

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09587

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント蛋白PD-1ホモログを標的とした新規抗体治療開発

研究課題名(英文) The development of new antibody treatment against immune checkpoint protein PD-1 homolog

研究代表者

原田 紀宏 (Harada, Norihiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10465065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫は、過度の免疫反応を抑制するシステムを有し、主に抑制性の補助シグナル分子によって機能している。この抑制性補助シグナル分子は免疫チェックポイント分子と呼ばれる。本研究においては、免疫チェックポイント分子PD-1Hに対する抗体作製を行った。作製した抗PD-1H抗体により、CD4陽性T細胞増殖が亢進する可能性、OVA誘導性喘息モデルマウスにおける気管支肺胞洗浄中の好酸球数が増加する可能性が示唆された。また、免疫チェックポイント分子TIM-3に対する抗体が肺胞マクロファージによるアポトーシス細胞除去を阻害することでブレオマイシン誘発間質性肺炎モデルマウスを増悪させる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント分子に対する新規抗体の炎症性疾患に対する効果を解析した。がん診療に用いられている免疫チェックポイント阻害療法は、重篤な合併症として間質性肺炎を発症することが知られている。新しい免疫チェックポイント阻害薬として期待される抗TIM-3抗体も同様に、あるいは、それ以上に間質性肺炎の合併症に注意する必要がある。また、同様に抗PD-1H抗体も炎症性疾患を悪化させる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The immune system includes immune checkpoints or inhibitory pathways against excessive immune responses, as well as co-stimulatory molecules, which act to enhance immune responses. New immune checkpoints that are being evaluated in the world includes PD-1homolog (PD-1H) and T cell Ig and mucin domain (TIM)-3. In the present study, we investigated the effects of anti-PD-1H mAb and anti-TIM-3 mAb in a murine model of OVA-induced allergic airway inflammation and in a murine model of bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis, respectively. Anti-PD-1H mAb treatment may enhance allergic airway inflammation. Moreover, anti-TIM-3 mAb treatment inhibited the phagocytic ability of alveolar macrophages, resulting in the defective clearance of apoptotic cells in lungs and enhanced bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis, suggesting that anti-TIM-3 mAb treatment may enhance cause pneumonitis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：免疫チェックポイント 抗体 PD-1H TIM-3

