

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380187

研究課題名(和文) 新たに発見した「制御性抗体」による過剰免疫応答調節の分子機構と難病制御

研究課題名(英文) A newly-found 'regulatory antibody': its immunosuppressive mechanisms and prevention of proinflammatory disorders

研究代表者

河本 正次 (Kawamoto, Seiji)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号：90294537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が発見した核のヒストンH1を標的とする「制御性抗体」による過剰免疫応答抑制の分子基盤を明らかにすると共に、当該知見を難治性炎症疾患の治療へと応用することを目的とした。

まず、抗ヒストンH1抗体のT細胞活性化抑制作用を規定する標的抗原候補をマウス初代T細胞および同抗体との反応性が亢進したマウスT細胞垂株をソースとしたプロテオーム解析により探索・同定した。更に、抗ヒストンH1抗体が肥満細胞を作用点として抗アレルギー作用を示すのみならず、敗血症性肺障害モデルマウスに対して抑制効果を示すことも発見し、本抗体が多彩な起炎症性の難病に対して治療効果を発揮しうることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Objective of this study is: 1) to elucidate molecular mechanisms underlying immunosuppressive activity of the newly-found 'regulatory antibody', which shows antigen specificity against nuclear histone H1; and 2) to apply this regulatory antibody to treat proinflammatory disorders.

First, we identified T cell surface cross-reactive antigens, which enabled anti-histone H1 antibody to fulfill its T cell regulatory activity. We also found that the anti-histone H1 antibody not only suppressed type I allergy by acting on mast cells, but also prevented the development of sepsis-like lung injury in mice. These results suggest the effectiveness of anti-histone H1 regulatory antibody against various proinflammatory disorders.

研究分野：免疫学・動物細胞工学

キーワード：免疫抑制抗体 免疫難病制御

1. 研究開始当初の背景

生体防御機構の最初の応答を担う「自然免疫」の発見、および、その応答の場を担う「樹状細胞」の発見にノーベル生理学・医学賞が与えられ、ペーリング-北里による抗体の発見に始まった免疫応答の正の制御に関する研究は、利根川による抗体生成機構の発見など、100年余りを経てその全容が解明された。その一方で、開始された免疫応答の終息や自己成分・食餌成分に対する免疫寛容誘導、あるいは過剰な免疫応答に対する抑制機構など、免疫応答の負の制御に対する我々の理解は乏しく、これら「制御性の免疫応答」に関する分子論的研究は今世紀になって漸く黎明期を迎えたにすぎない。生理的状況下での免疫抑制反応を規定する白血球は坂口により同定された「制御性 T 細胞 (Treg)」(Science 299, 1057, 2003)であり、同サブセットを標的としたがんや炎症疾患の治療技術開発が強力に進められつつある。また樹状細胞が Treg に免疫抑制白血球としての性格をインストラクトするモデルも提唱され、これを担う「制御性樹状細胞」にも注目が集まっている。しかしながら獲得免疫の中心を担う抗体にも負の免疫調節能があるのか、あるいは抗体による液性免疫応答と制御性免疫応答との間にクロストークがあるのか否かについては、依然として未解決のフロンティア課題として残されている。

ある種のラット同所性肝移植モデルでは免疫抑制剤を投与することなしに臓器が自然生着すること、また、同モデルの血中に免疫抑制因子が発現誘導されること、更には同免疫抑制因子を含む血清を一回術前投与しただけで、副作用なく臓器移植が可能であるとの知見 (Nature 292, 840, 1981 他) が得られていたが、その仕組みや免疫抑制因子の実体は長らく未解明のままであった。

研究代表者はこの免疫抑制因子の分子実体がヒストン H1 に対する特異抗体であることを発見した (Transplantation 77, 1595, 2004)。更に研究代表者は著明な免疫抑制活性を有する抗ヒストン H1 抗体の作製にも成功し (J. Immunol. 182, 4282, 2009 他)、本抗体が拒絶反応の回避のみならず劇症肝炎も抑制することことを発見した (Immunology 129, 547, 2010)。以上の研究代表者の先行結果は、抗ヒストン H1 自己抗体による全く新たな免疫寛容誘導機構の存在、ならびに同抗体を用いた起炎症性難病制圧への応用可能性を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、この研究代表者が独自に発見した「制御性抗体」による過剰免疫応答抑制の分子機構を解明すると共に、その知見を難

