

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460058

研究課題名(和文) TLR4刺激抗体による自己免疫疾患抑制機序の解明と新規予防・治療法の分子基盤

研究課題名(英文) A novel immunotherapy of autoimmune disease by agonistic toll-like receptor 4 antibody

研究代表者

塚本 宏樹 (TSUKAMOTO, HIROKI)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70423605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TLR4刺激抗体による1型糖尿病抑制機序の解明を通じて、新しい自己免疫疾患の発症予防・治療の基盤構築を目的にした。TLR4刺激抗体は、NODマウスの1型糖尿病の発症を予防するだけでなく、発症した1型糖尿病の自己免疫病態を寛解させることを明らかにした。TLR4刺激抗体の1型糖尿病抑制効果は、自己反応性T細胞の直接的抑制ではなく、樹状細胞への免疫寛容誘導や制御性T細胞、骨髄由来免疫抑制細胞の誘導を介した間接的作用機序であると考えられた。このような自然免疫を標的とした1型糖尿病の治療効果の発見は、既存の治療戦略とは異なる自己免疫疾患の新規治療法・治療薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Type 1 diabetes (T1D) is currently an incurable disease as other most autoimmune diseases. The pathology of T1D progresses from a silent prodromal phase to a clinical phase in which insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells is destructed by autoreactive T cells. In this study, we demonstrated that an agonistic monoclonal antibody (mAb) to Toll-like receptor 4 (TLR4) prevents from the onset of T1D by prophylactic treatment and also reverses the new-onset of T1D by therapeutic treatment in nonobese diabetic mice. An agonistic TLR4 mAb induces the tolerance in innate immunity via dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells, which results in the suppression of autoimmune T cells. In addition, regulatory T cells are also induced by agonistic TLR4 mAb in both periphery and pancreatic islets. These results propose that a tolerance induction through innate immunity by TLR4 mAb may be a novel immunological approach to cure the autoimmune pathology in T1D.

研究分野：免疫学

キーワード：Toll様受容体 自己免疫疾患 1型糖尿病 免疫寛容 機能性抗体 抗体医薬 自然免疫 骨髄由来免疫抑制細胞

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の治療は、ステロイドや免疫抑制剤による非特異的免疫抑制に依存した対症療法が主流であり、予防的治療、そして自己免疫病態を治癒・寛解誘導する治療法の開発が望まれている。膵特異的自己免疫疾患である1型糖尿病は、発症要因不明の難病である。1型糖尿病の病態は、自己反応性T細胞の膵島への浸潤による膵島炎に始まり、β細胞破壊が進行すると、高血糖や糖尿といった臨床症状が急速に顕在化する。現在、強化インスリン療法等の対症療法や膵島移植以外の有効な治療手段がなく、効果的な予防的治療、病態の進展阻止・寛解導入を達成する治療法の開発が望まれている。

樹状細胞等の抗原提示細胞に発現するToll様受容体(TLR)は、病原体関連共通分子構造(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)を認識することでサイトカインやリンパ球補助刺激分子の発現を増強し、自然免疫の賦活化とリンパ球による獲得免疫を誘導する。代表者は、TLR4によるグラム陰性菌細胞壁の主要構成成分であるリポ多糖の認識機構を明らかにすると共に、独自に作製した機能性モノクローナル抗体による免疫応答制御を基盤とした抗体免疫療法を開発を推進してきた。これらの研究成果から、機能性抗体によるTLRシグナルの増強あるいは減弱による、感染予防ワクチンや敗血症治療薬への可能性を見出している。また、刺激型TLR4抗体が、非自己外来抗原との同時投与によってアジュバント効果を示す一方、刺激型抗体の単独投与では抗原特異的抗体産生応答を著しく抑制することを明らかにしている(Rachmawati et al, *Int Immunol* 2013)。

