

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06540

研究課題名（和文）免疫難病治療の新規モダリティを目指したTNFR1シグナル選択的阻害薬の創製

研究課題名（英文）Structural optimization of a TNFR1-selective antagonistic TNF-alpha mutant to create new-modality TNF-regulating biologics

研究代表者

井上 雅己（Inoue, Masaki）

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：80757097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患治療にTNF阻害薬が奏功しているが、結核の再燃や脱髄症状の悪化などの懸念がある。我々は、これまで、感染防御能や制御性T細胞の活性化能の維持を期待して、免疫疾患の炎症病態を担うTNFR1シグナルだけを選択的に阻害するTNFR1選択的アンタゴニスト「T2」の開発を進めてきた。T2は関節リウマチや多発性硬化症の疾患モデルマウスで治療効果を示したが、血中滞留性が課題であった。本研究では、免疫疾患治療に資する新規モダリティとして、T2の抗炎症作用や体内安定性を向上させるため、3量体構造の一本鎖化及びIgG-Fc融合による構造最適化を図ったT2誘導體「scT2-Fc」の創製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

scT2-Fcは、(1)2価アンタゴニストによるTNFR1シグナル阻害活性の向上、(2)IgG-Fc融合の分子量増大による血中半減期の延長、(3)TNFR2シグナル温存による制御性T細胞の免疫抑制効果の維持、などの分子特性を有することで、TNF阻害薬よりも高い治療効果を発揮したと示唆された。生体内で長期間、炎症の抑制や免疫抑制活性の維持ができ、抗TNF抗体など他の免疫疾患治療薬に優位性を示すと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Excessive activation of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF α) is a major cause of autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis. TNF α induces immune responses via TNF receptor 1 (TNFR1) and TNFR2. Signaling via TNFR1 induces proinflammatory responses, whereas TNFR2 signaling is suggested to suppress the pathophysiology of inflammatory diseases. Here, we developed a TNFR1-selective, antagonistic TNF α mutant (T2) derivative, scT2-Fc, which represents a single-chain form of trimeric T2 with a human IgG-Fc domain. scT2-Fc had properties similar to those of T2, including TNFR1-selective binding avidity, TNFR1 antagonistic activity, and thermal stability, and had a significantly extended plasma t $_{1/2}$ in vivo. In a murine rheumatoid arthritis model, scT2-Fc delayed the onset of collagen-induced arthritis, suppressed arthritis progression in mice, and required a reduced frequency of administration.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：腫瘍壊死因子 TNF阻害薬 1型TNF受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍壊死因子 (TNF-) は、1 型 TNF 受容体 (TNFR1) 及び 2 型 TNF 受容体 (TNFR2) の 2 種類の受容体サブタイプを介して細胞内シグナルを伝達し、異なる生理作用を示す。過剰な TNFR1 の作用は炎症の惹起や悪化に、TNFR2 の作用はウイルス感染防御や多発性硬化症の病態抑制に関与する。また近年、免疫抑制機能に特化した T リンパ球である制御性 T 細胞 (Treg) において、高レベルに発現する TNFR2 が、免疫応答への抑制活性を亢進する役割をもつことがわかってきた。

バイオ医薬品は、治療が困難であった免疫疾患における薬物奏効率を劇的に向上させた。例えば、関節リウマチ患者では、炎症性サイトカインである TNF- の血中濃度が上昇し、関節に重篤な炎症や骨破壊が惹起されるが、TNF 阻害薬による TNF- の中和が抗炎症効果を示す。しかし、抗 TNF 抗体は、TNFR2 シグナルまで遮断することや、膜結合型 TNF を介してマクロファージを障害することで、ウイルスや細菌の感染・再燃リスクが懸念される。また、脱髄症状を悪化させる問題もある。そこで我々は、これまで、レセプターを創薬標的に、免疫疾患の発症・悪化の主な原因である TNFR1 シグナルを選択的に阻害する“TNFR1 選択的アンタゴニスト”として働く TNF 変異体タンパク質「T2」を創製し、関節リウマチや多発性硬化症の疾患モデルマウスでの治療効果を明らかにしてきた。T2 の特徴は、TNF- を中和する抗 TNF 抗体とは異なり、TNF- の TNFR1 への結合をブロックすることで、TNFR1 シグナルだけを選択的に阻害し、TNFR2 シグナルは温存できる点にある。しかし、T2 は、抗 TNF 抗体で懸念されている感染防御能の低下や TNFR2 シグナル阻害による Treg の活性低下を回避できる作用メカニズムを有するものの、サイトカイン由来の構造であるため、抗体に比べて生体内の安定性が乏しく、血中半減期の短さが課題であった。そこで本研究では、T2 の構造最適化を検討し、TNF 阻害薬よりも効果が優れる免疫疾患治療薬の創製を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、TNFR1 選択的アンタゴニスト「T2」の抗炎症作用や生体内安定性の向上を目指して、“3 量体構造の一本鎖化”及び“IgG-Fc 融合”による構造最適化を図った T2 誘導体「scT2-Fc」を創製することで、免疫疾患治療に資する新規モダリティ分子の開発、及び、そのための創薬基盤技術の確立を目的とした。