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

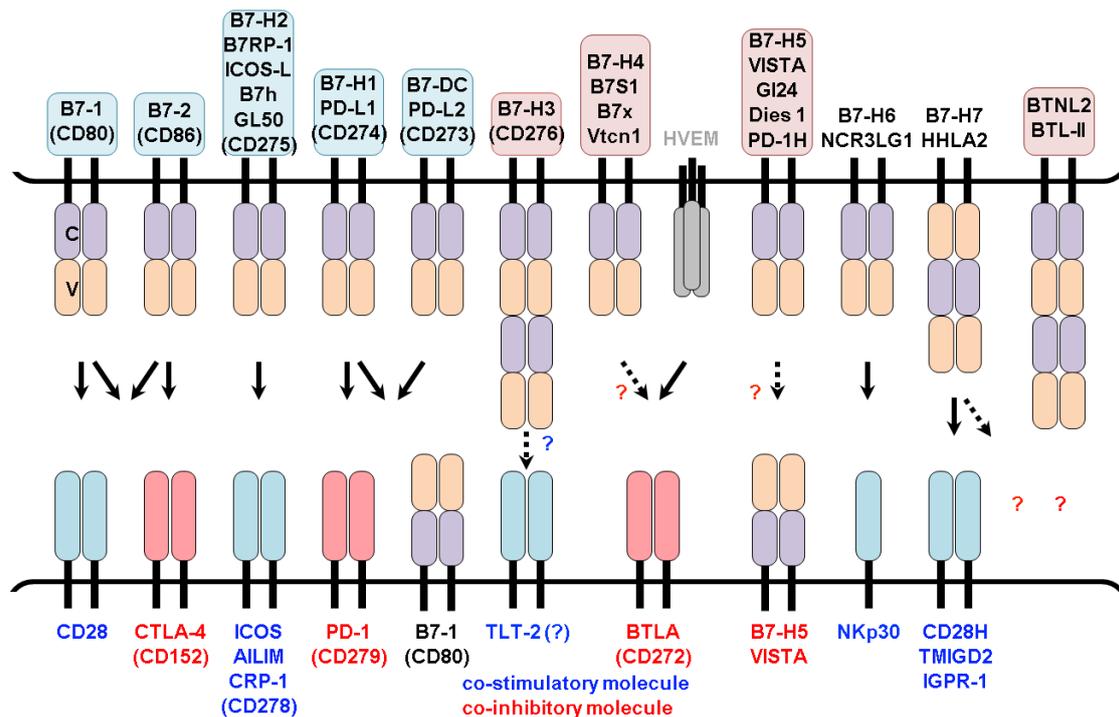
1. 研究開始当初の背景

(1) がん診療は格段に向上し、治癒率、生存率が向上しているにも関わらず、がんの罹患率、がんによる死亡率は増加の一途をたどっている。さらに、国立がん研究センターによる統計においては、日本人の二人に一人が一生のうち一度はがんになる可能性が指摘されている。がんの中でも特に肺がんは日本のみならず世界においてもがんによる死亡原因の第1位を占めており、常に新たな治療法の開発が求められている。

(2) そのなかで近年、新たながん免疫療法である新規に開発された免疫チェックポイント阻害療法が脚光を浴びている。これまでのがん免疫療法は、免疫を賦活することでがん細胞の排除を試みてきたが、効果を得ることが困難であった。しかし、免疫チェックポイント分子を阻害する抗体療法は、がん細胞が繰り出す免疫逃避機構を阻害することで抗がん免疫応答を増強させることに成功したのである。

(3) T細胞に発現する多様な補助シグナル分子によってT細胞受容体を介したシグナルは正または負に制御されている。免疫は、過度の免疫反応を抑制するシステムを有し、抑制性の補助シグナル分子によって機能している。抑制性補助シグナル分子は、免疫チェックポイント分子と呼ばれ、これに属する cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) や programmed cell death-1 (PD-1) は、T細胞を負に制御し、免疫寛容に関わる。

(4) 現在、CTLA-4、PD-1とそのリガンドPD-L1の抗体製剤をがん診療に使用することができる。CTLA-4、PD-1、PD-L1に対する抗体は、悪性黒色腫や肺がんなどに有益性が示され、がん治療に大きな変革をもたらした。CTLA-4とPD-1は、活性化T細胞に発現し、前者はCD28と共有のリガンドであるB7-1/B7-2との結合を競合することにより、後者はB7のホモログであるPD-L1 (B7-H1)とB7-DC (PD-L2)との結合により、免疫応答を負に制御する。肺がん診療においては、抗PD-1抗体がIV期非小細胞肺がんの予後を著しく改善させたが、その奏効率は、20%前後とその効果は限定的である。その低い奏効率からは、がん細胞が繰り出す免疫逃避機構には他分子も関与する可能性が想定される。このため、他の免疫チェックポイント分子が創薬の標的として世界中で探索されている。



図：B7スーパーファミリー

(5) PD-1ホモログ (PD-1H、別名 V-domain Ig suppressor of T cell activation: VISTA、B7-H5)は、2011年にクローニングされたCD28/B7ファミリーに属する新規分子であり、PD-1同様にT細胞に抑制的に作用することが報告された。そのカウンターパートは未だ不明であり、PD-1Hは抗原提示細胞にもT細胞にも発現するとされるが、未だその機能の全様は不明である。

