

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02673

研究課題名（和文）病変部位免疫環境のリモデリングを誘導する新規Treg制御法の開発

研究課題名（英文）Development of the novel screening method for reprogramming of inflammatory environment

研究代表者

関谷 高史（Sekiya, Takashi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・免疫応答修飾研究室長

研究者番号：80519207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、タンパク質ライブラリーを新規手法により作製し（IFDRライブラリーと呼称）、炎症性疾患の病変部位で制御性T細胞（Treg）の機能抑制を引き起こす因子の同定を目指した。本研究では、分泌シグナルペプチド、細胞株、薬剤耐性遺伝子の3点で改良を重ねることで、IFDRライブラリーを用いたスクリーニングのスケールアップに成功した。さらに、ライブラリーを用いたスクリーニングにより、Tregの機能を制御する2種類の分子を同定した。これら2分子に関し、Treg、エフェクターT細胞、抗原提示細胞のいずれと相互作用するのか検討したところ、片方はTreg、もう一方は抗原提示細胞と相互作用することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA、RNA等の核酸ライブラリーは、構築・改良が重ねられてきているが、タンパク質ライブラリーの簡便な作製法は存在しないのが現状と言える。しかし、本研究により、多種類の組み換えタンパク質を含むライブラリーの簡便な作製法が新たに構築された。

多細胞生物における細胞間相互作用の多くはタンパク分子により担われるため、本ライブラリーの応用により、免疫応答を制御する分子のみならず、様々な生物学的意義を持つ分子の同定が可能になると期待される。

さらに、本ライブラリーの応用で見出したTregの機能を制御する分子は、炎症性疾患や腫瘍など、Tregの機能異常が関与する疾患における治療標的としての展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research is to develop a novel recombinant protein library (called "IFDR library" herein), in which effective molecules are highly enriched than previous ones, and identify molecules which have an ability to modulate the function of regulatory T (Treg) cells in pathogenic environments, by utilizing the this novel library.

First, this research has succeeded in scaling up the screening of the IFDR library, by finding an optimal signal peptide, cell line, and drug resistance gene. Then, applying this improved IFDR library for the screening, I identified two molecules (termed 9-7F-6 and 18-11F-7) that have an ability to repress the function of Treg cells. I then purified the recombinant proteins of the two molecules from the culture supernatant of 293T cells, and applied the recombinant proteins for further investigation. As a result, it was revealed that 9-7F-6 and 18-11F-7 interacted with Treg and antigen presenting cells, respectively.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 細胞リプログラミング 制御性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞 (Treg) の機能不全は自己免疫疾患やアレルギーを引き起こす一方、過剰な活性は腫瘍形成や感染症の引き金となる。実際に、Treg の活性が多く炎症部位で抑制されていることや、逆に多くの腫瘍部位で亢進しており、病態の進行に深く関与していることが確認されてきている。従って、病変部位における Treg の活性制御は、病変部位免疫環境の正常化、リモデリングを誘導し、治療における有力な作用点となると期待される。しかし、その人為的制御法は確立されていなかった。病変部位 Treg の、遺伝子発現レベルでの異常は、様々なオミクス解析により明らかとなってきた一方、その異常を引き起こすエフェクター分子や、正常化を誘導する分子に関しては、新たな発見の余地が残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、炎症部位や腫瘍組織の免疫環境に正常化「リモデリング」を誘導することを目的とし、それら病変部位において異常をきたしている Treg の機能や性質の人為的制御法の開発を目指すものである。一方、Treg を標的とした治療は、細胞移入療法や、low-dose IL-2 の投与による増殖の促進などを中心に、既に様々な炎症性疾患を対象に治験が開始されている。著明な効果、または部分的な効果がそれぞれの疾患に対し確認されており、改良が進められている。しかし、細胞移入療法に関しては、正常な機能を保持した細胞を十分量取得することの困難さが課題点である。また、組織が保持できる細胞数には限りがあるため、既存細胞との replacement も障壁である。一方、Treg の増殖促進に基づく治療法に関しては、性質が変化した炎症部位 Treg の増殖が引き起こす副作用が懸念される。一方、注目すべき点として、多くの炎症性疾患病変部位では、Treg は正常組織と比較しても同程度の数量で存在する一方、機能の減弱を示す例や、炎症性のエフェクター T 細胞 (Teff) への転換が亢進している例が多く報告されてきている。そこで本研究は、そのように疾患部位で異常をきたしつつ存在する Treg に着目し、その機能や性質の回復に、炎症性疾患治療における新たな作用点としての可能性を求める。炎症部位 Treg の機能と性質の正常化の試みは、① Treg の機能を増強する因子 ② Teff への転換を防ぐ因子 ③ Teff を Treg にリプログラミングする因子 の探索という、3 方向から追求する。

