

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14877

研究課題名(和文)2型TNF受容体の選択的クラスタリング作用に基づく制御性T細胞の新規増幅法

研究課題名(英文)Novel Treg expansion method based on TNFR2-selective receptor clustering.

研究代表者

井上 雅己(Inoue, Masaki)

神戸学院大学・薬学部・助手

研究者番号：80757097

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、免疫疾患や臓器移植後の拒絶反応、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の治療等を目指して、2型TNF受容体(TNFR2)を標的とする制御性T細胞(Treg)の新規増幅法の開発を目的とした。クラスタリング作用による強いTNFR2シグナル伝達を可能にするため、独自に同定したTNFR2アゴニストに、一本鎖TNFR2抗体を融合させたイムノサイトカインを創製した。TNF受容体への結合性やTNFR2を介したシグナル伝達活性を解析した結果、TNFR2選択結合性を保持したまま、シグナル伝達が増強した。ヒトTregに対する増幅効果も認められた。従って、新規Treg増幅分子として有用であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本イムノサイトカインは、TNFR2アゴニストが刺激を与えつつ、抗体が受容体同士を相互に架橋するという二重特異性をもつ、新しい作用機序のTreg増幅分子である。膜結合型TNF特有のTNFR2シグナル伝達様式である受容体クラスタリング作用を誘導できるため、強力なTNFR2シグナルを介した、効果的かつ選択的なTreg増幅が可能となった。末梢性免疫寛容の誘導に重要となる、最も免疫抑制活性の高いエフェクターTregを増幅できた。新規モダリティの治療薬候補として期待でき、学術的・社会的に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文):We established a regulatory T cells (Tregs) expansion method based on TNFR2-selective receptor clustering effect for the treatment of immune diseases, rejection after organ transplantation, and graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. We identified a TNFR2-selective agonistic TNF mutant in a previous study. In this study, we created a novel immunocytokine which was fused TNFR2 agonist and TNFR2 scFv. The immunocytokine enhanced a signal transduction activity via TNFR2 with sustaining the TNFR2 selective binding activity. Furthermore, this molecule significantly expanded human effector Tregs ex vivo. Therefore, we considered that the immunocytokine would be beneficial as a novel Treg expander.

研究分野：創薬化学

キーワード：腫瘍壊死因子 TNF 制御性T細胞 TNFR2 イムノサイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチや多発性硬化症、1型糖尿病などの免疫疾患では、発症・悪化に自己反応性T細胞が関与する。また、臓器移植後の拒絶反応ではレシipientのT細胞が、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(GvHD)ではドナー由来T細胞が、非自己の細胞や組織に対して攻撃する。従って、末梢性の免疫バランスの破綻がこれらの病態の原因である。この状態を是正するため、近年、免疫抑制機能に特化したリンパ球である制御性T細胞(Treg)を「生体内で直接増幅する」、もしくは「生体外で増幅後に移入する」ことで、細胞障害性T細胞などのエフェクターT細胞に対する免疫寛容誘導を強化する新たな治療法が期待されている。

現在、Tregを生体内/外で増幅させる方法は、Tregに発現するCD25(IL-2受容体)に対するIL-2の利用や、mTOR阻害剤であるラパマイシンの投与など、いくつか存在する。しかし、Treg増幅活性が十分でないことや、ヘテロ不均一に増幅することなどの課題が残っており、より強力かつ選択的にTregを増幅できる方法論が求められている。

我々は、これまで、Tregに高レベルかつ高頻度に発現する2型TNF受容体(TNFR2)を標的とし、独自技術により作製したTNFR2選択的アゴニストTNF変異体タンパク質(R2-7アゴニスト)が、Tregを特異的に増幅・活性化できることを見出してきた。また、その研究過程で、(i)TNF受容体K0マクロファージに強制発現させた膜結合型TNFや、(ii)FLAGタグ融合アゴニストと抗FLAGタグ抗体の共刺激による膜結合TNF様活性が、TNFR2シグナルを増強させることを示し、膜結合型TNF特有のTNFR2シグナル伝達様式である、細胞膜上でのTNFR2集合化(クラスタリング)が、強いシグナル誘導に有用であることを見出している。

従って、TNFR2クラスタリングを惹起し、Tregを強力かつ選択的に増幅・活性化できれば、免疫寛容誘導を強化できる新たな免疫抑制療法の開発へと繋がる。そこで、R2-7アゴニストのTreg増幅効率を増強するため、分子構造の最適化を検証した。

