

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461503

研究課題名(和文) 抗TIM-4抗体の抗炎症作用メカニズムの解明と臨床研究に向けた基盤構築

研究課題名(英文) Analysis of therapeutic effect of anti-TIM-4 mAb on inflammatory disease.

## 研究代表者

秋葉 久弥 (Akiba, Hisaya)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60338316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト関節リウマチのモデルであるタイプIIコラーゲン誘発性関節炎マウスにおいて、抗TIM-4抗体を関節炎発症後や数十日経過した重篤の状態から投与した場合でも、有意な治癒効果が認められた。その作用機序として、T・B細胞非依存性の抗コラーゲンカクテル抗体誘発性関節炎マウスに抗TIM-4抗体を投与した際にも、治癒効果とともに関節内の炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ の産生低下が認められたことなどから、抗TIM-4抗体はTIM-4とマクロファージや破骨細胞などの炎症性細胞に発現するLMIR5との相互作用を阻害して抗炎症作用をもたらしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, mice were treated with anti-TIM-4 mAb during the effector phase of collagen-induced arthritis (CIA). Treatment with anti-TIM-4 mAb just before or after the onset or even at later stage of CIA significantly suppressed the development and progression by reducing pro-inflammatory cytokines in the ankle joints without affecting T or B cell responses. Consistently, clinical arthritis scores of collagen antibody-induced arthritis (CAIA) were significantly reduced in anti-TIM-4-treated mice with a concomitant decrease of pro-inflammatory cytokines in the joints. In vitro, macrophages secreted pro-inflammatory cytokines in response to TIM-4-Ig protein and LPS, which were reduced by the anti-TIM-4 mAb. The anti-TIM-4 mAb also inhibited the differentiation and bone resorbing activity of osteoclasts. The therapeutic effect of anti-TIM-4 mAb is mediated by the inhibition of pro-inflammatory cytokine production by inflammatory cells, osteoclast differentiation, and bone resorption.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 抗炎症作用 アレルギー疾患 細胞表面分子機能

1. 研究開始当初の背景

2001年、Kuchroo VK, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RHらハーバード大学のグループが、遺伝的にヘルパーT細胞2 (T helper 2; Th2) 優位なBALB/cマウスとTh2反応が弱いDBA/2マウスのコンジェニックマウスを用いて、マウスの気道過敏性に関連する遺伝子座、*T cell and airway phenotype regulator (Tapr)* を同定した。*Tapr* はマウス染色体11、ヒト染色体5q23-35に位置するが、Th2に関連するIL-4やIL-5といったサイトカイン遺伝子は含まれず、新たに*Tim1*, *Tim2*, *Tim3*の3つの*Tim*遺伝子が見出された。なかでも*Tim1*と*Tim3*はBALB/cマウスとDBA/2マウス間で遺伝子多型が見られ、マウスの気道過敏性に関連すると考えられた。TIM分子はI型の膜糖タンパク質で、T細胞に発現すると推測されたこと、細胞外領域にイムノグロブリン可変領域とムチン領域を持つこと (I cell Immunoglobulin Mucin domain) からこの名が付けられた。これまでにマウスではTIM-1, TIM-2, TIM-3, TIM-4が、ヒトではTIM-1, TIM-3, TIM-4がタンパク質として存在することが確認されている。マウスTIM-1, TIM-2, TIM-3およびヒトTIM-1, TIM-3は細胞内領域にチロシンキナーゼリン酸化モチーフを有しており、当初から細胞内にシグナル伝達を行うレセプター(受容体)として機能すると推測された。一方、TIM-4はこのモチーフを持たず、レセプターとしてではなくリガンドとして働くことが予想された。そして2005年、TIM-4はTIM-1に結合するTIM-1リガンドであることが上記グループにより示された。TIM-4の発現は、一部のマクロファージや樹状細胞、腹腔内B-1細胞などに限られている。2007年、マクロファージに発現するTIM-4が、アポトーシス細胞(死細胞)の細胞膜外に露出するフォスファチジルセリン(PtdSer)に結合して貪食に関わることが報告された。TIM-1も同様にPtdSerに結合することから、TIM-4とTIM-1の結合は直接ではなく、エクソソームと呼ばれる細胞外小型膜小胞を介して結合している可能性がある。我々も2010年、東京大学医科学研究所の山西、北浦らとともに、TIM-4が免疫グロブリン様受容体(Leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor 5; LMIR5)に結合することを報告した。しかし、その機能は未知であり、TIM-4本来の免疫反応における役割も不明である。