一方、多くの腫瘍部位では Treg が抗腫瘍免疫の抑制に関与している。腫瘍部位で Treg を特異的に除去することはマウス実験レベルでは可能であり、その奏功が報告されているが、臨床応用は難題と言える。そこで本研究は、腫瘍部位の Treg 活性を抑制する新規手法を、① Teff の活性を保ちつつ Treg 機能を抑制する因子 ② Treg 特異的に増殖抑制や細胞死を誘導する因子 ③ Treg を Teff にリプログラミングする因子 の探索という、3 方向から追求する。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 新規タンパク質分子ライブラリによるスクリーニング系の構築

研究代表者が先行研究で開発を進めた in-frame・順向きリコンビナントタンパク質ライブラリ (in-frame directed recombinant protein library: IFDR ライブラリ (図 1A, B)) を用い、Treg の機能を制御する因子、Treg の形質維持を制御する因子、Teff/Treg 間のリプログラミングを誘導する因子を、単一のスクリーニングで同定する。IFDR ライブラリは研

究代表者が独自に構築を進めてきたものであり、non-functional な分子の割合が低減されているうえ、Fc 融合型のプラットフォームであるため、ダイマー形成による機能増強と分泌タンパクの安定化により、有効分子の割合が enrich されており、スクリーニング効率の大幅な向上を可能とする。また、哺乳類細胞株を用いた作製となるため、翻訳後修飾も忠実に再現される。

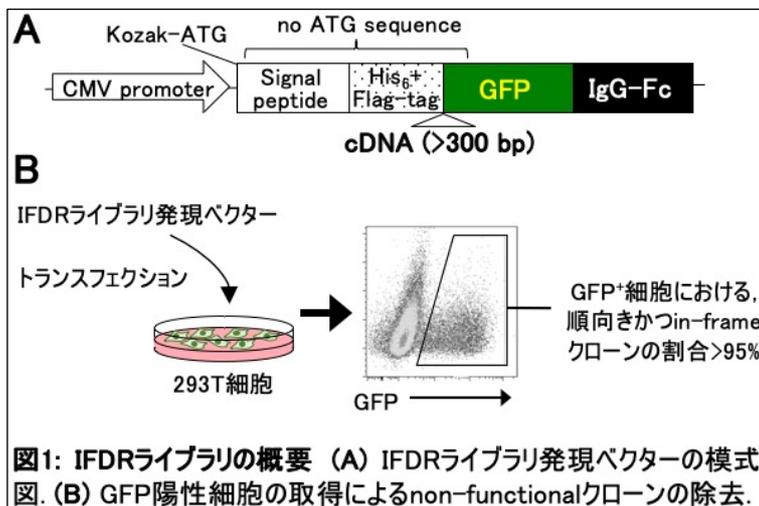


図1: IFDRライブラリの概要 (A) IFDRライブラリ発現ベクターの模式図. (B) GFP陽性細胞の取得によるnon-functionalクローンの除去.

### 3-2. スクリーニングにより同定された分子の機能解析

上記のスクリーニングで見出された因子の機能を、過剰発現実験、ノックダウン実験、拮抗ペプチドや中和抗体を用いた実験などにより、分子・細胞レベルで検討する。また、本ライブラリはFc融合型のプラットフォームであるため、そのままProtein G ビーズによる pull-down, 質量分析に応用することができる。見出された分子の中から3種類程選択し、標的細胞や相互作用因子を同定する。

## 4. 研究成果

### 4-1. 新規タンパク質分子ライブラリによるスクリーニング系を構築した

IFDR ライブラリを構成する発現ベクターは、当初の初期版のものは、スクリーニング操作

(細胞へのトランスフェクション、細胞のシングルナイズ、シングルナイズした細胞のコロニー形成、培養上清の回収)のステップを経ると、目的タンパク質分子の発現が殆ど見られなくなってしまうため、改良を要することが判明した。タンパク質分子の発現が見られなくなる要因としては、①トランスフェクションしたプラスミドが、細胞の増殖により希釈される ②ライブラリ遺伝子の転写量が少ない ③転写された mRNA