Nonobese diabetic (NOD)マウスは、ヒト同様、疾患感受性遺伝子MHCクラスIIの感受性ハプロタイプI-A<sup>g7</sup>を有する、1型糖尿病のモデルマウスである。膵β細胞に発現する自己抗原を樹状細胞等が抗原提示し、自己反応性T細胞が活性化する免疫学的機序で発症する。申請者らを始め(Yang et al, *J Immunol* 2011)、自己免疫疾患の成因や治療研究に世界中で汎用されている。このNODマウスに対して1型糖尿病発症前の若齢期にフロイント完全アジュバントを投与すると1型糖尿病が抑制されることが古くから知られている。代表者は、フロイント完全アジュバントがPAMPsを豊富に含むことに着目し、TLR4刺激抗体による1型糖尿病予防効果を着想するに至る。

## 2. 研究の目的

本研究では、TLR4刺激抗体による1型糖尿病の予防・治療効果とその作用機序を解明し、自己免疫疾患の発症予防・治療的寛解導入法の新規治療基盤の構築を目的にした。

## 3. 研究の方法

### (1) TLR4刺激抗体による1型糖尿病の予防効果、進展抑制・寛解導入効果

NODマウスは、自己反応性T細胞等の炎症性細胞の浸潤による膵島炎を発症し、β細胞の破壊が進行するとインスリン分泌量が減少、高血糖を呈する。TLR4刺激抗体の投与時期と回数を検討し、1型糖尿病の予防効果、並びに進展抑制・寛解導入効果を明らかにする。

膵島炎未発症あるいは発症初期の投与による予防効果

β細胞破壊によるインスリン欠乏初期～中期の投与による、糖尿病の進展抑制・寛解導入効果

### (2) TLR4刺激抗体の自己免疫疾患抑制機序の細胞生物学的解析

TLR4刺激抗体により1型糖尿病が抑制されたNODマウスについて、以下を評価する。

膵島炎

自己反応性T細胞の免疫応答

樹状細胞、マクロファージ、B細胞、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T細胞、制御性T細胞等の免疫担当細胞の数的変化と機能変化

### (3) TLR4刺激抗体による自己免疫疾患抑制機序の解析

NOD-scidマウスにTLR4刺激抗体を投与後、糖尿病発症NODマウスから自己反応性T細胞を養子移入する。NOD-scidマウスにおける糖尿病発症抑制効果を解析し、TLR4刺激抗体による自然免疫を介した自己反応性T細胞の抑制機序を探索する。

TLR4刺激抗体を投与したNODマウスの脾臓・腸間膜リンパ節細胞をlineage markerにより分画し、自己反応性NOD T細胞と共にNOD-scidマウスに養子移入する。NOD-scidマウスの糖尿病が抑制されるか解析し、TLR4刺激抗体による自己免疫抑制機序を担う制御性細胞を探索する。

## 4. 研究成果

### (1) TLR4刺激抗体による1型糖尿病の予防効果、進展抑制・寛解導入効果

TLR4刺激抗体を3-4週齢の若齢NODマウスに2週おきに3回腹腔内投与することにより、有意に糖尿病の発症を抑制できることを明らかにした。また、尿糖の出現した糖尿病発症NODマウスにTLR4刺激抗体を1週間おきに2回投与すると、糖尿病の進展を抑制、寛解導入できることを明らかにした。一方、刺激活性を持たないTLR4コントロール抗体

では、このような糖尿病の予防効果、治療効果とも認められなかった。

(2) TLR4 刺激抗体の自己免疫疾患抑制機序の細胞生物学的解析

TLR4 刺激抗体による治療効果の認められた NOD マウスでは、膵島炎が軽減し、浸潤リンパ球数が減少していた。

TLR4 刺激抗体の投与により、樹状細胞における共刺激分子 CD80、CD86、CD40 の発現低下と血清 IL-2、IL-4、IL-33、IL-10 濃度の上昇が認められた。また、CD11b<sup>+</sup>細胞や制御性 T 細胞数、特に Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Nrp1<sup>+</sup> 制御性 T 細胞が増加していた。

