

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15654

研究課題名(和文)自己寛容誘導と骨破壊抑制・標的組織指向性を併せ持つ新規生物学的製剤の創製

研究課題名(英文)Development of a novel biologic showing downregulation of immune responses, suppression of bone destruction and retention in the target site.

研究代表者

本間 雅 (Honma, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60401072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：種々の生物学的製剤の開発によって、関節リウマチの治療成績は向上しているが、骨破壊抑制や寛解達成率に関しては未だ不十分な側面もある。本研究では、T細胞の活性化を抑制して関節炎を抑制すると同時に、滑膜線維芽細胞などに高発現するRANKL細胞外ドメインに結合し、成熟破骨細胞形成を阻害する生物学的製剤の創製を目指して検討を行った。その結果、CTLA-4細胞外ドメイン、IgG1 Fcドメイン、抗RANKL scFvの三者をタンデムに融合したコンストラクトを用いる事で、関節リウマチ動物モデルにおいて、関節局所における炎症増悪を、より効率的に抑制すると共に、軟骨破壊・骨破壊を効率的に抑制できる事が示された。

研究成果の概要(英文)：Outcomes of RA treatment are recently improved due to the development of various anti-inflammatory biologics, however; there remains insufficiency from the viewpoint of protection from the bone destruction and the rate of remission induction. In the present study, we constructed a novel biologic; a tandem fusion construct of CTLA-4 extracellular domain, IgG1 Fc domain and anti-RANKL scFv. Experimental treatment of collagen-induced arthritis mice model showed that this construct exhibited stronger suppression of articular inflammation and protection from cartilage and bone destruction compared to the existing biologic abatacept.

研究分野：骨軟骨代謝学・リウマチ学

キーワード：免疫学 骨代謝 シグナル伝達 生理活性

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは最も頻度の高い自己免疫疾患の一つであり、関節滑膜を慢性炎症の首座とし、滑膜組織の腫瘍様増殖と成熟破骨細胞の過剰形成によって、関節の破壊が進行する特徴がある。関節リウマチにおいて、自己免疫応答の中核となるのは Th17 細胞と考えられており、IL-17 の分泌などを介して滑膜マクロファージを刺激し、TNF $\alpha$ 、IL-1, 6 などの分泌を亢進する。これら炎症性サイトカインの過剰産生は、関節の疼痛や腫脹を引き起こし、また滑膜組織の腫瘍様増殖も刺激する。加えて、IL-17 およびこれら炎症性サイトカインは、滑膜線維芽細胞上の RANKL 発現を強く誘導する。Th17 細胞自身も RANKL を高発現しており、これらは相乗的に成熟破骨細胞形成を誘導して関節破壊が進展する (Lubberts E. *Nat Rev Rheumatol.* 2015)。近年では、炎症性サイトカインに拮抗する種々の生物学的製剤の開発が進み、MTX に重ねて使用することで、炎症を中心とする症状緩和に一定の有効性が期待できるようになっている。一方で、骨破壊の抑制に関しては未だ不十分な側面もあり、破骨細胞抑制薬の併用が検討されている (Tanaka S. *World J Orthop.* 2013)。加えて、全ての患者が寛解に至る訳では無く、生物学的製剤の併用を検証する必要性も指摘されているが、免疫応答を全身性に強力に抑制した場合、感染症リスクの大幅増大や癌細胞に対する免疫監視低下など、深刻な副作用も懸念される。これらの点を踏まえると、関節炎症局所に標的化して全身暴露を低減すると共に、より強力に骨破壊を抑制できる生物学的製剤の開発が望まれる。そこで本研究では、RANKL の細胞外ドメインに結合し、成熟破骨細胞形成を強く阻害する単鎖化抗体 (scFv) と、T 細胞に対して末梢性免疫寛容を誘導するシグナル分子である CTLA-4 (CD80/86 から CD28 へのシグナル入力を阻害) あるいは PD-L1 (PD-L1 から PD-1 への抑制シグナル入力を増強) の細胞外ドメインを、タンデムに連結した融合タンパク質を用いることで、Th17 細胞の活性化を阻害して、炎症を抑制すると同時に、RANKL シグナルを阻害して、骨破壊の進展も抑制し、加えて RANKL 発現部位に集積することで全身暴露を低減し、副作用発現が抑制された新規生物学的製剤を創製できると考え、本研究計画の立案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、CTLA-4 あるいは PD-L1 の細胞外ドメインと anti-RANKL scFv を連結した融合タンパク質を、リンカー配列・オリエンテーション等を考慮しながら複数パターン設計し、標的分子に対する結合性・タンパク質収量・体内動態特性を基に選別した後、RA モデル動物としてコラーゲン関節炎誘導マウスを用いて薬理評価を行うことで、関節腫脹および関節破壊に対する抑制効果に関して評