2. 研究の目的

本研究では、生体内/外で効果的かつ選択的にTregを増幅し、過剰な免疫応答を抑制する新たな方法論の確立を目指した。そこで、TNFR2クラスタリング効果によりTNFR2シグナルを強力に活性化できる新規モダリティ分子として、「TNFR2アゴニストタンパク質(R2-7アゴニスト)」と「TNFR2に対する一本鎖抗体(TNFR2 scFv)」を融合したイムノサイトカイン「TNFR2-ICK」を創製した。TNFR2-ICKは、R2-7アゴニストが受容体に刺激を与えつつ、scFvが受容体間を相互に架橋するという二重特異性をもち、膜結合型TNF特有のTNFR2シグナル伝達様式である受容体クラスタリング作用を誘導できるため、強力なTNFR2シグナルを介した、効果的かつ選択的なTreg増幅が期待できる。独自技術を組み合わせることで創製できる、二重特異性と機能性を両立した新規イムノサイトカインである。in vitroでの特性解析及びex vivoでのTreg増幅効果を測定することで、TNFR2-ICKの有用性を検証した。

3. 研究の方法

TNFR2-ICKの遺伝子合成

抗ヒトTNFR2抗体のVL、VH遺伝子配列を取得し、両者をGSリンカーで連結したTNFR2 scFv遺伝子配列を決定した。また、R2-7アゴニストの3量体構造をGSリンカーで連結した一本鎖R2-7アゴニスト(scR2-7)を決定した。最終的に両者リンカーで連結したイムノサイトカインTNFR2-ICKを設計した。さらに、N末端に分泌シグナル配列、C末端にHis-tagを付加した全長遺伝子を人工合成した。またコントロールとして、TNFR2 scFv及びscR2-7の遺伝子をPCRによって取得した。

TNFR2-ICKタンパク質の発現・精製

TNFR2-ICKの遺伝子を哺乳類発現用プラスミド(pcDNA3.1)に挿入し、発現ベクターとして、pcDNA3.1-TNFR2-ICKを作製した。この発現ベクターをリポフェクション(ExpiFectamine 293 reagent)によってExpi293F細胞(Invitrogen)に導入した後、37℃で7日間培養し、培養液中にタンパク質を発現させた。培養上清を回収し、His-tagアフィニティクロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィー(GEヘルスケア)の2段階精製を行うことでタンパク質を単離精製した。また、同様の方法により、コントロールタンパク質であるTNFR2 scFv及びscR2-7を作製した。

型/型TNFレセプターへの結合性

表面プラズモン共鳴(SPR)法によるカイネティクス解析は、BIAcore X100(GEヘルスケア)を用いて行った。ヒトTNFR1もしくはヒトTNFR2のFc融合タンパク質をCM5センサーチップに固定化した。HBS-EPランニングバッファーで希釈した野生型ヒトTNF(wtTNF)及びR2-7、scR2-7、TNFR2 scFv、TNFR2-ICK(1.2, 3.6, 10.9, 32.7, 98.0 nM)を用いて、2分間の結合状態と2分間の解離状態を測定した。BIAevaluation X100を用いて、1:1結合モデルにおける結合解離パラメーターを算出した。

TNFR2 を介した生物活性

TNFR2/Fas キメラ受容体を強制発現させたマウス脂肪前駆細胞(TNFR2/Fas-preadipocyte)は、D-MEM (10% FCS 含有) を用いて培養した。96 ウェルプレートに 3×10^4 cells/well の細胞を播種した後、段階希釈したヒト wtTNF 及び R2-7, scR2-7, TNFR2 scFv, TNFR2-ICK を加えて、37 で培養した。48 時間後、WST-8 アッセイを行い、細胞生存率 (%) を測定した。

TNFR2-ICK の Treg 増幅作用

96 ウェルプレートに抗 CD3 抗体 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) を固定化した後、ヒト末梢血単核球 (PBMC) 5×10^4 cells/well を播種した。抗 CD28 抗体 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) とともに、TNFR2-ICK (3 $\mu\text{g/ml}$) を加えて、37 で培養した。72 時間後、細胞を回収し、CD3 及び CD4, CD25, CD45RA, TNFR2 を蛍光標識した。フローサイトメトリーにて解析を行い、Treg の割合を測定した。

