

## 各種サイトカインの精製と供給あるいはその改良

研究分担者 阿部 康弘（独）医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト

### 研究要旨

経鼻ワクチンは、粘膜面/全身面の二段構えの防御を構築出来る最適の方法であることから、新型/強毒インフルエンザといった粘膜感染症に対する効果的な予防法として期待されている。しかし、経鼻ワクチンの実用化にあたっては様々な問題が指摘されており、その中でも安全かつ有効な粘膜アジュバントが存在しないことが最大の原因であると強く認識され始めている。通常、鼻腔や腸管といった粘膜局所に抗原を単独で投与しても免疫誘導能に乏しく、ウイルス感染防御に十分な効果を期待することが出来ない。そこで現在、ワクチン接種した抗原特異的な免疫を効果的に誘導するための免疫活性化医薬、すなわち、粘膜アジュバントの開発研究が精力的に試みられている。これまでも、優れた効果を示す経鼻アジュバントとして、コレラトキシン（CT）や易熱性エンテロトキシン（LT）など、細菌毒素がアジュバントの素材として期待されてきた。しかし、これら病原体由来アジュバントを用い、インフルエンザ粘膜ワクチンの経鼻接種が行われた 2000 年スイスの臨床試験において、多数の視神経麻痺（ベル麻痺）などの重篤な副作用を呈することが明らかになり、細菌毒素などを素材とした粘膜アジュバントの臨床応用は、既に断念されていると言っても過言ではない。従って今、我々は、このような過去の事例を教訓として、従来までの細菌毒素などに依存した研究開発戦略を見直し、新たな素材に着目した独自の粘膜アジュバントの開発方針を提示していく必要がある。

そこで本研究では、免疫活性化能にも優れた生体分子で、既にタンパク性医薬品として臨床に応用された実績を有するサイトカインをアジュバント素材として活用するとともに、ナノマテリアルを抗原送達キャリアとして用いることで、安全性と有効性を兼ね備えた経鼻ワクチンアジュバントシステムの開発を試みる。本年度は、アジュバント素材として腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）に着目し、そのリコンビナント蛋白質の精製及び、その生物学的特性評価を行った。なお、作製したマウス TNF- $\alpha$ は、研究代表者（吉川班）に送付し、サイトカイン粘膜ワクチンアジュバントシステムの有効性評価に供した。

### A. 研究目的

人類は 20 世紀に三度のインフルエンザの世界的大流行（パンデミック）を経験し、死の恐怖に脅かされてきた。近年の筋肉内注射による全身免疫を利用したワクチンの普及、さらにはタミフルと言った特効薬が台頭したにも関わらず、毎年の如くインフルエンザが流行し、インフルエンザウイルスに感染することに起因した死亡例は後を絶たない。特に昨今は、高病原

性・強毒性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 型）の急速な拡散、そしてヒトへの感染例（新型インフルエンザ）の急増から、そのパンデミックが極めて危惧されている。このような異例な事態の中、最も重要視されていることの一つは、予め新型インフルエンザウイルスに対するワクチンを接種しておくことで、これ以上の感染拡大を未然に防ぐことである。現在問題となっているインフルエンザウイルスが粘膜面を介

して感染することを考慮すると、「感染の場」である粘膜局所での予防免疫を可能とする、粘膜免疫システムを応用した粘膜ワクチン開発に対する期待は非常に大きい。しかし、この粘膜ワクチンの有用性は、期待されつつも、十分に得られていないのが現状である。例えば、実用化されているインフルエンザ経鼻ワクチンは、乳幼児や老人に対する有効性と安全性が未だ十分に実証されていない。また、弱毒ポリオウイルスを用いた経口投与型のポリオワクチンでも、その高いワクチン効果が実証されつつあるものの、筋弛緩麻痺などの重篤な副反応を惹起する危険性を孕んでいる。そのため、生ワクチンと同等の有効性を保ちつつ、より安全性に優れたスプリットワクチン・サブユニットワクチンの開発に対する期待が高まっている。しかし、鼻腔や腸管といった粘膜局所に、免疫原性に乏しいワクチン抗原を単独で投与しても、免疫誘導能に乏しいことが原因となって、十分なウイルス感染防御効果が期待出来ない。そこで現在、ワクチン抗原に特異的な免疫を効果的に誘導するための免疫活性化医薬、即ち粘膜ワクチン用のアジュバントの開発研究が精力的に試みられており、これまでもコレラトキシン (CT) や易熱性エンテロトキシン (LT) などの細菌毒素が優れた効果を示す粘膜ワクチンアジュバントの素材として期待されてきた。しかし、インフルエンザ粘膜ワクチンの経鼻接種が行われた2000年 スイスの臨床試験において、多数の顔面神経麻痺 (ベル麻痺) などの重篤な副作用を呈することが明らかになるなど、細菌毒素を素材とした粘膜アジュバントの実用化は、未だ懸念されている。