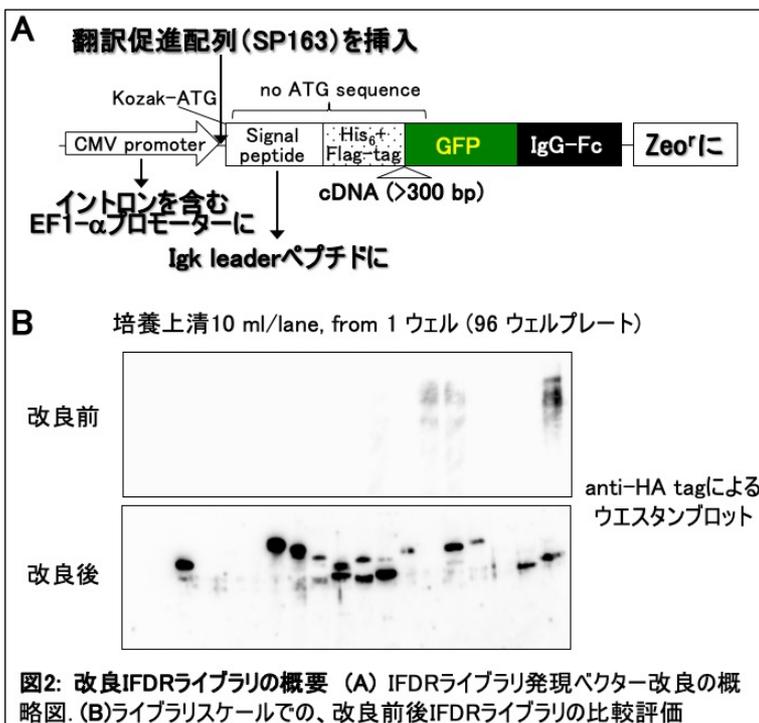


図2: 改良IFDRライブラリの概要 (A) IFDRライブラリ発現ベクター改良の概略図. (B)ライブラリスケールでの、改良前後IFDRライブラリの比較評価

の翻訳効率が低い ④ライブラリ遺伝子の発現が「サイレンシング」を受けることにより低下する ⑤発現したタンパク分子の分泌効率が悪い ⑥最初に用いた細胞株の NIH3T3 細胞が

適切ではない などの様々な理由が考えられたため、これら全てに関し改良を試みた (図 2A)。

まず、①のトランスフェクションしたプラスミドの希釈に関しては、自立増幅性プラスミド/細胞の使用、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターの3種類を試した結果、レンチウイルスベクターが最も高い発現持続性を示したため、採用した。②の転写量は、CMVプロモーターとEF-1 $\alpha$ プロモーターの2種類を比較した結果、後者が優れていたため採用した。③の翻訳効率、翻訳促進配列・SP163をプロモーター下流と1st ATGの上流に挿入することで、1.5倍程度のタンパク質産生の増加を得ることができた。④の遺伝子発現のサイレンシングは、イントロン配列を含むEF-1 $\alpha$ プロモーターを用いることで改善が得られた。また、サイレンシングに対してはセクションに用いる薬剤耐性遺伝子/薬剤の組み合わせが重要であることが知られているため、セクション薬剤に関しピューロマイシンとゼオシンを比較したところ、後者の方が高発現を導いたため、採用した。⑤のタンパク分子の分泌効率に関しては、当初使用していたCTLA-4の分泌シグナルを、最も強力な分泌シグナルとして報告されているIg $\kappa$ のリーダーペプチド配列と置き換えることで、培養上清中タンパク質濃度の飛躍的な向上が得られた。⑥の細胞株は、NIH3T3細胞とレトロウイルスの系よりも、CHO細胞とレンチウイルスの系の方が著明に高いタンパク質発現を導いたため、採用した。

以上の改良操作の結果、スクリーニング操作のプロセスで高発現を維持するIFDRライブラリバックボーンの作製に成功した (図 2B)。

#### 4-2. Tregによる免疫抑制を阻害するタンパク質分子のスクリーニング

上記のとおり構築したIFDRライブラリに対し、T細胞の増殖抑制が中程度となる比率で

Tregを加えた状態で、96 wellプレートを用いて細胞培養を行い、各培養上清に添加するだけで細胞増殖の度合いを定量できる「Cell Titer Gro」試薬を用い、