治性免疫疾患の治療へと応用展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗ヒストン H1 抗体の免疫抑制活性を規定する標的抗原の探索

C57BL/6 マウスの脾臓より初代全 T 細胞をマグネティックセルソーティングにより単離・精製した。本 T 細胞から得た可溶性画分を二次元 SDS-PAGE に供すると共に、抗ヒストン H1 抗体をプローブとした Western blot 解析、および標的抗原候補の網羅的プロテオーム解析による同定を行った。標的抗原が抗ヒストン H1 抗体の免疫抑制活性発揮に必要であることを検証するために、候補分子の T 細胞における発現を siRNA によりノックダウンすると共に、同細胞に対する抗ヒストン H1 抗体の免疫抑制活性の減退の有無を抗原受容体刺激に対する増殖抑制能を指標に評価した。

また、マウス T 細胞株 EL-4 をソースとして抗ヒストン H1 抗体との反応性が亢進した T 細胞亜株を同抗体をプローブとしたセルソーティングを繰り返すことにより樹立した。本亜株における標的抗原の網羅的プロテオーム解析、ならびに同定抗原の過剰発現による抗ヒストン H1 抗体に対する免疫抑制活性亢進の有無を抗原受容体架橋刺激による T 細胞活性化系に供して確認した。

(2) 抗ヒストン H1 抗体のアレルギーに対する抑制効果の検証

BALB/c マウスの骨髄由来肥満細胞を調製し、これを抗 DNP-IgE 抗体と DNP-BSA 抗原にて感作・刺激する I 型アレルギー反応系に対する抗ヒストン H1 抗体の抑制活性の有無をβ-ヘキソサミニダーゼの放出抑制活性を指標に検討した。また卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミゲル (Alum) の腹腔内免疫と OVA 経鼻感作を基調とするアレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻炎誘発相における抗ヒストン H1 抗体の抑制効果を同抗体の腹腔内投与により検証した。鼻炎病態進展を OVA 経鼻感作後 5 分間のくしゃみ行動回数、および鼻局所の組織病理学的解析にて評価すると共に、OVA 特異的 IgE、IgG1、および IgG2a 抗体応答および Th1/Th2 サイトカイン産生に及ぼす影響を酵素抗体法 (ELISA 法) で解析することにより評価した。

(3) 抗ヒストン H1 抗体の抗アレルギー作用メカニズムに関する解析

抗ヒストン H1 の *in vivo* における抗アレルギー作用点が I 型アレルギー反応の遮断にある可能性につき、BALB/c マウスへの

anti-DNP-IgE 抗体感作と DNP-HSA 抗原チャレンジを基調とする受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルへの同抗体の投与試験により検証した。また、本抗体が生体内ヒストン H1 による起アレルギー作用を拮抗阻害している可能性を検証すべく、アレルギー性鼻炎モデルマウスおよび肥満細胞におけるヒストン H1 の放出の有無を ELISA 法および Western blot 解析により確かめると共に、ヒストン H1 の起アレルギー活性につき、上記鼻炎モデルマウスへのヒストン H1 の点鼻および肥満細胞の I 型アレルギー反応系へのヒストン H1 の共刺激試験を実施することにより検討した。

(4) 抗ヒストン H1 抗体の敗血症に対する抑制効果の検証

抗ヒストン H1 抗体が自然免疫系の過剰応答による敗血症性ショック/多臓器不全に対しても抑制効果を示すか否かを検証するために、BALB/c マウスへのリポ多糖 (LPS) の腹腔内投与を基調とした急性肺障害モデルに対する同抗体の投与試験を実施した。本モデルに対する抑制効果については、生存日数と肺局所における病理学的病態進展、および全身性の起炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を解析することにより評価した。

4. 研究成果

(1) 抗ヒストン H1 抗体の免疫抑制活性を規定する標的抗原の探索

C57BL/6 マウスの初代 T 細胞をターゲットとして抗ヒストン H1 抗体により認識される交差反応抗原をプロテオーム解析により検索したところ、複数の抗原分子種が同定された。これらの候補抗原の発現を同 T 細胞において RNAi によりノックダウンしたところ、一部の抗原においてノックダウンにより抗原受容体架橋刺激による T 細胞の活性化に対する抗ヒストン H1 抗体の抑制活性がキャンセルされる所見を認めた。

