

201108017A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

抗体プロテオミクス技術を駆使した

悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 長野一也

平成 24 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

抗体プロテオミクス技術を駆使した

悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 長野一也

平成 24 年 5 月

目次

| | |
|--|-----------|
| I. 総括研究報告 | 1 |
| 抗体プロテオミクス技術を駆使した悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開 長野一也 | 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 12 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | 13 |

抗体プロテオミクス技術を駆使した悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開

研究代表者 長野一也 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

研究要旨

悪性中皮腫は、1970年頃に頻用されたアスベストの曝露を主要因とする疾患であり、5年生存率は3.7%と極めて予後不良である。また本疾患は、この曝露から40年程遅れて発症することから、現在患者数は急増している。以上の背景から、悪性中皮腫に対する有用な診断法・治療法の開発は国際的緊急課題であるものの、これまで悪性中皮腫の分子マーカーはみつかっていない。そこで本研究では、独自に確立した創薬バイオマーカー蛋白質の迅速探索法である「抗体プロテオミクス技術」により、悪性中皮腫関連マーカーを探索し、分子病態の解明、及び有用な診断法・治療法の開発に資する知見を収集することを目的とする。

これを達成するため、昨年度までに、正常中皮細胞に比べ悪性中皮腫細胞で発現変動している悪性中皮腫関連マーカー候補を同定し、これらの有用性を検証するためのモノクローナル抗体を、ファージ抗体ライブラリを活用したメンブランパンニング法により作製した。さらに、本疾患の治療薬として汎用されているシスプラチンに対する感受性を判定するマーカーの同定も目指し、数多くの悪性中皮腫細胞株の中から、発現変動を解析するための高感受性株と低感受性株をスクリーニングした。以上の成果をふまえ本年度は、昨年度までに取得したモノクローナル抗体の特異性を評価したうえで、多数の悪性中皮腫/正常中皮組織が搭載された組織マイクロアレイを免疫染色した結果、悪性中皮腫組織で高率に発現するAnnexin A4(ANXA4)を同定した。また、シスプラチン高感受性株と低感受性株の発現変動解析からもANXA4を見出し、各悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現量がシスプラチン感受性と相関することを明らかにした。

A. 研究目的

現在、疾患マーカーや創薬ターゲットなどの創薬バイオマーカー蛋白質の同定は、画期的医薬に直結することから、プロテオミクス研究を中心に世界規模で進められている。しかしながら、当該研究領域からこれまでに医薬品開発にまで至った例は殆どない。それはプロテオーム解析から見出される候補蛋白質の数が多く、この中から有用な分子を絞り込むための基盤技術が未成熟であることに起因している。

本観点から研究代表者らは、プロテオーム解析から直接同定・回収される微量な候補蛋白質を、吸着力に優れるニトロセルロース膜に効率よく固相化することで、ファージ抗体ライブラリの中から短期間かつ網羅的にモノクローナル抗体を作製可能な方法論を構築した。これにより、取得した抗体で組織マイクロアレイを免疫染色解析し、多症例のがん組織が有する臨床情報と各候補蛋白質の発現分布との相関解析から疾患マーカーや創薬ターゲットなどの創薬

バイオマーカー蛋白質となりうる有用な分子を絞り込むことが可能となった。そこで本研究では、創薬バイオマーカー蛋白質を効率よく探索可能な「抗体プロテオミクス技術」を駆使し、未だ本邦の死亡率第一位のがんの中でも、5年生存率が僅か3.7%と極めて予後不良な悪性中皮腫に応用することで、悪性中皮腫関連マーカー蛋白質を探索し、本疾患の分子病態の解明や有用な診断法・治療法の開発に資する知見を収集すると共に、創薬への展開を目指すことを目的とする。

悪性中皮腫は、1970年頃に頻用されたアスベストの曝露を主要因とする疾患であり、曝露から40年程遅れて発症することから、現在患者数は急増している。その一方で、本疾患に対する的確な診断・有効な治療法はなく、分子病態すら殆ど明らかにされていないことから、厚生労働行政にとって政策対応を必要とする疾患である。従って本研究によって得られる成果は、厚生労働行政にとって今後政策的な対応を必要とする悪性中皮腫に対して、基礎研究・応用研究の両者を発展させると共に、国民の健康増進や医療費削減、産業界の競争力向上等に貢献するものと期待される。

このような背景・目的のもとで2年間研究を進めた結果、正常中皮組織に比べ、悪性中皮腫組織で高率に発現するAnnexin A4(ANXA4)を世界に先駆けて見出した。また、本疾患の主要な治療薬であるシスプラチン(CDDP)に対する感受性を判定しうるマーカー分子の探索も試みたところ、ANXA4が同様に同定され、本分子の発現を低下させることでCDDPの感受性が亢進することを明らかとしたので、これら研究成果について報告する。

B. 研究方法

モノクローナル抗体提示ファージの作製

各抗ANXA4候補抗体が組み込まれたファージミドベクターpCANTAB5Eで形質転換された大腸菌

TG1株を凍結グリセロールストックから、50 µg/ml ampicillin、2% glucose含有2YT培地が入った96wellプレートに少量加え、250 rpm、37°Cで一晩培養した。翌日、各群の大腸菌数がプラトーに達したところで、各培養液10 µlを新たに調製した50 µg/ml ampicillin、2% glucose含有2YT培地100 µlに加え、OD₆₀₀ = 0.3~0.6まで培養した。上記培地で10倍希釈したM13K07ヘルパーファージ(Invitrogen)を20 µlずつ添加し、37 °Cで1時間、静置させることで感染させた。2,000 rpmで15分間遠心し、上清を除くことで得られたペレットに対して100 µg/ml ampicillin、50 µg/ml kanamycin 含有2YT培地を200 µlずつ添加して37 °Cで一晩培養した。翌日、2,000 rpmで15分間遠心して上清を回収し、各抗ANXA4候補抗体提示ファージを調製した。

Dot Blot ELISAによる特異性評価

AXNA4、Luciferase(Promega)、OVA(Sigma)、BSA(Sigma)をBio-Dot Microfiltration Apparatusを用いて、TBSに浸したニトロセルロース膜上に固相化した。各wellにBlocking buffer (10% skim milk, 25% glycerol)を200 µlずつ添加し、室温で2時間静置することでブロッキングした。TBSで1回洗浄後、Blocking bufferで 5×10^{12} CFU/mlに希釈した精製ファージをそれぞれ200 µl/well添加し、室温で2時間静置した。TBST (0.1% Tween 20を含むTBS)とTBSで5回ずつ洗浄後、Blocking bufferで1,000倍希釈したHRP/mouse anti-M13 monoclonal antibodyを200 µl/well添加した。TBSTとTBSで3回洗浄後、メンブレンをECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare)で処理し、LAS-3000を使用して検出・撮影した。

悪性中皮腫組織マイクロアレイの免疫染色

ヒト悪性中皮腫/正常中皮組織アレイ (US

Biomax) をキシレン・エタノールにて脱パラフィン・親水処理を行い、DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO) に浸して、125°Cで30秒、90°Cで30秒処理することで抗原を賦活化した。組織マイクロアレイの一連の染色操作には自動染色処理装置DAKO AutoStainer (DAKO) を使用した。内在性のペルオキシダーゼ処理のため、DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) を5分処理し、更に10% BSAで30分インキュベーションすることでブロッキングした。その後、 1×10^{13} CFU/ml ファージを添加し、室温で1時間静置した。TBST (0.05% Tween 20を含むTBS) で5回洗浄後、100倍希釈したMouse anti-M13 monoclonal antibody (GE Healthcare) を添加し、30分静置した。TBST (0.05% Tween 20を含むTBS) で3回洗浄後、ENVISION+ Dual Link, mouse (DAKO) を添加した。TBSTで3回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO) を用いて発色させた。

組織マイクロアレイによる抗原発現のスコア化は、がん細胞での発現分布の割合を2段階で(がん細胞の50%以下の発現を1、がん細胞の50%以上の発現を2)、発現強度を3段階にスコア化し、その合計が2以下で陰性、3以上で陽性と判定した。

