

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18115

研究課題名（和文）がん免疫逃避環境を改善しうる新規受容体指向性サイトカインの創製とがん治療への応用

研究課題名（英文）Identification of novel receptor-selective cytokine to overcome tumor immune escape mechanisms

研究代表者

野村 鉄也 (NOMURA, Tetsuya)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40582854

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん免疫療法の効果発現の妨げとなる免疫逃避機構の克服を目指した創薬開発の研究を行った。免疫抑制細胞の機能増強に関する腫瘍壊死因子TNFに着目しファージディスプレイ法を駆使することで、結合する複数のレセプターのうちR2を介した作用のみを選択的に阻害することができるTNF構造変異体アンタゴニスト候補クローンの創出に成功した。得られた受容体指向性アンタゴニストはがん免疫逃避機構の克服に向けた治療薬になることが期待される。今後は、より詳細な機能特性を評価するとともに、in vivoにおける抗腫瘍効果の検討を通じて、有効性を評価していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫逃避機構は、近年画期的がん治療法として期待されている免疫療法の効果発現の障壁となることから、克服は喫緊の課題となっている。その点本研究は、免疫逃避機構の中心的役割を担う免疫抑制細胞の機能を直接的に阻害することができる機能性タンパク質の創出を目指したものである。本研究で開発したタンパク質は、既存の免疫チェックポイント阻害薬とは異なる機序で作用しうる新たな治療薬となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, creation of novel drug to overcome immune escape mechanism in tumor microenvironment was performed. We succeeded in identifying TNFR2-selective antagonistic mutants with phage display technique. TNFR2-selective antagonistic mutants will be a promising drug to enhance the efficacy of cancer immunotherapy.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ファージディスプレイ法 免疫逃避機構 TNF TNFR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は、外科療法・放射線療法・化学療法のがん三大療法にかわる第四の治療法として注目される治療法である。がん免疫療法は、生体の免疫機能を利用してがん組織に対する特異的な免疫を効率よく誘導することによる治療であり、これまでの研究では如何にして効果的に免疫を誘導可能であるのかに焦点が絞られてきた。一方で近年、がん組織ではそうした抗腫瘍免疫に対する抵抗性を生ずる免疫逃避機構と呼ばれる機構が存在することが報告されてきた。特に免疫逃避機構には制御性 T 細胞 (Treg) や免疫抑制性細胞 (MDSC) などの免疫抑制細胞が重要な働きをしており、樹状細胞による T 細胞への抗原提示や T 細胞の増殖・活性化を抑制することで抗腫瘍免疫を抑えることが報告されている。したがって、これら免疫抑制細胞の機能を抑制することができれば、がん免疫逃避機構の克服に繋がると期待される。

2. 研究の目的

ライフサイエンス研究の進展に伴い、ノックアウトマウスの開発研究が盛んに行われ、様々な分子の機能的・形態的役割が明らかとなりつつある。その点近年、腫瘍壊死因子 (TNF) の Treg や MDSC の細胞表面に存在する II 型受容体 (TNFR2) を介した作用が、免疫抑制機能の増強に関与していることが報告されてきた。一方で、I 型受容体 (TNFR1) は主に上皮系の細胞に高発現しており、細胞に対する抗腫瘍作用を有することが古くより明らかとなっている。したがって、TNF による TNFR2 を介した作用を選択的に抑制することができれば、極めて有望な免疫逃避機構の制御薬になると期待される。そこで我々は、独自の機能性人工タンパク質創出技術であるファージディスプレイ法を駆使することで、TNF のアミノ酸を改変することにより TNFR2 に選択的に結合するものの活性を示さない受容体選択的 TNF 構造変異体アンタゴニストの開発研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) TNF 構造変異体ライブラリの構築

野生型 TNF のレセプターとの結合に関与する 9 つのアミノ酸 (29, 31-33, 143, 145-147, 149 番目) のコドン PCR 法により NNK 配列へと変換し、他の 20 種類のアミノ酸に網羅的に置換することで、様々な結合特性を有する構造変異 TNF から構成されるライブラリを構築した。これら遺伝子ライブラリをファージゲノムに挿入し、構造変異 TNF ファージライブラリを構築した。