4. 研究成果

TNFR2-ICK の遺伝子合成

分泌シグナルと His-tag を含む TNFR2-ICK の全長の遺伝子配列を作製した。クローニングベクターに組換えた後、シーケンス解析を行った結果、目的の配列が得られたことを確認した。また、TNFR2 scFv 及び scR2-7 の遺伝子も問題なく得ることができた。

TNFR2-ICK タンパク質の発現・精製

分子量 17 kDa の単量体 3 つが会合した R2-7 アゴニストや、分子量 25 kDa の TNFR2 scFv は、大腸菌発現系を用いて作製できる。しかし、これらを融合したイムノサイトカインは、分子量の増大と構造の複雑化のため、大腸菌での発現は困難と予想された。そこで、哺乳類発現系を用いたタンパク質作製を試みた。pcDNA3.1-TNFR2-ICK を導入した Expi293F 細胞の培養上清をクロマトグラフィーにて分離した結果、適切な分子量に相当する溶出時間にピークが認められた。高分子量側に認められた凝集タンパク質のピークは除いて、TNFR2-ICK を分取した。従って、哺乳類細胞発現系を用いて問題なくタンパク質を作製できることが分かった。コントロールタンパク質である TNFR2 scFv 及び scR2-7 も同様に作製できた。

型/型 TNF レセプターへの結合性

イムノサイトカイン構造による TNFR1, TNFR2 に対する結合力の変化を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によって測定した。TNFR2-ICK は、R2-7 に比べて、TNFR2 に対する結合力が増大したことがわかった。一方で、TNFR1 に対しては結合しなかった。また、TNFR2 scFv も TNFR2 に結合した。従って、TNFR2-ICK は、アゴニストと scFv を融合したことで、TNFR2 選択的結合性を保持しながら、結合活性が向上したと考えられた。

TNFR2 を介した生物活性

イムノサイトカイン構造による TNFR2 を介した生物活性の変化を調べた。TNFR2/Fas-preadipocyte を用いた細胞傷害アッセイの結果、TNFR2-ICK は濃度依存的に細胞死を誘導した。さらに、野生型ヒト TNF や R2-7 アゴニストに比べて、10 倍以上の高い活性を示した。また、TNFR2 scFv だけでは TNFR2 を介した細胞障害活性は認められなかった。従って、TNFR2-ICK によるクラスターリング効果によって、TNFR2 シグナル伝達活性が向上したと考えられた。

TNFR2-ICK の Treg 増幅作用

ヒト PBMC に TNFR2-ICK を作用させた結果、Treg の増殖が認められた。特に、CD4⁺ CD25^{high} CD45RA⁻ エフェクター Treg が優位に増加した。エフェクター Treg は、Treg の中で最も免疫抑制活性が高い画分であり、TNFR2 が高レベルに発現する。R2-7 アゴニストでは、Treg の増加は認められなかった。従って、TNFR2-ICK による TNFR2 シグナルの増強が Treg の増殖に有用であることが示唆された。

まとめ

本研究で新たに創製した、TNFR2 を標的とする機能性イムノサイトカイン「TNFR2-ICK」は受容体クラスターリングの誘導により、R2-7 アゴニストに比べて、TNFR2 シグナル伝達が増強されることがわかった。また、ヒト PBMC を用いた *ex vivo* の検討において、TNFR2-ICK は、野生型ヒト TNF や R2-7 アゴニストに比べて、エフェクター Treg の増幅効果が認められた。従って、TNFR2 アゴニストの構造最適化として、TNFR2 scFv を融合したイムノサイトカイン構造は有用であると考えられた。TNFR2-ICK は、新たな Treg expander として活用でき、免疫疾患等の治療薬候補になると期待できる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1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 -
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 -
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masaki Inoue, Haruhiko Kamada, Shin-ichi Tsunoda
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 Sydney 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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 (京都)
4. 発表年 2019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 (京都)
4. 発表年 2019年～2020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～2020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 2型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～2020年

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 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Inoue M, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S.
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 The 45th Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 井上雅己、大崎奈都喜、國重将大、三木望稔里、小野寺章、河合裕一、鎌田春彦、堤 康央、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 - 一本鎖化及びFc融合の有効性の検討 -
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年～2019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 2018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 2018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 2018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 2018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
研究協力者	角田 慎一 (TSUNODA Shin-ichi)		
研究協力者	鎌田 春彦 (KAMADA Haruhiko)		