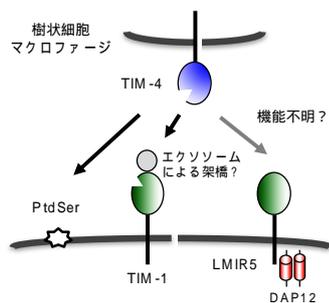


図1 TIM-4結合分子

関節リウマチの患者数は膠原病患者の中でも圧倒的に多く、我が国における関節リウマチ患者数は、一般的に約70~80万人ともいわれている。関節リウマチは関節・滑膜組織の炎症と増殖によって、骨・軟骨が破壊される慢性炎症性疾患である。関節リウマチの進行には、T細胞、B細胞、マクロファージなどの様々な免疫細胞が関与している。なかでも滑膜マクロファージは、腫瘍壊死因子-(TNF-)やインターロイキン-6(IL-6), IL-1といった炎症性サイトカインを産生してマクロファージ自身のみならず、滑膜を作る滑膜線維芽細胞を活性化して増殖させる。その結果、関節内にパンヌスが形成され、破骨細胞を活性化して軟骨や骨の破壊がおこる。

これまで自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療には主に免疫抑制剤が用いられてきたが、これらの薬剤は好ましいと好ましくないにかかわらず全ての免疫反応を抑制してしまう。しかし今日、関節リウマチ治療薬インフリキシマブ(抗TNF-抗体)や気管支喘息治療薬オマリズマブ(抗IgE抗体)のように、病態形成に関与する特定のサイトカインや細胞表面分子を標的にした抗体療法が飛躍的な治療効果をもたらしている。免疫研究における大きな目標は、病原体や発癌などに対する通常の免疫反応を維持、あるいは高め、自己組織やアレルゲンなど自身に不利に働く免疫反応を人為的に制御可能にすることにある。抗体療法は大きな可能性を秘めており、その発展は標的分子の的確な選択に委ねられている。

2. 研究の目的

TIM-4がヒト関節炎治療の新たなターゲットになるか、その可能性を探ることを目的として、抗TIM-4抗体による抗炎症作用のメカニズムを解明する。また関節炎マウスの血中に可溶性TIM-4が存在することを発見したことから、抗ヒトTIM-4抗体を作製して、患者検体から可溶性TIM-4の検出を試み、疾患との相関を検討して臨床研究の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 抗TIM-4抗体の抗炎症作用のメカニズムの解明

コラーゲン誘発性関節炎マウスの作製  
DBA/1マウスにタイプII型コラーゲン200µgと完全フロイントアジュバントのエマルジョン(CII/FCA)を免疫し、14日後にさらにCII200µgと不完全フロイントアジュバントのエマルジョン(CII/IFA)を免疫して、コラーゲン誘発性関節炎マウスを作製した。TIM-4に対する抗体とコントロール抗体を(300µg/1回)、関節炎を誘導する誘導期と症状が出る発症期等に分けて腹腔内投与した。発症日を観察するとともに、関節炎の症状(クリニカルスコア)を四肢それぞれに

