

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：34509

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19567

研究課題名（和文）制御性T細胞コントロールのための免疫サイトカインの創製と最適化デザイン

研究課題名（英文）Molecular design of immunocytokines for control of regulatory T cell function

研究代表者

角田 慎一（Tsunoda, Shin-ichi）

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：90357533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、TNFR2シグナルの選択的な活性化によるTregの増幅を可能とする新規バイオロジクスとして、TNFR2に対するscFv（一本鎖化Fv）抗体とTNFR2アゴニストの融合タンパク質からなる「免疫サイトカイン（TNFR2-1C）」の創製を試みた。これにより、TNFR2のシグナリングとクラスタリングに基づく、Tregの選択的で強力な増幅法としてのTNFR2-1Cの可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、TNFR2のシグナリングとクラスタリングを誘導する新規バイオロジクスとしてTNFR2-1Cを創製した。TNFR2-1Cはin vitroにおいて、TNFR2アゴニストよりも効率よくヒトTregを増幅した。また、マウスへのTNFR2アゴニストの投与によってTregの増加が認められたことから、まだ検証はできていないが、TNFR2-1Cの投与によっても同様に、Tregの効率的な増幅が期待できる。TNFR2-1Cは、Tregの効率的な増幅作用を発揮することから、免疫疾患や移植医療における新たな創薬シーズになるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we developed a new biologics which expands regulatory T-cells (Tregs) via TNFR2 signal activation. The biologics named immunocytokine (TNFR2-1C) is a recombinant fusion protein composed of anti-huTNFR2 single-chained Fv antibody (scFv) and huTNFR2-selective agonistic TNF-alpha mutant. TNFR2-1C bound to TNFR2 with high affinity and stimulated the proliferation of PBMC-derived effector Treg subset in vitro. These results indicate that the TNFR2-1C is promising as a Treg expander.

研究分野：分子細胞免疫学

キーワード：TNFR2 immunocytokine 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

昨今、制御性 T 細胞 (Treg) の数や機能を生体内/外で人為的に増幅させることで、過剰な免疫応答を抑制し、疾患の治療を達成しようとするアプローチに期待が寄せられている。例えば、関節リウマチ等の自己免疫疾患に対する Treg を利用した治療、臓器移植後の拒絶反応の抑制のための生体外増幅 Treg の移入、移植片対宿主病 (GvHD) 抑制のための低用量 IL-2 投与による生体内 Treg 誘導、などの研究が試みられている。しかし、Treg を強力に増幅させる方法は未だ未確立といえる。研究代表者らは、これまでに 2 型 TNF 受容体 (TNFR2) 選択的にシグナルを伝達できる TNF 変異体 (TNFR2 アゴニスト) を創製し、病態解明や治療応用に向けた研究を推進してきた中で (Abe Y, Tsunoda S, et al. Biomaterials 2011, Inoue M, Tsunoda S, et al. J Cell Sci. 2015)、TNFR2 アゴニストがマウス Treg を選択的に増殖・活性化することを明らかとした。すなわちこれは、TNFR2 シグナルが Treg の機能に重要な役割を担っていることを示唆するものである。また研究代表者らは、TNF/TNFR2 複合体の結晶構造を解析し、TNFR2 のシグナル伝達には、TNFR2 が細胞膜上でクラスタリングを伴う可能性を見出している (Mukai Y, Tsunoda S, et al. Sci Signal. 2010)。これら背景のもと、TNFR2 への選択的結合・刺激と TNFR2 のクラスタリング誘導能を有するバイオロジクスが創製できれば、強力な Treg 増幅剤になるものと考えた。

生体で末梢性免疫寛容を誘導するためには、Treg をいかに特異的に増幅できるかが鍵となる。特にヒトでは、従来 Treg と考えられていた CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞が機能的に不均一な細胞集団であることが明らかとされている。そのため、ヒトでの免疫寛容の誘導には、Treg の中でも抑制活性の高い画分と考えられているエフェクター Treg (eTreg, CD4⁺CD45⁺CD25^{high}Foxp3^{high} T 細胞) の増殖・活性化が期待される。我々は、TNFR2 が eTreg にも高発現していることを見出しており、TNFR2 は、ヒト eTreg 増幅のための標的としても有望である。

2. 研究の目的

本研究では、TNFR2 シグナルの選択的な活性化による Treg の増幅を可能とする新規バイオロジクスとして、TNFR2 に対する scFv (一本鎖化 Fv) 抗体と TNFR2 アゴニストの融合タンパク質からなる「イムノサイトカイン (TNFR2-IC)」の創製を試みた (図 1)。これにより、TNFR2 のシグナリングとクラスタリングに基づく、Treg の選択的で強力な増幅法としての TNFR2-IC の可能性を探った。

