収縮反応に対するTY-52156の効果を、イヌ摘出脳底動脈を用いて組織レベルで検証した。まずS1Pによる血管収縮反応の用量設定試験を実施した結果、5 μMで化合物の効果を判定するのに十分な血管収縮反応が確認された(60 mM KClでの収縮反応を100%としたとき、約20-30%の収縮反応)。そこで、S1P(5 μM)刺激により摘出血管の収縮反応がプラトーに達した後、TY-52156の累積投与(1、3、10 μM)を行い、血管収縮反応への影響を観察したところ濃度依存的な収縮反応の解除が観察された。

TY-52156の発生への影響

野生型Zebrafishを用いたTY-52156の発生に及ぼす影響を検討したが、初期発生、体軸形成における異常を誘導しなかった。時間経過でblastomereの形成からsomite形成、gastrulationなどを観察していったが、細胞に効果を示す100 nM以上の高濃度でも発生への影響はみられなかった。さらに、血管発生・心臓発生を可視化するZebrafishを用いて心血管系への影響を検討したが、明かな発生異常は認めなかった。

HUVECでのS1Pによる遺伝子発現誘導

S1P刺激によって、解析として意味のある遺伝子はarray上の41059遺伝子のなかで、Quality controlで31970遺伝子が解析該当遺伝子となりさらに有意な変動を示したものは656遺伝子であった。具体的には、VCAM-1、ICAM-1C、chemokineが増加した。また、ほかにCSF2、Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3、selectin E、interferon regulatory factor (IRF1)が顕著に増加した。

その他、スフィンゴシン1リン酸シグナルにかかわる遺伝子としてS1P1とS1P2、SPHK1(sphingosin kinase 1)の発現増加を認めた。

HUVECsをS1Pによって刺激した際に発現が増加する遺伝子がTY-52156により1時間ではそれほど抑制効果を示さないが、同じ遺伝子でも3時間では抑制傾向、さらに6時間では強い抑制を認めた。TY-52156は1 μMでは抑制傾向が弱い10 μMでは強い抑制が見られた。

血管の平滑筋層では陽性反応が認められた。特に動脈硬化巣に発現が認められた。また血管周囲の脂

肪組織にも陽性反応が認められる症例が存在した。血管以外で免疫染色陽性反応を認めた臓器としては、副腎の髄質、胃底腺の細胞、腸管の陰窩部の細胞、また中枢神経系では海馬の神経細胞に陽性像が認められた症例があった。肝硬変の肝臓で肝細胞に陽性所見を認めた症例も存在した。検索した臓器の中では精巣、甲状腺、肺胞上皮細胞では発現は認められなかった。

D. 考察

S1P は GPCR であり、そのサブタイプには S1P₁~S1P₅ 受容体が報告されている。これまで、摘出心臓を用いた灌流試験において、S1P が冠血流量を著しく低下させることが報告されている。しかし、どの受容体サブタイプが本作用に関与しているか不明であったが、本研究により S1P₃ 受容体はその機序に中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。また本研究では、イヌ摘出脳底動脈を用いた検討で TY-52156 は S1P による血管収縮反応を抑制した。

血管平滑筋収縮はミオシン軽鎖の磷酸化により増強、脱磷酸化により減弱するが、後者は Rho キナーゼによって抑制されている。S1P による冠血流量低下に対する TY-52156 の作用メカニズムを明らかとするため、HCASMCs を使い、S1P による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇及び Rho の活性化に対する TY-52156 の効果を検証した。その結果、TY-52156 は S1P による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を有意に抑制すること及び Rho の活性化の抑制傾向を示すことが判明した。

脳血管への効果を検討する実験では S1P を添加後、収縮反応がプラトーに達した後、薬剤添加を行っており、血管収縮反応の持続相を評価する系と考えられている。本条件下においても TY-52156 は濃度依存的に S1P の血管収縮反応を解除することが示されことから、TY-52156 は S1P による Rho の活性化を抑制すると考えられる。

トアエイヨーで新規に合成した TY-52156 の動物個体での安全性についての研究を行い、その安全性が確認できた。Zebrafish では S1P2 のノックダウンにより 2 分心臓が形成されてしまう (miles apart として報告されている)。この異常は、心臓の原基が lateral plate mesoderm にありこの左右の原基が正中で融合することが、心臓の tubulation に不可欠であると考えられている。この左右の原基の融合に、S1P、S1P2 受容体シグナルが重要であるので、S1P2 の発現減少により心臓が二つに別れたままの状態になると予想されている。S1P3 にも同様な作用を補助する機能があるとすると、S1P3 拮抗薬の TY-52156 でも 2 分心臓を起こしてしまう可能性もあったが、今年度の研究で、その可能性は否定することができた。

今回施行した S1P₃/Edg3 のヒトの各臓器を用いた免疫組織学的検索において、各臓器に存在する血管では、中膜平滑筋および動脈硬巣周囲部に免疫陽性反

応が認められた。さらに S1P₃/Edg3 は副腎の髄質、胃底腺の腺細胞、腸管陰窩部の細胞、中枢神経系の神経細胞、血管周囲の脂肪細胞にも免疫陽性反応を認めた。以上の結果から S1P₃/Edg3 は全身各臓器の動脈の平滑筋、および消化管、中枢神経系、副腎等に発現が認められており、S1P₃ 受容体拮抗薬の投与をする際には、精神神経症状、消化管症状、肝機能、副腎機能等にも留意して投与を行う必要が有ることが予想された。TY-52156 の作用する受容体が、血管以外にも存在することを考慮して副作用の検討を行うことが重要であることが示唆された。

血管内皮細胞を S1P 刺激した際に転写が亢進あるいは減弱する遺伝子を網羅的に array を用いて解析することで、細胞間接着、ストレス反応性に増加する遺伝子群が誘導されることを明らかにすることができた。

