

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08300

研究課題名(和文) 免疫抑制機能に相関して制御性T細胞に発現するFCRL3膜受容体の役割

研究課題名(英文) Functional antibodies against membrane receptors expressed on regulatory T cells in correlation with immunosuppressive function

研究代表者

永田 諭志 (Nagata, Satoshi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：40246682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体の免疫応答の適切な制御は、免疫が生体全体に有益な効果を与えかつ害を生じないために極めて重要である。本研究ではヒト制御性T細胞の機能制御に重要な役割を示す Fc receptor-like 3 (FCRL3) と TNF receptor 2 (TNFR2) に対する新規抗体群を取得した。TNFR2 に対してアゴニスト活性とアンタゴニスト活性を示す機能抗体群の結合エピトープを独自の「エピトープ均質化抗体パネル法」により同定した。得られた抗TNFR2アンタゴニスト抗体は、制御性T細胞の増殖と機能を抑制し、新しいタイプの免疫チェックポイント阻害薬として開発できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの治療薬として、免疫チェックポイント阻害剤が成功を収めている。このように免疫制御による治療は、免疫異常疾患に留まることなく、様々な疾病に対して、有効な治療法を開発する新たなアプローチとして脚光をあびている。制御性T細胞による抑制制御は、主要な免疫制御機構の1つであるが、制御性T細胞群は、いくつかの異なる細胞集団から構成されており、その機能的な重要性の順列や分化・誘導機序はよくわかっていない。本研究を通じて取得された、制御性T細胞群の表面に発現するTNFR2に対するアンタゴニスト抗体は、制御性T細胞の増殖と機能を抑制し、新たなタイプの免疫チェックポイント阻害薬として開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Appropriate control of the immune response is extremely important to induce a beneficial effect on the whole body without harm. In this study, we obtained new groups of antibodies against Fc receptor-like 3 (FCRL3) and TNF receptor 2 (TNFR2), which have important roles in the regulation of human regulatory T cell function. We identified binding epitopes associated with the agonistic activity or antagonistic activity against TNFR2 by our unique "epitope-normalized antibody panel" technology. The obtained anti-TNFR2 antagonist antibody suppresses the proliferation and function of regulatory T cells and may be developed as a new type of immune checkpoint inhibitor.

研究分野：免疫学、抗体工学

キーワード：FCRL3 制御性T細胞 TNFR2 アゴニスト抗体 アンタゴニスト抗体

1. 研究開始当初の背景

生体の免疫応答の制御は、免疫が生体全体に有益な効果を与え、かつ害を生じないために極めて重要である。適切な部位に適切な強さで免疫応答を誘導するために、多様な免疫制御機構が生体内で働いている。主要な免疫制御機構の1つとして、生体内のT細胞の機能的一群である制御性T細胞(regulatory T cell = Treg)が、がん抗原を含む自己抗原や、外来抗原に対する獲得免疫応答を、抑制制御することがよく知られている。しかしながら、制御性T細胞群は、いくつかの異なった細胞集団から動的に構成されており、その機能的重要性の順列や分化・誘導機序はよくわかっていない。我々はヒト制御性T細胞の機能的亜集団が、機能し、分化するために、重要な細胞膜上のレセプターやリガンドを同定し、それらの分子に対する特異的抗体を用いて、細胞を刺激にすることにより、細胞機能の制御と分化メカニズムを解明するための研究を展開してきた。我々は独自の機能抗体作製技術として、細胞表面に存在するレセプター分子表面を網羅する多数のエピトープに対し必要最小限のモノクローナル抗体のパネルである「エピトープ均質化抗体パネル」の作製技術を有しており、同一標的についてアゴニスト抗体とアンタゴニスト抗体の同時取得を可能にしている。