以上の観点から我々は、細菌毒素に代わる新たな素材としてサイトカインを用いることを提案し、実用化に向けた粘膜アジュバント開発を目指して研究に取り組んできた。サイトカインは生体内に存在する自己由来の生理活性タンパク質であり、免疫原性などの点で、CTなどの外

来性異物よりも粘膜アジュバント素材としての安全面に優れていると期待される。さらにサイトカインは、免疫制御に関わる主要な分子であることから、樹状細胞などの抗原提示細胞に対する強力な活性化作用、さらにT細胞やB細胞といった獲得免疫担当細胞の分化/増殖刺激作用など、有効性が求められる粘膜アジュバントとしての性質を兼ね備えた分子であると考えられる。そこで、本年度は、アジュバント素材として腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) に着目し、そのリコンビナント蛋白質の精製及び、その生物学的特性評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. サイトカインの大腸菌発現

mouse TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ) は、大腸菌による蛋白質発現系にて、発現・精製した。蛋白質発現プラスミドにより大腸菌 BL21-CodonPlus ( $\lambda$ DE3) -RIL 株 (Stratagene Inc.) を形質転換し、1 L の 0.4% glucose、1.68 mM MgSO<sub>4</sub>、50  $\mu$ g/mL ampicillin (Sigma-Aldrich Corp.) 含有 Terrific Broth 培地 (Invitrogen Corp.) 中で OD<sub>600</sub>=3.0-3.5 になるまで 37°C、250 rpm にて振盪培養した。その後、終濃度 1 mM となるように IPTG を加え、さらに 4 時間培養することで、リコンビナント蛋白質を inclusion body として誘導した。

### 2. Inclusion body の回収、可溶化

培養した大腸菌を 3000 rpm、10 分間遠心を行うことにより回収し、TES buffer (50 mM Tris、40 mM EDTA、250 mM NaCl、pH 8.0) で懸濁し、終濃度 0.23 mg/mL となるように Lysozyme (Roche Diagnostics Corp.) を加え、室温で 1 時間反応させた。その後、終濃度 0.5 M となるように NaCl を、2.5% となるように Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp.) を添加し、室温で 1 時間振盪した後、4°C、10000 rpm、40 分間遠心した。得られた沈殿に対し、先ほどと同様に 0.5 M NaCl、2.5% Triton

X-100 含有 TES buffer に懸濁し遠心するという操作を 2 回繰り返す、さらに、NaCl、Triton X-100 非含有 TES buffer で同様の操作を 3 回繰り返すことで、TNF の inclusion body を精製した。得られた inclusion body を秤量し、湿重量 1.8 g あたり 10 mL の GTE buffer (6 M Guanidine、100 mM Tris、2 mM EDTA、pH 8.0) に懸濁し、2 時間室温にて静置した。その後、4°C、12000 rpm、40 分間遠心し、その上清を可溶性 inclusion body とした。上清に含まれる蛋白質量は、Coomassie-Blue Plus Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた Bradford 法により定量し、終濃度 10 mg/mL となるように GTE buffer を用いて希釈した。その後 Dithioerythritol (Sigma-Aldrich Corp.) を終濃度 65 mM となるように添加し、4 時間室温で静置した。

### 3. Refolding 及び精製

pH 9.5 に調製した Refolding buffer (100 mM Tris、2 mM EDTA、1 M Arginine) を氷冷し、酸化型グルタチオン (Sigma-Aldrich Corp.) を 0.9 mM になるように添加後、激しく攪拌しながら可溶性 inclusion body 溶液を加えることで inclusion body を 100 倍に希釈した。4°C で 30 時間静置することで refolding を行った後、SPECTRA/POR Membrane MWCO 6-8000 (Spectrum laboratories Inc.) を用い、40 倍量の Dialysis buffer (20 mM Tris pH 7.4、100 mM Urea) に対し 4°C で 12 時間透析を行った。この透析操作をさらに 1-2 回繰り返すことで透析内液の液を置換し、得られた透析液を、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の Cellulose Acetate Membrane Filter (Advantec MFS, Inc.) を用いて清透化した。

得られた蛋白質溶液は、HPLC 高圧グラジエントシステム LC-8020 Model II (TOSOH Corp.) を用いて精製した。陰イオン交換樹脂; Q-sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を充填した Tricorn カラム (GE Healthcare) を