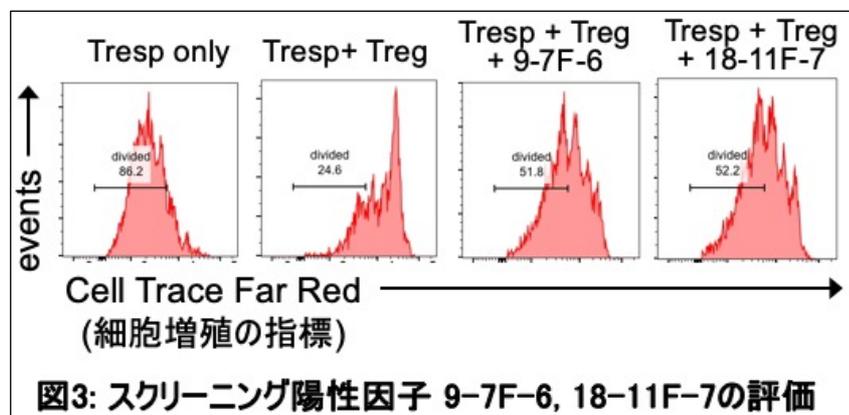


図3: スクリーニング陽性因子 9-7F-6, 18-11F-7の評価

各ウェルにおける細胞増殖を解析するという手法でスクリーニングを行った。スクリーニングは、96 well plate 52枚、計・約52000分子に対して行った。増殖が亢進したウェルにはTreg機能の抑制因子が添加され、増殖抑制が強化されたウェルにはTreg機能の増強因子が添加されたと判断し、スクリーニングを完了した結果、9-7F-6, 18-11F-7と仮名する二分子が、Tregによる免疫抑制を阻害する分子として単離された (図3)。

#### 4-3. 9-7F-6および18-11F-7の機能解析

蛍光タンパク質と融合させた9-7F-6および18-11F-7リコンビナントタンパク質をExpi-CHO-S細胞システムを用いて精製し、Treg細胞、エフェクターT細胞 (Teff)、抗原提示細胞と混合し、フローサイトメトリーにより解析することで、これら2分子の作用の標的細

胞の同定を試みた。その結果、9-7F-6はTreg細胞と主に相互作用する一方、18-11F-7は抗原提示細胞と主に相互作用することが見出された。これらの結果から、9-7F-6はTregに直接作用し、18-11F-7は抗原提示細胞に作用することでTregの機能に何らかの影響を及ぼす可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takashi Sekiya, Takaki Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 RGMB enhances the suppressive activity of the monomeric secreted form of CTLA-4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43068-y	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 Lyszkiewicz Marcin, Takashi Sekiya, Andreas Krueger et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 miR-181a/b-1 controls thymic selection of Treg cells and tunes their suppressive capacity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2006716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.2006716	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 Chen Joyce, Lopez-Moyado Isaac F., Seo Hyungseok, Lio Chan-Wang J., Hempleman Laura J., Sekiya Takashi, Yoshimura Akihiko, Scott-Browne James P., Rao Anjana	4. 巻 567
2. 論文標題 NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 530-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-019-0985-x	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 Sekiya Takashi, Hibino Sana, Saeki Keita, Kanamori Mitsuhiro, Takaki Satoshi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1627 ~ 1638.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.07.008	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 Sekiya Takashi, Kagawa Shizuko, Masaki Katsunori, Fukunaga Koichi, Yoshimura Akihiko, Takaki Satoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulation of peripheral Th/Treg differentiation and suppression of airway inflammation by Nr4a transcription factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102166 ~ 102166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102166	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4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takashi Sekiya, Satoshi Takaki, and Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Roles of the nuclear orphan receptor Nr4a in Th/Treg differentiation and in regulation of allergic asthma pathogenesis
3. 学会等名 The 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷 高史
2. 発表標題 制御性T細胞移入療法の進歩を導く基礎研究の現在
3. 学会等名 第55回 日本移植学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Sekiya, Satoshi Takaki, and Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Roles of the nuclear orphan receptor Nr4a in Th/Treg differentiation and in regulation of allergic asthma pathogenesis
3. 学会等名 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関谷 高史
2. 発表標題 Nr4aファミリー転写因子によるCD4T細胞の分化制御
3. 学会等名 第28回 東京免疫フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 関谷 高史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ 制御性T細胞研究の現在	

1. 著者名 関谷 高史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------