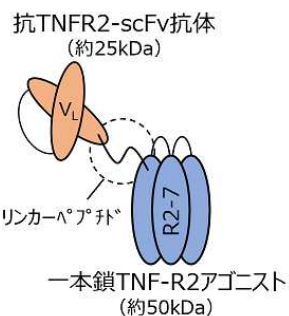


図1 TNFR2-IC タンパク質の模式図

3. 研究の方法

(1) TNFR2-IC タンパク質の作製

TNFR2 アゴニストの作製には、これまでに研究代表者が確立してきたファージディスプレイ技術を駆使したサイトカイン機能改変技術を適用した。ヒト TNF- α の 6 箇所のアミノ酸残基をランダム化した TNF 変異体ファージライブラリの中から、ヒト TNFR2 に選択的に結合し、シグナルを伝えるアゴニスト TNF 変異体をスクリーニングした。同様に、ヒト TNF- α の 9 箇所のアミノ酸残基をランダム化した TNF 変異体ファージライブラリの中から、マウス TNFR2 に選択的に結合し、シグナルを伝えるアゴニスト TNF 変異体をスクリーニングした。また、ヒト TNFR2 に結合し、アゴニスト/アンタゴニスト活性は示さないモノクローナル抗体クローン (80M2) の遺伝子情報は Dr. Klaus Pfizenmaier から提供していただいた。

TNFR2-IC は、cDNA を遺伝子合成により作製し、哺乳類発現系を用いて組換えタンパク質を作製した。Expi293F 細胞に、リポフェクションにより TNFR2-IC 発現ベクター (pCAG-TNFR2-IC) を導入した。37°C、8% CO₂ 下で 1 週間培養した後、培養上清を回収し、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー (KanCap A) 及びゲルろ過クロマトグラフィー (HiLoad superdex 200 pg) による 2 段階分離により、タンパク質を精製した。

(2) TNFR2-IC の物性評価

TNFR2-IC の TNFR2 結合特性は、BIAcore を用いて解析した。ヒト TNFR2-Fc (500 RU) を固相化した CM5 センサーチップに、TNFR2-IC もしくは R2-7 (1.2, 3.6, 10.9, 32.7, 98.0 nM) を作用させ、結合解離反応を測定した。

(3) TNFR2-IC の in vitro 特性評価

TNFR2-IC の in vitro シグナル特性を TNFR2 シグナルのアッセイ細胞を用いて評価した。Human TNFR2/Fas-PA を 96 ウェルプレートに播種した (3x10⁵ cells/well) 後、R2-7 および TNFR2-IC, 80M2scFv-Fc を作用させ、培養した。48 時間後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて、細胞傷害活性を測定した。非作用群を 100% として、各濃度における細胞生存率を算出した。

(4) ヒト Treg における TNFR2 の発現解析

ヒト PBMC (1x10⁶ cells/tube, Precision for Medicine 社) に、anti-huCD4 mAb-APC と anti-huCD25 mAb-BV421, anti-huCD45RA mAb-FITC, anti-huTNFR2 mAb-PE/Cy7 を加えて染色した後、フローサイトメトリー (FCM) により、各 Treg 画分の TNFR2 発現レベルを解析した。

(5) TNFR2-IC のヒト Treg 増幅作用の評価

96 ウェルプレートに抗ヒト CD3 抗体 (0.5 ug/mL) を加えて一晩静置し、抗体を固相化したのち、ヒト PBMC (5x10⁴ cells/well, Precision for Medicine 社) を播種した。IL-2 (10 U/mL) 及び TNFR2-IC (10 ng/mL) を添加し、37°C で 72 時間培養した。細胞を回収した後、anti-huCD4 mAb-APC と anti-huCD25 mAb-BV421, anti-huCD45RA mAb-FITC で染色し、各 Treg 画分の割合を FCM で測定した。

(6) TNFR2 アゴニストのマウスにおける in vivo 作用の評価

TNFR2 アゴニストが in vivo において Treg 増幅作用を発揮するかどうか検証するため、一本鎖化マウス TNFR2 アゴニスト (scR2agoTNF) タンパク質をマウスに投与し (100 μg/mouse x 5days)、リンパ節細胞中の CD4⁺ FoxP⁺ Treg の割合を FCM で解析した。