0~4点の5段階でスコア化して測定を行った。後肢の関節から組織標本を作製し、炎症性細胞浸潤、滑膜細胞の増殖、パンス形成、軟骨の菲薄化を観察した。さらに関節組織をホモジナイザーにより粉碎した培養液から、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 のサイトカインと血清中の抗 CII 抗体価を ELISA 法にて測定した。また腰椎リンパ節からリンパ球を調製し、異なる濃度の CII により再刺激を行い、細胞増殖能は放射性同位元素<sup>3</sup>H-Thymidine の取り込み実験により、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-17 濃度は ELISA 法により測定した。

#### 抗コラーゲン抗体誘導関節炎マウスの作製

DBA/1 マウスに抗 CII カクテル抗体 (5 クローンカクテル) 2 mg を、3 日目にリポポリサッカライド 25  $\mu$ g を投与して抗コラーゲン抗体誘導関節炎マウスを作製し、抗 TIM-4 抗体群とコントロール抗体群 (300  $\mu$ g/1 回) に分けて週 2-3 回腹腔内投与を行った。関節炎症状等の測定は、コラーゲン誘発性関節炎マウスと同様に行った。

#### 卵白アルブミンタンパク質誘発性喘息モデルマウス

BALB/c マウスに卵白アルブミンタンパク質 100  $\mu$ g を 2 mg アラムアジュバンドとともに 0 日目および 14 日目に皮下注射によって免疫を行い、22 日目から卵白アルブミンタンパク質を隔日で 4 回ネブライザー吸入を行って卵白アルブミンタンパク質誘発性喘息モデルマウスを作製した。抗 TIM-4 抗体群とコントロール抗体群 (300  $\mu$ g/1 回) に分けて週 2-3 回腹腔内投与を行った。気道過敏性試験、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数およびサイトカイン量の測定、血清抗卵白アルブミン抗体価、リンパ節細胞再刺激実験による CD4 T 細胞の増殖能および Th2 サイトカイン産生量、肺組織標本における気管支への炎症細胞浸潤および粘液産生細胞の発生数を測り評価項目とした。

#### (2) 未知の TIM-4 レセプターの同定

TIM-4-イムノグロブリン (Ig) キメラタンパク質が既知のレセプターが発現していないマウス胸腺リンパ腫由来の L5178Y 細胞に結合する。細胞表面タンパク質をビオチンによる標識の後、TIM-4-Ig を用いた免疫沈降を行い、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、ウエスタンブロッティング後にタンパク質消化を行い、ペプチド分析から TIM-4 に結合する分子の同定を行った。

#### (3) 抗ヒト TIM-4 抗体の作製

ヒト培養細胞の mRNA からヒト TIM-4 cDNA を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によりクローニングした。ヒト TIM-4 cDNA を pMKITneo 組換え発現ベクターに挿入して TIM-4-Ig キメラタンパク質をチャイニース

ハムスター卵巣細胞に発現させた。培養上清からプロテイン G カラムを用いて TIM-4-Ig を精製した後、完全フロイントアジュバント (CFA) とエマルジョンを作り、BALB/c マウスに数回免疫した。マウスからリンパ節 B 細胞を回収して、マウスミエロマがん細胞と細胞融合を行った後、ヒト TIM-4 に結合するモノクローナル抗体を産生する融合細胞 (ハイブリドーマ) を、ヒト TIM-4 発現細胞を用いた FACS 解析により選別した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗 TIM-4 抗体の抗炎症作用のメカニズムの解明

抗 TIM-4 抗体による発症抑制効果  
DBA/1 マウスにコラーゲン誘発性関節炎を発症させ、抗 TIM-4 抗体投与群とコントロール抗体投与群の 2 群に分け、発症期の 14 日から 37 日まで抗体投与を行った。抗 TIM-4 抗体投与群は、コントロール抗体投与群と比較して、関節炎症状と発症率ともに低値を示した。後肢関節の組織学的解析においても、抗 TIM-4 抗体投与群では、炎症性細胞浸潤、滑膜細胞の増殖、パンス形成、軟骨の菲薄化が抑制されており、関節内の炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1) 量も低値を示した。以上のように、抗 TIM-4 抗体を CIA 発症前後に投与した結果、関節炎の発症抑制効果が認められた。