また、マウス T 細胞株 EL-4 を用いて抗ヒストン H1 抗体と高反応性を示し、かつ同抗体に対する免疫抑制感受性も亢進した EL-4 亜株 (EL-4.10) を同抗体をプローブとした 10 回のセルソーティングを繰り返すことにより樹立した。EL-4.10 細胞および親株である EL-4 細胞上の抗ヒストン H1 抗体に対する交差反応抗原につき differential プロテオーム解析に供して比較したところ、上記の初代 T 細胞系にて同定されたもの同一の抗原分子種が同定された。更に当該抗原を親株の EL-4 細胞において過剰発現させた結果、細胞表面における抗原分子の外来発現が認められると同時に、抗ヒストン H1 抗体に対する免疫抑制感受性も亢進していることが判

明した。

以上一連の結果から、抗ヒストン H1 抗体の T 細胞活性化に対する抑制活性を規定する責任抗原が同定できたものと判断された。

(2) 抗ヒストン H1 抗体のアレルギーに対する抑制効果

抗ヒストン H1 抗体を OVA 誘発性アレルギー性鼻炎モデルマウスに投与したところ、鼻炎症状の進展が著明に抑制されること、また、鼻病態局所における好酸球の浸潤も有意に減退していることが判明した。一方、本抗体は同モデルのアレルゲン特異的な抗体応答には全く影響を及ぼすことなく当該抗アレルギー作用を発揮していることも明らかとなった。更に本抗体は肥満細胞の *in vitro* における IgE 依存的な脱顆粒反応も抑制することを見いだした。

(3) 抗ヒストン H1 抗体の抗アレルギー作用メカニズムに関する解析

上記の結果から、抗ヒストン H1 抗体が肥満細胞をターゲットとして I 型アレルギー疾患を負に制御しうる可能性が示唆された。これを *in vivo* にて更に確認するために、IgE-肥満細胞シグナリング経路依存的な受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルマウスに対する抗ヒストン H1 抗体の投与試験を実施した。その結果、本抗体の投与が PCA 反応を著明に抑制することが明らかとなり、抗ヒストン H1 抗体の *in vivo* における免疫学的作用点が肥満細胞における I 型アレルギーシグナル伝達経路の遮断にあることが明確に示された。

抗ヒストン H1 抗体はいかなるメカニズムにより I 型アレルギー反応を遮断しているのだろうか？研究代表者は、脱顆粒反応を起こしつつある肥満細胞からヒストン H1 が放出され、これが起アレルギー因子として病態を正に制御すると共に、抗ヒストン H1 抗体はこのヒストン H1 による起炎症シグナルを抑制しているのではないかとの作業仮説を想定した。そこでまず、I 型アレルギー反応に伴ってヒストン H1 が放出される可能性を検証したところ、アレルゲン感作マウスの血中のみならず、*in vitro* における脱顆粒反応下にある肥満細胞培養上清においてもヒストン H1 タンパク質レベルの上昇が観察された。更に、ヒストン H1 による外来刺激が肥満細胞の脱顆粒反応を更に亢進させること、また、ヒストン H1 の点鼻がアレルギー性鼻炎症状を悪化させうることも見いだした。

以上の結果から、抗ヒストン H1 抗体は肥満細胞から放出されるヒストン H1 による I 型アレルギー反応のポジティブフィードバックループを負に制御することによって抗アレルギー作用を発揮している可能性が示唆された。

(4) 抗ヒストン H1 抗体の敗血症に対する抑制効果

研究代表者は抗ヒストン H1 抗体が抗原提示細胞に作用して自然免疫応答を負に制御しうる証拠をこれまでに見いだしている (Mol. Immunol. 42, 1155, 2005)。そこで、本抗体が過剰な自然免疫シグナリングを主因とする敗血症も負に制御しうる可能性を検証する足がかりとして、同病態モデルである LPS 誘発性急性肺障害モデルに対する本抗体の投与効果を検討した。その結果、ヒストン H1 抗体の投与により生存日数の有意な延長と肺組織障害の抑制が認められると共に、同群の血中および肺局所における起炎症性のヒストン H1 ならびにコアヒストン分子種レベルの上昇と血中起炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α) の産生上昇がいずれも有意に抑制されていることが判明した。これらの所見から、抗ヒストン H1 抗体が敗血症/多臓器不全の病態コントロールにも極めて有用であることが示唆された。