TLR4 刺激抗体により CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞を前処置すると、その T 細胞刺激活性は減弱した。一方、TLR4 刺激抗体は CD3 抗体刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化を直接的には抑制することはできなかった。

(3) TLR4 刺激抗体による自己免疫疾患抑制機序の解析

T 細胞と B 細胞を欠損した NOD-scid マウスに自己反応性 NOD T 細胞を養子移入すると 1 型糖尿病を発症したが、TLR4 刺激抗体を事前投与した NOD-scid マウスでは糖尿病の発症が抑制された。この結果から、TLR4 刺激抗体は自己反応性 T 細胞を直接標的とせず、非リンパ球系細胞を介した間接的作用機序により、自己反応性 T 細胞を抑制し、1 型糖尿病を予防、治療すると考えられた。

TLR4 刺激抗体による抗原特異的な T 細胞抑制機序を解析するために、MHC クラス I、II 拘束性に OVA 部分配列を特異的に認識する T 細胞受容体組換えマウス OT-I と OT-II を用いて解析を行った。OT-I と OT-II マウス由来の CD8<sup>+</sup>と CD4<sup>+</sup> T 細胞を CFSE 標識し、C57BL/6 マウスに養子移植後、OVA に対する抗原特異的な T 細胞応答をフローサイトメトリーで解析した。TLR4 刺激抗体を投与したマウスでは OVA 特異的な T 細胞分裂が有意に抑制していた。

TLR4 刺激抗体を投与すると骨髄由来免疫抑制細胞と同じ細胞表面マーカーを持つ Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> 細胞が末梢血、脾臓、骨髄で増加することを明らかにした。脾臓 Gr1<sup>+</sup> 細胞と T 細胞を共培養し CD3/CD28 抗体で刺激したところ、T 細胞の増殖が有意に低下していた。これらの結果から、TLR4 刺激抗体が非リンパ球系細胞である骨髄由来免疫抑制細胞の誘導を介して T 細胞を間接的に抑制していることが示唆された。

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12件)

Jinno D, Kanemitsu Y, Saitoh K, Nankumo S, Tsukamoto H, Matsumoto Y, Abe T, Tomioka Y. Rapid and selective simultaneous quantitative analysis of modified nucleosides using multi-column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Sci Technol*. 8:1-9, 2017, DOI: 10.1186/s40543-017-0110-4 (査読有).

Numasaki M, Tagawa M, Tsukamoto H, Tomioka Y, Ohnui T, Arai H. Immunogenotherapy of Cancer Using Recombinant Adenovirus Expressing Type III interferon IL-28A or IL-29. *Immunotherapy*. 2(4): 1000131, 2016, DOI: 10.4172/2471-9552.1000131 (査読有).

Numasaki M, Tsukamoto H, Tomioka Y, Nishioka Y, Ohnui T. Heterodimeric cytokine, consisting of IL-17A and IL-17F, promotes migration and capillary-like tube formation of human vascular endothelial cells. *Tohoku J Exp Med*. 240(1):47-56, 2016, DOI: 10.1620/tjem.240.47 (査読有).

Numasaki M, Tagawa M, Takagi K, Suzuki T, Nishioka Y, Ohnui T, Tsukamoto H, Tomioka Y, Haswgawa K. Antitumor immunity elicited by direct intratumoral administration of a recombinant adenovirus expressing either IL-28A/IFN- $\lambda$ 2 or IL-29/IFN- $\lambda$ 1. *Cancer Gene Ther*. 23(8):266-77, 2016, DOI: 10.1038/cgt.2016.29 (査読有).

Endo S, Yoshitake H, Tsukamoto H, Matsuura H, Kato K, Sakuraba M, Takamori K, Fujiwara H, Takeda S, Araki Y. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells. *Sci Rep*. 6:23616, 2016, DOI: 10.1038/srep23616 (査読有).

森川みき、金光祥臣、塚本宏樹、富岡佳久: イナビル®添加乳糖に夾雑する乳タンパク質によってアナフィラキシーを呈した1例、*アレルギー*、65巻3号 200-205、2016年、DOI: 10.15036/arerugi.65.200 (査読有)

Tsukamoto H, Ukai I, Yamagata Y, Takeuchi S, Kubota K, Kozakai S, Suzuki N, Kimoto M, Tomioka Y. Leucine-rich repeat 2 of human Toll-like receptor 4 contains the binding site for inhibitory monoclonal antibodies. *FEBS Lett*. 589(24 Pt

B):3893-3898, 2015, DOI:  
10.1016/j.febslet.2015.11.018 ( 査読有 ) .

Yago T, Tsukamoto H, Liu Z, Wang Y, Thompson LF, McEver RP. Multi-inhibitory effects of A<sub>2A</sub> adenosine receptor signaling on neutrophil adhesion under flow. *J Immunol.* 195(8):3880-3889, 2015, DOI: 10.4049/jimmunol.1500775 ( 査読有 ) .

Bednar KJ, Tsukamoto H, Kachapati K, Ohta S, Wu Y, Katz JD, Ascherman DP, Ridgway WM. Reversal of new-onset type 1 diabetes with an agonistic TLR4/MD-2 monoclonal antibody. *Diabetes.* 64(10):3614-3626, 2015, DOI: 10.2337/db14-1868 ( 査読有 ) .

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 ) .

Tsukamoto H. Extracellular adenosine is a therapeutic target for limiting graft-versus-host disease and enhancing the graft-versus-tumor effect against hematopoietic malignancy. *Yakugaku Zasshi.* 134(10):1021-7, 2014 ( 査読有 ) .

Tsukamoto H. Immune regulation via the generation of extracellular adenosine by CD73. *Seikagaku.* 86(6):766-9, 2014 ( 査読有 ) .

[学会発表](計17件)

小坂井沙緒、小林洋平、金光祥臣、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久： Toll様受容体4シグナルによるGr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞誘導を介した抗原特異的抗体産生抑制機序(26X-am02S) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

久保田佳苗、武内偲乃、鶴飼一步、小坂井沙緒、金光祥臣、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久： LPS-binding proteinはToll様受容体4の二量体化・内在化を介してTRIF依存的IKKε/TBK1/IRF3経路を活性化する(26X-am01S) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

山形由貴、鶴飼一步、金光祥臣、小林洋平、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久：

不活性型二量体構造の誘導を介した抑制型ヒトToll様受容体4抗体の新規作用機序(25X-pm03S) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

齋藤一樹、金光祥臣、田中晃佑、鈴木千登世、阿部高明、塚本宏樹、松本洋太郎、富岡佳久： LC-MSを用いた細胞内サイクリックADPリボース高感度定量法の構築(25P-am09) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

小林洋平、小坂井沙緒、久保田佳苗、武内偲乃、金光祥臣、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久： 異なるシグナル誘導活性を持つToll様受容体4刺激抗体による抗原特異的抗体産生抑制効果(ポスター26PB-am056S) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

山形由貴、大久保美咲、鶴飼一步、金光祥臣、松本洋太郎、塚本宏樹、富岡佳久： ヒトToll様受容体4活性化に必要なleucine-rich repeat 13は抑制抗体によって認識される(ポスター26PB-am083S) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

齋藤一樹、田中晃佑、鈴木千登世、阿部高明、金光祥臣、塚本宏樹、松本洋太郎、富岡佳久： サイクリックADPリボース安定同位体の合成(ポスター25PA-am108) *日本薬学会第137年会*、2017年3月25-27日、仙台市(仙台国際センター・東北大学)

武内偲乃、久保田佳苗、小坂井沙緒、塚本宏樹、富岡佳久： LPS-binding proteinはリポ多糖によるToll様受容体4の内在化を誘導する(OB-05) *第55回日本薬学会東北支部大会*、2016年9月25日、郡山市(奥羽大学)

