



抗原の免疫応答機構の解析 ～改変蛋白質医薬品の開発に期待～

平成 22 年 10 月 1 日

九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬学分野の植田教授らの研究グループは、（崇城大学の井本教授、米国ラホヤ免疫アレルギー研究所宗博士との共同研究で）、蛋白質抗原が免疫応答を引き起こす主要な要因の一つは、蛋白質抗原の構造安定性であることを世界で初めて突き止めました。この研究成果によって、抗体医薬品の機能を高めるためにアミノ酸配列を改変したとしても、不測の免疫応答を回避する方策が提案されたので、今後、高機能化蛋白質医薬品の研究が一層進展することが期待されます。この研究成果は、国際科学誌「The Journal of Immunology」に 2010 年 10 月 1 日付けで発表されました。

論文名

A Protein's Conformational Stability Is an Immunologically Dominant Factor: Evidence that Free-Energy Barriers for Protein Unfolding Limit the Immunogenicity of Foreign Proteins.

The Journal of Immunology 185; 4199-4205 (2010)

研究の背景

かねてから自己蛋白質の化学変化（デアミド化など）などにより、自己抗体産生が知られています。また、最近では抗体医薬品のアミノ酸配列を改変することにより、体内での滞留時間が長くなり、薬が長時間働くことが報告されています（Igawa et al. Nature biotechnology 2010）。蛋白質医薬品が今後益々利用されるようになるため、蛋白質医薬品内にある不安定なアミノ酸配列の改変や高機能化を目指してアミノ酸配列を改変した蛋白質医薬品の創製が予想されます。アミノ酸配列改変に伴い、不測の免疫応答が生じる場合については対策が必要です。

研究の成果

生体に異物（異種蛋白質）が侵入すると、細胞内でカテプシンB、Dなどのプロテアーゼ（蛋白質分解酵素）により、異種蛋白質がペプチドへと断片化された後、そのペプチドが抗原提示細胞表面に提示されます（図1）。従って、蛋白質が分解されないようにすることが異物に対する免疫応答を回避する方法です。カテプシンB、Dなどのプロテアーゼは蛋白質の立体構造が壊れた状態に作用するので、蛋白質の立体構造を壊さないようにすることが異種蛋白質に対する免疫応答を抑制する方法として知られています（So et al. JBC, 1997 ;Thai et al. JBC, 2004）。そこで、この報告では、果たして蛋白質の立体

構造を安定に保つことで抗体産生は完全に抑制できるか、できるとすればそれはどの程度なのかということを検証しました。

蛋白質の安定性はDSC (示差走査熱量計) を用いて正確に評価することができますが、この機器は蛋白質の変性過程が可逆的な条件でないと正しい結果(変性温度など)を与えません。リゾチームは酸性条件で蛋白質の変性の可逆性が証明されている数少ない蛋白質

なので、安定性の異なる種々のリゾチーム誘導体を作成し、それらのIgG産生量を評価しました。図2は種々のニワトリリゾチーム誘導体の安定性とそれらをマウスに投与した際のIgG

産生のプロット(■)と種々の自己免疫応答を起こすマウスリゾチーム誘導体の安定性とそれらをマウスに投与した際のIgG産生のプロット(○)を示しています。縦軸は蛋白質の安定性、横軸はIgG産生量です。それぞれの蛋白質群でよい直線性を示し、IgG産生が消失する安定性はほぼ一致(21~23kcal/mol)していました。