細胞培養

悪性中皮腫細胞株(H28、H2052、H2452、H226、MSTO221H) はATCCより購入したものをを用いた。培養には、10% FCS/RPMI1640を用い、いずれも継代培養してサブコンフルエント状態のものを実験に供した。Human Mesothelial Cells (HMC) はZen-Bioより購入したものをを用いた。培養には、Mesothelial Cell Growth Medium (Zen-Bio) を用い、継代培養してサブコンフルエント状態のものを実験に供した。

Two dimensional differential in-gel

electrophoresis (2D-DIGE) 解析

通常培養環境下で培養したH28、H2052をサンプルとして用いた。サンプル各50 μ gをそれぞれ400 pmolのラベル化試薬 cy2、cy3、cy5 (GE Healthcare) と氷上で30分間反応させ、その後10 mM Lysineを加え、氷上で10分間静置して反応を停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT、2% pharmalyte (GE Healthcare)、7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS) で450 μ lにメスアップした。一方、蛋白質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化試薬で標識していないサンプルも同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pI 4-7) ストリップ (GE Healthcare) を入れ、oilを重層した。ETTAN IPGPhor (GE Healthcare) を用いて、プレ膨潤を10時間行い、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gelを平衡化buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に浸し、各15分間平衡化を行った。二次元目のSDS-PAGEを行うため、ゲル溶解が可能なSDS-PAGE用ゲル(10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyl-tartardiamide gels) にIPG-gelスリップをセットした。アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE Healthcare) を用いて、2次元電気泳動を行った。ピック用ゲルはDeep Purple Total Protein Stainを用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGEを使用し、スポットピックにはEttan Spot Picker (GE Healthcare) を使用した。

MS解析

ゲル片に100 μ lの脱色液(25 mM ammonium

bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振盪させた後、脱色液を取り除くことで脱色を行った。続いて 200 μ l の acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器によって乾燥させることで脱水を行った。脱水したゲル片に 5 μ l の trypsin 溶液 (20 μ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ l の 100 % acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドを抽出した。このペプチド抽出液を遠心濃縮器によって濃縮し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 5 μ l を nano-LC (EASY-nLC (Bruker Daltonics)) にて分離し、各画分のペプチドを ESI-Q-TOF MS (maxis (Bruker Daltonics)) にて配列の決定並びに、蛋白質同定を行った。なお、ペプチドの同定には、メチオニン残基の酸化、iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮した。

Western Blotting

各種悪性中皮腫細胞株 (H28、H2052、H2452、H226、MSTO221H) と正常中皮細胞 (Human Mesothelial Cells (HMC)) を細胞溶解液により可溶化し、2 倍濃度の Laemmli Sample Buffer を等量混合した。終濃度 5% となるように 2-mercaptoethanol を添加後、95 °C で 5 分処理した。各試料を、SDS-PAGE 用ゲルに添加し、電気泳動を行い、蛋白質を分離した。その後ゲルを PVDF 膜に転写し、10% Block Ace にて室温、1 時間イン

キュベーションすることでブロッキングした。TBS で 1 回洗浄後、mouse anti-human ANXA4 (Abnova : 1D3) を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) にて 3 回洗浄した後、0.4% Block Ace で 3,000 倍希釈した HRP/mouse anti-M13 monoclonal antibody を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、メンブレンを ECL plus Western Blotting Detection System で処理し、LAS-3000 により検出・撮影した。

ANXA4及び β -actinの発現量は、Image Jにより各バンドの強度を定量することにより解析した。

C. 研究結果

C-1. 抗ANXA4抗体候補の特異性評価

正常中皮細胞に比較して、悪性中皮腫細胞で発現上昇していた悪性中皮腫特異的マーカー候補である ANXA4を見出し、これに対して独自のメンブレンパンニング法によってファージ抗体ライブラリの中から、ANXA4に結合しうる10クローンをスクリーニングしたことを昨年度報告した。そこで本年度は、ANXA4に対するモノクローナル抗体で多数の悪性中皮腫・正常中皮組織を免疫染色し、その発現プロフィールから、ANXA4の悪性中皮腫特異的マーカーとしての有用性を評価することを目的とした。

これを達成するため、まず、検証に用いる特異性の高い抗体を得るため、前年度までに取得した各クローンそれぞれについて、等タイターの精製ファージを各種蛋白質に添加することで結合性を評価した。その結果、#2, 7, 9, 10の4クローンではスクリーニングと同様に、ANXA4に対する結合性が認められたのに対し、#1, 3, 4, 5, 6, 8の6クローンではスクリーニングとは異なり、結合性が認められなかった。これは、スクリーニング時には、大腸菌から産生さ

れた培養上清そのままを使用しており、各群間でのファージのタイターが一定していないために、抗原に対して非特異的に吸着し擬陽性になったものと考えられる。また、#7と#9はANXA4のみならず、Luciferaseにも結合性が認められた。ANXA4（319アミノ酸から成り、分子量は36kDa）とLuciferase（1241アミノ酸から成り、分子量は137kDa）の相同性は12%と低いものの、ANXA4の30番台と120番台付近、280番台に類似の配列が存在するため、#7と#9はこれらの領域を認識する抗体である可能性が考えられた。今後タイター依存性など詳細な検討は詳細な検討は必要なものの、少なくとも、#2と#10は、ANXA4に対して特異性の高いクローンであることが示唆された（Fig. 1）。

C-2. ANXA4の発現プロファイル解析

ANXA4の悪性中皮腫特異的マーカーとしての有用性を検証するため、C-1で見出されたモノクローナル抗体を用い、ANXA4の発現プロファイルを解析した。C-1でANXA4に対して特異性の高かった#2の抗体提示ファージを用い、数多くの悪性中皮腫組織/正常中皮組織が搭載された組織マイクロアレイを免疫染色したところ、正常中皮組織では25%の症例でANXA4陽性であったのに対し、悪性中皮腫組織では62%の症例で陽性であり、がん組織で高率に発現していることが明らかとなった。尚、野生型ファージ単独群では陽性例はなく、ファージの非特異的な吸着による染色ではないことを確認している（Data not shown）。以上から、本分子は、悪性中皮腫特異的マーカー候補になりうることを示されたとともに、本疾患に何らかに関連する可能性が考えられた（Fig. 2）。

C-3. CDDP高感受性株と低感受性株における発現変動解析とCDDP感受性マーカー候補の同定

CDDPは、悪性中皮腫治療において最も効果が高い

とされる第一選択薬であるが、その奏功率は僅か20%に満たない。CDDPは、腎毒性などの副作用を示すため、無効症例へのCDDP投与は患者のQOLを著しく低下させる。従って、薬剤投与前にCDDPの感受性を事前に予測可能なバイオマーカー蛋白質があれば、CDDPの有効性が期待できない症例に対しては、葉酸代謝拮抗薬であるペメトレキセドといった別の悪性中皮腫治療薬へ変更することも可能となり、患者のQOLの向上に貢献しうる。

本観点から研究代表者は、悪性中皮腫におけるCDDP感受性バイオマーカー蛋白質の探索・同定を目的に、昨年度までに各種悪性中皮腫細胞株のCDDP感受性試験を行い、候補蛋白質を見出すためのCDDP高感受性としてH2052を、低感受性株としてH28をスクリーニングした。そこで本年度はこれら細胞株間で発現変動しているCDDP感受性マーカー候補を同定すべく、2D-DIGE解析を行った（Fig. 3）。その結果、H2052に比べ、H28で2倍以上発現変動していた蛋白質を8種類見出し、全て質量分析により同定した（Table 1）。興味深いことに、この中には、先ほど悪性中皮腫組織で高率に発現していたANXA4もあり、本分子がCDDPの感受性に関与している可能性が考えられた。

C-4. 各種悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現量とCDDP感受性の相関解析

C-3の結果を受け、研究代表者は、ANXA4とCDDPの感受性の連関を解析するため、各種悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現量とCDDPの感受性の相関を解析した。各種悪性中皮腫細胞株におけるCDDPの感受性については昨年度までに下記のように明らかにしている（Fig. 4(a））。

【CDDP感受性(括弧内はIC₅₀)】 H28 (154.5 μ M) < H226 (87.5 μ M) < H2452 (66.0 μ M) < MSTO-221H (49.5 μ M) < H2052 (27.8 μ M) 一方、各種悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現