価を加え、最適な分子構造を特定することを目標とした。本研究のコンセプトが確立されることで、将来的には、関節リウマチに対する有効性の高い新規生物学的製剤の創製が可能となると期待される。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 融合タンパク質の分子設計および基本的な特性の評価

マウスおよびヒトの RANKL 細胞外ドメインの N 末端側に GST を融合させたタンパク質を、大腸菌発現系を用いて取得し、GSH ビーズに固相化したものを用いて、ヒト scFv を提示するファージディスプレイ・ライブラリーのスクリーニングを行い、マウスおよびヒト双方の RANKL 細胞外ドメインに親和性を示すクローンを取得した。次いで、このクローンを利用し、ヒト CTLA-4 の細胞外ドメインあるいはヒト PD-L1 の細胞外ドメインと、ヒト anti-RANKL scFv をタンデムに連結した融合タンパク質を複数設計した。この際、融合タンパク質の発現安定性・血中動態特性などを改善することを意図し、ヒト免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域も融合タンパク質内に含めることとした。

設計した各融合タンパク質コンストラクトに関して、一過性のタンパク質過剰発現に汎用される 293FT 細胞を宿主細胞として用い、組換えタンパク質の取得を行なった。タンパク質の精製は、コンストラクトの C 末端に付加した 6×His タグに対するアフィニティクロマトグラフィを用いた。得られた組換えタンパク質に関し、RANKL 細胞外ドメインに対する結合親和性、および CD86 細胞外ドメインあるいは PD-1 細胞外ドメインに対する結合親和性を、ELISA 手法を用いて評価した。また、得られたタンパク質をマウスに投与し、経時的に血液を採取した。その後、ELISA 手法を用いて血中濃度推移を評価した。

### 3-2. 組換えタンパク質の血中滞留性改善を図るための発現系変更

3-1 の検討により、CTLA-4Ig\_scFv のコンストラクト構造を、より高次のアッセイ系での評価に使用することに決定したが、293FT 細胞の一過性発現系を用いて取得した組換えタンパク質は、血中滞留性が不十分であると考えられた。この原因の一つとして、組み換えタンパク質の糖鎖修飾におけるシアル酸含量が、293FT 細胞の一過性発現系では低いことが懸念された。そこで、生物学的製剤の生産で汎用される CHO-DG44 細胞を用い、恒常発現株を取得することで、血中滞留性の改善を試みた。CTLA-4Ig\_scFv あるいは CTLA-4Ig の発現ベクターを直鎖化し、IR/MAR 法を用いて CHO-DG44 細胞への遺伝子導入を行なった。トランスフェクション翌々日から 2  $\mu$ g/mL プラストサイジン、1 mg/mL G418 を用いて薬剤選択を開始し、1 週間後にプラストサイジンの濃度を 10  $\mu$ g/mL に上げた。そ