我々はこれまでに、ヒト制御性T細胞のうち、約50%をしめる細胞亜集団の細胞膜表面に、Fc receptor-like 3 (FCRL3) が特異的に高発現し、これらのFCRL3+制御性T細胞は、T細胞受容体刺激に非応答性であることを世界で始めて見出している。一方、近年、がんの治療薬として、抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害薬が成功を収めているが、FoxP3+制御性T細胞はTNF receptor 2 (TNFR2) が高発現し、抗TNFR2のアンタゴニスト抗体は、制御性T細胞の増殖と機能を抑制し、新しいタイプの免疫チェックポイント阻害薬となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では抗FCRL3抗体や抗TNFR2機能抗体を作製し、FCRL3またはTNFR2陽性の制御性T細胞について、これらのレセプター刺激による細胞機能変化や抑制メカニズムを明らかにすることを目的とした。長期の狙いとしては、これらのレセプター依存性のシグナルを標的とした新たな免疫制御医薬の開発につなげる。

3. 研究の方法

FCRL3およびTNFR2に対する抗体パネル作製を通じ機能エピトープ領域を同定するとともに、作製したアゴニストまたはアンタゴニスト抗体を用い、陽性細胞の機能変化について解析した。

4. 研究成果

(1) FCRL3については、研究開始当初は、我々が過去に作製した抗FCRL3モノクローナル抗体H5を使用して、FCRL3依存性の細胞内シグナル経路を解析する計画であったが、我々の共同研究を含む他の研究の進捗により研究開始後約一年後に、使用している抗体のエピトープが刺激のために最適でないことが示唆された。そのため、これに対応して、別のエピトープを認識し、より効率よく細胞内シグナルを誘導可能な、新しい抗FCRL3抗体を取得中である。現在までにFCRL3の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体パネルを新たに40抗体作製しH5と異なるエピトープ領域に対する抗体を含め、7抗体からなる抗FCRL3エピトープ均質化部分抗体パネルを作製した。これらの抗体はH5抗体と異なるエピトープを認識する抗体が含まれている。現在、協力研究者との共同研究を通じ、FCRL3のIgA結合阻害能と制御性T細胞機能に与える影響について検討中である。

(2) 制御性T細胞に高発現し、細胞増殖と機能発現に働くTNFR2レセプターに対して、多数のモノクローナル抗体を順次作製し、抗体ペア相互の競合結合阻害パターンを指標に、クラスター分析により抗体の認識エピトープを均質化する方法により、17の抗TNFR2抗体より構成される抗TNFR2エピトープ均質化部分抗体パネルを得た。17抗体のすべてのペアで相互競合結合試験(逐次結合アッセイ = Sequential Binding Assay)を行い、各抗体の他の抗体と抗原複合体の結合を、競合抗体非存在下での結合%として

数値化した。その結合マトリックスのクラスター分析で得られた樹形図の形状を、安定化指数 (Stability Index: 我々の独自パラメーター) によって解析し、エピトープグルーピングのための閾値を算出した。その結果、図1のように、算出された閾値によりエピトープが7群と判断され、各エピトープグループはマトリックスの反応パターンと対応した。得られた異なるエピトープに対する7種類の抗体の機能を検討した。

(3) 各抗体のアゴニスト活性を TNFR2 を発現させた Ramos-Blue レポーター細胞を用い、各抗体刺激により誘導される NFkB 依存性シグナルをレポータータンパク質の分泌性アルカリフォスファターゼの発現として、PNPP 基質を用いて検出した。その結果、エピトープ5に相関し TR92 抗体に強いアゴニスト活性が検出された。一方 TNFR2 発現 Ramos-Blue レポーター細胞を、TNF

で刺激して誘導される TNF 依存性シグナルに対して、各抗体による抑制効果を検討したところ、エピトープ7に相関し TR109 抗体に強いアンタゴニスト活性が検出された。両抗体とも、TNFR2 に対する TNF リガンドの結合を阻害し、リガンド結合部位を認識すると考えられたが、エピトープのトポロジーの差により、機能的に異なったアゴニスト抗体とアンタゴニスト抗体の同時取得に成功した。