scT2-Fc は、一本鎖 TNFR1 アンタゴニスト-Fc 融合体という独自の分子構造をもつ新規モダリティである。3 量体構造を有する T2 は、T2 遺伝子と Fc 遺伝子を単純に連結しただけでは、2 価の T2 が Fc で融合した scT2-Fc として発現しない。その点、我々はこれまでに T2 のアンタゴニスト活性を維持したまま、分子構造を安定化させる創薬基盤技術として、一本鎖構造化を見出してきた (Inoue M, *J. Biol. Chem.*, 2017)。本技術により、一本鎖 T2 (scT2) は、3 量体構造がペプチドリンカーによって連結した一本のアミノ酸配列で構成されるため、C 末端への Fc 融合が容易になり、IgG 型構造である scT2-Fc の創製が可能になった。scT2-Fc は、生体内で長期間、TNFR1 シグナル阻害による炎症の抑制、並びに TNFR2 シグナル温存による Treg 活性の維持を達成できると考えられたことから、その有効性について検証した。

3. 研究の方法

(1) scT2-Fc タンパク質の作製

3 量体に相当する T2 遺伝子 3 つを GS ペプチドリンカー遺伝子で連結し、その 3' 末端にヒト IgG1 由来 Fc 遺伝子を融合した発現ベクターを構築した。Expi293F 細胞に scT2-Fc 遺伝子を導入し、培養上清にタンパク質を発現させた。上清を回収した後、Protein A アフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーで精製し、scT2-Fc を作製した。

(2) scT2-Fc の 1 型 / 2 型 TNF レセプターへの結合性

表面プラズモン共鳴法によるカイネティクス解析には、BIAcore X100 (GE ヘルスケア) を用いた。ヒト TNFR1 もしくは TNFR2 の Fc 融合タンパク質を CM5 センサーチップに固定化した。scT2-Fc は、HBS-EP ランニングバッファーを用いて、1.2, 3.6, 10.9, 32.7, 98.0 nM の 5 段階に希釈した。シングルサイクルカイネティクス解析により、5 段階濃度のタンパク質の結合と解離を連続して測定した。

(3) scT2-Fc の TNFR1 を介したアゴニスト・アンタゴニスト活性

マウス繊維芽細胞 (LM 細胞) は、D-MEM (10% FCS, 1% 抗生物質カクテルを含む) を用いて培養した。アゴニスト活性の測定には、96 ウェルプレートに 3×10^4 cells/well の細胞を播種し、段階希釈した野生型 TNF 及び scT2-Fc を添加した。アンタゴニスト活性の測定には、96 ウェルプレートに 1×10^4 cells/well の細胞を播種し、野生型マウス TNF (5 ng/ml) とともに、段階希

釈した scT2-Fc を添加した。37 °C で 48 時間培養した後、メチレンブルーアッセイにて細胞生存率を測定した。

(4) scT2-Fc の動態解析

BALB/c マウス (8 週齢メス) に、scT2-Fc を 50 µg 腹腔内投与した後、尾から経時的に採血 (投与後 6, 24, 48, 72, 96, 168, 192 時間) した。陽性コントロールとして、エタネルセプトを同様に投与した。採血は、尾先端 1-2 mm を切断後、ヘパリンコート処理したヘマトクリット管で尾静脈から行った。キャピラリー遠心機を用いて、12,000 rpm 15 分間遠心した後、血漿を回収し、ヒト IgG-Fc に対する ELISA 法で濃度を測定した。

(5) CIA マウスでの薬理効果

CIA マウスの作製と scT2-Fc の投与

DBA/1J マウス (6-7 週齢オス) にウシ Ⅱ型コラーゲンと完全フロイントアジュバントの混合液を免疫した (Day0)。3 週間後 (Day21) から生理食塩水、scT2-Fc (1 µg/mouse) 及び エタネルセプト (25 µg/mouse) を週 2 回で 3 週間腹腔内投与した。四肢の炎症の程度は、関節炎スコアの基準「0: 変化なし、1: 指関節 1, 2 本が腫脹発赤、2: 指関節 3 本以上または手首/足首関節が腫脹発赤、3: 一本の手や足全体の発赤、4: 一本の手や足全体の腫脹が最大限に到達」にしたがって計測した。