の後、限界希釈法を2回繰り返して、CD86に対する結合性を指標としてクローンの単離・選択を行なった。

### 3-3. 組換えタンパク質の破骨細胞形成抑制活性の評価

選択した CTLA-4Ig\_scFv における N 末端側の構造は、既存のアバタセプトと同様の構造であり、CD80/86 への結合性の維持も確認されているため、免疫細胞への抑制作用も維持されていると想定できる。一方、C 末端側の構造に関しては、scFv 部分が RANKL に対する結合性を維持していることは確認されているものの、新規構造であるため、成熟破骨細胞形成に対する抑制活性は確認する必要があると考えられた。破骨前駆細胞様 Raw264.7 細胞を 100 ng/ml GST-sRANKL, 10 ng/ml M-CSF で刺激することで成熟破骨細胞の形成を誘導する実験系を用い、CHO 細胞恒常発現系を用いて取得した組換えタンパク質を培地中に添加し、成熟破骨細胞の形成に与える影響を評価した。成熟破骨細胞の形成は、特異的なマーカー酵素である TRAP の活性を指標として評価した。

### 3-4. 関節リウマチモデル動物を用いた、組換えタンパク質の薬理活性評価

関節リウマチの病態モデルとして汎用されるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) マウスを用いて、炎症抑制・軟骨破壊・骨破壊の三点に関して評価を行った。関節炎モデルマウスを用いてアバタセプトの薬理作用を評価している過去の報告では、コラーゲンの二次免疫を行うタイミングから薬剤投与を開始することで、病態進展に対する予防的な効果の評価を行なっている例が多い。種々の免疫系細胞が相互に関連しつつ、T 細胞の活性化が強く誘導されていく時期までに介入することで、CTLA-4 組換えタンパク質の薬理応答を明確に評価できる利点があるためと考えられる。しかしながら本検討においては、抗 RANKL scFv との融合タンパク質に関して薬理応答を評価することを目的としている。そのため、関節滑膜における RANKL 発現が誘導されていると考えられる時期として、四肢の関節全てに炎症が認められた段階で群分けを行い、その後薬剤の投与を開始する事で、中期以降の関節炎に対する治療的な効果の評価することとした。2型コラーゲン 100  $\mu$ g を完全フロイントアジュバントと混合してエマルジョンを作成し、7週齢の雄性 DBA/1J マウスの尾根部皮下内に投与した (day0)。さらに day21 の段階で、2型コラーゲン 100  $\mu$ g と不完全フロイントアジュバントの混合エマルジョンを用いて二次免疫をかけた。day27 に LPS 50  $\mu$ g/body を腹腔内投与した。その後、継続的に四肢の厚みを計測し、day30 前後の段階で両後肢の厚みが 1.8~2.5mm であり、かつ両前肢の厚みが 2.0mm を超えた個体を選別し、各群へのランダム割付を行なっ

た。この選別方法により、選別された個体のうちほとんどの個体において炎症が自然軽快せずに増悪していくことを確認した。炎症の増悪は day33 前後でピークに達し、5日間ほど炎症状態を維持した後に緩徐に回復していくことから、ピークに達する day33 前後で RANKL および CD86 に対する相互作用が最大化される関節腔内濃度を得られるように投与量を設定した。タンパク質の関節腔への移行率は分子サイズと相関することが知られており、本検討で用いる組換えタンパク質に関しては、血清中濃度の 0.2 倍程度であると想定された。RANKL および CD86 との結合親和性を考慮すると、関節腔内濃度として 50 nM が維持されていれば、RANKL および CD86 に対する十分な占有率を達成できると考えられた。そこで、血清中のトラフ濃度として 250 nM 程度を目標とし、10 mg/kg を連日投与することとした。

