

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02699

研究課題名(和文) 免疫制御シグナルTNFR2-APP3経路の機能解明と低分子がん免疫治療薬開発

研究課題名(英文) Study of TNFR2-APP3 signaling pathway and its immuno-suppressive 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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Treg/MDSCの機能に関わることが示唆されているTNFR2及びTNFR2-APP3シグナルに着目し、免疫制御の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。また、新規がん免疫治療薬の開発を念頭に、TNFR2-APP3シグナルの低分子制御薬の探索を試みた。研究の結果、TNFR2-APP3シグナルがTreg/MDSCの増殖やTregの免疫抑制機能に関わっていることが明らかとなった。また、TNFR2がin vivoでの腫瘍免疫抑制機構に関与することが示唆された。これらの結果から、TNFR2-APP3シグナルは、がん免疫治療の標的になることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNFR2-APP3経路のシグナルの詳細や当該シグナルとTreg/MDSC細胞を介する免疫制御との連関、がん免疫治療における有用性についての詳細は不明であったが、本研究でその一端を解明することができた。昨今、がん免疫療法は大きく期待されているが、これまでTNFR2シグナルの制御をがん免疫療法に応用した例はなく、また、TregやMDSCの機能を抑制できる低分子薬の開発は未踏である。本研究により、TNFR2-APP3シグナル経路を標的とし、がん免疫抑制の中心を担うと考えられるTreg/MDSCの機能の制御に基づくがん免疫療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the role of TNFR2-APP3 signal in immuno-suppressive function of regulatory T-cells (Treg) and myeloid-derived suppressor cells (MDSC). In addition, we tried to discover an inhibitor of TNFR2-APP3 signal for cancer immunotherapy. TNFR2-APP3 signal is revealed to have important roles in proliferation of Tregs/MDSCs and immuno-suppressive function of Tregs. In addition, TNFR2 was suggested to have a suppressive function in in vivo anti-tumor immunity. These results indicate that TNFR2-APP3 signal is promising as a drug-target for cancer immunotherapy.

研究分野：分子細胞免疫学

キーワード：TNFR2 APP3 Treg MDSC がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は、宿主免疫系にがん細胞を攻撃させようとするアプローチであり、標的の特異性の高さや副作用の少ない治療が達成できる可能性などから、理想のがん治療法と考えられている。PD-1、CTLA-4 といった免疫チェックポイントと呼ばれる免疫抑制関連分子の機能を抗体により遮断することで抑制性免疫を解除することががん治療に有効であることが臨床的にも示されているが、がんにおける免疫抑制のメカニズムは複雑であり、未だ十分に解明されておらず、それを自在にコントロールするには至っていない。

がん組織をとりまく免疫システムの中で、制御性T細胞 (Treg) は、免疫抑制機能を担う主要な細胞と考えられている。Treg は種々のタイプのがん組織において、がん局所や周辺リンパ節に集積が認められている。そのため、Treg の機能抑制が可能となれば、幅広いがんの種類で抗がん免疫を有効化できるものと期待される。

研究代表者らは、TNF- α 受容体のサブタイプである 2 型 TNF 受容体 (TNFR2) のユニーク性に着目して機能解析や創薬応用の研究を推進しているが、その中で、TNFR2 がリンパ球の中で Treg 特異的に発現していることを見出した。さらに、TNFR2 と相互作用してシグナルを伝える新規の細胞内アダプター分子として APP3 を同定した(Inoue M, Tsunoda S et al. J Cell Sci 2015)。TNF 受容体には、2 種類のサブタイプが存在し、TNFR1 が炎症の惹起やアポトーシス誘導に関与するのに対し、TNFR2 は機能的に未解明な点が多い受容体である。これまでに得た知見から、TNFR2 は Treg に発現し、いわゆる effector T 細胞にはほとんど発現していない。また最近、Treg 同様に免疫抑制機能を担うと考えられている骨髄由来抑制細胞 (MDSC) にも TNFR2 が高発現することが報告されるなど、TNFR2 はがんにおける抑制性免疫機構に重要な役割を担っていると予想される。しかし、Treg や MDSC における TNFR2 の機能は未解明であり、がん免疫療法への応用も未踏である。