(3) TR109 アンタゴニスト抗体の Fv 遺伝子を取得同定し Fv 配列をヒト IgG1 の定常領域と遺伝子上で融合させ、ヒトキメラ抗体および Fab 抗体を作製した。その結果、TR109 アンタゴニストのヒトキメラ抗体および Fab 抗体は、いずれもオリジナルマウス TR109 抗体と同様に TNF の活性を抑制し、アンタゴニスティックな活性が確認された(図2)。このように TR109 のアンタゴニスト活性は確かに Fv による特異的抗原結合に依存することが確認できた。

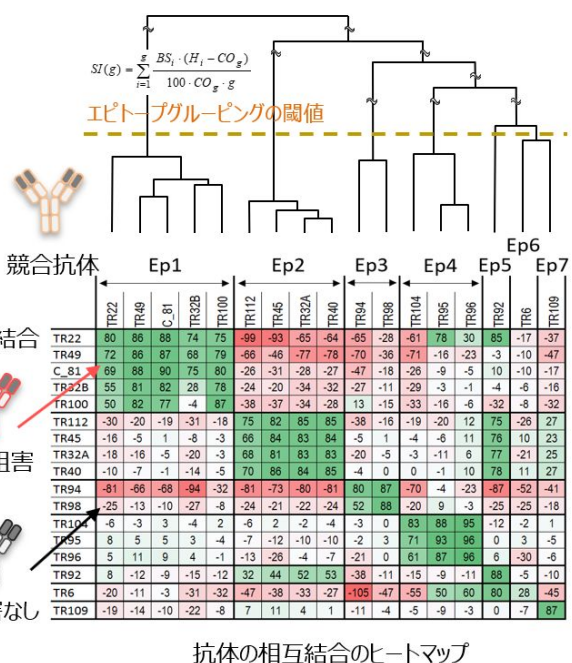


図1 本研究で得られた抗TNFR2エピトープ均質化抗体パネル

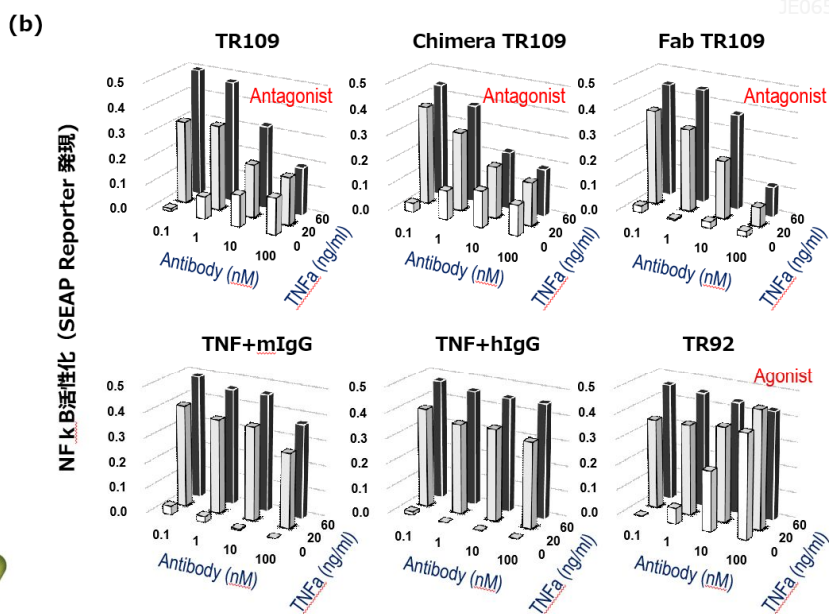
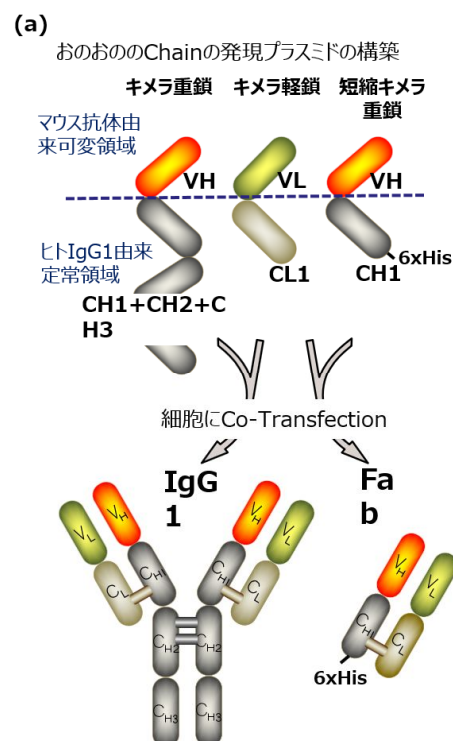