Buffer A (20 mM Tris、1 mM EDTA、pH 7.4) により平衡化し、そこへ蛋白質溶液をアプライした。カラムに吸着した蛋白質は、Buffer A により洗浄した後、Buffer B (20 mM Tris、1 mM EDTA、300 mM NaCl、pH 7.4) により溶出させた。得られた溶出液は、Amicon Ultra-4 (Millipore Corp.) を用いた限外ろ過により濃縮し、20 mM Tris buffer、pH 7.4 で平衡化した Superose 12 10/300 GL カラム (GE Healthcare) へとアプライすることでゲル濾過を行った。

### 4. L-M 細胞を用いた生物活性の評価

マウス繊維芽細胞である L-M 細胞は 1% ウシ胎児血清 (FCS (fetal calf serum; GIBCO BRL)) 及び、抗生物質 (1% Antibiotic-Antimycotic (100 U) liquid; GIBCO BRL) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM; Sigma-Aldrich, Inc.) で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴培養プレートにて 1% FCS 含有 MEM で  $1.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$ /well に希釈した L-M 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% 炭酸ガス気相下で 2 時間培養した後、予め、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  actinomycin-D (acti-D; Wako Pure Chemical Industries) 含有培地にて段階希釈した mTNF- $\alpha$  100  $\mu\text{L}$  を加えた。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。洗浄後 0.05% メチレンブルー溶液で細胞を染色し、プレートを洗浄・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、活性を評価した。

### C. 研究結果 (結果は D 項にまとめて記載)

#### D. 考察

##### リコンビナント mTNF- $\alpha$ の精製

mTNF- $\alpha$  の遺伝子を、T7 プロモーター下に発現するベクターに組み込み、大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3) -RIL に導入すること

により、mTNF- $\alpha$ を大腸菌内に大量誘導し、inclusion body として回収した。IPTG で mTNF- $\alpha$  の発現を誘導した後、回収した inclusion body を SDS-PAGE を用いて解析し、その誘導を確認した。その結果、17kDa の蛋白質のバンドとして観察された。次に、回収した inclusion body を可溶化させ、条件検討の結果を参考に pH9.5 に調製した Refolding buffer (100 mM Tris、2 mM EDTA、1 M Arginine) にて refolding した後にイオン交換クロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。その結果、約 50kDa の溶出ピーク (25 分) を示したことから、FB1 はホモ三量体を形成していることが示唆された (図 1)。

#### **mTNF- $\alpha$ の生物学的特性評価**

L-M 細胞に対する細胞傷害活性を指標に、mTNF- $\alpha$ の mTNFR1 を介した生物活性を評価した。その結果、mTNF- $\alpha$ の添加濃度依存的に L-M 細胞の細胞死が認められたことから、今回作製した mTNF- $\alpha$ は、mTNFR1 を介した生物活性を有することが判明した (図 2)。なお、その EC<sub>50</sub> 値は 0.3 ng/ml であり、過去の報告例と同等の比活性を保持していることを確認している。また、mTNFR2 を介した生物活性については、これまでマウス T 細胞である CT6 細胞に対する増殖活性が唯一報告されている。しかし、CT6 細胞は mTNFR2 だけでなく、mTNFR1 も発現しているため純粋に mTNFR2 のみを介した生物活性を評価できない。そのため、今後は、mTNFR1 が欠損した細胞株を樹立することで、新たな生物活性評価系を構築する予定である。

#### **E. 結論**

以上、本研究では、refolding 条件を最適化することで、リコンビナント mTNF- $\alpha$ の精製に成功した。また、作製した mTNF- $\alpha$ は、L-M 細胞に対して細胞傷害活性を示すことから、生物活性を有することが判明した。作製した mTNF- $\alpha$ は、研究代表者 (吉川班) に送付し、サイトカ