(6) PD-1H同様にCD28/B7ファミリーホモログであるB7-H3、B7-H4、butyrophilin-like 2 (BTNL2)もまた免疫チェックポイント分子としてがん免疫の抑制などへの関与が示されているが、その機能、及び受容体に関しては明らかではない。B7-H3は、クローニング当初は活性化補助シグナル分子として発表されたが、抑制性の免疫チェックポイント分子として多くの報告があり、がん免疫への関与も期待されている。B7-H4は、細胞外ドメインが1つのIg-like V domainと1つのIg-like C domainで構成され、活性化された抗原提示細胞に発現されるが受容体は同定されていない。BTNL2は、マウスの炎症性腸疾患で腸管上皮細胞と抗原提示細胞

胞から同定され、細胞外ドメインが2つの Ig-like V domain と2つの Ig-like C domain で構成される。B7-H4、BTNL2 ともに活性化 T 細胞に対して抑制性に働くと考えられている。

2. 研究の目的

本研究においては、抗 PD-1H 抗体による新規抗体治療開発を目的とした。抗 PD-1H 抗体の作用機序を明らかにするためにアレルギー性気道炎症における抗体の効果を喘息モデルマウスを用いて解析する。また、PD-1 ホモログ同様に T 細胞に対して抑制的に作用する可能性がある B7-H3、B7-H4、BTNL2 に関しても同様に新たな標的として設定し、抗体作製を行う。さらには、免疫チェックポイント分子として作用する T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3) に関しては、炎症に対する作用が十分に解析されておらず、TIM-3 の肺の炎症における役割を解析することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗体の作製と抗 PD-1H 抗体の作用機序の解明

① PD-1H、B7-H3、B7-H4、BTNL2 に対する抗体作製

チオグリコレートにて誘導したマウス腹腔滲出性マクロファージの mRNA からマウス PD-1H、B7-H3、B7-H4、BTNL2 の cDNA を RT-PCR によりクローニングした。組換え発現ベクターに導入し、これら CD28/B7 ファミリーホモログのマウス免疫グロブリンキメラ蛋白をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に発現させ、培養上清からプロテインGカラムを用いて可溶性マウス免疫グロブリンキメラ蛋白を精製した。これらのうち、可溶性マウス PD-1H-免疫グロブリンキメラ蛋白を抗原として、Sprague Dawley ラットの足底に皮下注射で免疫を行い、リンパ節 B 細胞を回収し、マウスミエローマ細胞との細胞融合を行い、融合細胞 (ハイブリドーマ) を作製した。CHO 細胞にマウス PD-1H を遺伝子導入し、ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

② 卵白アルブミンタンパク (OVA) 誘導性喘息モデルマウスの作製

100 μ g の OVA 溶液と 2mg の水酸化アルミニウムゲルの懸濁液を BALB/c マウスに 0 日目と 14 日目に腹腔内投与し、21 日目から隔日で 4 回 1% OVA 溶液を吸入させる。最終抗原吸入 24 時間後に以下の解析を行った。抗 PD-1H 抗体とコントロール抗体は、感作前の誘導期から感作後の発症期まで腹腔内投与を行った。

- ・気管支肺胞洗浄液中の細胞数の計測並びに Diff Quik 染色後に目視にて細胞分画を計測。
- ・気管支肺胞洗浄液中のサイトカインを ELISA で測定。
- ・縦郭リンパ節を回収し、リンパ節細胞差刺激実験による CD4 陽性 T 細胞の増殖能およびサイトカイン産生量の測定。

(2) 抗 TIM-3 抗体の肺の炎症における役割解析

① ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスの作製

C57BL/6 マウスに 0.8 mg/kg のブレオマイシンを経鼻投与し、モデルを作製した。抗 TIM-3 抗体とコントロール抗体とを週 3 回、0 日目から 19 日目まで腹腔内投与し、21 日目に解析を行った。肺組織染色 (H&E、マッソントリクローム染色)、気管支肺胞洗浄液中サイトカイン測定 (ELISA)、肺内のコラーゲン量の測定、肺内細胞のフローサイトメトリーなどを行った。