図2. 組み替えヒトキメラTR109抗体およびTR109抗体由来Fabの作製 (a) とTNFR2依存性NF-kB細胞シグナル誘導に対する効果 (b)

(4) TNFR2 陽性であるヒト制御性 T 細胞は、IL-2 の存在下で TNF 依存性に増殖し活性を示す。抗 TNFR2 アゴニスト抗体は TNF を機能的に代替し、アンタゴニスト抗体は TNF 機能を抑制することから、制御性 T 細胞を介する免疫応答の制御への応用が想定される。そこで各抗体の制御性 T 細胞における効果を検討するために、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を各種濃度の IL2 と TNF の存在下で 4 日間培養し、制御性 T 細胞の増殖を CD4 陽性細胞中の Foxp3 制御性 T 細胞の陽性比率として算出した。図 3 a に示すように予想通り、ヒト末梢血単核細胞の細胞培養中で、IL2 と TNF 依存性にヒト制御性 T 細胞が増殖した。この TNF 依存性の T 細胞増殖が観察された条件で、TR92 アゴニスト抗体および TR109 アンタゴニスト抗体を各種濃度で加え、5 日間培養後に、各抗体の効果を抗体がないの制御性 T 細胞の陽性比率変化として算出した (図 3 b)。その結果、確立された実験条件 (IL2, 100ng/ml ; TNF, 100ng/ml) において、TR92 および TR109 抗体による、制御性 T 細胞の増殖促進および増殖抑制が観察され、それぞれ TNFR2 シグナルへのアゴニスティック効果およびアンタゴニスティック効果が確認された。