(2) バイオパンニング法を駆使した TNFR2 結合選択的アンタゴニストの選別

構造変異 TNF ファージライブラリの中から、あらかじめイムノチューブに固相化しておいた TNFR2 への結合親和性を利用したバイオパンニング法により、TNFR2 に強く結合する変異体を増幅した。その際、TNFR1 に結合性の高いクローンが濃縮されないようにするために、ライブラリにあらかじめ TNFR1 を加えておき、TNFR2 に作用した。その後、モノクローン化後の大腸菌培養上清を用いて、ELISA 法により各クローンの各レセプターへの結合力を測定した。さらに TNFR1 (R1) を介した生物活性をマウス繊維芽細胞である L-M 細胞の細胞傷害性を指標に評価した。また TNFR2 を介した活性は、研究協力者らが開発した細胞外領域が TNFR2、細胞内領域が Fas であるキメラレセプターを強制発現する脂肪前駆細胞の細胞傷害性を指標に行った。以上のスクリーニングにより TNFR2 に選択的に結合するものの活性を示さない変異体を単離した。

(3) マウス骨髄細胞を用いた MDSC の分化誘導と TNF による *in vitro* 増殖法の構築

マウス脛骨・腓骨より骨髄細胞を単離し、GM-CSF 存在下において 4 日間培養した。その後 CD11b, Gr-1 に対する抗体を修飾した磁気ビーズを利用して MDSC を分離した。さらに、TNFR2 指向性アンタゴニストのスクリーニング法の構築を目指して TNF による MDSC の増殖を目指した野生型 TNF の作用濃度を検討した。

(4) His タグ付き TNF 構造変異体タンパク質の発現精製

TNF 構造変異体遺伝子の C 末端に His タグ遺伝子を導入したプラスミドを構築し大腸菌株 BL21 に導入した。IPTG 存在下 25℃ にて 4 時間振盪培養後、大腸菌を遠心分離し得られたペレットにリゾチームを加え、超音波処理によりタンパク質抽出液を回収した。ニッケルカラムを用いたアフィニティー精製を行い、His タグタンパク質を精製した。

(5) TNFR2 結合選択的アンタゴニスト精製タンパク質による TNFR1 を介した生物活性評価

精製した His タグ付き TNFR2 結合選択的アンタゴニストを用いて、L-M 細胞に対する細胞傷害活性の評価を行った。

4. 研究成果

独自の機能性タンパク質創出技術であるファージディスプレイ法を駆使することで、TNF 中のレセプターとの結合に関与する 9 つのアミノ酸を網羅的に他の 20 種類のアミノ酸へと置換した 1 億種類以上の構造変異体からなるライブラリの構築に成功した。さらにこの中から TNFR2 への結合親和性を利用したパンニング法を 3 回繰り返し行い、TNFR2 に高い結合性を示すクローンの濃