4. 研究成果

(1) TNFR2-IC タンパク質の作製

タンパク質機能改変技術を用いてヒト TNFR2 に選択的に結合し、アゴニストとして作用する (TNFR1 には作用しない) TNF 変異体クローン (R2-7) を得た。同様に、マウス TNFR2 に選択的に結合し、アゴニストとして作用する TNF 変異体クローン (R2agoTNF) を得ることができた。

TNFR2 アゴニスト (R2-7) をペプチドリンカーで一本鎖化した scR2-7、また、抗 TNFR2 抗体 (80M2) の可変ドメイン (VH/VL) を一本鎖化した 80M2-scFv を連結させた TNFR2-IC の cDNA を遺伝子合成で作製した (図 2)。哺乳類細胞発現系で産生させた TNFR2-IC 組換えタンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーで解析した結果、TNFR2-IC は単一ピーク由来の分子として回収できた。回収したタンパク質をウエスタンブロッティングによって確認した結果、TNFR2-IC は 75-kDa の分子として検出された。

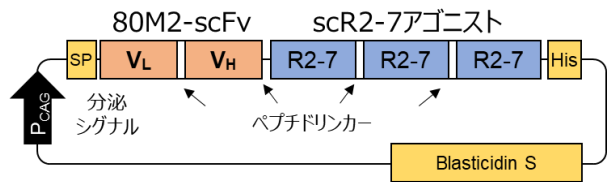


図 2 TNFR2-IC 発現ベクターの構成

(2) TNFR2-IC の物性評価

精製した TNFR2-IC の TNFR2 への結合特性を解析した結果、TNFR2-IC は、TNFR2 結合部位が増えたことで、R2-7 に比べて、当モルあたりの結合量が増大したことがわかった。しかし、結合解離定数は同等であり、表面プラズモン共鳴法では解析できていない可能性が示唆された。

(3) TNFR2-IC の in vitro 特性評価

TNFR2-IC の in vitro シグナリング活性を TNFR2 依存性に細胞死が誘導されるアッセイ細胞 (hTNFR2/Fas-PA 細胞) で評価した。アゴニスト活性をもたない 80M2 抗体由来の 80M2scFv の Fc キメラ体 80M2scFv-Fc は細胞傷害性を示さなかった。一方、TNFR2 アゴニストタンパク質 R2-7 は濃度依存的な細胞傷害性を示した。さらに、80M2-scFv と scR2-7 を連結した TNFR2-IC は、R2-7 に比べて 100 倍程度高い細胞傷害性が認められた。本結果から、TNFR2 のクラスターリング効果が加わったために TNFR2 のシグナリング活性が大きく向上したものと考えられた。

(4) ヒト Treg における TNFR2 の発現解析

疾患治療への応用を念頭に、ヒト PBMC 由来の各 Treg フラクション (サブセット) における TNFR2 の発現レベルを FCM により解析した。その結果、CD4⁺ CD25^{high} CD45RA⁺ effector Treg (eTreg, フラクション II) では、他の Treg 画分に比べて、TNFR2 が高発現することがわかった。よって、ヒトにおいても TNFR2 が Treg の増幅・機能制御の標的分子として有望であることが示唆された (図 3)。

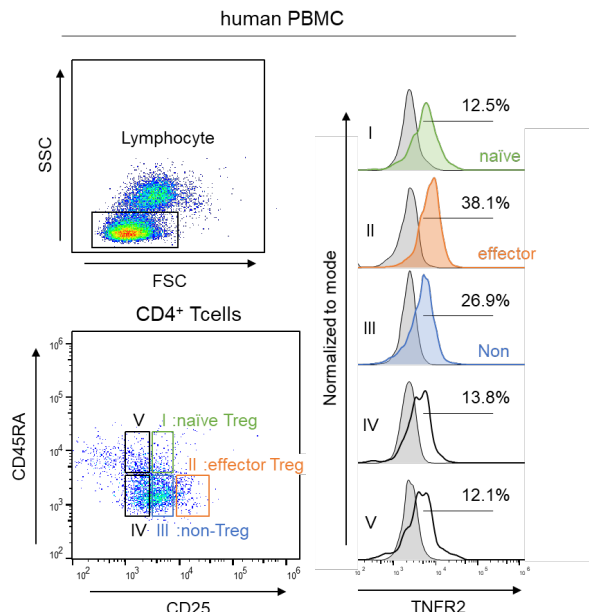


図 3 TNFR2 はヒト eTreg に高発現する。

(5) TNFR2-IC のヒト Treg 増幅作用の評価

In vitro でヒト PBMC に TNFR2-IC を作用させ、Treg の増幅作用を FCM 解析により検討した。その結果、CD4⁺ CD25^{high} CD45RA⁻ effector Treg (フラクション II) が選択的に、有意に増幅されることが確認できた。