齋藤一樹、金光祥臣、松本洋太郎、塚本宏樹、鈴木千登世、阿部高明、富岡佳久： LC-MSを用いた高感度サイクリックADPリボース定量法の構築(OD-05) *第55回日本薬学会東北支部大会*、2016年9月25日、郡山市(奥羽大学)

金光祥臣、森川みき、塚本宏樹、松本洋太郎、森川昭正、富岡佳久： イナビル®によるアナフィラキシー症例報告と添加乳糖に夾雑するアレルゲン乳タンパク質の同定(17-10-O21-08) *第26回日本医療薬学会年会*、2016年9月17-19日、

京都市(国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都)

金光祥臣、森川みき、塚本宏樹、森川昭正、富岡佳久：イナビル®によるアナフィラキシー症例報告と添加乳糖に夾雑するアレルゲン乳タンパク質の同定(17-10-O21-08) 第146回宮城県病院薬剤師会学術研究発表会、2016年3月6日、仙台市(東北大学)

陣野大輔、齋藤一樹、南雲信之介、金光祥臣、塚本宏樹、松本洋太郎、三島英換、鈴木千登世、阿部高明、富岡佳久：LC/MS/MSによる修飾核酸一斉定量法の構築と応用 第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、矢巾町(岩手医科大学矢巾キャンパス)

鵜飼一步、塚本宏樹、山形由貴、鈴木直人、富岡佳久：新規ヒトTLR4モノクローナル抑制抗体のエピトープ解析(ポスター28PB-pm100S) 日本薬学会第135年会、2015年3月26-28日、神戸市(神戸学院大学・兵庫医療大学)

武内偲乃、塚本宏樹、鵜飼一步、山形由貴、久保田佳苗、小坂井沙緒、富岡佳久：CD14のLPS結合能とTLR4内在化の機能連関(ポスター28PB-pm115S) 日本薬学会第135年会、2015年3月26-28日、神戸市(神戸学院大学・兵庫医療大学)

塚本宏樹、富岡佳久：機能性Toll様受容体4抗体による敗血症治療と病態解析への応用 第16回応用薬理シンポジウムシンポジスト、2014年12月4-5日、松島町

山形由貴、塚本宏樹、鵜飼一步、鈴木直人、富岡佳久：機能抑制型抗ヒトTLR4モノクローナル抗体は不活性型TLR4二量体構造を誘導する(ポスター4P-452) 第87回日本生化学会大会、2014年10月15-18日、京都市(国立京都国際会館)

陣野大輔、齋藤一樹、由利謙典、武川力永、塚本宏樹、鈴木直人、阿部高明、富岡佳久：シーストレスインターフェイスを用いたCE-MSによる低分子化合物分析法の検討 第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき市(いわき明星大学)

〔図書〕(計3件)

塚本宏樹：Toll様受容体4抑制抗体の作用機序とそのエピトープ、細胞、48号4巻(2016年4月号、2016年3月31日刊行) p204-206、ニューサイエンス社

塚本宏樹：【研究戦略・YAKU学～研究現場から～】機能性抗体によるToll様受容体の活性制御を基盤とした敗血症治療薬開発、薬事日報、第11542号(2015年3月2日) p8、薬事日報社

Takahashi T, Saigusa D, Takeda C, Saito K, Suzuki N, Tsukamoto H, Tomioka Y: Determination of Sphingolipids by LC-MS/MS (Yokomizo T, Murakami M, eds). In: *Bioactive Lipid Mediators-Current Reviews and Protocols*, p353-370, Springer Japan, Tokyo, Japan. 2015.

〔その他〕

東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野ホームページ  
[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~gankagak/Gann\\_Top.html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~gankagak/Gann_Top.html)

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

富岡 佳久 (TOMIOKA, Yoshihisa)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号： 00282062

(4) 研究協力者

( )