

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790112

研究課題名(和文)新規抑制型抗体によるヒトTLR4機能抑制性エピトープの同定と新規活性制御法の開発

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanism of human Toll-like receptor 4 function by the inhibitory monoclonal antibody

研究代表者

塚本 宏樹 (TSUKAMOTO, HIROKI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70423605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規敗血症治療薬の抗体医薬品シーズとして期待される抑制型ヒトToll-like receptor 4(TLR4)モノクローナル抗体の作製に成功した。両抗体は、lipopolysaccharide(LPS)誘導性のサイトカイン産生、補助刺激分子の発現誘導、NF- κ Bの活性化を抑制することを明らかにした。また、両抗体のTLR4抑制機序は、抗体による不活性型TLR4多量体構造の誘導、LPS刺激によるTLR4内在化の抑制に依存し、TLR4とLPSの結合に依存しない新規作用機序であった。更に、TLR4細胞外ドメインに抗体医薬品の創薬標的となり得る機能抑制性エピトープの存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, novel inhibitory monoclonal antibodies against human Toll-like receptor 4 (TLR4), which are potential leading antibodies for anti-sepsis antibody drugs, were developed. These antibodies inhibited the production of proinflammatory cytokines, the upregulation of costimulatory molecules and the activation of NF- κ B in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cells such as human peripheral blood mononuclear cells. The inhibitory activities were mediated by novel mechanism that is the induction of inactive TLR4 oligomerization, the inhibition of LPS-induced TLR4 internalization, but not the inhibition of TLR4-LPS binding. In addition, the epitope to which the binding of antibody inhibits the TLR4 function was found on extracellular domain of TLR4 independently of MD-2. Identification and characterization of this epitope may provide a promising drug discovery target structure for the development of anti-septic antibody drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：TLR4 MD-2 リポ多糖 モノクローナル抗体 敗血症 抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

急速な医薬の進歩は、多くの疾患においてその根治を可能にしつつある。感染症も例外ではなく、抗生物質や化学療法剤の開発・改良も進み、優れた予防・治療効果を得るに至る。しかしながら、敗血症に対する有効な治療法・治療薬の開発は未だ達成されず、致死率は依然高いのが現状である。

病原体の侵入に際して TLR4 は、グラム陰性菌外膜の構成成分である LPS を認識し、免疫反応を誘導させる。しかしその一方、その過剰な免疫応答はエンドトキシンショックを誘発し、敗血症の主たる病因になる。それ故、敗血症治療における標的分子として、LPS アナログを中心とした TLR4 アンタゴニスト創薬が世界中で進められている。

細胞膜上の TLR4 は LPS 受容体として活性化シグナルを伝達するが、実際に細胞外で LPS を認識するのは会合分子 MD-2 である。MD-2 と LPS が直接結合することによって、TLR4 細胞外領域の二量体化が誘導され、細胞内 TIR ドメインからシグナルが伝達される。

LPS の最小活性構造は lipid A である。MD-2 はその微細な分子構造を認識し、LPS の生物活性を決定する。特に lipid A の脂肪酸側鎖の構造やリン酸基の有無は MD-2 への結合様式に決定的影響を与える。例えば、lipid A 構造に変異を持つ LPS はその生物活性が減弱し、アンタゴニストとして作用する場合もある。これまで、LPS をリード化合物としたアナログ創薬が国内外で展開されてきたが、その作用機序の多くは MD-2 との結合様式に大きく依存すると考えられる。しかし、LPS アナログ創薬において、承認に至る有効な臨床的敗血症治療効果を得たものは未だ存在しない。この結果は、LPS と MD-2 の結合が極めて強く、十分な競合阻害を達成できないことが要因と考えられる。また同時に、競合阻害に依存した創薬開発では有効な敗血症治療効果を達成するには不十分であり、「競合阻害薬の限界」も示唆される。

申請者は TLR4 欠損マウスを免疫動物として用い、ヒト TLR4 の細胞外領域に対する 20 種類以上のモノクローナル抗体を作製し、これら抗体の 1 つ HT52 が LPS による TLR4 の活性化を極めて強く抑制することを見出した。この抑制効果は、既報の抑制抗体 HTA125 よりもその作用は強く、抗体間のクロスブロック解析からは、「HT52 と HTA125 のエピトープは極めて立体的近傍に位置し、他の無機能抗体エピトープとは一線を画す」ことも判明した。さらに、HT52 のクロスブロックを指標にスクリーニングし、HTB2 抑制抗体を得ることも成功した。これら一連の結果は、HT52 が認識する TLR4/MD-2 の抑制性エピトープの存在を示す。興味深いことに、HT52、HTA125、HTB2 は全て MD-2 との会合とは無関係に TLR4 を単独認識する。予備実験では、TLR4 細胞外領域の leucine-rich repeat (LRR) 1-6 に抑制性エピトープが存在することが示唆されている。前述のように LPS と

MD-2 の直接結合を考えると、これら抑制抗体の作用機序が LPS 結合の競合阻害であれば、エピトープは TLR4/MD-2 複合体上に存在するはずである。さらに TLR4/MD-2/LPS の共結晶構造からも、LRR1-6 と LPS の直接的相互作用は認められない。したがって、「HT52 は単純に MD-2 の LPS 結合を競合阻害するのではなく、TLR4 細胞外領域のある分子構造に作用することによって LPS 結合非依存的に TLR4 を抑制している」可能性が高い。実際、TLR4/MD-2 と LPS の結合を共役沈降実験で検証すると、HT52 は LPS 結合を抑制しない。

したがって、TLR4 細胞外領域に存在する抑制性エピトープを介した、新規作用機序による TLR4 活性制御法・制御薬の可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、HT52 が認識する TLR4 機能抑制性エピトープの同定、その TLR4 抑制機序を解明し、新しい作用機序による TLR4 活性制御法・制御薬開発への応用を目指す。

- (1) HT52 の機能評価: サイトカイン産生、補助刺激分子の発現誘導、シグナル分子の活性評価
- (2) LPS 結合に作用点をもつ LPS アナログや CD14 機能阻止抗体との併用効果
- (3) HT52 抑制性エピトープの同定: LRR 欠損体とアラニンスキャンニングによる責任領域の同定
- (4) HT52 による TLR4 抑制機序の解明: 二量体化、インターナリゼーション、LPS 結合への影響
- (5) 同定した抑制性エピトープを認識する、さらに強力な抑制型抗体の作製

3. 研究の方法

- (1) HT52 抗体の機能評価
HT52 の抑制効果を、LPS 刺激によるサイトカイン産生 (TNF- α 、IL-6、IFN- α / β)、補助刺激分子 CD80/CD86 の発現亢進、NF κ B や IRF-3 の活性化を指標に解析する。安定発現細胞や培養細胞株、ヒト末梢血単核球を用い、ELISA、フローサイトメトリー、Western blot とレポーターアッセイにて評価を行う。
- (2) LPS アナログや CD14 機能阻止抗体との併用効果

LPS アナログ lipid IVa は MD-2 の binding pocket に結合するが二量体化を誘導しない競合的拮抗薬である。独自に作製した CD14 機能阻止抗体は本分子による LPS 結合を阻害し、MD-2 への LPS 転送を減弱させる。LPS 結合に作用点をもつこれら既存の TLR4 阻害薬と HT52 の協調的抑制効果を解析する。

(3) HT52 抗体の認識する抑制性エピトープの同定

LRR 欠損体による抑制性エピトープの絞込み

TLR4 細胞外領域は N-terminal (LRR1-6)、central (LRR7-12)、C-terminal (LRR13-22) domain に大別される。これらドメイン欠損体発現細胞に対する反応性をフローサイトメトリーと免疫沈降法で検討し、抑制性エピトープが存在する LRR を段階的に同定する。

アラニンスキャンニングによる抑制性エピトープの同定

抑制性エピトープの責任 LRR のアラニン変異体を作製し、その微細構造について精査を行う。

(4) HT52 による TLR4 抑制機序の解析

LPS 誘導性の分泌型 TLR4/MD-2 複合体の二量体化をゲルろ過クロマトグラフィーや Native PAGE で解析する。

C 末端に FLAG や GFP の 2 種類のタグをそれぞれ付加した TLR4 の安定発現細胞を LPS 刺激後、一方のタグで免疫沈降し、もう一方のタグによる Western blot で二量体化の検出を行う。

TLR4/MD-2 発現細胞を LPS 刺激し、細胞表面上の TLR4 のインターナリゼーションをフローサイトメトリーで解析する。

(5) 同定した抑制性エピトープを認識する、さらに強力な抑制型モノクローナル抗体の作製

抑制性エピトープを含む LRR を調製し、TLR4/MD-2 二重欠損マウスに免疫誘導を行う。TLR4/MD-2 安定発現細胞のフローサイトメトリーでスクリーニングし、更に強い抑制型抗体の作製を試みる。

ヒト TLR4/MD-2 の安定発現 Ba/F3 細胞(マウス由来)を免疫し、蛍光標識 HT52 のクロスブロックを指標に抗体スクリーニングする。

4. 研究成果

(1) HT52 抗体の機能評価

HT52 抗体が、ヒト末梢血単核球、U373 細胞、TLR4/MD-2 安定発現 Ba/F3 トランスフェクタント細胞における、LPS 刺激誘導性のサイトカイン産生 (TNF- α , IL-6, IL-12)、補助刺激分子 CD86 の発現亢進、NF κ B の活性化を強く抑制することを明らかにした。

(2) LPS アナログや CD14 機能阻止抗体との併用効果

HT52 抗体と CD14 機能阻止抗体 1B12 との併用による抑制効果の増強を明らかにした。LPS アナログ lipid Iva についても同様に解析したが、アナログ自身の抑制作用が顕著ではなく、現在解析を継続している。

(3) HT52 抗体が認識する抑制性エピトープの同定

TLR4 細胞外領域 (sTLR4) の N 末端 50-190 アミノ酸を含む各種分泌型 LRR 発現ベクターを作製し、CHO 細胞で一過性発現させた。完全長 sTLR4 は予想通り、培養液中に分泌が認められたが、C 末端側を欠損させた sTLR4 欠損体は分泌が障害され、細胞内に局在した。また、完全長 sTLR4 が予想通り単量体で発現したのに対して、欠損体はジルフィド結合により多量体化していた。そのため、HT52 のエピトープ解析に支障が生じ、システインをセリンに置換した sTLR4(aa50-190)欠損変異体による解析、並びにヒト/マウス全長 sTLR4 キメラによる解析を進めている。

(4) HT52 抗体による TLR4 抑制機序の解析

HT52 抗体は、LPS と TLR4/MD-2 の結合を阻害しないが、LPS 刺激誘導性の TLR4 インターナリゼーションを抑制することを明らかにした。また、HT52 抗体が不活性化 TLR4/MD-2 二量体化を誘導することが示唆された。

(5) さらに強力な抑制型モノクローナル抗体の作製

TLR4 欠損マウスを免疫し、HT52 とエピトープがオーバーラップする抗体 HTB2 を HT52 とのクロスブロッキングスクリーニングにより選別した。NF κ B レポーターアッセイによる活性評価により、HTB2 抗体も HT52 同様に TLR4 抑制活性を有することが示唆された。

TLR4 欠損マウスを免疫して作製したモノクローナル抗体群のうち、HT52 とは全く異なる抗原認識を示すが、同等の強い抑制効果を持つ抗体 HT4 の作製に成功した。

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 10 件)

Tsuji M, Matsunaga H, Jinno D, Tsukamoto H, Suzuki N, Tomioka Y. A validated quantitative liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry method for monitoring isotopologues to evaluate global modified cytosine ratios in genomic DNA. *J Chromatogr B Analyt*

Technol Biomed Life Sci. 953-954:38-47, 2014. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.01.050. 査読有

Ihara H, Tsukamoto H, Taniguchi N, Ikeda Y. An Assay for α 1,6-Fucosyltransferase (FUT8) Activity based on the HPLC Separation of a Reaction Product with Fluorescence Detection. *Methods Mol Biol.* 1022:335-48, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-465-4_25. 査読有

Thompson LF, Tsukamoto H, Chernogorova P, Zeiser R. A Delicate Balance – CD73 generated adenosine limits the severity of graft vs. host disease, but also constrains the allogeneic graft vs. tumor effect. *OncImmunity.* 2(1): e22107, 2013. doi: 10.4161/onci.22107. 査読有

Tsukamoto H, Ihara H, Ito R, Ukai I, Suzuki N, Kimoto M, Tomioka Y, Ikeda Y. MD-2-dependent human Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies detect extracellular association of Toll-like receptor 4 with extrinsic soluble MD-2 on the cell surface. *Biochem Biophys Res Commun.* 440(1):31-36, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.004. 査読有

Ihara H, Hanashima S, Tsukamoto H, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Ikeda Y. Difucosylation of chitooligosaccharides by eukaryote and prokaryote α 1,6-fucosyltransferases. *Biochim Biophys Acta.* 1830(10):4482-4490, 2013. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.013. 査読有

Rachmawati NM, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Bahrin U, Tsukamoto H, Yanagibashi T, Nagai Y, Takatsu K, Ohta S, Kimoto M. Inhibition of antibody production in vivo by pre-stimulation of Toll-like receptor 4 before antigen priming is caused by defective B cell priming and not impairment in antigen presentation. *Int Immunol.* 25(2): 117-128, 2013. doi: 10.1093/intimm/dxs096. 査読有

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ohta S, Nagai Y, Ihara H, Miyake K, Ikeda Y, Kimoto M. Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation accounts for the low responder phenotype of

BALB/c B cells. *J Immunol.* 190(1):195-204, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1201047. 査読有

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ihara H, Ikeda Y, Kimoto M. Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs. *Int Immunol.* 24(8): 495-506, 2012. doi: 10.1093/intimm/dxs053. 査読有

Ito R, Takahashi M, Ihara H, Tsukamoto H, Fujii J, Ikeda Y. Measurement of peroxiredoxin-4 in rat tissues and implication of its serum level as a potential marker for hepatic disease. *Mol Med Report.* 6(2):379-384, 2012. doi: 10.3892/mmr.2012.935. 査読有

Tsukamoto H, Chernogorova P, Ayata K, Gerlach UV, Rughani A, Ritchey JW, Ganesan J, Follo M, Zeiser R, Thompson LF, Idzko M. Deficiency of CD73/ecto-5'-nucleotidase in mice enhances acute graft-versus-host disease. *Blood.* 119(19):4554-4564, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-09-375899. 査読有

[学会発表](計 8件)

津久井佑梨、陣野大輔、三島英換、鈴木直人、塚本宏樹、三枝大輔、伊藤邦彦、阿部高明、富岡佳久：抗 1-methyladenosine 抗体反応性分子の同定を目的とした tRNA 分子種の解析法に関する研究、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28-30 日、熊本

菅原大貴、田代匠、三枝大輔、塚本宏樹、奥田亜沙、小原祐太郎、鈴木直人、富岡佳久：リコカルコン A の COX-1 活性抑制メカニズムの解明、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28-30 日、熊本

Tsukamoto H, Ukai I, Kimoto M: MD-2-dependent and lipopolysaccharide-induced conformation change-sensitive monoclonal antibodies detect extracellular association of human toll-like receptor 4 with soluble MD-2 on cell surface. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、千葉

陣野大輔、鈴木直人、津久井佑梨、三枝大輔、三島英換、鈴木千登世、塚本宏樹、

阿部高明、富岡佳久：新規腎障害マーカーとしての 1-メチルアデノシンの検討、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台

中曽根正皓、鈴木直人、金光祥臣、塚本宏樹、富岡佳久：LC/ESI MS を用いた血清胸腺因子(FTS)定量法の開発、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ohta S, Nagai Y, Ihara H, Miyake K, Ikeda Y, Kimoto M: Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation may account for the low LPS responder phenotype of BALB/c B cells. 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡

Ihara H, Hanashima S, Tsukamoto H, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Ikeda Y: Enzymatic synthesis of di-fucosylated chitooligosaccharide by human and rhizobia α 1,6-fucosyltransferases. 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡

Rachmawati NM, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Bahrin U, Tsukamoto H, Ohta S, Kimoto M: Inhibition of antibody production in vivo by pre-injection of agonistic anti-TLR4/MD-2 monoclonal antibody before antigen priming is caused not by impairment in antigen presentation but by defective B cell priming. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、2012 年 12 月 5-7 日、神戸

〔図書〕(計 2 件)

Ikeda Y, Ihara H, Tsukamoto H, Gu J, Taniguchi N: Mannosyl (β -1,4)-glycoprotein β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (MGAT3); β 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III, GlcNAc-T III) (Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, eds), Springer Japan (Tokyo, Japan), In: *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, 2nd ed., 2014, p209-222.

Ihara H, Tsukamoto H, Gu J, Miyoshi E, Taniguchi N, Ikeda Y: Fucosyltransferase 8. GDP-fucose N-glycan core α 6-fucosyltransferase (FUT8) (Taniguchi N, Honke K,

Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, eds), Springer Japan (Tokyo, Japan), In: *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, 2nd ed., 2014, p581-596.

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：炎症治療用医薬組成物
発明者：木本雅夫、塚本宏樹、福留健司、常吉直子
権利者：佐賀大学
種類：特許
番号：特願 2012 135989
出願年月日：平成 24 年 6 月 15 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 宏樹 (TSUKAMOTO, HIROKI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：70423605

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：