量は、Western Blot法により解析し (Fig. 4(b))、
デンストメトリーを用いて定量比較した (Fig. 4(c))。
その結果、CDDPに対する感受性が最も低いH28で
ANXA4の発現量が最も高く、CDDPの感受性が亢進
するにつれて、おおよそANXA4の発現量も低下する
傾向が認められた。

ANXA4はANXA1~A13のサブタイプが知られて
いるAnnexin Aファミリーの1つであり、カルシウム
依存性の細胞膜の恒常性調節因子として恒常性維持
に関与していることが知られている。一方で、がん
においては、カルボプラチンの感受性に関与する事
が卵巣がんでも報告されており、膜透過・イオン交
換反応・エキソサイトーシスを介して抗がん剤を排
出している可能性が推察されている。従ってANXA4
は、悪性中皮腫においてもCDDPの感受性に関連する
蛋白質であることが強く示唆される。今後、ANXA4
と悪性中皮腫のCDDP感受性の連関についてより詳
細に解析するため、遺伝子工学的にANXA4遺伝子を
強制発現・ノックダウンさせた際のCDDP感受性を評
価していく予定である。また、CDDP投与歴のある臨
床検体を用いて、ANXA4の発現プロファイルと
CDDPの感受性の相関を解析することで、悪性中皮腫
に対する治療薬選択のための薬剤感受性マーカーと
しての有用性の検証を進める予定である。

以上、本研究を推進することにより、極めて予後
不良な悪性中皮腫の克服の一助になることを期待し
ている。

D. 考察

C. 研究結果の欄に記載。

E. 結論

当該研究では、悪性中皮腫関連マーカーの探索を
目的として、本年度は以下の知見を得た。

- ANXA4に対する特異性の高いモノクローナル
抗体を2クローン得た。
- ANXA4は、正常中皮組織に比べ、悪性中皮腫組
織で高率に発現しており、悪性中皮腫関連マー
カーであることが示唆された。
- CDDPに対する高感受性株と低感受性株間で2
倍以上発現変動していた8種類の蛋白質を同定
し、ANXA4も含まれていた。
- ANXA4の発現量は、CDDPに対する感受性が亢
進するのに伴い、低下する傾向が認められ、
CDDPの感受性を判定しうるマーカーになる可
能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

① 論文発表 原著論文

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- α using a phage display system
with one-step competitive panning.,
Biomaterials, 32: 5498-5504, 2011.

総説・その他

該当なし。

② 学会発表

国内学会発表

1. 金崎聡一郎, **長野一也**, 山下琢矢, 渡邊貴信, 前田
祐香, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央,
角田慎一 : 乳がん関連たんぱく質 Ephrin
receptor A10 に対する抗体医薬開発に向けた
基礎検討., 第27回日本DDS学会学術集会., 東

- 京(東京), 2011年6月.
2. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 趙秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん関連たんぱく質 Ephrin receptor A10 の機能解析と創薬標的としての有用性評価., 第27回日本DDS学会学術集会., 東京(東京), 2011年6月.
 3. **長野一也**, 岡村賢孝, 山下琢矢, 堤康央, 角田慎一: プロテオミクスによる大腸がん転移関連たんぱく質の探索., 第20回日本がん転移学会学術集会・総会., 浜松(静岡), 2011年6月.
 4. Yamashita T., **Nagano K.**, Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteomic profiling of proteins associated with metastasis in colorectal cancer cell lines., 第70回日本癌学会学術総会., 名古屋(愛知), 2011年10月.
 5. 金崎聡一郎, **長野一也**, 山下琢矢, 前田祐香, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 腫瘍血管新生に及ぼす Exosome の生理機能の解明., 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011年10月.
 6. 山下琢矢, **長野一也**, 金崎聡一郎, 古屋剛, 前田祐香, 今井直, 趙秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による肺がん転移関連たんぱく質の探索 - Oxysterol binding protein like 5 及び Calumenin の転移との関連解析 -, 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011年10月.
 7. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 乳がん関連たんぱく質 Eph receptor A10 の機能解析と治療標的としての有用性評価., 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011年10月.
 8. Yamashita T., **Nagano K.**, Kanasaki S., Maeda Y., Furuya T., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S.: Membrane proteome analysis of exosomes for lung cancer diagnosis., 第5回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011年11月.
 9. 山下琢矢, **長野一也**, 金崎聡一郎, 前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: Exosome 由来膜たんぱく質のプロテオーム解析による新規肺がん血液診断マーカーの探索., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.
 10. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 古屋剛, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん分子標的治療薬の開発を目指した Eph receptor A10 の創薬ターゲットとしての有用性評価., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.
 11. **長野一也**, 岡村賢孝, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 古屋剛, 井上雅己, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: 大腸がん転移診断・治療法の開発を目指した転移関連たんぱく質の探索., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.

国際学会発表

1. Yamashita T., **Nagano K.**, Watanabe T., Kanasaki S., Maeda Y., Zhao X., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Expression of Annexin A4 is related to cisplatin-susceptibility in mesothelioma cells., HUPO2011(10th World Congress), Geneva(Switzerland), 4-7 September, 2011.
2. Kamada H., Abe Y., **Nagano K.**, Tsutsumi Y., Tsunoda S.: The search for a biomarker of hepatic injury expressed by sinusoidal endothelial cells., HUPO2011(10th World Congress), Geneva(Switzerland), 4-7 September, 2011.
3. **Nagano K.**, Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Imai S., Abe Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: The relationship between oxysterol binding protein like 5 and calumenin during lymph node metastasis., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.
4. Kanasaki S., **Nagano K.**, Yamashita T., Maeda Y., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Possibility of Ephrin receptor A10 as a drug target in triple negative breast cancer., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer

Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.

5. Maeda Y., **Nagano K.**, Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Functional analysis of a novel breast cancer related protein, ephrin receptor A10., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

無し

② 実用新案登録

無し

③ その他

無し

尚、下記に本研究の協力研究者を列挙する。

| | |
|-------|----------------|
| 山下琢矢 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 矢野聖二 | 金沢大学がん研究所 |
| 常山幸一 | 富山大学大学院医学薬学研究部 |
| 堤 康央 | 大阪大学大学院薬学研究科 |
| 角田慎一 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 鎌田春彦 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 阿部康弘 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 森功美子 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 國丸亜記 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 井上雅己 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 金崎聡一郎 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 古屋 剛 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 前田祐香 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |

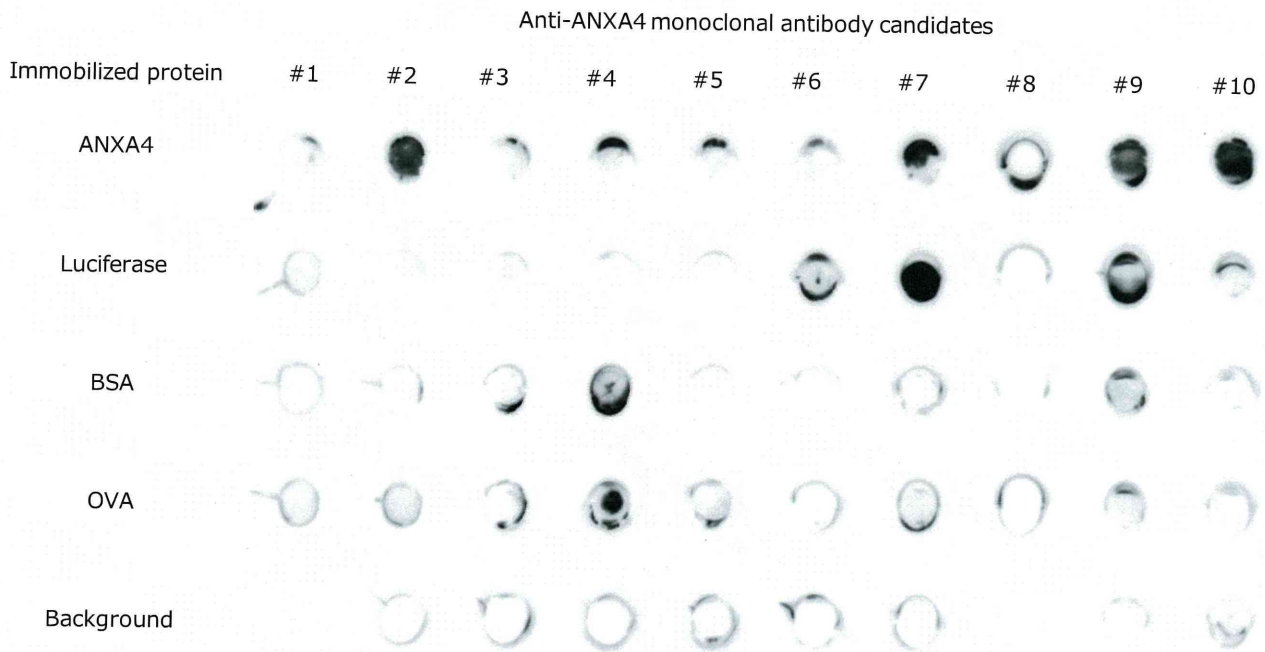


Fig. 1 Specificity analysis of 10 anti-ANXA4 monoclonal antibody candidates-expressing phage by dot blot ELISA

Antigen proteins were immobilized on nitrocellulose membrane. Anti-human ANXA4 monoclonal antibody candidates-expressing phages (1×10^{12} CFU) as primary antibody were incubated with each antigen. Binding to each antigen was detected by HRP conjugated anti-M13 antibody.

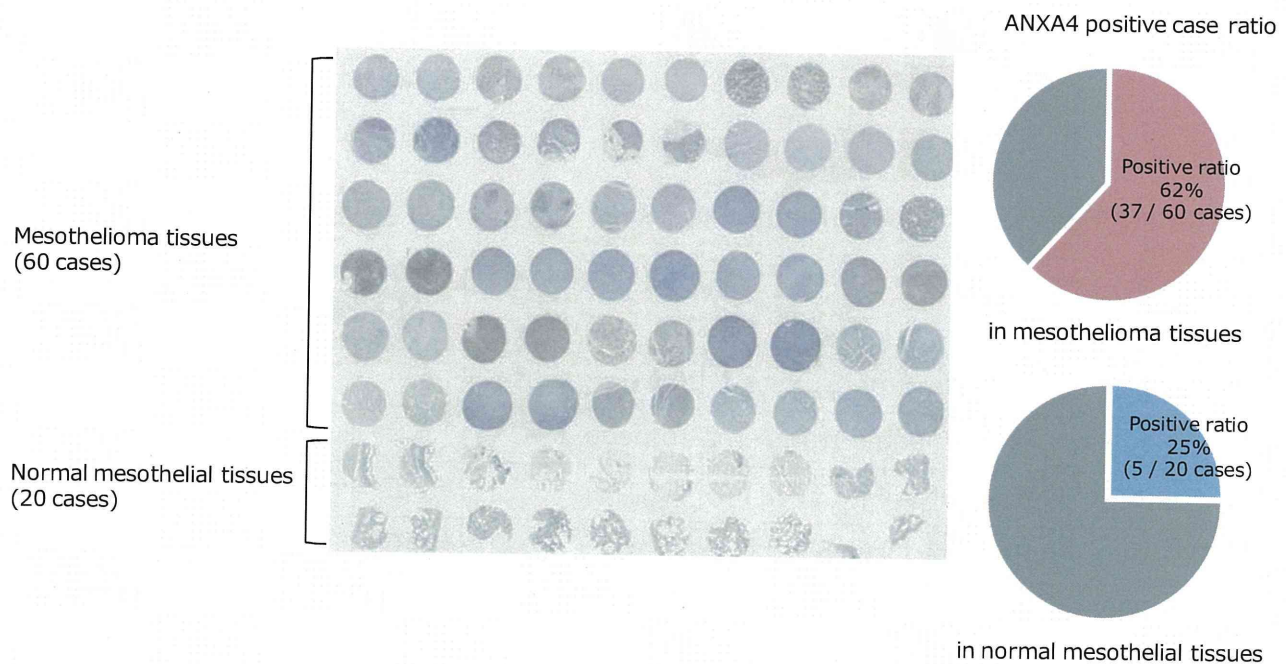


Fig. 2 ANXA4 expressed ratio in clinical mesothelioma / normal mesothelial tissues

Tissue microarray with 60 mesothelioma and 20 normal mesothelial tissues was immunostained using anti-ANXA4 antibody-expressing phages (clone #2). Distribution score was scored as 0 (0%), 1 (1– 50%), and 2 (51– 100%) to indicate the percentage of positive cells in all tumor cells present in one tissue. The intensity of the stain (intensity score) was scored as 0 (no signal), 1 (weak), 2 (moderate), and 3 (marked). The cases that sum of distribution score and intensity score was more than 3 score were regarded as positive.

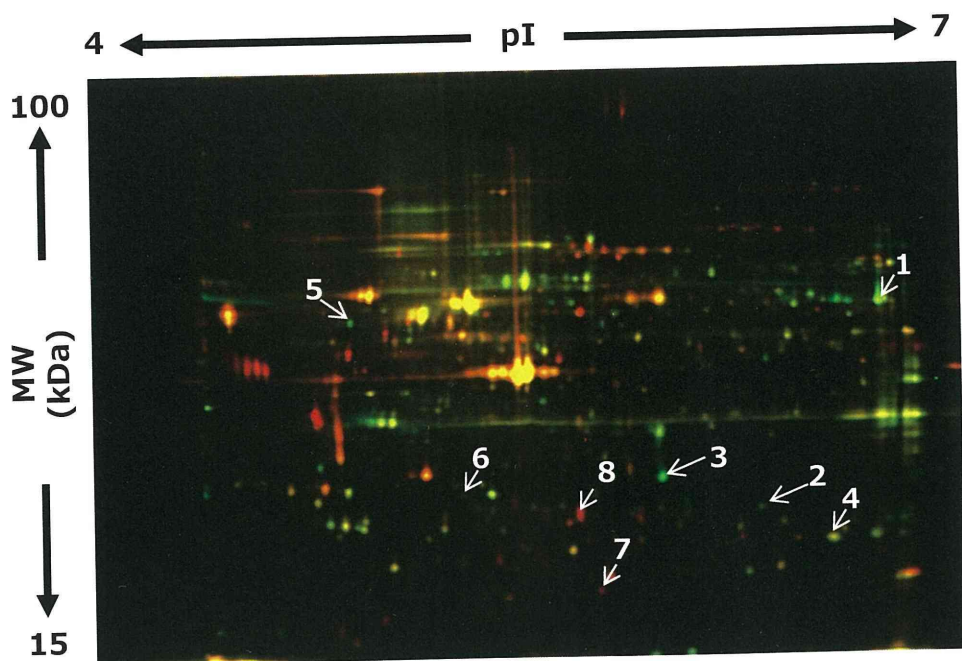


Fig. 3 2D-DIGE image of fluorescently labeled proteins derived from H28 and H2052 cells. Proteins derived from high and low-susceptible mesothelioma cells (H2052 and H28) were labeled with cy3 and cy5, and then separated by IEF-PAGE and SDS-PAGE. The differentially-expressed spots in H28 were indicated by arrows and identified by ESI-Q-TOF MS analysis

Table 1 Identification of differentially-expressed proteins in H28 compared to H2052

| Spot No. | Accession No. | Protein name | pI | MW | Expression ratio (H28 / H2052) |
|----------|---------------|--|-----|------|--------------------------------|
| 1 | P11413 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | 6.4 | 59.3 | 21.0 |
| 2 | P78417 | Glutathione S-transferase omega-1 | 6.2 | 27.6 | 7.4 |
| 3 | P09525 | Annexin A4 | 5.6 | 35.9 | 3.6 |
| 4 | P30041 | Peroxiredoxin-6 | 6.0 | 25.0 | 3.5 |
| 5 | Q09028 | Histone-binding protein RBBP4 | 4.7 | 47.7 | 3.0 |
| 6 | P07195 | L-lactate dehydrogenase B chain | 5.7 | 36.6 | 2.9 |
| 7 | P32119 | Peroxiredoxin-2 | 5.7 | 21.9 | 0.03 |
| 8 | Q9Y696 | Chloride intracellular channel protein 4 | 5.5 | 28.8 | 0.13 |