病理解析

scT2-Fc の投与期間終了後 (Day42) 安楽死させたマウスの四肢を切断し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定化した。EDTA で 2 週間脱灰した後、組織をパラフィン包埋した。切片スライドを作製し、HE 染色を行った。また、連続切片を用いて、TRAP 染色を行った。一つ以上の核をもつ TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞としてカウントした。

炎症性サイトカインの測定

Day42 にマウスの眼窩静脈叢からヘマトクリット管を用いて採血した後、遠心分離で血漿を回収した。抗マウス IL-1 β ELISA を用いて、血漿中の IL-1 β 濃度を測定した。

リンパ球の解析

Day42 にマウスの腋窩・鼠経部からリンパ節を摘出した後、細胞を調製した。抗マウス CD4 (PerCP) 抗体、抗マウス CD8 (FITC) 抗体を用いて、蛍光免疫染色を行なった後、固定化・透過処理を行い、抗マウス Foxp3 (APC) 抗体を用いて、細胞内染色を行なった。フローサイトメトリーを用いて、各リンパ球のポピュレーションを測定した。

4. 研究成果

(1) scT2-Fc タンパク質の作製

scT2-Fc は、哺乳類細胞を用いて発現させることができた。また、クロマトグラフィーを用いて、凝集することなく、目的分子量のタンパク質として精製できた。

(2) scT2-Fc の 1 型 / 2 型 TNF レセプターへの結合性

scT2-Fc は TNFR1 に結合する (KD: 4.2 nM) が、TNFR2 には結合しなかった。したがって、scT2-Fc は、Fc 融合体であっても、TNFR1 への選択性と親和性は保持されたことがわかった。

(3) scT2-Fc の TNFR1 を介したアゴニスト・アンタゴニスト活性

アゴニスト活性測定条件では、野生型 TNF が濃度依存的に LM 細胞の細胞死を誘導したが、scT2-Fc は高濃度においても細胞死をほとんど誘導しなかった。したがって、scT2-Fc は TNFR1 を介したシグナル伝達を示さないと考えられた。また、アンタゴニスト活性測定条件では、scT2-Fc は、TNF による LM 細胞の細胞死を濃度依存的に抑制した。Fc 融合体においても、アゴニスト活性・アンタゴニスト活性は保持されることがわかった。

(4) scT2-Fc の動態解析

単回投与後 24 時間以内に消失した scT2-Fc に対して、scT2-Fc は長期間、血中濃度が維持された。血中半減期は、抗 TNF 薬であるエタネルセプトが 131 時間、scT2-Fc が 193 時間であった。Fc 融合によって血中滞留性が向上したことがわかった。

(5) CIA マウスの作製と scT2-Fc の投与

scT2-Fc 投与群では、生理食塩水投与群に比べて、関節炎スコアの上昇が有意に抑制された。Day42 における炎症所見では、生理食塩水投与群では関節の腫脹が認められたのに対し、エタネルセプト投与群及び scT2-Fc 投与群では関節の腫脹が抑制された。したがって、scT2-Fc は、エタネルセプトと同じ週 2 回の投与で同等の効果を示した。また、HE 染色の結果から、scT2-Fc 投与群では、生理食塩水投与群に比べて、炎症性細胞の浸潤などが抑制された。TRAP 染色の結果

から、scT2-Fc 投与群では、破骨細胞分化も抑制された。scT2-Fc 投与群では、血中 IL-1 濃度も低下した。したがって、scT2-Fc の投与による炎症抑制効果が示され、scT2-Fc は、Fc 融合体として、薬理効果を保ったまま、投与間隔を延長することができた。さらに、リンパ球解析の結果、scT2-Fc 投与群では、CD4⁺Foxp3⁻ Tconv に比べて、CD4⁺Foxp3⁺ Treg の割合が高く、免疫抑制活性をもつ Treg が増加していると考えられた。scT2-Fc が低投与量でエタネルセプトと同等の効果を示す理由の一つとして、Treg 活性が関与する可能性が示唆された。

(6) まとめ

本研究では、構造最適化により、血中滞留性などの T2 の機能を向上させる目的で、T2 ホモ 3 量体構造をペプチドリンカーで直鎖状に連結した一本鎖化 T2 に、ヒト IgG1 由来 Fc 領域を融合させた scT2-Fc 融合タンパク質を創製した。さらに、生物活性や体内動態などの分子特性、関節リウマチモデルマウスに対する薬理作用について解析した。その結果、以下の知見を得た。