E. 結論

S1P3 特異的阻害剤 TY-52156 は、冠・脳血管の S1P 依存性の収縮を抑制することを ex vivo の系で明らかにした。また、個体発生には影響を及ぼさないことを Zebrafish で確かめた。S1P3 が血管以外にも発現することから、発現臓器での副作用を検討するときに考慮が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1226-1233, 2007
- (2) Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin. Invest* 117; 2812-2824, 2007
- (3) An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*. (in press)
- (4) Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2 Inhibits the Motility of a Human Glial Tumor Cell Line by Activating RhoA. *Mol. Cancer. Res.* 5, 1099-1109, 2007.
- (5) DDX1 promotes proliferation of the JC virus through transactivation of its promoter. *Microbiol Immunol.* 51: 339-347, 2007

(6) Identification of DDX1 as a JC virus transcriptional control region-binding protein. *Microbiol Immunol.* 51: 327-337, 2007

(7) Pharmacological cdk inhibitor R-Roscovitrine suppresses JC virus proliferation. *Virology.* 370:173-183,2007

2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

自己免疫疾患に対する蛋白性医薬品の創出戦略とその 応用に関する研究

所属 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
研究者 堤 康央

研究要旨

本研究では、自己免疫疾患に対する有効性・安全性に優れた新規蛋白性医薬品の創出を目的に、二種類の TNF 受容体の一方のみに結合する受容体指向性構造変異アゴニスト・アンタゴニスト TNF を作製し、in vitro および in vivo における特性評価を行った。

分担研究者

- (1) 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
角田 慎一
- (2) 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部
鎌田 春彦
- (3) 株式会社林原生物化学研究所
谷合 まどか
- (4) 株式会社林原生物化学研究所
有安 利夫

A. 研究目的

近年、自己免疫疾患の発症や悪化に関連して発現挙動に変化が認められる蛋白質（疾患関連蛋白質）群が数多く同定され、疾患のマーカーとして、また創薬ターゲットとして注目されている。特に現在、関節リウマチ、多発性硬化症といった難治性の自己免疫疾患においては、疾患の発症や悪化のメカニズムの解明、さらにそのメカニズムに応じた治療薬・治療方法の開発が厚生労働行政の面からも待望されている。このような背景のもと、昨今の国内外の研究から、自己免疫疾患をはじめとする広範な炎症の惹起・悪化における疾患関連蛋白質として、TNF が key molecule として認識されつつあり、TNF を創薬ターゲットとした医薬品開発が進められている。TNF は、生体内では可溶型／膜結合型 TNF として存在しており、全身性の

広範な炎症に加えて、局所的な炎症反応に対しても、その発症や悪化に関与することが明らかになっている。さらに、TNF が結合するレセプターには TNFR1 と TNFR2 が存在し、各レセプターが可溶型／膜結合型 TNF と相互に作用しつつ、非常に複雑かつ巧妙にその生体内反応が制御されており、どちらか一方のレセプターが自己免疫疾患の治療に寄与することが示唆されている。従って、可溶型／膜結合型 TNF の TNFR1/TNFR2 を介した“4種のリガンド-レセプター結合”の活性・機能を個別に解析、さらに生体防御機構の維持や自己免疫疾患の治療に関わるリガンド-レセプター結合には何ら影響を及ぼさず、炎症の惹起・悪化に関与する“特定のリガンド-レセプター結合”のみを阻害できる治療薬の開発が重要となってくる。本研究は、これまで我々が独自に開発してきたフェージ表面提示法を駆使し、TNFR1 および TNFR2 指向性の TNF 変異体（アゴニストおよびアンタゴニスト）を創出し、可溶型／膜結合型 TNF の TNFR1/TNFR2 を介した機能と作用を追求することを通じて、炎症の惹起・悪化あるいは生体防御機構の維持・形成における TNF/TNFR の役割を解析し、炎症性疾患に対する画期的な治療薬の開発に資することを目的としている。特にレセプター特異的なアンタゴニスト（TNF 変異体）は、宿主の生体防御機構を保持させながら、抗炎症作用を発

揮できる既存の抗 TNF 薬とは異なる画期的な医薬品となりうる。したがって、本研究は国民の健康と福祉の向上にも大きく貢献できるものと期待される。

B. 研究方法

B-1

リコンビナントタンパク質の作製

作製したプラスミドをヒートショック法で大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3) -RIL (STRATAGENE) に形質転換し、37°Cで一晩培養した。OD₆₀₀ = 3.0 になった時点で終濃度 1mM の IPTG を加え、さらに 4 時間培養後することで、リコンビナントタンパク質を inclusion body として誘導した。培養した大腸菌を 3,000 rpm、10 分間遠心を行うことにより回収し、TES buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、40 mM EDTA、250 mM NaCl) で懸濁し、終濃度 0.23 mg/mL となるように Lysozyme (Roche Diagnostics) を加え、室温で 1 時間振とう培養した。その後、終濃度 0.5 M および 2.5% となるように NaCl および Triton X-100 を添加し、室温で 1 時間振とう培養した後、4°C、10,000 rpm、40 分間遠心した。得られた沈殿をソニケーションにて粉碎し、再度 TES buffer に懸濁し、洗浄操作を行った後、4°C、10,000 rpm、40 分間遠心し、得られた沈殿を inclusion body として回収した。得られた inclusion body を GTE buffer (6 M Guanidine HCl、100 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA) に懸濁し、4 時間室温にて静置した。Dithioerythritol (Sigma-Aldrich, Inc.) を終濃度 10 mg/mL となるように添加し、4 時間室温で静置した。その後、pH9.5 に調整した Refolding Buffer (100 mM Tris pH8.0、2 mM EDTA、1 M Arginine)、および Glutathione oxidized (Sigma-Aldrich, Inc.) を 55mg/L の濃度で Refolding Buffer に添加後、攪拌しながら可溶化した inclusion body 溶液を加え、4°Cで 30 時間静置した。Dialysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4、100 mM Urea) を用いて 4°Cで透析し、Membrane Filters (cellulose acetate, 0.2µm,