一方、血清中の抗 CII 特異的な IgG1, IgG2a, IgG2b 量は、抗 TIM-4 抗体投与群とコントロール抗体投与群で差は認められなかった。また、腰椎リンパ節細胞を用いたリンパ球再刺激実験においても、細胞増殖能や培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生量に両者で差は認められなかった。従って、抗 TIM-4 抗体投与による発症抑制効果は、B 細胞及び T 細胞の働きに関係なくもたらされたものと推測された。

##### 関節炎発症後における抗 TIM-4 抗体の効果

次にコラーゲン誘発性関節炎を発症した直後のマウスに抗 TIM-4 抗体を投与して効果の検討を行った。クリニカルスコアが 1 点になった時点でマウスを抗 TIM-4 抗体群とコントロール抗体群に無作為に分けて投与を行った。結果、抗 TIM-4 抗体投与群はコントロール抗体投与群と比較して、有意に関節炎の進行が抑制された。関節内の IL-6 量も抗 TIM-4 抗体投与群において有意に低値を示した。さらにより進行が進んだ重篤な状態の関節炎に対する治療効果の検討も行った。コラーゲン誘発性関節炎を誘導して発症率が 100% に達した 34 日目に、関節点数が同等となるように抗 TIM-4 抗体群とコントロール抗体群にマウスを振り分け、34 日から 62 日まで投与を行った (図 2)。驚くことに、抗 TIM-4 抗体は既に進行過程にある関節炎マウスに対しても、有意に症状の抑制効果をもたらした。これらの結果は、抗 TIM-4 抗体が進行過

程にある関節炎に対しても十分に治療効果を発揮する可能性を示している。これまで種々の免疫疾患モデルマウスに数々の細胞表面分子に対する抗体投与実験を行ってきたが、抗原免疫時や発症期に抗体投与を行い、抑制効果を認めるケースは多々あっても、明らかな病態形成後に抗体投与を行い、治療効果が認められたケースは極めて希である。

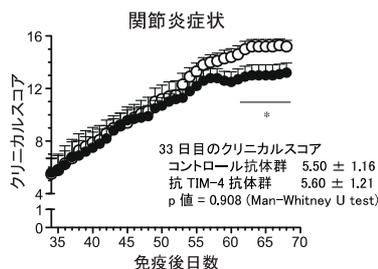


図2 関節炎進行後の抗TIM-4抗体投与効果

### 抗コラーゲン抗体誘導関節炎マウスにおける抗TIM-4抗体の効果

T細胞及びB細胞非依存的に関節炎を惹起できる関節炎モデルである、抗コラーゲン抗体誘導関節炎マウスを作製し、これに抗TIM-4抗体を投与して評価を行った。結果、抗TIM-4抗体投与群は有意に関節炎の進行を抑制した。また有意差は得られなかったものの、発症率についても抑制する傾向が認められた。関節内の炎症性サイトカイン量も有意に抑制されていた。これらの結果より、抗TIM-4抗体は関節内のマクロファージや骨を破壊あるいは吸収する破骨細胞などの自然免疫細胞の働きを抑えて、関節炎の治療効果を発揮するものと考えた。