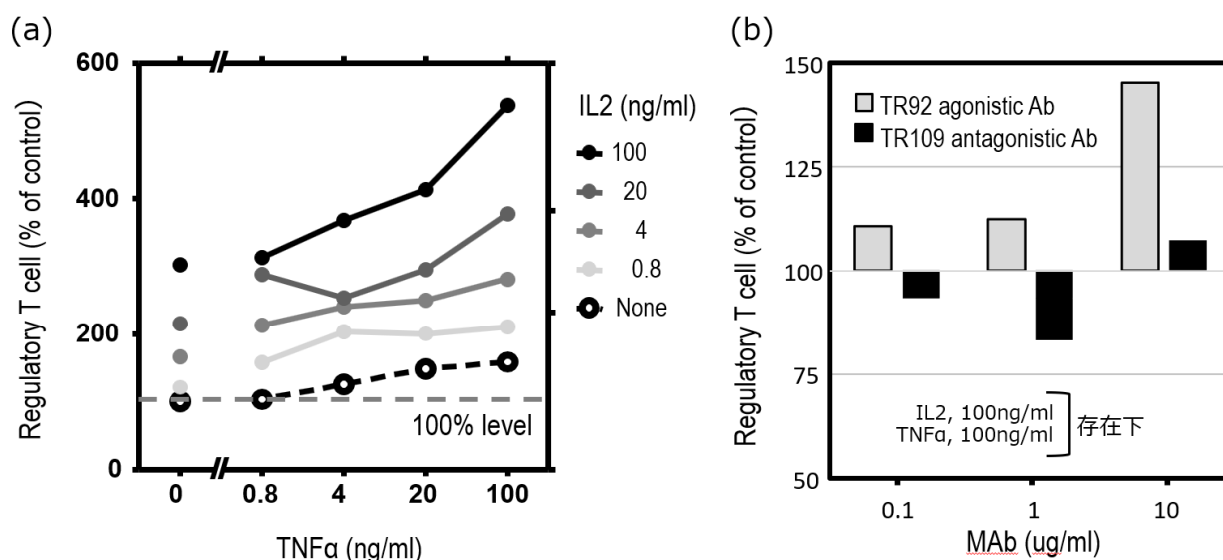


図 3. TR92アゴニスト抗体およびTR109アンタゴニスト抗体のTNF依存性ヒト制御性T細胞増殖に与える効果

(5) 本研究を通じ取得された機能抗体群は、今後の制御性 T 細胞の増殖、分化、機能解明に役立つ。論文文化をめざし、すでに協力研究者との国際共同研究を開始している。また本研究で得られた抗 TNFR2 アンタゴニスト抗体を、新しい免疫チェックポイント阻害薬として医療応用する可能性を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shancer Zoe, Liu Xiu-fen, Nagata Satoshi, Zhou Qi, Bera Tapan K., Pastan Ira	4. 巻 116
2. 論文標題 Anti-BCMA immunotoxins produce durable complete remissions in two mouse myeloma models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4592 ~ 4598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1821733116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shancer Zoe, Williams Matthew, Igelman Austin, Nagata Satoshi, Ise Tomoko, Pastan Ira, Bera Tapan K	4. 巻 1
2. 論文標題 Preclinical development of anti-BCMA immunotoxins targeting multiple myeloma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antibody Therapeutics	6. 最初と最後の頁 19 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/abt/tby004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Khan Sheema, Zafar Nadeem, Khan Shabia S., Setua Saini, Behrman Stephen W., Stiles Zachary E., Yallapu Murali M., Sahay Peeyush, Ghimire Hemendra, Ise Tomoko, Nagata Satoshi, Wang Lei, Wan Jim Y., Pradhan Prabhakar, Jaggi Meena, Chauhan Subhash C.	4. 巻 20
2. 論文標題 Clinical significance of MUC13 in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 563 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2017.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Evans Rick L., Pottala James V., Nagata Satoshi, Eglund Kristi A.	4. 巻 18
2. 論文標題 Longitudinal autoantibody responses against tumor-associated antigens decrease in breast cancer patients according to treatment modality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-018-4022-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 永田諭志、伊勢知子、鎌田春彦	4. 巻 36
2. 論文標題 標的に抗体が結合できる部位はいくつあるか?-効率よく新しい機能抗体を探索するためのエピトープ均質化抗体パネル	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1867-1874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Akiba, Reiko Satoh, Satoshi Nagata, Kouhei Tsumoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Effect of allotypic variation of human IgG1 on the thermal stability of disulfide-linked knobs-into-holes mutants of the Fc for stable bispecific antibody design	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antibody Therapeutics	6. 最初と最後の頁 65-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/abt/tbz008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abhijit A Ambegaonkar, Satoshi Nagata, Susan K Pierce, Haewon Sohn	4. 巻 10
2. 論文標題 The Differentiation in vitro of Human Tonsil B Cells With the Phenotypic and Functional Characteristics of T-bet+ Atypical Memory B Cells in Malaria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00852.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 鎌田春彦、永田諭志、近藤裕郷	4. 巻 48
2. 論文標題 高効率な臨床抗体の開発を目指して	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 91-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 エピトープ均質化抗体パネル、ならびにその作製方法および利用	発明者 近藤裕郷 鎌田春彦 永田諭志 他4名	権利者 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-551721	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 エピトープ領域架橋型バイバロトピック抗体、及びそれを製造する方法	発明者 秋葉宏樹、永田諭志、津本浩平	権利者 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-61014	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ピシリージョ シリアコ (Piccirillo Ciriaco)	McGill University, Departments of Microbiology & Immunology and Medicine・Professor	
研究協力者	トルネイ マット (ToInay Mate)	FDA, Office of Biotechnology Products・Principal Investigator	