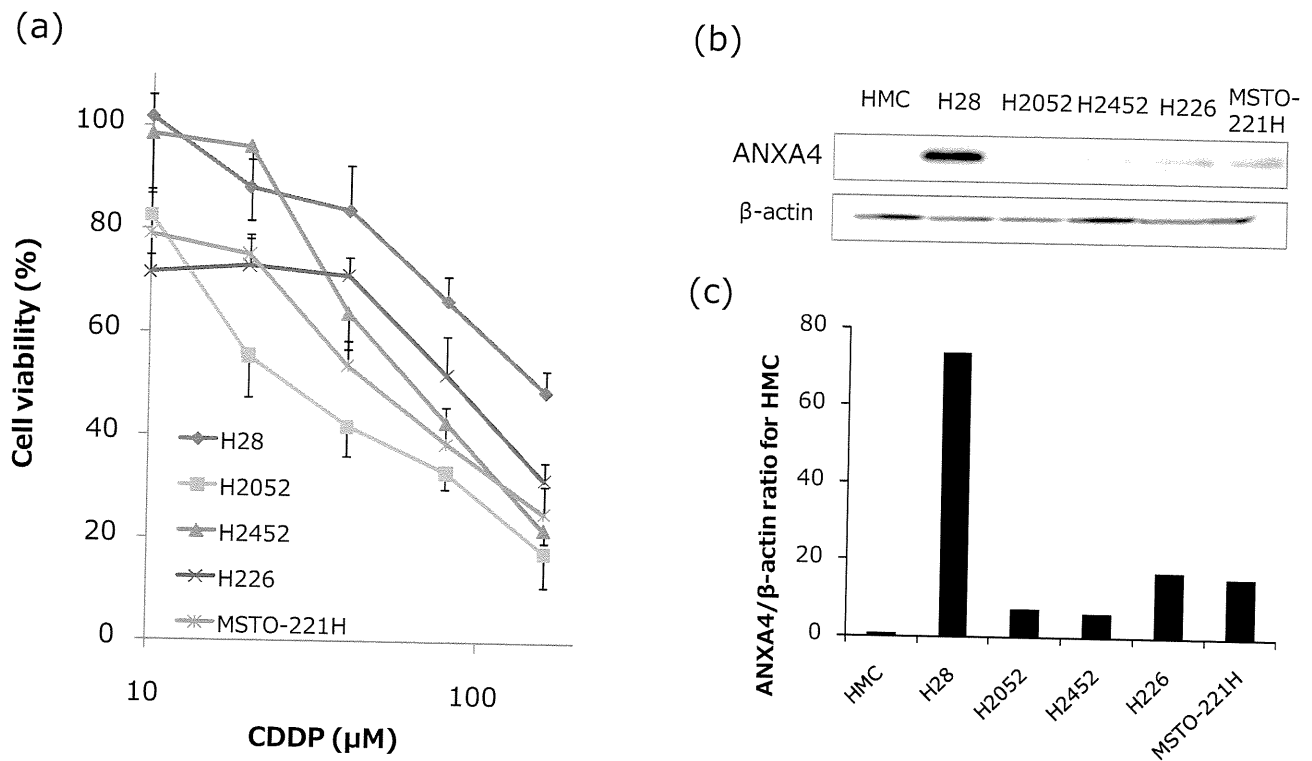


Fig. 4 Correlation of ANXA4 expression and CDDP susceptibility in malignant mesothelioma cells.

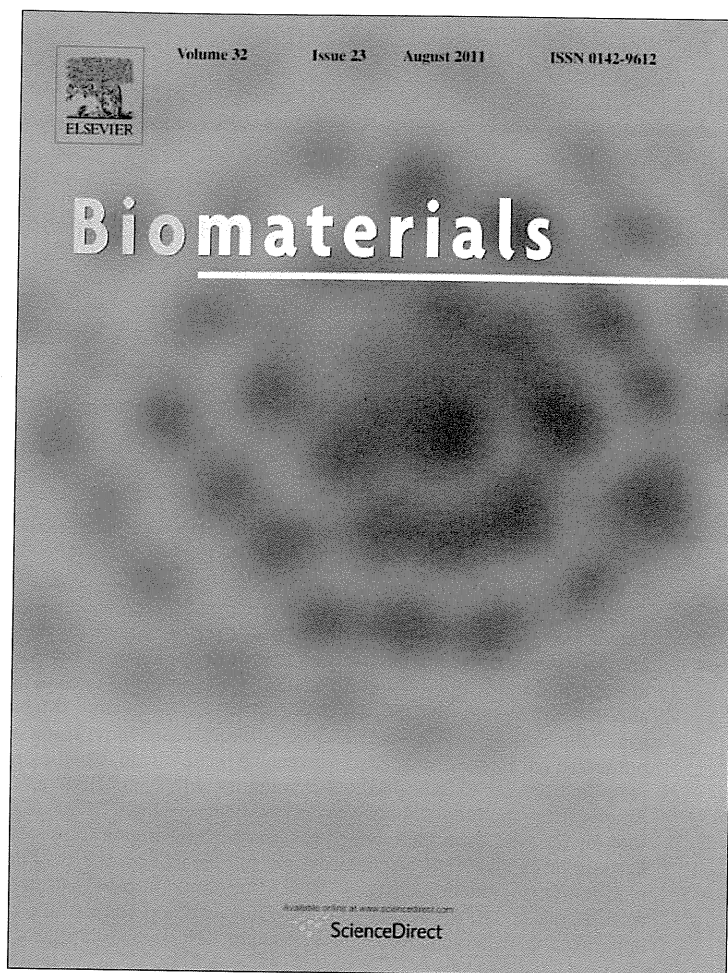
Mesothelioma cell lines, H28, H2052, H2452, H226 and MSTO-221H were incubated with various concentration of cisplatin for 24 hrs. Cytotoxicity of mesothelioma cells was evaluated by WST-8 assay (a). ANXA4 expression level in human primary mesothelial cell, HMC, and mesothelioma cell lines was analyzed by western blotting (b). Intensity of the western blotting images was quantified by densitometry (c).

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|----------------------------|----|---------------|------|
| 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- α using a phage display system with one-step competitive panning. | <i>Biomaterials</i> | 32 | 5498- 5504 | 2011 |

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

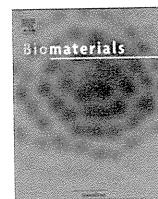


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning

Yasuhiro Abe^a, Tomoaki Yoshikawa^{a,b}, Masaki Inoue^a, Tetsuya Nomura^a, Takeshi Furuya^{a,b}, Takuya Yamashita^{a,b}, Kazuya Nagano^a, Hiromi Nabeshi^{a,b}, Yasuo Yoshioka^{a,c}, Yohei Mukai^{a,b}, Shinsaku Nakagawa^{b,c}, Haruhiko Kamada^{a,c}, Yasuo Tsutsumi^{a,b,c}, Shin-ichi Tsunoda^{a,b,c,*}

^aLaboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^cThe Center of Advanced Medical Engineering and informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2011

Accepted 5 April 2011

Available online 5 May 2011

Keywords:

Cytokine

Molecular biology

Protein

Affinity

Bioactivity

ABSTRACT

Tumor necrosis factor- α (TNF) is one of the attractive targets for the development of anti-inflammatory and anti-tumor drugs, because it is an important mediator in the pathogenesis of several inflammatory diseases and tumor progression. Thus, there is an increasing need to understand the TNF receptor (TNFR1 and TNFR2) biology for the development of TNFR-selective drugs. Nonetheless, the role of TNFRs, especially that of TNFR2, remains poorly understood. Here, using a unique competitive panning, we optimized our phage display-based screening technique for isolating receptor-selective TNF mutants, and identified several TNFR2-specific TNF mutants with high TNFR2 affinity and full bioactivity via TNFR2. Among these mutants, the R2-7 clone revealed very high TNFR2-selectivity (1.8×10^5 fold higher than that for the wild-type TNF), which is so far highest among the reported TNFR2-selective TNF mutants. Because of its high TNFR2-selectivity and full bioactivity, the TNF mutant R2-7 would not only help in elucidating the functional role of TNFR2 but would also help in understanding the structure-function relationship of TNF/TNFR2. In summary, our one-step competitive panning system is a simple, useful and effective technology for isolating receptor-selective mutant proteins.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tumor necrosis factor- α (TNF) is a major inflammatory cytokine that plays a central role in host defense and inflammation via two receptor subtypes, TNF receptor (TNFR)1 and TNFR2 [1,2]. Elevated serum levels of TNF correlates with the severity and progression of the inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA), inflammatory bowel disease, septic shock, multiple sclerosis and hepatitis [3–5]. Currently, TNF-neutralization therapies have proven successful for the treatment of RA [4,6,7]. However, these therapies can cause serious side effects, such as tuberculosis, because TNF-dependent host defense functions are also inhibited [8,9]. Therefore, understanding the function of TNF/TNFRs is important for optimal therapy of various TNF-related autoimmune

diseases. TNFR1 is constitutively expressed in most tissues and seems to be the key mediator of TNF signaling [10,11]. In contrast, the expression of TNFR2 is more restricted and is found mainly on certain T-cell subpopulations [12], endothelial cells, cardiac myocytes [13] and neuronal tissue [14,15]. Recent studies suggested that TNFR2 signaling is associated with T-cell survival [16], cardioprotection [17,18], remyelination [19], and survival of some neuron subtypes [20,21]. Although the two TNFRs have been shown to have distinct functions in some cells [22], the physiological significance of the presence of both receptors is not fully understood. Especially TNFR2-induced signaling remains elusive and need further investigation.

In order to understand the mechanism of TNFRs, we have investigated the relationship between the biological activities and structural properties of a large number of TNF mutants by phage-display technique [23,24]. However, screening efficiency of isolating TNFR2-selective TNF mutants using this technique is extremely low, and it is difficult to prepare large repertoire of TNFR2-selective TNF mutants for the structure-activity relationship study. In our previous study, we screened 500 phage clones

* Corresponding author. Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan. Tel.: +81 72 641 9814; fax: +81 72 6419817.

E-mail address: tsunoda@nibio.go.jp (S.-i. Tsunoda).

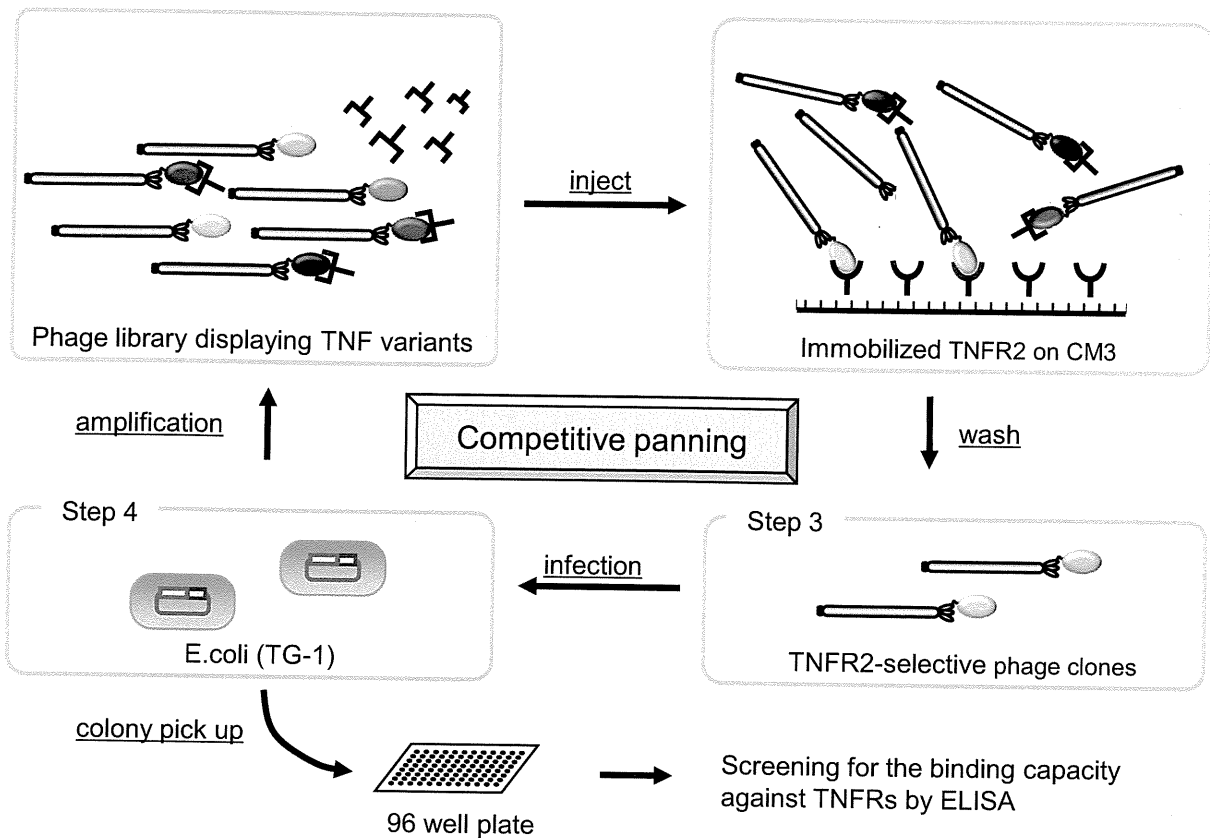


Fig. 1. Screening scheme for isolating TNFR2-selective TNF mutants using competitive panning. To concentrate TNFR2-selective mutant TNFs, phage libraries were pre-incubated with TNFR1 Fc chimera (TNFR1-Fc), and subsequent biopanning against the TNFR2 was carried out in the presence of TNFR1-Fc using the BIAcore biosensor. After several rounds of panning, phage clones were isolated and screened by ELISA.

for isolating TNFR2-selective mutants using the conventional panning method [23]. Out of the 500 clones, only 2 clones showed selectivity for TNFR2 binding that was 10-times higher than the wild-type TNF (wtTNF). Furthermore, bioactivities of these two TNFR2 selective TNF mutants were lower than that of wtTNF (<30%). To improve the screening efficacy, we optimized our phage display-based cytokine mutagenesis technology [25] with an unique competitive panning technique for identifying TNFR2-specific TNF mutants with higher affinity and bioactivity. In this

competitive panning technique, phage libraries were pre-incubated with TNFR1 Fc chimera (TNFR1-Fc), and subsequent biopanning against the TNFR2 was carried out in the presence of TNFR1-Fc using the BIAcore biosensor. Since TNFR1-binding clones could not bind to TNFR2 due to steric hindrance, TNF mutants binding only to TNFR2 were selectively enriched with high efficiency. Using this optimized competitive panning technique, we have identified TNFR2-selective TNF mutants with full bioactivity via TNFR2.

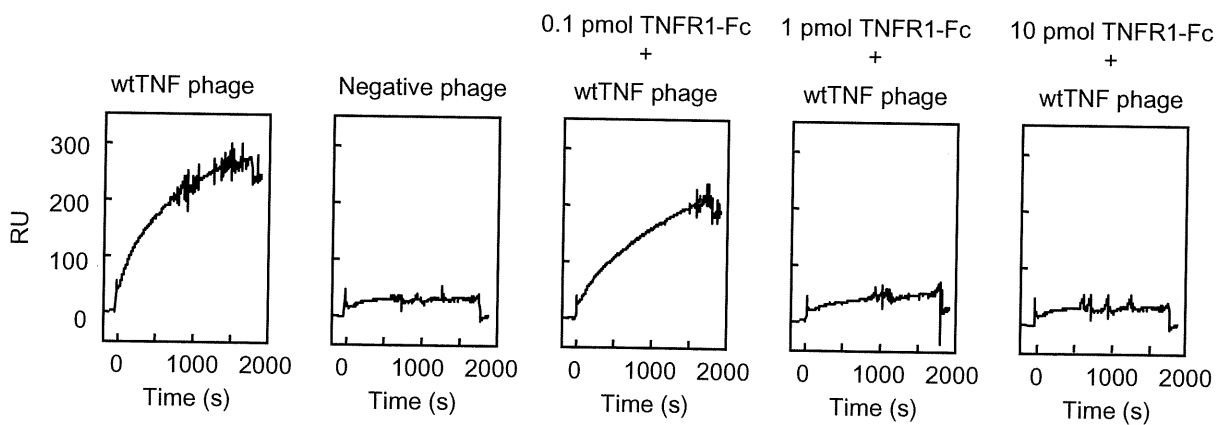


Fig. 2. Optimization of competitive panning using BIAcore biosensor. 0.1 pmol, 1 pmol or 10 pmol of human TNFR1-Fc was mixed with 1×10^{10} CFU phages displaying wtTNF for 2 h at 4 °C, and the mixture was passed over the TNFR2-immobilized CM3 sensor chip and real-time biomolecular interaction analyses were performed with BIAcore biosensor. Anti-CD25 single chain Fv-displaying phage was used as a negative control.