ADVANTEC) を用いてフィルター掛けした後、buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA) で平衡化した Q sepharose (Amersham Biotech, Inc.) に添加し、0.3 M NaCl 含有 buffer A で溶出させることによりタンパク質を濃縮した。得られた溶出液を、PBS で平衡化した superose 12 HR 10/30 (Amersham Biotech, Inc.) にて、human wtTNF と同じ分画である約 50 kDa のピークを分取した。

ヒト TNFR1 を介した生物活性の評価 (HEp-2 細胞に対する細胞傷害性試験)

96well plate に 4×10^4 cells の HEp-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 2 時間培養を行った後、予め、100 µg/mL シクロヘキシミド (和光純薬株式会社) 含有 10% FCS-RPMI にて段階希釈したサンプル 100 µL を加えた。18 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、plate を洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、比活性を評価した。標準品には、recombinant human TNF (peprotech, Inc.) を用いた。

BIAcore を用いた各 TNF 変異体の human TNFR1 および TNFR2 に対する結合力の測定

BIAcore biosensor (BIAcore 2000、ピアコア株式会社) を用いて各変異体の human TNFR1 (hTNFR1) および human TNFR2 (hTNFR2) に対する親和性を測定した。各 TNF サンプルを、4 µg/mL から、4.9 ng/mL にランニングバッファー HBS-EP で適宜希釈し、各 TNF レセプターを固相化した CM5 センサーチップ上に 60 µL (3 min) インジェクション後、180 秒ランニングバッファーを流すことで結合反応と解離反応における相互作用を計測した。各速度パラメーターの算出は BIA evaluation 3.0 program を用いて行った。

TNFR1 を介した生物活性の評価 (L-M 細胞に対する細胞傷害性試験)

あらかじめ、96well plate にて 1% FCS 含有 MEM にて 10 倍希釈又は段階希釈したサンプル 100 μ L に、20 μ g/mL アクチノマイシン D (終濃度 1 μ g/mL、和光純薬株式会社) 含有 1% FCS-MEM で 3×10^4 cells/100 μ L/well に希釈した L-M 細胞を添加した。細胞播種後、24 時間培養を行った後、25% グルタルアルデヒドで生細胞を固定した。以降の測定は、上述した「HEp-2 細胞に対する細胞傷害性試験」に準じて行った。

GalN/TNF 肝炎モデル

BALB/c マウス雌 6 週齢は日本 SLC より購入した。搬入後 2 日間予備飼育し、各群 n=6 で検討した。コントロール群は 20 mg GalN (Sigma Aldrich) および 1.0 μ g human wtTNF を生理食塩水 (or PBS (-)) に溶解し、尾静脈より投与した。治療群は GalN/TNF に加え mutTNF-T2 または抗 human TNF 抗体 (anti-human TNF antibody; R&D systems, clone number AB-210-NA) を尾静脈より共投与した。mutTNF-T2 の投与量は、10、30、270 μ g/mouse、抗 human TNF 抗体は 50 μ g/mouse で検討した。抗炎症効果の検討は、マウスの生存率および血中 ALT 濃度の測定により評価した。血清中 ALT レベルは 6 時間ごろから上昇し、9 時間後に最大値に達することを確認していることから、共投与後 9 時間後に採血を行った。

四塩化炭素誘発肝炎モデル

BALB/c マウス (雌 6 週齢) は日本 SLC より購入した。肝炎誘発モデルは四塩化炭素 (和光純薬) を 0.1 ml/kg となるよう 10 mg/kg のコーン油 (和光純薬) で希釈し、腹腔内投与した。コーン油のみ投与した群をノーマル群とした。このモデルにおいて、血中 TNF 濃度は投与後 12 時間後に最大値となるため、四塩化炭素投与 12 時間後に PBS (-) (コントロール群) および mutTNF-T2、抗 mouse TNF 抗体 (Purified rat anti-mouse TNF antibody; BD Biosciences, clone number MP6-XT3) を静脈内投

与した。その後四塩化炭素投与後 24、48 時間後に採血を行い、血清を得た。mutTNF-T2 の投与量は、30、90、270 μ g/mouse、抗マウス TNF 抗体の投与量は 20、100 μ g/mouse で検討した。

B-2

構造変異 TNF の発現プラスミドベクターの構築

mutTNF-T2 の遺伝子は、Nde I サイトおよび、EcoR I サイトを付加したプライマー、TNF-oligo-18 (5' -GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GTC AGA TCA TCT TCT CAA CCC CGA GTG-3') および new-Eco-TNF (5' -CTT CC TTT CGG GCT TTG TTA GCA GAA TTC TTA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG-3') を用いて、アニーリングを 60°C で 1 分間、伸長反応を 68 °C で 1 分間に設定し、サイクル数 35 で増幅し PCR 産物を得た。PCR purification kit で精製後、Nde I (Roche Diagnostics 株式会社) および、EcoR I (Roche Diagnostics 株式会社) によって処理した。予め、Nde I、EcoR I で処理した pYas-1 にライゲーションキット Ver.2 (宝酒造株式会社) を用いてライゲーションことで、TNF 変異体の発現プラスミドを作製した。

ELISA による各 TNF 変異体の human TNFR1 および human TNFR2 に対する結合力の評価

96well Immuno Plate (NUNC) に B buffer で 5 μ g/mL に希釈した goat IgG fraction to human IgG Fc (CAPPEL; ICN Biomedicals, Inc.) を固相化した。2% BlockAce を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングを行い、PBS による洗浄操作を 3 回繰り返した後、希釈溶液 (0.4% BlockAce) にて 0.2 μ g/mL に希釈した human TNFR1 および TNFR2 Fc chimera (ALEXIS) を添加した。添加後、4% BlockAce を用いて blocking を行った。予め 0.4% BlockAce で 100 ng/mL に希釈した wtTNF-FLAG と段階希釈したサンプルを 1:1 で混合したプレミクスチャーを添加した。室温 2 時間反応させた後、先ほどと同様の洗浄操作を行い、0.4% BlockAce で 0.2 μ g/mL に希釈した Biotinylated anti-FLAG M2 Ab (Sigma-Aldrich, Inc.) を添加した。室温 2 時