関節の炎症度合いに関しては、四肢の厚み、および複数人の評価者による観察に基づく腫脹スコアを用いて、経時的に評価を行った。また、最終投与日から2日目に膝関節を単離し、川本法を用いて凍結薄切標本を作成した。作成した組織標本に対し、サフラニンO染色およびトルイジン・ブルー染色を行った上で、軟骨破壊のスコアリングを行った。スコアリングの基準としては既報に従い、以下を採用した。0:浸食なし 1:軟骨表面のみ浸食される 2:軟骨組織の変性が起こるが、変性が tidemark には達しない 3:変性が tidemark の深度まで達し、変性率 1/4 以下 4:変性率 1/4 ~ 1/2 5:変性率 1/2 ~ 3/4 6:変性率 3/4 ~ 9/10 7:変性率 9/10 以上 8:軟骨欠失 これらの評価基準に基づき、各標本の膝関節中央脛骨中央部の領域においてスコアを算出した。また、同様に組織標本に対して TRAP 基質による染色を行い、破骨細胞数 (N. Oc/BS) および骨量 (BV/TV) の計測を行なった。破骨細胞数の計測においては、大腿骨成長板より遠位の領域において、骨梁上の TRAP 陽性細胞数を計測し、骨梁の周長で除することで規格化した (N. Oc/BS)。骨量については、同じ領域について骨梁の面積を計測し、領域全体の面積で除して規格化した (BV/TV)。

## 4. 研究成果

### 4-1. 融合タンパク質の分子設計および基本的な特性の評価

設計した各コンストラクトは、293FT 細胞一過性発現系において、その後の評価に使用するために十分な産生量を取得することが可能であった。また、CTLA-4 細胞外ドメインを IgG Fc 領域の C 末端側に配置したコンストラクトでは、CD86 細胞外ドメインに対する結合親和性が低下することが確認されたが、他のコンストラクトに関しては、分子内の配置は標的結合親和性に大きな影響を与えなかった。一方、マウスに投与した際の血中滞留性に関しては、PD-L1 細胞外ドメイン融合

コンストラクトは、いずれの構造に関しても非常に短い血中半減期を示し、糖鎖修飾などの影響が大きい可能性が考えられた。最終的に、標的分子への結合親和性が維持されており、血中半減期が最も長いコンストラクトとして、既存の生物学的製剤であるアバタセプト (CTLA-4Ig / CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 Fc 領域を改変ヒンジで連結した構造) と同構造の C 末端側に 5 残基 (GSTSG) のリンカーを用いて抗 RANKL scFv を融合したコンストラクト (CTLA-4Ig\_scFv) を採用し、以降の検討に用いることとした。

#### 4-2. 組換えタンパク質の血中滞留性改善を図るための発現系変更

293FT 細胞一過性発現系を用いて調製した CTLA-4Ig\_scFv 組換えタンパク質は、同様に調製した対照コンストラクト CTLA-4Ig と同程度の血中滞留性であった。しかしながら、CTLA-4Ig と同構造であるアバタセプトに関する過去の報告と比較すると、293FT 細胞一過性発現系で調製した CTLA-4Ig は、血中半減期が短いことが明らかとなった。同構造の組換えタンパク質であるにも関わらず、血中半減期に差異が認められたことから、発現系の違いに起因する、糖鎖修飾の違いが原因となっている可能性が想定された。そこで、生物学的製剤の生産で汎用される CHO-DG44 細胞を用い、目的タンパク質を高産生する恒常発現株の樹立を行った。取得した恒常発現細胞株から、培養上清中に分泌された各融合タンパク質を回収し、血中滞留性を評価した。その結果、CHO-DG44 細胞で産生した融合タンパク質に関しては、293FT 細胞一過性発現系を用いて取得した融合タンパク質と比較して、C<sub>max</sub> が約 2 倍、血中消失半減期が約 1.3 倍に改善したことが明らかとなった。