(5) 抗ヒストン H1 抗体の創薬応用展開に向けた今後の展望

本研究により、ヒストン H1 抗体による T 細胞活性化抑制の分子基盤の一端が明らかにされると共に、本抗体が拒絶反応のみならず、アレルギーや敗血症といった極めて多彩な難治性炎症疾患に対しても病態抑制効果を示しうることが実証された。今後、本抗体の T 細胞や肥満細胞、あるいは抗原提示細胞における薬理学的作用点を更に明らかにすることにより、当該創薬シーズを利用した難病治療技術の開発へと繋がることが期待される。

従来、ヒストンなどの核成分に対する抗核抗体は自己免疫疾患の増悪因子と認識されてきたが、本研究にて得られた一連の結果は、当該自己抗体が「制御性抗体」として生体にとって有害な過剰免疫応答を負に制御している可能性を想起させるものであり、慢性炎症疾患全般に対する本抗体の有望性が更に期待できる。また本研究の成果は、従来臨床にて多用されている免疫グロブリン大量療法 (IVIG) による過剰炎症抑制の奏効機序を解明する上でも新たな指針を提供しうるものと期待される。

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)

〔論文発表〕(計 4 件)

1. Kusano T., Chiang K. C., Inomata M., Shimada Y., Ohmori N., Goto T., Sato

S., Goto S., Nakano T., Kawamoto S., Takaoka Y., Shiraiishi N., Noguchi T., Kitano S. (2015) A novel anti-histone H1 monoclonal antibody, SSV monoclonal antibody, improves lung injury and survival in a mouse model of lipopolysaccharide-induced inflammation. *BioMed Res. Int.* 2015: 491649. doi: 10.1155/2015/491649. (査読付)

2. Takaoka Y., Goto S., Nakano T., Tseng H. P., Yang M. H., Kawamoto S., Ono K., Chen C. L. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice. *Sci. Rep.* 4: 5204. doi: 10.1038/srep05204. (査読付)
3. Nakano T., Lai C. Y., Goto S., Hsu L. W., Kawamoto S., Ono K., Chen K. D., Lin C. C., Chiu K. W., Wang C. C., Cheng Y. F., Chen C. L. (2012) Immunological and regenerative aspects of hepatic mast cells in liver allograft rejection and tolerance. *PLoS ONE* 7: e37202. doi: 10.1371/journal.pone.0037202. (査読付)
4. Oyoshi M. K., He R., Kanaoka Y., Elkhal A., Kawamoto S., Lewis C. N., Austen K. F., Geha R. S. (2012) Eosinophil-derived leukotriene C4 signals via type 2 cysteinyl leukotriene receptor to promote skin fibrosis in a mouse model of atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 4992-4997. doi: 10.1073/pnas.1203127109. (査読付)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Takaoka Y., Nakano T., Tseng H. P., Yang S. M., Kawamoto S., Chen C. L. (2014) Impact of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) on the prevention of lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice. 第 43 回日本免疫学会学術集会 (2014 年 12 月 10 日~12 月 12 日、国立京都国際会館、京都市)
2. 高岡勇輝、河本正次、高橋未来、片山明子、中野敏明、大森直哉、後藤武、佐藤秀次、後藤茂、陳肇隆、小埜和久 (2013) 抗ヒストン H1 抗体による T 細胞活性化抑制機構の解明 第 4 回癌・炎症と α リポ酸研究会 (2013 年 11 月 16 日、別府湾ロイヤルホテル、大分県速見郡日出町)

3. Takaoka Y., Kawamoto S., Katayama A., Nakano T., Yamanaka Y., Takahashi M., Shimada Y., Chiang K. C., Ohmori N., Aki T., Goto T., Sato S., Goto S., Chen C. L., Ono K. (2013) A unique T cell regulatory role of anti-histone H1 autoantibody: its mode of action through regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. Federation of Clinical Immunology Societies 2013 (2013年6月27日～6月30日、Seaport Boston Hotel、ボストン市、アメリカ合衆国)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河本 正次 (SEIJI KAWAMOTO)
広島大学・先端物質科学研究科・教授
研究者番号：90294537