② 肺胞マクロファージ貪食能解析

Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) 標識した白血病細胞株を紫外線照射によりアポトーシス細胞として調整し、抗体と反応させたのちに、C57BL/6 マウスに気管内投与を行った。1 時間後に気管支肺胞洗浄液を回収し、フローサイトメトリーを用いて、肺胞マクロファージが取り込んだ CFSE を測定し、アポトーシス細胞の貪食能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 抗体の作製

PD-1H、B7-H3、B7-H4、BTNL2 分子の抗体を作製するために、チオグリコレートにて誘導したマウス腹腔滲出性マクロファージの mRNA から、これらホモログの cDNA を RT-PCR によりクローニングを行った。全塩基配列、および、細胞外領域の塩基配列を持ったプラスミドベクターを作製し、これらホモログと免疫グロブリンのキメラ蛋白をチャイニーズハムスター卵巣細胞に発現させ、培養上清からプロテインGカラムを用いて可溶性キメラ蛋白を精製した。これらを抗原として、ラットの足底に皮下注射で免疫を行い、リンパ節 B 細胞を回収し、マウスミエローマ細胞との細胞融合を行い、融合細胞 (ハイブリドーマ) を作製、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、抗体作製を行っている。抗 PD-1H 抗体に関しては、複数のクローンを樹立している。

(2) 抗 PD-1H 抗体の作用機序の解明

OVA 誘導性喘息モデルマウスに抗 PD-1H 抗体投与を行った結果、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数はコントロール群で平均 5.6×10^5 個、抗 PD-1H 抗体群で平均 10.2×10^5 個、細胞分画はそれぞれ、マクロファージ (2.3×10^5 vs 3.0×10^5)、好酸球 (2.7×10^5 vs 6.3×10^5)、好中球 (1.9×10^5 vs 2.5×10^5)、リンパ球 (0.4×10^5 vs 0.5×10^5) と抗 PD-1H 抗体群で好酸球数の増加を認めたが、現時点で優位差は認めない。気管支肺胞洗浄液中のサイトカインについても有意差を認めなかった。縦郭リンパ節を回収し、リンパ節細胞差刺激実験による CD4 陽性 T

細胞の増殖能およびサイトカイン産生量の測定したところ、サイトカインには有意差を認めなかったが、抗 PD-1H 抗体群で CD4 陽性 T 細胞増殖の亢進を有意に認めた。これらの結果より、本研究で作製した抗 PD-1H 抗体により、CD4 陽性 T 細胞増殖が *ex vivo* で亢進する可能性が認められた。また、同抗体により OVA 誘導性喘息モデルマウスにおける気管支肺胞洗浄中の好酸球数が *in vivo* で増加する可能性が示唆された。今後、更なる解析が必要である。

(3) 抗 TIM-3 抗体の肺の炎症における役割解析

①ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスにおける抗 TIM-3 抗体の効果

ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスに抗 TIM-3 抗体を投与した結果、コントロール抗体群に比べ、抗 TIM-3 抗体群では病理標本で炎症細胞浸潤と線維化の増悪を認めた。Ashcroft スコアでは、コントロール抗体群に比べ、抗 TIM-3 抗体群で有意な悪化を認めた。14 日目から 20 日目までの解析でも抗 TIM-3 抗体は弱いながらもコントロール抗体群に比して悪化傾向を認めたが、早期の 0 日目から 5 日目までの解析では抗 TIM-3 抗体の効果は認められなかった。線維化の過程では線維芽細胞が α -smooth muscle actin (α SMA) を発現して筋線維芽細胞に分化する。この系で α SMA の発現解析を行うとコントロール抗体群に比べ、抗 TIM-3 抗体群では α SMA の発現が亢進していた。線維化ではコラーゲンが間質に蓄積するが、肺内のコラーゲン沈着は、コントロール抗体群に比べ、抗 TIM-3 抗体群で増加していた。しかしながら、気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量には、コントロール抗体群と抗 TIM-3 抗体群で違いを認めなかった。線維化に関与するサイトカインとしては、transforming growth factor- β (TGF- β) がよく知られている。また、hepatocyte growth factor (HGF) は、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスを抑制する可能性が指摘されているほか、抑制性 Smad 分子である Smad7 を誘導して TGF- β の作用を制御するとされる。このため、気管支肺胞洗浄液中の TGF- β と HGF を測定したところ、コントロール抗体群に比べ、抗 TIM-3 抗体群で TGF- β は増加していた一方で HGF は減少していることが判明した。これらの結果より、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスにおいて、抗 TIM-3 抗体は肺の炎症と線維化を増悪させ、TGF- β 産生も誘導し、HGF 産生を抑制することが示唆された。