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、Treg/MDSC の機能及びがんの免疫抑制の仕組みの中で、TNFR2-APP3 シグナルがどのような分子メカニズムで関与しているのかを明らかにすること、さらに、医療応用の観点から、TNFR2-APP3 シグナルのがん免疫治療の標的としての有用性を明らかにし、がん免疫治療薬への応用の可能性を探ることを目的とする。具体的には、① Treg/MDSC の抑制性免疫機能における TNFR2-APP3 シグナルの役割と分子メカニズムをマウス及びヒトの細胞レベルで解析した。また、② TNFR2 及び APP3 ノックアウトマウス(KO マウス)を用いて in vivo での機能明らかにした。③ TNFR2-APP3 シグナルを特異的に阻害可能な低分子化合物の探索のためのアッセイ系を確立した。

3. 研究の方法

(1) TNFR2-APP3 シグナルと Treg/MDSC 機能の連関解析

マウスリンパ節あるいは骨髄から細胞を回収し、フローサイトメトリー (FCM) により Treg あるいは MDSC における TNFR2 の発現レベルを解析した。ヒト Treg における TNFR2 の関与を調べるため、PBMC を用いて TNFR2 の発現レベルをフローサイトメトリー (FCM) 解析した。TNFR2 シグナルが Treg の機能に関わるかどうか調べるため、独自に作製した TNFR2 アゴニストタンパク質を作用させた際の Treg の増殖変化を in vitro CFSE 解析により評価した。

(2) TNFR2-APP3 シグナルの in vivo 機能解析

TNFR2-KO マウス、APP3-KO マウス、及び野生型 B6 マウスのリンパ節から細胞を調製し、Treg の数的変化を FCM で解析した。また、In vivo での TNFR2 刺激が Treg に与える影響を調べるため、TNFR2 アゴニスト-Fc キメラタンパク質を作製し、50 μ g/mouse で週 2 回、1, 2 あるいは 4 週間投与した。経時的にリンパ節細胞を回収し、Treg の割合を FCM で解析した。

(3) TNFR2-APP3 シグナル制御による抗腫瘍免疫の検討

8-12 週齢の B6 マウス及び TNFR2-KO マウスに B16-F10 メラノーマ (4×10^5 cells/mouse) を皮内移植した。移植後、経日的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積 (mm^3) を概算した (体積 = 長径 \times 短径²) / 2)。また、移植 19 日後に腫瘍を摘出し、組織分散試薬 (BD Horizon Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent) を用いて細胞を調製した。得られた細胞を FCM により解析し、腫瘍への Treg や MDSC の浸潤の違いを調べた。

(4) TNFR2 シグナルを阻害可能な低分子化合物探索

TNFR2 シグナル活性を阻害できる低分子化合物の探索・同定を行うため HTS 用アッセイ細胞として、ヒト TNFR2 cDNA を Ramos-blue 細胞に導入することでトランスフェクタントを作製した (Ramos-blue-huTNFR2)。セルソーターによりモノクローン化し、TNFR2 を高発現するクローンを得た。本細胞に TNF- α あるいは TNFR2 アゴニストタンパク質を作用させた場合、させない場

合の発光シグナルを測定した。

4. 研究成果

(1) TNFR2-APP3 シグナルと Treg/MDSC 機能の関連解析

マウスリンパ節細胞を用いて CD4⁺CD25⁺ Treg における TNFR2 の発現レベルを解析した結果、Treg 特異的に TNFR2 が発現すること、Treg ではない Tconv にはほとんど発現していないことが確認できた。次に、マウス Treg の増殖・機能における TNFR2 の関与を調べた。Treg は、TNFR2 アゴニストタンパク質の作用により、細胞分裂が促進された (図 1)。また、免疫抑制に関わるサイトカイン IL-10 産生も、IL-2 共存下で促進された。