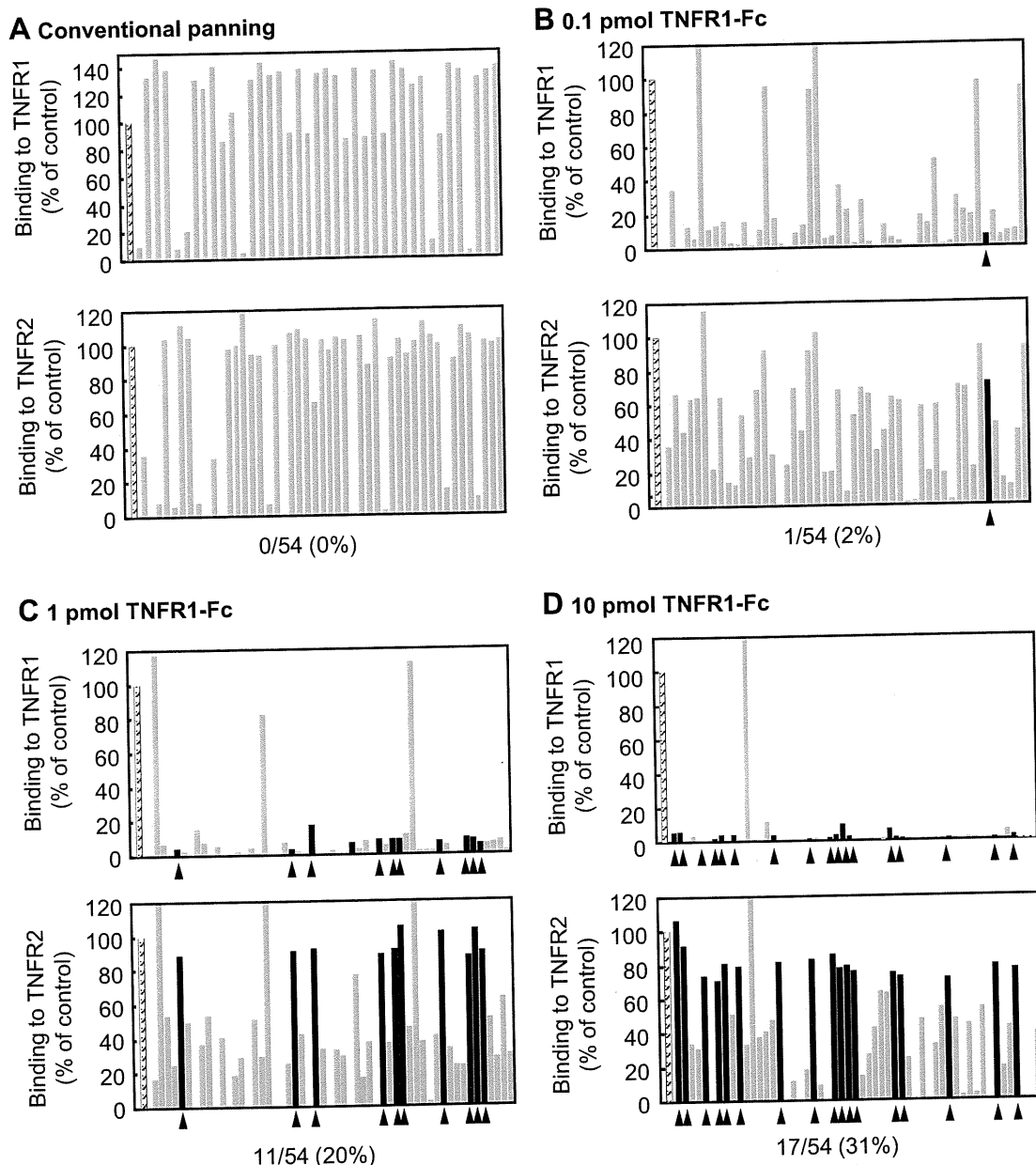


Fig. 3. Determination of relative affinities of mutant TNFs for TNFR1 or TNFR2 by capture ELISA. *E. coli* supernatant containing a TNF mutant (gray bar) from each panning conditions, in which phages were premixed with (A) none, (B) 0.1 pmol, (C) 1 pmol and (D) 10 pmol of TNFR1-Fc, were applied to the TNFR1-Fc or TNFR2-Fc immobilized plate and detected with biotinylated polyclonal anti-TNF antibody. wtTNF was used as a positive control (hatched bar). Affinities of TNFR2-selective clones (black bar) for TNFR2 was more than 70% of that of the wtTNF, and that for TNFR1 was less than 30% of that of the wtTNF.

2. Materials and methods

2.1. Cells

HEp-2 cells, a human fibroblast cell line, were provided by Cell Resource Center for Biomedical Research (Tohoku University, Sendai, Japan) and were maintained in RPMI 1640 (Sigma–Aldrich Japan, Tokyo, Japan) supplemented with 10% bovine fetal serum (FBS) 1 mM sodium pyruvate, 50 mM 2-mercaptoethanol, and antibiotics. hTNFR2/mFas-PA cells are preadipocytes derived from TNFR1^{-/-}R2^{-/-} mice expressing a chimeric receptor, the extracellular and transmembrane domain of human TNFR2, and intracellular domain of mouse Fas; these cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 5 μg/ml Blasticidin S HCl (Invitrogen, Carlsbad, CA), and antibiotics [26].

2.2. Library construction

Protocol for the construction of phage-display library displaying structural mutants of human TNF has been described previously [23]. In brief, multiple

mutations were introduced into the wtTNF gene by PCR to randomly replace the codons of 6 amino acid residues at positions 29, 31, 32, 145, 146 and 147, respectively, of the TNF protein. The PCR product was digested with the restriction enzymes Hind III and Not I, and ligated into the Hind III/Not I digested pY03' phagemid vector for displaying the TNF mutants on the phage surface as g3p-fusion proteins.

2.3. Optimization of competitive panning using BIAcore biosensor

Human TNFR2-Fc (R&D systems, Minneapolis, MN) was diluted to 50 μg/ml in 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) and immobilized onto a CM3 sensor chip using an amine coupling kit (GE Healthcare, UK), which resulted in an increase of 5000–6000 resonance units (RU). 0.1 pmol, 1 pmol or 10 pmol of human TNFR1-Fc (R&D systems) was mixed with 100 μl of wtTNF-displaying phage (1×10^{11} CFU/ml) for 2 h at 4 °C, and the mixture was passed over the TNFR2-immobilized CM3 sensor chip at a flow rate of 3 μl/min. The binding kinetics of the mixtures to TNFR2-Fc were analyzed by BIAcore 2000 (GE Healthcare).