②肺内の TIM-3 発現解析

肺をミンチし、肺内の免疫担当細胞浮遊液を調整した。これらの細胞表面上の TIM-3 の発現をフローサイトメトリーにて解析した結果、肺胞マクロファージにのみ TIM-3 の発現が認められ、間質のマクロファージや樹状細胞、好酸球、好中球、Natural killer (NK) 細胞、B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞では、その発現は認められなかった。ブレオマイシン誘導性モデルマウスにおいてもこの発現パターンには変わりがなく、肺胞マクロファージのみ TIM-3 の発現が認められた。

③抗 TIM-3 抗体は肺胞マクロファージによるアポトーシス細胞食食を抑制する

肺内の免疫担当細胞では、肺胞マクロファージにのみ TIM-3 の発現が認められたため、肺胞マクロファージの主な働きである食食に注目した。TIM-3 はアポトーシス細胞の食食に関与する。また、以前の報告で、アポトーシス細胞をブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスに経気道投与すると HGF が誘導された結果、肺の炎症と線維化が抑制されることが示唆されていた。これらから、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスにおいて、TIM-3 はアポトーシス細胞の食食を介して HGF の産生を誘導し、抑制的に作用するが、抗 TIM-3 抗体により、この抑制作用が阻害された結果、ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスが増悪した可能性を想定した。ブレオマイシン誘導性間質性肺炎モデルマウスの系の 7 日目の肺組織で TUNEL 陽性のアポトーシス細胞数を計測した結果、コントロール抗体群に比べ、抗 TIM-3 抗体群で有意な TUNEL 陽性のアポトーシス細胞数の増加を認めた。これらの結果より、抗 TIM-3 抗体は肺胞マクロファージによるアポトーシス細胞食食を抑制している可能性が示唆された。さらに、CFSE 標識した白血病細胞株を紫外線照射によりアポトーシス細胞として調整し、抗体と反応させたのちに、C57BL/6 マウスに気管内投与を行った。1 時間後に気管支肺胞洗浄液を回収し、肺胞マクロファージが取り込んだ CFSE をフローサイトメトリーで解析した。コントロール抗体で前処置した CFSE 陽性のアポトーシス細胞は肺胞マクロファージに食食されたが、抗 TIM-3 抗体で前処置した CFSE 陽性のアポトーシス細胞の肺胞マクロファージによる食食はコントロール抗体に比べて有意に抑制された。アポトーシスではカスパーゼが活性化され、細胞内タンパク質を切断するとともにフォスファチジルセリン (PtdSer) をその表面に表出させる。マクロファージは PtdSer を “eat me” シグナルとして認識、食食するが、この PtdSer を TIM-3 が認識することが知られる。

④以上の結果より、抗 TIM-3 抗体が肺胞マクロファージによるアポトーシス細胞除去を阻害することでブレオマイシン誘発間質性肺炎モデルマウスを増悪させる可能性を明らかにした。がん診療に用いられている免疫チェックポイント阻害療法は、重篤な合併症として間質性肺炎を発症することが知られている。新しい免疫チェックポイント阻害薬として期待される抗 TIM-3 抗体も同様に、あるいは、それ以上に間質性肺炎に注意する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

①. Tanabe Y, Harada N, Ito J, Matsuno K, Takeshige T, Harada S, Takemasa M, Kotajima