次に、ヒト Treg における TNFR2 の発現レベルを PBMC を用いて解析した結果、CD4⁺CD25^{hi}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。

一方、マウス骨髄細胞を用いて CD11b⁺ Gr-1^{low} の単球系 MDSC (M-MDSC) と CD11b⁺ Gr-1^{high} の顆粒球系 MDSC (G-MDSC) における TNFR2 の発現を解析したところ、とくに M-MDSC で TNFR2 の高発現が認められた。

以上の結果から、TNFR2 がマウス及びヒト Treg に高発現し、少なくともマウス Treg の増殖や免疫抑制機能の発現に関わることが示された。また、腫瘍免疫抑制に関わると考えられている MDSC にも Treg が高発現していたことから、MDSC の機能にも TNFR2 が関わっている可能性が示された。

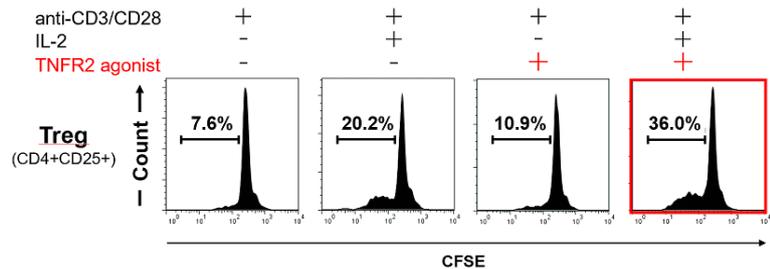


図 1 TNFR2 アゴニスト刺激によるマウス Treg の分裂

(2) TNFR2-APP3 シグナルの in vivo 機能解析

TNFR2-KO、APP3-KO、野生型 B6 マウスのリンパ節中の Treg 数を比較した結果、TNFR2 KO マウスでは野生型マウスに比べて Treg 数が減少しており、TNFR2 シグナルが in vivo での Treg の分化・増殖に関与することが示唆された (図 2)。

また、マウスに TNFR2 アゴニスト-Fc タンパク質を投与した際の Treg の変化を経時的に解析したところ、1 週間後では生食投与群に比べて約 20%の増加がみられ、その増加率は経日的に減少する傾向にあったものの、少なくとも 4 週間後でも増加状態が持続していた。

これらの結果から、マウス生体内において、TNFR2-APP3 シグナルが Treg の分化・増殖に一定の関わりを有することが示唆された。

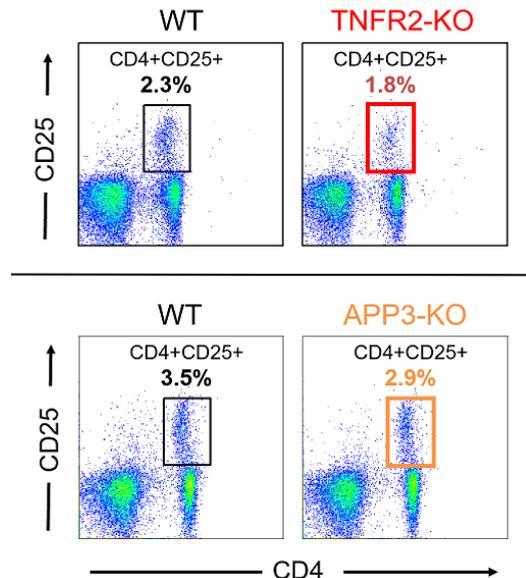


図 2 TNFR2-KO マウス及び APP3-KO マウスにおけるリンパ節 Treg の存在率

(3) TNFR2-APP3 シグナル制御による抗腫瘍免疫の検討

野生型マウスと TNFR2-KO マウスにおける B16 メラノーマの生着・増殖を調べた結果、TNFR2-KO マウスでは、野生型マウスに比べて、腫瘍の増大が抑制された (図 3)。移植 19 日目の腫瘍に浸潤した CD11b⁺Gr1⁺ MDSC の存在率を FCM で解析したところ、野生型マウスに比べて TNFR2-KO マウスの腫瘍の MDSC の割合は有意に減少していた。また、TNFR2-KO マウスでは、腫瘍に浸潤した CD4⁺Foxp3 Treg の存在率も同様に有意に低下していた。