縮に成功した。モノクローン化後の各クローンの培養上清を用いたスクリーニングの結果、TNFR2に選択的に結合し活性を示さないクローンを3種類同定することに成功した。一方で、*in vitro*におけるMDSCのTNFによる増殖に対する抑制活性を評価するためのスクリーニング法の構築にも成功した。また得られた候補クローンに関して詳細な特性を評価する目的でHisタグを共発現する精製タンパク質の創出にも成功した。候補クローンのTNFR1を介した生物活性を評価したところ、野生型TNFの作用と比較してほとんど活性を示さないことが確認された。このようにファージディスプレイ法を駆使することで、2種類の受容体に結合するTNFの受容体結合性・活性を改変した構造変異体の創出に成功した。また得られた候補タンパク質は免疫逃避機構の改善に資すると期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamakawa M, Nomura T, Yamagata M, Hirai T, Koizumi N, Maruyama K, Utoguchi N	4. 巻 2(6)
2. 論文標題 DC-based immunotherapy using vascular endothelial cells cultured in conditioned medium as a vaccine antigen exerts an anti-tumor effect by inhibiting angiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB reports	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Satoh A, Hirai T, Koizumi N, Hatakeyama S, Watanabe A, Nomura T, Sakurai F, Mizuguchi H, Utoguchi N	4. 巻 2(6)
2. 論文標題 Adenovirus fiber can distribute itself to the cell surface without membrane damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB reports	6. 最初と最後の頁 113 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nomura Tetsuya, Yamakawa Makie, Shimaoka Takuto, Hirai Takamasa, Koizumi Naoya, Maruyama Kazuo, Utoguchi Naoki	4. 巻 42
2. 論文標題 Development of Dendritic Cell-Based Immunotherapy Targeting Tumor Blood Vessels in a Mouse Model of Lung Metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 645 ~ 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00737	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 野村 鉄也	4. 巻 45
2. 論文標題 免疫逃避機構の克服を目指した2型受容体選択的TNFアンタゴニストの創製	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical science digest	6. 最初と最後の頁 24 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nomura T, Hirata K, Shimaoka T, Yamakawa M, Koizumi N, Suzuki R, Maruyama K, Utoguchi N	4. 巻 40
2. 論文標題 Cancer vaccine therapy using tumor endothelial cells as antigens suppresses solid tumor growth and metastasis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1661-1668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00145	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 野村 鉄也, 宇都口 直樹	4. 巻 32
2. 論文標題 がん血管を標的としたがん免疫療法の開発	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 192 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2745/dds.32.192	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 野村 鉄也	4. 巻 78
2. 論文標題 若手研究者紹介「安全で有効な製剤の開発を目指して」	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 薬剤学	6. 最初と最後の頁 72 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.14843/jpstj.78.72	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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野村 鉄也, 井上 隼輔, 多田 遥子, 井上 雅己, 小泉 直也, 鎌田 春彦, 角田 慎一, 宇都口 直樹
2. 発表標題 がん免疫逃避機構の克服を目指したII型受容体選択的TNFアンタゴニストの創製
3. 学会等名 日本薬学会 140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 隼輔, 野村 鉄也, 多田 遥子, 井上 雅己, 平井 孝昌, 小泉 直也, 鎌田 春彦, 角田 慎一, 宇都口 直樹
2. 発表標題 がん免疫逃避機構の克服を目指したR2選択的TNF構造変異体アンタゴニストの創出
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 鉄也, 仁井田 怜子, 國友 瑞穂, 宮崎 賢太郎, 山川 真希枝, 平井 孝昌, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 In vitro 管腔形成モデルを用いたがん擬似血管の特性解析に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会 139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 鉄也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 Development of dendritic cell-based immunotherapy using tumor endothelial cells as vaccine antigens
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山川 真希枝, 野村 鉄也, 山形 真理子, 平井 孝昌, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 腫瘍血管内皮細胞を標的としたワクチン療法の有用性評価と免疫応答の解析
3. 学会等名 第34回日本DDS学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村 鉄也, 山川 真希枝, 平井 孝昌, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 腫瘍組織より分離した腫瘍血管内皮細胞を利用したがん免疫療法の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村 鉄也, 山川 真希枝, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 がん血管を標的とした樹状細胞免疫療法の開発
3. 学会等名 第33回日本DDS学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村 鉄也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 がん血管を抗原として利用したがん免疫療法はがん増殖や転移を効果的に抑制する
3. 学会等名 第11回医療薬科学若手シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村 鉄也, 山川 真希枝, 平井 孝昌, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 n vitroがん血管モデルを用いた免疫療法の新生血管に対する影響の評価
3. 学会等名 日本薬学会 138年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山川 真希枝, 野村 鉄也, 平井 孝昌, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 腫瘍血管内皮細胞を標的とした樹状細胞ワクチン療法による抗腫瘍効果と抗原特異的免疫誘導能の解析
3. 学会等名 日本薬学会 138年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野村 鉄也, 宇都口 直樹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 5
3. 書名 DDS先端技術の製剤への応用開発	

〔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