- ・ scT2-Fc は、高い TNFR1 アンタゴニスト活性を有した
- ・ scT2-Fc は、TNF 阻害薬と同様の血中半減期を有した
- ・ scT2-Fc は、関節リウマチマウスの炎症を抑制し、TNFR2 シグナルの温存による Treg 増加が示唆された

一本鎖化と Fc 融合に基づく構造最適化は、TNFR1 アンタゴニストの有効性向上に有用であると考えられ、新規関節リウマチ治療薬のシーズとして期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue Masaki, Tsuji Yuta, Ueno Reira, Miyamoto Daisuke, Tanaka Keisuke, Moriyasu Yuka, Shibata Saya, Okuda Mei, Ando Daisuke, Abe Yasuhiro, Kamada Haruhiko, Tsunoda Shin-ichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Bivalent structure of a TNFR2-selective and agonistic TNF- munein Fc-fusion protein enhances the expansion activity of regulatory T cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-40925-9	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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 井上 雅己、角田 慎一	4. 巻 93
2. 論文標題 免疫疾患治療薬を目指した1型TNF受容体選択的アンタゴニストの創製と構造最適化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 391 ~ 395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930391	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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 帆花、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 In vitroで増幅したTNFR2+CD4+CD25+ Tregの免疫抑制活性
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 横山 あさひ、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR2標的イムノサイトカインのヒト制御性T細胞の増殖促進作用
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大仲 沙和、辻 優太、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR2アゴニスト修飾マイクロビーズによるTreg増幅作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩田 茜音、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 2型TNF受容体シグナル伝達における受容体クラスター形成の意義
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 屋田 萌生、井上 雅己、柴田 紗弥、角田 慎一
2. 発表標題 関節炎モデルマウスにおけるTNFR2アゴニストTNF変異体の炎症抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田 紗弥、井上 雅己、屋田 萌生、角田 慎一
2. 発表標題 2型TNF受容体シグナルを介したTreg制御による食物アレルギー抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柏田 彩夏、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 受容体クラスタリングによりTNFR2シグナルを効率よく誘導可能なイムノサイトカインの創製
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 雅己
2. 発表標題 制御性T細胞の増幅を目指した2型TNF受容体アゴニストタンパク質の創製
3. 学会等名 BioJapan 2022（横浜）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 雅己
2. 発表標題 生体の免疫抑制機能を高める制御性T細胞増幅薬「TNFR2アゴニスト」の創製
3. 学会等名 NIRO令和4年度産学官交流ミーティング（神戸）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森安 裕香、井上 雅己、鎌田 春彦、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR1アンタゴニストFc融合分子の関節リウマチ治療薬としての有用性
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本 大輔、井上 雅己、上野 怜良、角田 慎一
2. 発表標題 2型TNF受容体を標的としたTreg制御による関節炎抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 奎輔、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR2新規アダプター分子アミノペプチダーゼP3の免疫機能における役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 怜良、井上 雅己、田中 奎輔、鎌田 春彦、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR2アゴニストFc融合体の創製と接触皮膚炎モデルにおける治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小橋 幸奈、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR2シグナルを効率よく誘導可能なイムノサイトカインの創製 () 分子設計とタンパク質発現
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 実優、井上 雅己、角田 慎一
2. 発表標題 TNFR2シグナルを効率よく誘導可能なイムノサイトカインの創製 () 高機能化と分子特性解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鍋島 由希子、井上 雅己、阿部 康弘、伊勢 知子、永田 諭志、角田 慎一
2. 発表標題 免疫難病治療薬の開発に向けた新規ヒトBAFFRモノクローナル抗体の特性解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 幸穂、井上 雅己、阿部 康弘、伊勢 知子、永田 諭志、角田 慎一
2. 発表標題 B細胞リンパ腫治療薬を目指した抗BAFF受容体モノクローナル抗体の創製と細胞傷害活性
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 雅己
2. 発表標題 TNF受容体サブタイプ選択的な新規バイオリクス「TNF- α 機能改変体」の創製
3. 学会等名 第3回 神戸医療産業都市 産学官医連携オープンイノベーション推進プログラム シーズ発表会（招待講演）
4. 発表年 2021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	角田 慎一 (Tsunoda Shinichi) (90357533)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

	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	辻 優太 (Yuta Tsuji)	神戸学院大学・薬学部 (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
---------	---------