(6) TNFR2 アゴニストのマウスにおける in vivo 作用の評価

TNFR2-IC の in vivo 作用を検証する前段階として、TNFR2 アゴニストの in vivo 投与時の作用を検討した。scR2agoTNF タンパク質をマウスに投与したところ、リンパ節中の CD4⁺ Foxp3⁺ Treg の割合が選択的に、有意に増加することが判明した。

以上、本研究では、TNFR2 のシグナリングとクラスターリングを誘導しうる新規バイオロジクスとして TNFR2-IC を創製した。TNFR2-IC は in vitro において、TNFR2 アゴニストよりも効率よくヒト Treg を増幅した。また、マウスへの TNFR2 アゴニストの投与によって Treg の増加が認められたことから、まだ検証はできていないが、TNFR2-IC の投与によっても同様に、Treg の効率的な増幅が期待できる。TNFR2-IC は、Treg の効率的な増幅作用を発揮しうることから、免疫疾患や移植医療における新たな創薬シーズになるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Masaki, Tsuji Yuta, Yoshimine Chinatsu, Enomoto Shota, Morita Yuki, Osaki Natsuki, Kunishige Masahiro, Miki Midori, Amano Shota, Yamashita Kanako, Kamada Haruhiko, Tsutsumi Yasuo, Tsunoda Shin-ichi	4. 巻 295
2. 論文標題 Structural optimization of a TNFR1-selective antagonistic TNF mutant to create new-modality TNF-regulating biologics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9379 ~ 9391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012723	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 -

1. 著者名 Inoue Masaki, Yamashita Kanako, Tsuji Yuta, Miki Midori, Amano Shota, Okumura Taichi, Kuge Koki, Tone Takao, Enomoto Shota, Yoshimine Chinatsu, Morita Yuki, Ando Daisuke, Kamada Haruhiko, Mikami Norihisa, Tsutsumi Yasuo, Tsunoda Shin-ichi	4. 巻 206
2. 論文標題 Characterization of a TNFR2-Selective Agonistic TNF- Mutant and Its Derivatives as an Optimal Regulatory T Cell Expander	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1740 ~ 1751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000871	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井上雅己, 鎌田春彦, 新山真由美, 角田慎一
2. 発表標題 免疫疾患治療薬としての1型TNF受容体アンタゴニストタンパク質の創製と構造最適化
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上雅己, 角田慎一
2. 発表標題 新規モダリティ免疫難病治療薬を目指したサイトカイン機能改変体の開発
3. 学会等名 第1回ファーマラボEXPO アカデミックフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 優太, 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 2型TNF受容体を標的とするアゴニストタンパク質のTreg機能制御薬としての有用性
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本章太, 井上雅己, 鎌田春彦, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 新規関節リウマチ治療薬を目指したTNFR1選択的アンタゴニストFc融合タンパク質の創製と有効性の検証
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue M, Kamada H, Tsunoda S.
2. 発表標題 Development of artificial TNFR1-selective antagonistic cytokine-derivatives for the treatment of rheumatoid arthritis.
3. 学会等名 14th World Congress on Inflammation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野翔太, 井上雅己, 鎌田春彦, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 関節炎モデル/肝炎モデルにおけるTNFR1アンタゴニスト誘導体の薬理作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下加菜子, 井上雅己, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 担がんマウスの腫瘍増殖における2型TNF受容体シグナルの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上雅己, 角田慎一
2. 発表標題 免疫制御薬としてのTNFR1選択的アンタゴニストTNF変異体の構造最適化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉峯千夏, 井上雅己, 鎌田春彦, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 TNFR1選択的アンタゴニストFc融合タンパク質の創製と新規関節リウマチ治療薬としての有効性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本章太, 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 ファージ表面提示法を活用したTNF の構造改変によるTNFR2アゴニストタンパク質の創製と特性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田有貴, 井上雅己, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 2型TNF受容体シグナルの欠損による制御性T細胞を介した抗腫瘍免疫への影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 優太, 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 小野寺章, 河合裕一, 角田慎一
2. 発表標題 Tregを標的とした免疫制御薬としてのTNFR2アゴニストの有用性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田慎一
2. 発表標題 TNFR2シグナルの免疫制御・がん免疫療法の標的としての可能性
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue M, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S.
2. 発表標題 Trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- mutant enhances molecular stability and enables facile modification.
3. 学会等名 2018 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 分担 者	井上 雅己 (Inoue Masaki) (80757097)	神戸学院大学・薬学部・助教 (34509)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------