イン粘膜ワクチンアジュバントシステムの有効性評価に供した。

上述したように、サイトカインは医薬価値に優れた魅力的なアジュバントになるものと考えられるが、生理活性タンパク質であるサイトカインを粘膜ワクチンアジュバントとして経粘膜投与した場合、蛋白分解酵素や pH 変化などにより失活・分解されてしまい、十分な効果を発揮できないものと予想される。さらに、サイトカインの多彩な生理活性に基づく予期せぬ副作用のリスク等が律速となり、サイトカイン粘膜アジュバント開発は著しく制限されてしまうことが懸念される。この点、これまでに我々は、サイトカイン等のタンパク質の医薬価値を飛躍的に向上し得る独自の機能性人工タンパク質創出システム (生物学的 DDS 技術) を構築しており、本システムを TNF- $\alpha$ へと適用した場合、TNF- $\alpha$ に受容体指向性を付与できるのみならず、体内安定性や生物活性までも飛躍的に向上可能な TNF 変異体を創出できることを明らかにしている。従って、これら独自技術をサイトカイン粘膜アジュバント開発へと応用出来れば、安全かつ有効な医薬価値に優れたサイトカイン粘膜アジュバントの創製につながると期待される。今後は、本研究で見出したナノ DDS キャリアと活性増強型 TNF 変異体やレセプター指向性 TNF 変異体などを組み合わせることで、有効性安全性に優れた経鼻ワクチンアジュバントシステムの最適化を図る予定である。

#### **F. 健康危険情報**

該当なし

#### **G. 研究発表**

##### **① 論文発表**

該当なし

##### **② 学会発表**

該当なし

## H. 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

### その他

該当なし

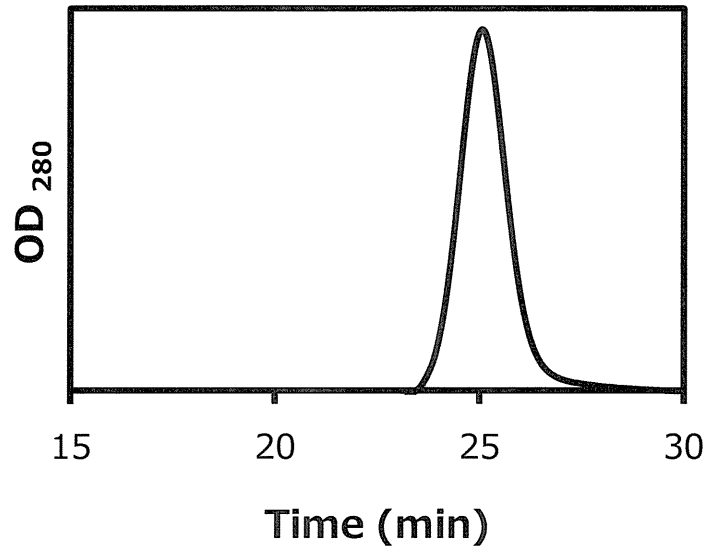


図 1. リコンビナント mTNF- $\alpha$  のゲルろ過-HPLC 解析.

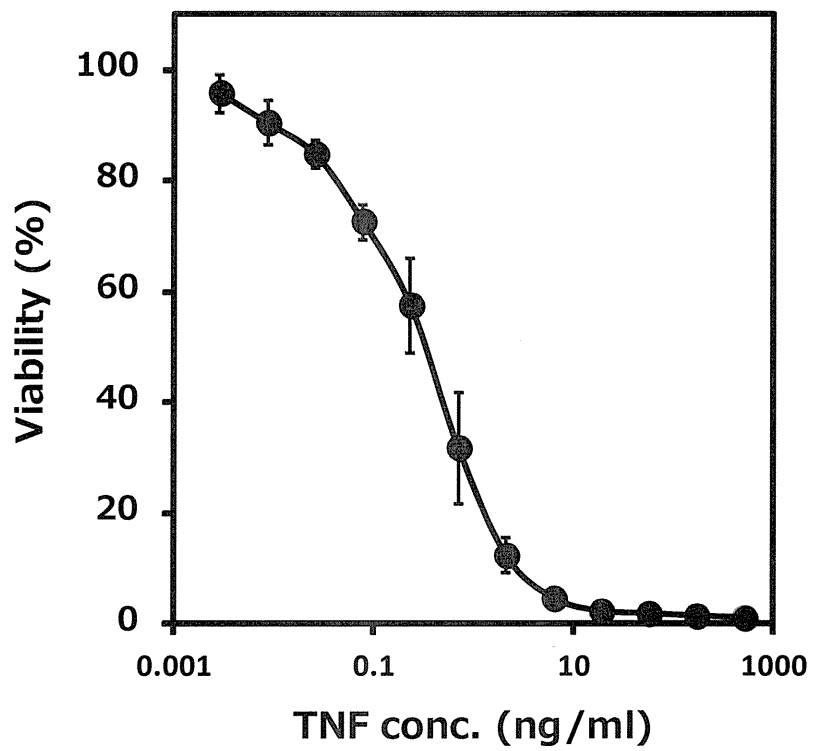


図 2. L-M 細胞を用いた mTNFR1 を介した生物活性の評価.

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当無し					