TNFR2-KO マウスで腫瘍に浸潤した MDSC や Treg が減少し、腫瘍増殖も抑制され

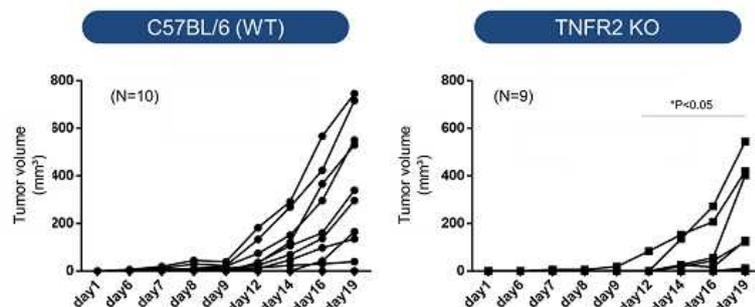


図 3 TNFR2-KO マウス及び野生型マウスにおける B16 メラノーマの腫瘍増殖変化

ていたことから、TNFR2 シグナルが腫瘍免疫の抑制に関わる MDSC や Treg の機能に関わっていることが示唆された。

(4) TNFR2 シグナルを阻害可能な低分子化合物探索

Ramos-blue 細胞は NF κ B が活性化されるとアルカリホスファターゼを発現し、発光で検出できるレポーター細胞である。本細胞に TNFR2 cDNA を導入したトランスフェクタント Ramos-blue-huTNFR2 を作製し、モノクローン化することで TNFR2 を高発現するクローンを得た。なお TNFR1 は元から発現している。本細胞を HTS のアッセイ細胞として利用すれば、TNFR2 の選択的な低分子阻害薬のヒットを同定できるものと考えられる (図 4)。本細胞に TNFR2 アゴニストタンパク質を作用させると発光が認められ、R2 選択的なシグナルの阻害を検出できるものと考えられた。

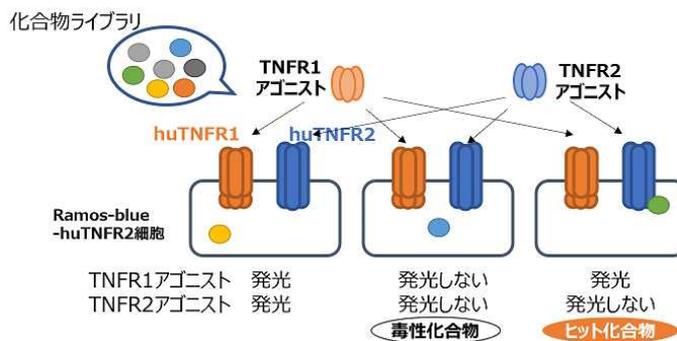


図 4 Ramos-blue-TNFR2 細胞を用いた TNFR2 阻害薬スクリーニング系の概要図

以上、本研究では、Treg/MDSC の機能及びがんの免疫抑制の仕組みの中で、TNFR2-APP3 シグナルがどのような分子メカニズムで関与しているのか、その一端を明らかにした。マウス及びヒトの Treg に TNFR2 が高発現しており、マウス Treg において増殖、免疫抑制機能に関与することが明らかとなった。また、MDSC にも TNFR2 が高発現しており、その機能との関連は今後検討予定である。一方、がんにおける免疫抑制には Treg や MDSC が関与することが報告されているが、それに TNFR2-APP3 シグナルが関与することが示唆された。今後、TNFR2-APP3 シグナルを選択的に阻害する低分子薬が開発できれば、有効性や医療コストの点からも、がん免疫治療薬に大きく貢献しう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 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 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
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

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

〔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	永田 諭志 (Nagata Satoshi) (40246682)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研 究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー (84420)	
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
---------	---------