- M, Ishimori A, Katsura Y, Makino F, Atsuta R, Takahashi K. Difference between two exhaled nitric oxide analyzers, NIOX VERO((R)) electrochemical hand-held analyzer and NOA280i((R)) chemiluminescence stationary analyzer. *J Asthma* 2019; 56: 167-172. 査読有, doi: 10.1080/02770903.2018.1439953.
- ②. Yasuda M, Harada N, Harada S, Ishimori A, Katsura Y, Itoigawa Y, Matsuno K, Makino F, Ito J, Ono J, Tobino K, Akiba H, Atsuta R, Izuhara K, Takahashi K. Characterization of tenascin-C as a novel biomarker for asthma: utility of tenascin-C in combination with periostin or immunoglobulin E. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018; 14: 72. 査読有, doi: 10.1186/s13223-018-0300-7.
 - ③. Matsuno K, Harada N, Harada S, Takeshige T, Ishimori A, Itoigawa Y, Katsura Y, Kodama Y, Makino F, Ito J, Atsuta R, Akiba H, Takahashi K. Combination of TWEAK and TGF-beta1 induces the production of TSLP, RANTES, and TARC in BEAS-2B human bronchial epithelial cells during epithelial-mesenchymal transition. *Exp Lung Res* 2018; 44: 332-343. 査読有, doi: 10.1080/01902148.2018.1522558.
 - ④. Kanemaru R, Takahashi F, Kato M, Mitsuishi Y, Tajima K, Ihara H, Hidayat M, Wirawan A, Koinuma Y, Hayakawa D, Yagishita S, Ko R, Sato T, Harada N, Kodama Y, Nurwidya F, Sasaki S, Niwa SI, Takahashi K. Dasatinib Suppresses TGFbeta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells and Inhibits Pulmonary Fibrosis. *Lung* 2018; 196: 531-541. 査読有, doi: 10.1007/s00408-018-0134-6.
 - ⑤. Isshiki T, Akiba H, Nakayama M, Harada N, Okumura K, Homma S, Miyake S. Cutting Edge: Anti-TIM-3 Treatment Exacerbates Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice. *J Immunol* 2017; 199: 3733-3737. 査読有, doi: 10.4049/jimmunol.1700059.

[学会発表] (計 50 件)

- ①. Tanabe Y, Harada N, Harada S, Matsuno K, Takeshige T, Ito J, Miyake S, Takahashi K, Akiba H, Circulating levels of soluble TIM-4 in the patients with asthma. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2018.
- ②. Sasano H, Harada N, Harada S, Tanabe Y, Sandhu Y, Takeshige T, Matsuno K, Ishimori A, Makino F, Ito J, Chiba A, Miyake S, Takahashi K, Innate lymphoid cell subsets in peripheral blood of patients with asthma treated with mepolizumab, ILC 2018/The 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells, 2018.
- ③. Takeshige T, Harada N, Matsuno K, Ishimori A, Tanabe Y, Sasano H, Nakamura A, Harada S, Katsura Y, Makino F, Ito J, Atsuta R, Akiba H, Takahashi K, Chitin induced production of prostaglandin E2 in alveolar macrophages and bronchial epithelial cells, American Thoracic Society International Conference 2018.
- ④. Matsuno K, Harada N, Itoigawa Y, Takeshige T, Harada S, Ishimori A, Tanabe Y, Katsura Y, Makino F, Ito J, Atsuta R, Akiba H, Takahashi K, TWEAK enhances epithelial mesenchymal transition and chemokine production in human bronchial epithelial cells. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2017.
- ⑤. Isshiki T, Akiba H, Nakayama M, Harada N, Ko Okumira, Miyake S, TIM-3 regulates pulmonary fibrosis through apoptotic cell clearance. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：秋葉 久弥

ローマ字氏名：AKIBA, Hisaya

研究協力者氏名：一色 琢磨

ローマ字氏名：ISSIKI, takuma

研究協力者氏名：原田 園子

ローマ字氏名：HARADA, sonoko

研究協力者氏名：松野 圭

ローマ字氏名：MATSUNO, kei