#### 4-3. 組換えタンパク質の破骨細胞形成抑制活性の評価

破骨前駆細胞様 Raw264.7 細胞を用いた成熟破骨細胞誘導系に対して、CHO-DG44 細胞恒常発現株を用いて取得した組換えタンパク質が与える影響を評価した結果、CTLA-4Ig に関しては、成熟破骨細胞の形成抑制作用は弱く、400 nM において抑制作用が観察された。一方 CTLA-4Ig\_scFv に関しては、25 nM の低濃度から、有意な成熟破骨細胞形成の抑制作用が認められ、200 nM ではコントロール群と同程度まで成熟破骨細胞の形成が抑制された。この結果から、CTLA-4Ig\_scFv 融合タンパク質は、CTLA-4 分子に起因する活性よりも大幅に強い成熟破骨細胞形成抑制活性を有していることが確認された。

#### 4-4. 関節リウマチモデル動物を用いた、組換えタンパク質の薬理活性評価

群分けを行なった日より 7 日間、CTLA-4Ig または CTLA-4Ig\_scFv を連日腹腔内投与し、コントロール群に対しては組換えタンパク

質と同容量の生理食塩水投与を行なった。投与 1, 4, 6, 8 日目に 200  $\mu$ L/body の採血を行ない、血清中薬物濃度を測定したところ、投与 4 日目のトラフ血清中濃度として 500 nM を超えていたため、関節腔内でも目標の濃度を達成できているものと考えられた。

四肢の厚みおよび関節炎スコアを経時的に測定した結果、CTLA-4Ig\_scFv 投与群では生理食塩水投与群と比較して有意に炎症の進行が抑制された一方で、CTLA-4Ig 投与群では、生理食塩水群と炎症の進行に有意な差が認められなかった。さらに、膝関節の凍結薄切標本を用いた軟骨破壊の評価に関しても、CTLA-4Ig\_scFv 投与群において、生理食塩水投与群と比較して有意に軟骨破壊が抑制されていることが確認された。これらの結果は、CTLA-4Ig\_scFv が CTLA-4Ig と比較して、より強く炎症を抑制することで、炎症性サイトカインによって誘導されるタンパク質分解酵素の低減などに繋がった可能性を示唆しており、意図した分子設計が反映された薬理活性を示していると考えられた。

さらに、膝関節の凍結薄切標本を用いた骨破壊の評価に関しては、CTLA-4Ig\_scFv 投与群では、生理食塩水投与群に対して破骨細胞数が大幅に減少しており、骨量減少に対しても抑制傾向が示された。また、CTLA-4Ig に関しては、生理食塩水投与群と比較して有意な破骨細胞数の減少は認められず、骨量の減少についても生理食塩水投与群と同程度であった。このことから、CTLA-4Ig\_scFv は RANKL シグナルの阻害を介して成熟破骨細胞の形成を抑制する作用が発揮されているものと考えられ、この点においても意図した分子設計が反映されていると考えられた。

#### 4-5. 結論および考察

本研究の結、免疫応答を緩和する CTLA-4 細胞外ドメインと、IgG1 Fc ドメイン、RANKL 細胞外ドメインを認識する scFv の三者をタンデムに融合したコンストラクトを設計することで、関節リウマチ動物モデルにおいて、関節局所における炎症増悪を、より効率的に抑制すると共に、軟骨破壊・骨破壊を効率的に抑制できる事が示された。今後、関節炎症局所に CTLA-4Ig\_scFv の集積が生じているのか、などの点も検証する必要があると考えている。本研究の完成は、「炎症局所に選択的な分子を標的とした抗体フラグメントと免疫寛容誘導分子との融合タンパク質によって効率的な炎症の抑制を達成する」というコンセプトの確立に繋がると考えており、多くの限局型自己免疫疾患に対して応用できる可能性が考えられる。今後、他の自己免疫疾患に対しても検討対象を拡大したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

①藏田玲美、本間雅、池淵祐樹、苅谷嘉頭、鈴木洋史 関節リウマチに対する新規バイオロジクスの創製検討 日本薬剤学会第33年会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本間 雅 (HONMA, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60401072