### 抗TIM-4抗炎症作用機序

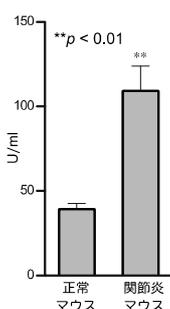


図3 コラーゲン誘発性関節炎マウスにおける血清可溶性TIM-4の上昇

マクロファージや破骨細胞にはLMIR5が発現しており、TIM-4がLMIR5を介してこれらの細胞の働きを強化していると考えられる。事実、TIM-4タンパク質をマクロファージとともに培養すると、炎症性サイトカイン(IL-6, TNF-)の産生増加が認められ、この効果は抗TIM-4抗体添加によって阻害された。またマウスの骨髄細胞から破骨細胞を誘導するタンパク質であるRANKLとM-CSFとともに骨髄細胞を抗TIM-4抗体で培養すると、破骨細胞の形成がおよそ半分に抑制された。また細胞表面から遊離し可溶型となったTIM-4を検出するサンドイッチELISA法を開発し、関節炎マウスの血清中の可溶性TIM-4を測定したところ(図3)、正常マウスと比較して多量に検出されたことから、この可溶

型TIM-4がマクロファージや破骨細胞に作用しているものと考えられる。可溶型TIM-4の遊離は、メタロプロテアーゼ(MMP)・インヒビターであるBatimastatによって阻害されたことから、MMP-1,-2,-3,-7,-9のいずれかによる切断により遊離したものと考えられる。さらに切断部位のアミノ酸配列を同定する必要がある。

現在、RA治療にはTNF- やIL-6など個々の炎症性サイトカインの機能抑制を期待する生物学的製剤の使用が主流となっている。今後、新たにTIM-4を標的にすることで、広範囲な炎症性サイトカインの産生抑制や破骨細胞などの炎症誘導細胞の機能を抑制するなど大きな効果が期待できる。さらに可溶型TIM-4は炎症疾患の補助診断あるいは治療効果や予後予測に際して有用なバイオマーカーになる可能性がある。

### (2) 抗TIM-4抗体による免疫活性増進作用について

#### コラーゲン誘発性関節炎マウス

DBA/1マウスにコラーゲン誘発性関節炎を発症させ、抗TIM-4抗体とコントロール抗体を誘導期の0日から11日まで投与を行った。結果、抗TIM-4抗体投与群ではコントロール抗体投与群と比較して、関節炎症状が悪化し、発症率も高値を示した。後肢関節の組織学的解析においても、抗TIM-4抗体投与群では、炎症性細胞が多く浸潤、滑膜細胞が増殖しており、顕著なパンヌス形成が認められた。この効果は、発症期投与の結果と逆となる。関節内の炎症性サイトカイン(IL-6, TNF-, IL-1)量に変化はなかったことから炎症性細胞に作用したのではない。一方、腰椎リンパ節細胞を用いたリンパ球再刺激実験では、培養上清中のIFN-、IL-17産生量が有意に増加していた。このことから、抗TIM-4抗体は免疫初期にはCD4 T細胞の活性化を促進する効果がある。

#### 卵白アルブミンタンパク質誘発性喘息マウス

Th2細胞の働きが発症と密接に関わる、卵白アルブミンタンパク質誘発性喘息マウスを作製して、抗TIM-4抗体とコントロール抗体を同様に誘導期の0日から11日まで投与を行った。結果、気道過敏性亢進の更新、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数の増加、卵白アルブミン再刺激によるT細胞増殖およびTh2サイトカインのIL-4, IL-5, IL-13の産生促進が有意に認められた。このことから喘息モデルマウスにおいても同様に、抗TIM-4抗体は免疫初期にはCD4 T細胞の活性化を促進する効果がある。

従って、TIM-4分子自体はコラーゲン誘発性関節炎や卵白アルブミンタンパク質誘発性喘息の誘導段階である免疫初期には、免疫反応を抑制する働きがあり、逆に症状が出る発症期や発症後期では免疫反応を促進すると

いう2つの異なる働きがあることが明らかとなった。

### (3) 未知のTIM-4 レセプターの同定

L5178Y 細胞に対してTIM-4-Igにより免疫沈降を行い、結合するタンパク質の解析を行った結果、Heat shock protein、ATP synthase subunit など細胞内タンパク質が多く検出された。これらはエクソソームと呼ばれる細胞外小胞に含まれる内容物である。エクソソームは、図1に示したようにTIM-4とTIM-1の結合を架橋している可能性があり、今回検出されたこれらのタンパク質はTIM-4-Igがエクソソームに結合して得られた可能性が高い。エクソソームを介さず直接結合するタンパク質があるか否かが判定するために、エクソソームを除去する方法を考える必要がある。