間反応させた後、先ほどと同様の洗浄操作を行い、1000倍希釈したアビジン HRP を添加した。室温 1 時間反応させ、同様の洗浄操作を行い、基質溶液 (TMBZ) 100 μ L/well を加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加し反応を停止した。

PEG-T2 (monoPEG 化 mutTNF-T2) の作製

mutTNF-T2 の PEG 化には mPEG-SPA, MW 5,000 (the succinimidyl ester of methoxy poly (ethylene glycol) propionic acid, molecular weight 5,000, shearwater corporation) を用いた。mPEG-SPA, MW5,000 は mutTNF-T2 に対して、10 倍モル量の PEG を添加し、37°C、15 分間反応させた。ε-アミノカプロン酸 (Sigma-Aldrich, Inc) を PEG の 10 倍量添加することにより、反応を競合停止させた。得られた PEG-T2 は PBS で平衡化した Superose 12 カラムを用い、PEG 鎖が一分子結合したフラクションをモノ PEG 化体として分取精製し、以降の実験に供した。

破骨細胞分化誘導に対する阻害活性評価

骨髄細胞を DBA/1J マウスの大腿骨から採取し、10%FCS、抗生物質を含む MEM に懸濁し、50 ng/mL M-CSF 存在下で 1.5×10^4 cells/cm² となるよう播種し、3 日間培養した。培養上清を除き、PBS で洗浄した後に、接着している細胞をトリプシン処理によって回収し、48well plate に 1.5×10^4 cells/well となるように播種した。予め各濃度に希釈した mutTNF-T2 と 20 ng/mL に希釈した recombinant mouse TNF を混合し、細胞に添加した。5 日間培養した後に、細胞をグルタルアルデヒドで固定し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphate: TRAP) 染色キット (Cell Garage) で染色することで TRAP 陽性細胞を検出し、顕微鏡下で TRAP 陽性細胞を計数した。

B-3

独立行政法人医薬基盤研究所で予めスクリーニングされ、組換えられた発現用プラスミドを用いて、大腸菌を形質転換することで、野生型およ

び種々の機能性人工 TNF を産生する大腸菌を樹立した。大量調製を目指して、この大腸菌のインクルージョンボディより組換えタンパク質を回収し、陰イオン交換 Q-sepharose ならびにゲル濾過 Superdex 200 カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。

さらに、臨床応用に向けたタンパク医薬品の作製のため、試料に含有する可能性のある LPS などの発熱性物質をより完全に除去するため、引き続き、検討を加えた。最終的に、尿素添加溶媒を用いた、Q-sepharose および Superdex 200 カラムによるリクロマトグラフィーを採用し、最終精製法とした。

精製標品は、ヒト咽頭癌細胞株 HEP-2 細胞およびマウス線維芽細胞株 L-M 細胞に対する細胞傷害活性にて生物活性を評価した。また、ヒト TNFR2 特異的なシグナル伝達を調べるために、ヒト野生型 TNF の刺激に対してラット GM-CSF が産生誘導される、ヒト TNFR2 のみを強制発現させた CTL ハイブリドーマ PC60 細胞 (ラット×マウス) を用い評価した。

B-4

TNF が発症および症状の増悪に関与している疾病 2 種①関節リウマチ症、②2 型糖尿病について、疾患動物モデル実験系の確立および治療実験系の確立を目指した。

①関節リウマチモデル (CAIA) : 関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを用いる CAIA は、一般的に広く用いられるコラーゲン誘発リウマチモデル (CIA) と比較して、抗リウマチ効果評価期間が約 1/3 と短縮でき、治療薬のスクリーニングに優れた方法と見られる。

今回、CAIA の系の確立と治療実験系の確立を目指した。BALB/c マウスへ関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを静注し、3 日後 LPS を腹腔内投与し、経日的に体重、Paw の厚み (Paw スコア) と、関節炎 (RA) スコアを記録し、症状を評価した。発症開始を確認した時点で、腹腔内へ、生食またはポジティブコントロールであるエタネルセプト (Enbrel ; TNFR2-IgG Fc) を 2 週間連日朝

タ2回投与し、症状の推移を評価した。

②2型糖尿病モデル(KK-Ay):肥満型2型糖尿病モデルマウス KK-Ay は、加齢に伴い糖尿病を発症する。尿糖をチェックし、すべてのマウスの発症を確認後、群分けして、以下標品を週2回腹腔内投与あるいは経口投与し、随時血漿をサンプリングして、血糖値(隔週)・インスリン値(2週間間隔)等を分析し、症状を評価した。また、正常マウスコントロール群として、C57BL/6も同様に標品投与した。標品として、生食、既存薬ピオグリタゾン(TZD、これのみ混餌経口投与)、抗マウスTNF中和抗体を用い、標品投与は、計12回行い、TZDは、粉餌に混ぜて自由摂取させた。

(倫理面等への配慮)

本研究において、ヒト由来の組織等を使用しないため、倫理面に配慮する点は特にない。また本研究計画では組換えDNA実験を行うが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、機関承認実験として承認されている。

C. 研究結果

C-1

TNF指向性アゴニストの特性評価

構築した構造変異TNFライブラリを最適条件下でパンニングし、迅速かつ網羅的にTNF-R1指向性TNF変異体の創出を試みた。その結果、TNF-R1を介した生物活性が増強されたクローンやTNF-R1指向性アゴニストの候補クローンを多数得ることに成功し、また生物活性は示さないもののTNF-R1への結合力を有するTNF-R1指向性アンタゴニストの候補クローンも単離することに成功した。得られた候補クローンのアミノ酸配列を解析したところ、置換したアミノ酸残基の中で、生物活性を示したクローン全てにおいてY87が保存されていることが判明し、TNFの構造-活性に関する既存の概念を覆す新しい知見が得られた(表1)。

TNF/GalN誘発肝炎モデルにおけるmutTNF-T2の抗

炎症効果

In vivoにおけるmutTNF-T2の炎症に及ぼす影響を検討するため、まずGalN/TNF誘発肝炎モデルにおけるmutTNF-T2の肝炎抑制効果を検討した。生存率について確認した結果(図1)、GalN/TNFと共にPBSを投与したコントロール群においては、9時間から15時間後にすべてのマウスが死亡し、24時間後の生存率は0%であった。一方、mutTNF-T2投与群においては、全ての群でTNF中和抗体投与群よりも生存率の向上が認められた。中でも270 μ g/mouse群においては15時間後における生存率が60%であり、その後2週間以上生存した。次に肝障害マーカーである血中ALT値についても検討を行った。コントロール群においてALT値の顕著な上昇が見られたが、mutTNF-T2投与により投与量依存的にALT値上昇の抑制が見られ、270 μ g投与群においては有意なALT値上昇の抑制効果が認められた(図2)。

四塩化炭素誘発肝炎モデルにおけるmutTNF-T2の抗炎症効果

四塩化炭素投与後、48時間後の血中ALT値を測定した結果、コントロール群のALT値は24時間後と比べ顕著に低下しているものの、依然としてノーマル群よりも高い値を示した。一方、mutTNF-T2投与群ではコントロール群と比較し顕著にALT値が低下していることが確認され、30 μ g投与群においても有意にALT値の低下が認められた(図3)。興味深いことに、TNF中和抗体投与群において、20 μ g投与群ではコントロール群と比較して有意なALT値の低下が認められたものの、100 μ g/mouse投与群では逆に顕著なALTの上昇が認められた。この現象について詳細なメカニズムは不明であるが、同様の現象が幾つか報告されている。その報告によると、四塩化炭素誘発肝炎モデルは、約24時間後に肝障害の指標であるALT値が最大となり、48時間後には自然治癒に向かうモデルであるが、この治癒過程にはTNFR2が関与しているために、中和抗体によって完全に内在性TNFが枯渇されると自然治癒が遅れるのではないかと考察されている。今回の検討で、TNFR1のみ

を選択的に阻害する mutTNF-T2 投与することで、肝障害マーカーである ALT 値の有意な低下が認められた。このことから、TNFR2 を介した作用を阻害することなく、TNFR1 を介した細胞障害活性や炎症反応のみを選択的にブロックすることで、四塩化炭素誘発肝炎モデルにおける肝障害を効果的に抑制できることが示唆された。

C-2

モノ PEG 化 mutTNF-T2 の作製

部位特異的バイオコンジュゲーションを行うに当たり、一般に広く用いられており、有効性が認められている直鎖型で分子量 5,000 の PEG を用いた。TNF は三量体形成しており、一分子中 3 個存在している N 末端アミノ基のうち、1 個の N 末端アミノ基に対し、PEG を一分子導入したモノ PEG 化 mutTNF-T2 (PEG-T2) を作製した (図 4)。この PEG-T2 の TNFR1 に対する結合力を BIAcore を用いて評価した結果、結合力の指標である KD が PEG 化していない mutTNF-T2 とほぼ同等であり、そのセンサーグラムからも同等の結合力を有していることが確認された (図 5)。次に、アンタゴニスト活性について、L-M 細胞を用いて検討した結果、PEG 化していない mutTNF-T2 のグラフと PEG-T2 のグラフが重なることから、ほぼ、同等のアンタゴニスト活性を有していることが判明した (図 6)。

破骨細胞分化誘導に対する阻害活性の評価

TNF が生体内で発揮する生理作用のうち、破骨細胞分化に対する阻害効果について検討した。

TNF は破骨細胞の分化制御を担う重要なサイトカインであることが知られている。破骨細胞は骨吸収や骨粗しょう症、関節炎における関節破壊に密接に関係している。マウス骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養し、wtTNF を作用することで、破骨細胞様分化の代表的なマーカーである TRAP 陽性を示す細胞が多数観察される。この作用は wtTNF が TNFR1 に結合することで発揮されるものと考えられている。そこで、wtTNF と共に各濃度へ希釈した mutTNF-T2 を作用させたところ、TRAP 陽性細胞が顕著に減少していた (図 7)。即ち、mutTNF-T2

が wtTNF による破骨細胞分化誘導に対して阻害活性を示すことが明らかとなった。

C-3

5 種類の機能性人工 TNF をはインクルージョンボディとして発現させ、1 L 培養あたり、1.25 g ~2.5 g 重量の回収を得た。そのうち、200 mg タンパク量を用いて変性溶解・リフォールディング処理後、Q-sepharose に吸着させ、0.3 M NaCl で溶出し、Superdex200 カラムクロマトグラフィーにより、40 kDa 付近のピーク画分を回収した。しかし、この時点で、発熱性物質の濃度が、1 ng/mg タンパク質を大きく上回ったため、発熱性物質の除去を試みた。種々の検討の結果、0.2 M 尿素添加溶媒で Q-sepharose カラムクロマトグラフィーを再度行い、Superdex200 により溶媒置換することにより最終標品を得る方法とした。この手法の結果、発熱性物質濃度も 1 ng/mg タンパク質以下となり、動物実験に供することが出来るグレードの標品と判断した。(表 2)

これらの標品について、in vitro 試験により、TNF としての生物活性を評価した。ヒト TNFR1 を介した生物活性は、HEp-2 細胞に対する細胞傷害性 (図 8) により、一方、マウス TNFR1 を介した生物活性 (図 9) は L-M 細胞に対する細胞傷害性により評価した。

図 8 に示すように、M2 および M3 は、野生型 TNF と同等のアゴニスト活性を示し、一方、TNFR1 指向性アンタゴニスト M4、TNFR2 指向性アゴニスト M5 は、ほとんど細胞傷害活性を示さなかった。

TNFR1 指向性アゴニスト M3 は、TNFR1/R2 アゴニスト M2 と異なり、マウス TNFR1 に対しては活性を示さず、ヒト TNFR1 特異的に反応し、細胞傷害活性を示した (図 9, 10)。

また、TNFR1 指向性アンタゴニスト M4 については、マウス L-M 細胞系で、一定量の WT TNF と共存させることによる競合阻害活性にて評価した。その結果、M4 は添加量依存的に野生型 TNF 活性を阻害した (図 10)。

一方、ヒト TNFR2 指向性アゴニスト M5 は、ヒト HEp-2 細胞に対しては細胞傷害性は示さなかつ

た (図 8) が、ヒト TNFR2 のみを強制発現させた CTL ハイブリドーマ PC60 細胞に対しては、シグナル伝達が認められた (図 11)。

以上の結果、高純度の機能性人工 TNF を大量生産するシステムを確立した。今回調製した標品は、*in vitro* 試験により期待通りの生物活性を保持していることが判った。

インクルージョンボディ 1 g 重量当たりのタンパク量は、約 100 mg。回収率が、10%と仮定すると、精製標品を 1 g 調製するためには、最も回収率が低いワーストケースで約 80 L 量培養が必要となる。TNF 変異体毎に条件を詰めれば、回収率を上げることは可能と考えられるので、培養量も数 10 L 程度に抑えることができると考えている。

今回調製した標品は、*in vitro* 試験により期待通りの生物活性を保持していることが判り、今後の *in vivo* 試験において、充分使用可能であると判断された。

C-4

①関節リウマチモデル(CAIA)

関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを用いることにより、期待どおりの期間に関節炎を惹起された。また、Enbrel 投与群と対照 (生食) 投与群間に症状の有意な差が認められた。

関節炎の発症は、惹起後 5 日目に認められた。指先からの浮腫ではなく、いきなり四肢先全体の腫脹が確認された。発症確認後群分けし、翌日 (6 日目) より生食または Enbrel 投与を開始した。体重は LPS 投与のみにおいても 10-20%の減少が認められた (図 15)。

関節炎の平均スコア値は 8 日目でピークとなり生食群のスコアは暫減したものの、21 日目までスコア 3 以上を維持した。一方、Enbrel 投与群は、RA スコアのピークも低く、さらに、その後のスコア値も低下し、有意な抑制効果が認められた (図 13)。また、Paw スコアも同様の傾向を示した (図 14)。

CAIA モデル系は、期待されたとおり、2 週間程度で関節炎を発症した。さらに、発症時から標品

を投与開始することにより、治療効果も評価できると考えられた。

CIA モデルは、指先の腫脹から発症が開始する。一方、CAIA モデルは、四肢先全体がいきなり腫脹するのが特徴で、症状の評価は、RA スコアよりも Paw スコアの方がより反映していると判断された。但し、測定方法の汎雑さと、急激な発症のために個体間のバラツキも大きい結果となり、有意差を得るためには、試験群を 10 匹以上確保する必要があると予想された。

②2 型糖尿病モデル(KK-Ay)

尿糖により発症が確認された KK-Ay マウスは、その後、血糖値・インスリン値においても週令とともにさらに高値へ推移した。体重も増加し、典型的な 2 型糖尿病を発症していた。

投与系の評価については、ポジティブコントロールとして 2 型糖尿病経口薬 TZD は、効能どおり、血糖値およびインスリン値の改善をはじめ、有意な糖尿病改善効果が認められ、副作用の体重増加も確認された。また、TNF アンタゴニストの抗マウス TNF 中和抗体 (Mab-TNF) は、インスリン抵抗性 (インスリン抵抗性の指標 ; HOMA-IR) の改善と、脂質代謝の改善が認められたが、血漿アディポネクチン値に差は、認められなかった。

図 15 に示すように、血糖値の推移は、生食群で経時的に増加した。それに対して、TZD 投与群は有意な血糖値降下効果を示し、TNF 中和抗体による効果は認められなかった。

最終投与後、空腹時血糖値とインスリン値から得られる HOMA-IR 値を評価した。HOMA-IR 値は、4 以上で強いインスリン抵抗性を意味するが、生食群の値は、強い糖尿病発症を示していた。また、それと比較して抗体・TZD 群とも有意に低下していた (図 16)。

12 回投与終了後、空腹時血漿アディポネクチン値は、KK-Ay 生食投与群は、C57BL/6 生食投与群のレベルと比較して有意に低下しており、糖尿病発症を示していた。一方、TZD 投与群の血漿アディポネクチン値は、C57BL/6 生食投与群のレベル

程度に上昇していた。一方、抗体投与群は、KK-Ay 生食群と有意な差は認められなかった (図 17)。

投与終了し、経口糖負荷試験を行った。KK-Ay 生食群の血糖値は、正常コントロール C57BL/6 生食群といずれの点においても有意に高く、糖尿病発症が示された。一方、TZD、抗体群は、KK-Ay 生食群に比べて、ピーク値こそ低い、経時的な血糖値の減少には有意な差は、認められなかった (図 18)。

糖尿病の直接的症状ではないが、メタボリック シンドロームの指標の一つであり、肥満から 2 型糖尿病へ移行する際に多く認められる脂質代謝異常についても評価するため、遊離脂肪酸 (NEFA) および血漿中性脂肪 (トリグリセリド) について調べた。その結果、KK-Ay 生食投与群の血漿レベルは高く、それと比較して、TZD および抗体投与群において脂質代謝改善効果が認められた (図 19)。

生食群は、いずれもほぼ期待通りの分析結果となったことから、KK-Ay マウスを用いて、2 型糖尿病モデル系を確立することができたと判断した。さらに、治療効果を評価するための投与系もほぼ確立できたと判断した。

今後、この実験系を基本に、試験項目をさらに追加して、例えば、TNF レセプター指向性アンタゴニストの 2 型糖尿病モデルに対する治療薬としての標品評価ができると考えられた。

ただし、今回ポジティブコントロールに用いた TZD は、効果が強い上、タンパク製剤に比べて薬価も安価であるため、TNF レセプター指向性アンタゴニストの糖尿病治療薬としての実用化は難しいと考えられる。しかし、生体内で多面的な生理活性を有する TNF を分子標的とした場合、例えば、関節リウマチと糖尿病を併発した患者に対してどのような臨床効果あるいは副作用が予想されるのかについて研究することは重要であると考えている。

D. 考察

C. 研究結果の欄に記載

E. 結論

本検討では、独自のファージ表面提示法を駆使して、1 億種類もの多様性を持った TNF の構造変異体ライブラリの中から、医薬価値に優れたタンパク質医薬品のスクリーニングを行い、複数の TNFR1 受容体指向性構造変異 TNF を得ることができた。この研究過程の中で、我々は TNFR1 指向性アンタゴニストである mutTNF-T2 を見いだすことに成功している。この mutTNF-T2 を用いて *in vivo* における抗炎症薬としての特性を肝炎モデルにて検討した結果、mutTNF-T2 は肝炎を抑制する活性を持つことが明らかになった。今回の結果は mutTNF-T2 の抗炎症剤としての有用性を示す重要な知見であり、これまで TNF 中和抗体を治療に用いることが困難であった疾患に対し、レセプター指向性アンタゴニストを用いることで、その治療が可能になるものと期待される。

また、本研究では、抗炎症治療薬としての機能性人工タンパク質である mutTNF-T2 を作製し、それらの *in vitro* における治療効果へのメカニズム解析についてその基礎検討を行った。また、*in vivo* への適応を目指して、機能性人工タンパク質の体内安定性を改善するテクノロジーの一つであるバイオコンジュゲーションを試行し、mutTNF-T2 が有する生物活性を完全に保持した PEG-T2 を得ることができた。今後、この mutTNF-T2 ならびに PEG-T2 を有効な抗 TNF 療法の医薬品候補として利用するための、基礎情報の集積をはかるとともに、立体構造解析や TNF/TNFR 機能の解析を通じて、病態の形成・悪化メカニズムと TNF との関連性を調べることで、より安全性の高い自己免疫疾患に対する根治治療薬の開発を行っていきたいと考えている。

さらに、機能性人工 TNF 発現プラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、インクルージョンボディとして組換え蛋白質を調製し、変性溶解リフォーリング後、カラムクロマトグラフィーにより精製標品を安定供給できるシステムが確立できた。また、今回調製した標品は、*in vitro* 試験により期待通りの生物活性を保持していることが

判った。

また、TNF が発症・増悪に関与すると見られる疾病 2 種①関節リウマチ症、②2 型糖尿病について、モデル実験系が確立できた。今後、スクリーニングされた TNF レセプター指向性アンタゴニスト・アゴニスト等の各種機能性人工 TNF を用いて、*in vivo* での治療効果実験を進める上で、これらの疾患動物モデルを用いた実験系は有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. : Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain., *Biol. Pharm. Bull.*, 30(2):218-223, 2007.
2. Gao J.Q., Kanagawa N., Motomura Y., Yanagawa T., Sugita T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S. : Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer., *Gene Ther.*, 14(6):491-502, 2007.
3. Hayashi A., Wakita H., Yoshikawa T., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Mukai Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S. : A strategy for efficient cross-presentation of CTL-epitope peptides leading to enhanced induction of *in vivo* tumor immunity., *J Control Release.*, 117(1):11-9, 2007.
4. Tanimoto T., Yamamoto S., Taniai M., Taniguchi M., Ariyasu H., Ushio C., Aga M., Mukai Y., Tsutsumi Y., Ariyasu T., Ohta T. and Fukuda S. : The combination of IFN- α 2 and IFN- α 8 exhibits synergistic antiproliferative activity on renal cell carcinoma (RCC) cell lines through increased binding affinity for IFNAR-2., *J. Interferon. Cytokine. Res.*, 27(6):517-523, 2007.
5. Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035, 2007.
6. Gao J.Q., Eto Y., Yoshioka Y., Sekiguchi F., Kurachi S., Morishige T., Yao X., Watanabe H., Asavatanabodee R., Sakurai F., Mizuguchi H., Okada Y., Mukai Y., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S. : Systemic Administration of PEGylated Adenovirus Vector Enhances Vector Accumulation and Gene Expression in Tumors and Improves Anti-tumor Effects in Cytokine Gene Therapy., *J. Control. Release.*, 122(1):102-110, 2007.
7. Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library., *Pharmazie.*, 62(8):569-573, 2007.
8. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity

of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363:1027-1032, 2007.

9. 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., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : 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.
10. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, in press.

総説・その他

1. 堤 康央, 石井明子, 早川堯夫 : 第6節 機能性人工タンパク質., *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, (株)エル・アイ・シー, p.369-378, 2007.
2. Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y. : Development of new anti-TNF therapy., *Inflammation and Regeneration*, 27:512-515, 2007
3. 向 洋平, 堤 康央, 中川晋作., *細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの応用技術.*, *絵で見てわかるナノ DDS.*, 遺伝子医学 MOOK 別冊, p.184-190, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

PDB への登録

1. Mukai Y., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : TNF Receptor Subtype One-selective TNF Mutant with Antagonistic Activity :2007, (PDB ID 2E7A and RCSB ID RCSB026314)

表1 TNFR1指向性構造変異TNFのアミノ酸配列

Clone.	Sequense					
	A 84	V 85	S 86	Y 87	Q 88	T 89
mTNF-	A	V	S	Y	Q	T
Lys-(-)	(GCC)	(GTC)	(TCC)	(TAC)	(CAG)	(ACC)
2-1C	T	N	H	Y	S	N
	(ACC)	(AAC)	(CAC)	(TAC)	(TCG)	(AAC)
2-1F	S	S	T	Y	P	D
	(AGC)	(TCG)	(ACC)	(TAC)	(CCC)	(GAC)
2-2A	S	K	T	Y	T	H
	(TCG)	(AAG)	(ACC)	(TAC)	(ACC)	(CAC)
2-2B	S	P	L	Y	P	K
	(AGC)	(CCC)	(CTG)	(TAC)	(CCC)	(AAG)
2-2D	S	T	N	Y	N	G
	(TCC)	(ACC)	(AAC)	(TAC)	(AAC)	(GGC)
2-2E	S	S	A	Y	A	S
	(TCC)	(AGC)	(GCG)	(TAC)	(GCG)	(AGC)
2-2G	T	S	A	Y	G	P
	(ACC)	(TCG)	(GCC)	(TAC)	(GGG)	(CCG)
2-2H	S	R	V	Y	T	A
	(TCG)	(CGC)	(GTG)	(TAC)	(ACC)	(GCC)
2-3A	S	N	A	Y	D	I
	(TCG)	(AAC)	(GCC)	(TAC)	(GAC)	(ATC)
2-3F	T	T	A	Y	S	G
	(ACG)	(ACG)	(GCG)	(TAC)	(AGC)	(GGC)
2-4B	T	H	K	Y	P	Q
	(ACG)	(CAC)	(AAG)	(TAC)	(CCG)	(CAG)
2-4C	S	K	T	Y	S	H
	(AGC)	(AAG)	(ACC)	(TAC)	(TCC)	(CAC)
2-4E	S	S	H	Y	R	F
	(TCG)	(TCC)	(CAC)	(TAC)	(AGG)	(TTC)
2-5A	T	T	A	Y	P	W
	(ACC)	(ACG)	(GCC)	(TAC)	(CCG)	(TGG)
2-5C	A	R	S	Y	N	R
	(GCC)	(CGC)	(AGC)	(TAC)	(AAC)	(AGG)
2-5F	S	Q	A	Y	N	T
	(TCG)	(CAG)	(GCG)	(TAC)	(AAC)	(ACG)
2-5H	S	H	T	Y	P	S
	(AGC)	(CAC)	(ACC)	(TAC)	(CCG)	(AGC)
2-6A	T	P	A	Y	P	R
	(ACC)	(CCC)	(GCC)	(TAC)	(CCC)	(CGG)
2-6B	T	K	S	Y	S	K
	(ACG)	(AAG)	(TCC)	(TAC)	(TCC)	(AAG)
2-6C	T	E	Q	Y	S	H
	(ACC)	(GAG)	(CAG)	(TAC)	(TCC)	(CAC)
2-8A	T	P	Q	Y	P	S
	(ACG)	(CCC)	(CAG)	(TAC)	(CCG)	(TCC)

Clone	Sequense					
	A 84	V 85	S 86	Y 87	Q 88	T 89
mTNF-	A	V	S	Y	Q	T
Lys-(-)	(GCC)	(GTC)	(TCC)	(TAC)	(CAG)	(ACC)
3-1B	S	S	S	Y	Q	S
	(TCC)	(AGC)	(TCC)	(TAC)	(CAG)	(TCG)
3-3A	S	T	S	Y	P	T
	(TCC)	(ACG)	(TCC)	(TAC)	(CCG)	(ACC)
3-3D	A	V	S	Y	Q	T
	(GCC)	(GTC)	(TCC)	(TAC)	(CAG)	(ACC)
3-3H	S	A	T	Y	P	H
	(TCG)	(GCG)	(ACG)	(TAC)	(CCG)	(CAC)
3-4A	S	K	T	Y	S	H
	(AGC)	(AAG)	(ACC)	(TAC)	(TCC)	(CAC)
3-4B	A	V	S	Y	Q	T
	(GCC)	(GTC)	(TCC)	(TAC)	(CAG)	(ACC)
3-4C	T	A	A	Y	P	A
	(ACG)	(GCC)	(GCC)	(TAC)	(CCC)	(GCG)
3-4D	S	D	S	Y	T	S
	(TCG)	(GAC)	(AGC)	(TAC)	(ACG)	(AGC)
3-4E	T	D	R	Y	S	S
	(ACG)	(GAC)	(CGC)	(TAC)	(AGC)	(AGC)
3-5B	T	D	S	Y	P	S
	(ACC)	(GAC)	(AGC)	(TAC)	(CCC)	(TCG)
3-5C	G	D	S	Y	H	T
	(GGC)	(GAC)	(TCG)	(TAC)	(CAC)	(ACG)
3-5F	A	K	S	Y	P	S
	(GCC)	(AAG)	(TCG)	(TAC)	(CCC)	(TCC)
3-5H	T	S	A	Y	D	H
	(ACC)	(TCC)	(GCC)	(TAC)	(GAC)	(CAC)
3-7D	N	H	R	Y	Q	D
	(AAC)	(CAC)	(AGG)	(TAC)	(CAG)	(GAC)
3-7F	T	H	S	Y	A	H
	(ACG)	(CAC)	(TCC)	(TAC)	(GCC)	(CAC)
3-7H	S	N	A	Y	G	Y
	(TCC)	(AAC)	(GCG)	(TAC)	(GGC)	(TAC)
3-8B	S	N	Q	Y	E	H
	(AGC)	(AAC)	(CAG)	(TAC)	(GAG)	(CAC)
3-8D	S	A	D	Y	P	H
	(TCC)	(GCG)	(GAC)	(TAC)	(CCC)	(CAC)
3-1C	T	P	A	I	N	R
	(ACC)	(CCC)	(GCC)	(ATC)	(AAC)	(CGG)
3-5G	A	P	G	Y	S	H
	(GCG)	(CCC)	(GGC)	(TAC)	(TCC)	(CAC)

★はアゴニスト候補となる構造変異TNFを示す

◎はアンタゴニスト候補となる変異体を示す