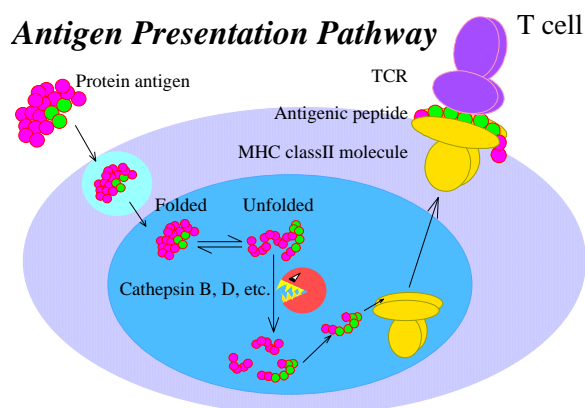


図1 異種蛋白質の抗原提示の概要

Folded:蛋白質が立体構造を保った状態

Unfolded:蛋白質の立体構造が壊れた状態

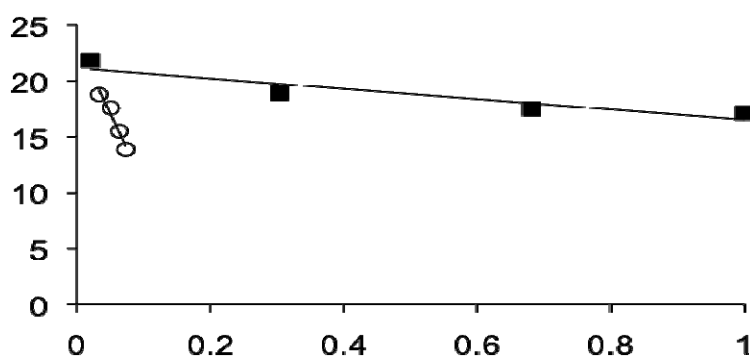


図2 蛋白質の安定性とIgG産生

縦軸は蛋白質の安定性 (ΔG : 単位kcal/mol)、横軸は野生型ニワトリリゾチームをマウスに免疫し42日後のIgG産生量に対する各蛋白質のIgG産生量の割合。蛋白質は水溶液中で、往々にして未変性状態(生理機能を持つ形:Nと表す)と変性状態(生理機能を失った形:Dと表す)の平衡関係にあるので、[N]と[D]の割合($K=[D]/[N]$)から、蛋白質の安定性(ΔG)は、 $\Delta G = -RT \ln K$ に式(Rは気体定数、Tは絶対温度)により求められます。

そこで、図3では、北米では主要な花粉症の原因蛋白質の一つPhlp7(生理条件では $\sim 20\text{kcal/mol}$ の安定性を持つ)とその変異体(M5C)(生理条件下では 20kcal/mol を遥かに上回る安定性を持つ)をマウスに投与し、IgG産生を調べたところ、Phlp7に対する抗体は検出できましたが、Phlp7(M5C)に対するIgGは検出できませんでした。以上のことから、蛋白質の安定性は抗原性の一因であること、抗原性を示す異種蛋白質の安定性には上限があることを証明しました。

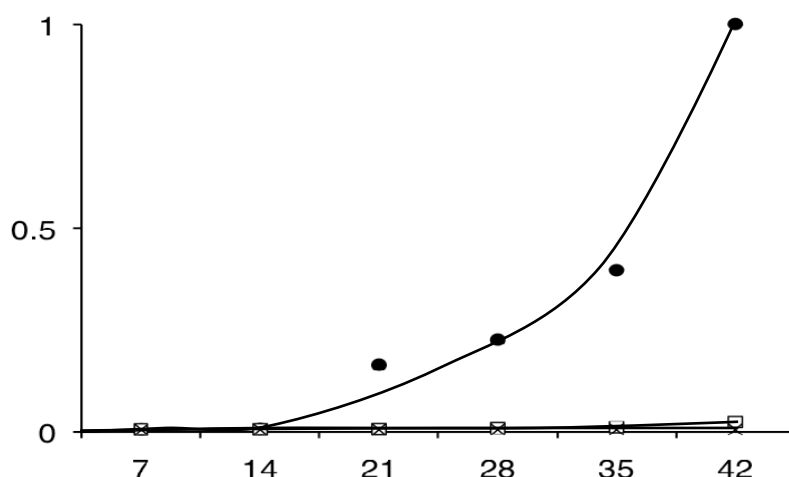


図3 Phlp7とその変異体の抗体産生

縦軸は42日後のPhlp7のIgG産生量に対する相対値、横軸は最初に抗原をマウスに投与した後の日数。Phlp7(●)、Phlp7 (M5C)(□)。

研究成果の意義

細胞工学の手法でヒト型インスリンが恒常的に生産されるずっと前には、ヒト型インスリンと一つアミノ酸配列が異なるブタインスリンを糖尿病の治療に試験的に使用したこともあるようです。ブタインスリンをヒトに継続投与すると抗体が産生されました。また、わずかなアミノ酸配列の改変でも免疫応答が生じる場合があることが報告されています(例えば、我々の研究報告 Tsujihata et al. J. Immunol. 2000; Mol. Immunology 2001)。この研究結果は、例えば、蛋白質医薬品のデアミドーションを回避するため、Asn(アスパラギン残基)をAla(アラニン残基)に置換しても、併せて蛋白質の安定性を高度に高める事ができれば免疫無視 (immune ignorance) の状態を誘導することを示唆したもので、蛋白質医薬品の創製や機能向上に有益な情報を与えたと考えています。

お問い合わせ先

九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬学分野教授 植田 正

電話：092-642-6662

メールアドレス：ueda@phar.kyushu-u.ac.jp