Table 1
Amino acid sequences of wtTNF and TNFR2-selective TNF mutants.

| Clone | Residue position | | | | | |
|-------|------------------|----|----|-----|-----|-----|
| | 29 | 31 | 32 | 145 | 146 | 147 |
| wtTNF | L | R | R | A | E | S |
| R2-6 | L | R | R | H | E | D |
| R2-7 | V | R | R | D | D | D |
| R2-8 | L | R | R | N | D | D |
| R2-9 | L | R | R | T | S | D |
| R2-10 | L | R | R | Q | D | D |
| R2-11 | L | R | R | T | D | D |
| R2-12 | L | R | R | D | G | D |
| R2-13 | L | R | R | D | E | D |

2.4. Selection of phage displaying TNFR2-selective TNF mutants by competitive panning

1×10^{10} CFU phages displaying TNF mutants were pre-incubated for 2 h at 4 °C, with serially diluted TNFR1-Fc. The mixtures were injected at 3 μ l/min over the sensor chip. After injection, the sensor chip was washed using the rinse command for 3 min. Elution was carried out using 20 μ l of 10 mM glycine-HCl (pH 2.0) and the eluted phage was neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 6.9). The recovered phages were amplified by infection of *E. coli* strain TG1 (Stratagene, La Jolla, CA), which allow read-through of the amber stop codon located between the TNF and g3p sequences of pY03' phagemid vector. These steps were repeated twice. After final round of panning, the phage mixture was used to infect *E. coli* and plated on LB agar/ampicillin plates. Single clones of transfected TG1 were randomly picked from the plate and each colony was grown in 2-YT medium with ampicillin (100 μ g/ml) and glucose (2% w/v) at 37 °C until the OD₆₀₀ of the culture medium reached 0.4. Each culture was centrifuged, the supernatants were removed, and fresh 2-YT media with ampicillin (100 μ g/ml) was added to each *E. coli* pellet. After incubation for 6 h at 37 °C supernatants were collected and used to determine affinity for TNFRs by capture ELISA as described previously [24]. After the procedure, the phagemid vectors were sequenced using a Big Dye Terminator v3.1 kit and ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems Ltd., Pleasanton, CA).

2.5. Expression and purification of TNF mutants

Preparation of purified recombinant protein was described previously [25]. In brief, TNF mutants recombinant into pYas1 vector, under the control of T7 promoter, were produced in *E. coli* (BL21 λ DE3). Mutant TNFs recovered from inclusion body, which were washed in Triton X-100 and solubilized in 6 M guanidine-HCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, and 2 mM EDTA. Solubilized protein was adjusted to 10 mg/ml and was reduced with 10 mg/ml dithioerythritol for 4 h at RT and refolded by 100-fold dilution in a refolding buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M arginine, and oxidized glutathione (551 mg/L)). After dialysis with 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 100 mM urea, active trimeric proteins were purified by Q-Sepharose (GE Healthcare) chromatography and size-exclusion chromatography (Superose 12; GE Healthcare).

2.6. Analysis of binding kinetics using surface plasmon resonance (SPR)

The binding kinetics of the wtTNF and TNF mutants were analyzed by the SPR technique (BIAcore 2000; GE Healthcare). TNFR1-Fc or TNFR2-Fc were separately

immobilized on to CM5 sensor chip, resulting in an increase of 3000–3500 RU. During the association phase, wtTNF or TNF mutants diluted in running buffer (HBS-EP) at 156.8, 52.3, 17.4, 5.8 or 1.9 nM were passed over the immobilized TNFR2 for 2 min at a flow rate of 20 μ l/min. During the dissociation phase, HBS-EP was run over the sensor chip for 1 min at a flow rate of 20 μ l/min. The SPR measurements for TNFR1 were performed using much higher concentrations of TNF mutants (392.1, 130.7, 43.6, 14.5 or 4.8 nM). The data were analyzed globally with BIAevaluation 3.1 software (GE Healthcare) to apply a 1:1 Langmuir binding model. The obtained sensorgrams were fitted globally over the range of injected concentrations and simultaneously over the association and dissociation phases.

2.7. In vitro assessment of bioactivity via TNFR1 or TNFR2 with TNF mutants

HEp-2 cells were seeded at 4×10^4 cells/well in 96-well plates and incubated for 18 h with serially diluted wtTNF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) or TNF mutants in the presence of 50 mg/ml cycloheximide. After incubation, cell survival was determined by methylene blue assay as described previously [25]. In the case of analyzing TNFR2-mediated biological activity, hTNFR2/mFas-PA were seeded on 96-well micro titer plates with a density of 1.5×10^4 cells/well in culture medium. Serial dilutions of wtTNF (Peprotech) and TNF mutants were prepared with 1 μ g/ml cycloheximide and added to each well. After 48 h-incubation at 37 °C, the cell viabilities were analyzed using a WST-8 assay kit (Nacalai Tesque) according to the manufacturer's instructions.

3. Results**3.1. Optimization of one-step competitive panning protocol**

To improve identifying TNFR2-selective TNF mutants with better bioactivity, we have introduced a step to remove the TNFR1-binding phages from the library by competitive panning using TNFR1-Fc. We postulated that TNFR1-binding clones could be eliminated when panning for the TNFR2-binding clones is performed in the presence of TNFR1 protein (see Fig. 1). Although an immunoplate or immunotube is commonly used for the panning [27–29], these techniques cannot make real-time observation of the interaction between phage library and receptor, and are difficult to automate and control the precise settings. Therefore, we first utilized the BIAcore biosensor and optimized the concentration of TNFR1-Fc required for eliminating the TNFR1-binding clones. Serially diluted human TNFR1-Fc was mixed with 1×10^{10} CFU phages displaying wtTNF, and the binding avidity of the phage-displayed wtTNF for TNFR2 was assessed using a BIAcore biosensor. As shown in Fig. 2, TNFR1-Fc inhibited the binding of phage-displayed wtTNF to TNFR2 in a dose-dependent manner. 10 pmol of TNFR1-Fc virtually abolished the binding of wtTNF not only to TNFR2 (last panel in Fig. 2) but also the binding of wtTNF to TNFR1 (data not shown). These results clearly suggest that 10 pmol of TNFR1-Fc would be sufficient for competitively subtract unwanted TNFR1-binding phage clones from a phage library displaying structural TNF mutants.

Table 2
Binding kinetics of TNFs to TNFR1 and TNFR2.

| | TNFR1 | | | | TNFR2 | | | |
|-------|---|---|-------------------------|---------------------------|---|---|-------------------------|---------------------------|
| | k_{on}^a (10^6 M ⁻¹ s ⁻¹) | k_{off}^b (10^{-4} s ⁻¹) | K_D^c (10^{-10} M) | Relative ^d (%) | k_{on}^a (10^6 M ⁻¹ s ⁻¹) | k_{off}^b (10^{-4} s ⁻¹) | K_D^c (10^{-10} M) | Relative ^d (%) |
| wtTNF | 0.45 | 1.3 | 2.9 | 100.0 | 2.0 | 12.1 | 6.1 | 100.0 |
| R2-6 | 0.79 | 54.5 | 68.8 | 4.2 | 3.2 | 7.8 | 2.4 | 251.4 |
| R2-7 | 0.44 | 116.0 | 262.0 | 1.1 | 2.1 | 7.4 | 3.6 | 169.7 |
| R2-8 | 1.22 | 50.3 | 41.1 | 7.1 | 3.1 | 6.6 | 2.1 | 291.0 |
| R2-9 | 1.19 | 50.1 | 42.3 | 6.9 | 3.8 | 12.6 | 3.3 | 185.2 |
| R2-10 | 0.67 | 43.9 | 63.7 | 4.6 | 2.2 | 5.3 | 2.4 | 253.5 |
| R2-11 | 0.81 | 87.5 | 108. | 2.7 | 2.3 | 5.4 | 2.3 | 264.5 |
| R2-12 | 1.36 | 98.8 | 72.6 | 4.0 | 4.1 | 10.6 | 2.6 | 235.0 |
| R2-13 | 0.97 | 104.0 | 107.0 | 2.7 | 2.9 | 8.2 | 2.9 | 212.2 |

Kinetic parameters for each TNF were calculated from the respective sensorgram by BIAevaluation 3.1 software, and taking into consideration that the TNF binds as a trimer.

^a k_{on} is the association kinetic constant.

^b k_{off} is the dissociation kinetic constant.

^c K_D is the equilibrium dissociation constant ($K_D = k_{off}/k_{on}$).

^d Relative values were calculated from the K_D (wtTNF)/ K_D (TNF mutants) \times 100.