### (4) 抗ヒトTIM-4抗体の作製

BALB/c マウスにTIM-4-Ig/CFAを免疫する方法では免疫力が弱く、結局、抗ヒトTIM-4モノクローナル抗体を得ることができなかった。そこでマウスの系統をC57BL/6マウスに、免疫原を組換えTIM-4タンパク質に変えてCFAとともに3回免疫を行った後、リンパ節B細胞をミエロマがん細胞と細胞融合を行った。結果、4つの異なる抗ヒトTIM-4モノクローナル抗体を得た。現在、これらの抗体がTIM-4タンパク質のどの部位を認識するのか検討中である。少なくとも異なる部位を認識する抗体が2種類あれば可溶性TIM-4検出の為にサンドイッチELISA法を開発することが可能となる。

## 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)

### [雑誌論文](計14件)

Tripathi, S., L. Chabtni, P. J. Dakle, B. Smith, H. Akiba, H. Yagita, and I. Guleria. 2015. Effect of TIM-3 Blockade on the Immunophenotype and Cytokine Profile of Murine Uterine NK Cells. *PLoS One* 10: e0123439. 査読有

10.1371/journal.pone.0123439

Nozaki, Y., A. R. Kitching, H. Akiba, H. Yagita, K. Kinoshita, M. Funauchi, and I. Matsumura. 2014. Endogenous Tim-1 promotes severe systemic autoimmunity and renal disease MRL-Fas(lpr) mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F1210-1221. 査読有

10.1152/ajprenal.00570.2013

Yeung, M. Y., M. M. McGrath, M. Nakayama, T. Shimizu, O. Boenisch, C. N. Magee, R. Abdoli, H. Akiba, T. Ueno, L. A. Turka, and N. Najafian. 2013. Interruption of Dendritic Cell-Mediated TIM-4 Signaling Induces Regulatory T Cells

and Promotes Skin Allograft Survival. *J Immunol* 191: 4447-4455. 査読有

10.4049/jimmunol.1300992

Baghdadi, M., A. Yoneda, T. Yamashina, H. Nagao, Y. Komohara, S. Nagai, H. Akiba, M. Foretz, H. Yoshiyama, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, M. Takeya, B. Viollet, H. Yagita, and M. Jinushi. 2013. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. *Immunity* 39: 1070-1081. 査読有

10.1016/j.immuni.2013.09.014

Abe, Y., F. Kamachi, T. Kawamoto, F. Makino, J. Ito, Y. Kojima, D. Moustapha Ael, Y. Usui, H. Yagita, Y. Takasaki, K. Okumura, and H. Akiba. 2013. TIM-4 has dual function in the induction and effector phases of murine arthritis. *J Immunol* 191: 4562-4572. 査読有

10.4049/jimmunol.1203035

### [学会発表](計5件)

F. Kamachi, N. Harada, J. Ito, K. Takahashi, K. Okumura, S. Miyake, H. Akiba. Anti-TIM-4 mAb ameliorates allergic lung inflammation. The Multifaceted Roles of Type 2 Immunity 2014年12月10日-2日 Bruges, Belgium

F. Kamachi, N. Harada, J. Ito, K. Takahashi, K. Okumura, S. Miyake, H. Akiba. Anti-TIM-4 mAb ameliorates allergic lung inflammation by inhibiting TIM-4-mediated mast cell stimulation. 15th International Congress of Immunology, 2013年08月22日-27日 Milan, Italy

### [その他]

ホームページ情報

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laborary/laborary/meneki/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋葉 久弥 (AKIBA, Hisaya)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 60338316

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし