

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03484

研究課題名(和文)LILRB4による免疫チェックポイント機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of LILRB4-mediated immune checkpoint

研究代表者

高井 俊行(TAKAI, Toshiyuki)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：20187917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイントLILRB4がマクロファージ、樹状細胞などに発現し、免疫系を制御する分子機構を解析したところ、LILRB4が生理的リガンド分子であるフィブロネクチン、とりわけそのN末端30キロダルトンドメイン(FN30)を認識することを発見し、フィブロネクチン結合性インテグリンをはじめとする細胞接着に伴うFocal Adhesionシグナルを制御していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞接着には細胞外マトリクス分子群を認識するインテグリンの活性化が伴い、これが起点となって様々な細胞内シグナルが導入されて細胞接着が確立され、増殖、分化、移動などの細胞機能が実行されることが知られていた。しかしこれを制御する機構は知られていなかった。本研究成果は細胞接着を起点に始まるシグナルを最も上流部で制御している分子がLILRB4であることを発見したものである。インテグリンなどの細胞接着は多様な生理機能のみならず疾患にも深く関わっていることは言うまでもなく、これを制御する機構が同定できたことは創薬にも新たなルートを拓くものであり、学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Regulatory mechanism of the immune checkpoint LILRB4 expressed mainly on myeloid-lineage cells such as macrophages and dendritic cells has not been clarified yet. We successfully identified its physiological ligand as fibronectin (FN), more specifically its N-terminal 30 kDa domain (FN30). We also found that upon recognition of FN30 by LILRB4, this regulatory receptor could suppress FN-binding integrin signal as well as focal adhesion-related signal associated with cell adhesion. Our findings identify for the first time a unique regulator of cell-adhesion-related intracellular signal.

研究分野：免疫学、とりわけ免疫制御受容体と疾患との関連研究

キーワード：免疫チェックポイント 細胞接着 インテグリン シグナル制御

## 1. 研究開始当初の背景

がんと自己免疫の克服は長寿社会が希求する課題であるが、最近、難治性がんに対して T 細胞に発現する抑制受容体, PD-1 や CTLA-4 のいわゆる免疫チェックポイントを阻害する抗体医薬が注目されている。CTLA-4 による制御性 T 細胞の誘導、さらにはがん免疫のエフェクターである CD8<sup>+</sup> T 細胞が、がん細胞に発現する PD-1 のリガンド PD-L1 により疲弊状態となるためがん免疫は本来、弱い。これらを阻害することの有効性が臨床で証明された意義は大きく、外科手術、放射線、抗がん剤・分子標的薬というがん治療の 3 本柱に加え、近い将来は免疫治療が大きなウェイトを占めることが予測される。しかしながらこの免疫治療は分子基盤の理解と欠点の克服が必要である。本研究の核心的な「問い」として T 細胞の免疫チェックポイントは PD-1 や CTLA-4 で網羅できたのか、それとも免疫チェックポイント機構は T 細胞だけに具備されるものではなく他の免疫細胞にも多重的に機能しているのかが解決される必要がある。さらに免疫チェックポイント阻害の欠点は、PD-L1 ががん細胞上に発現することが条件になることと、副作用として肺や筋肉、皮膚等に自己免疫性炎症を発症し易くなることである。一方で、自己免疫の患者には経口ステロイド剤の投与が標準的に必要になるが、投薬を続けると感染症のみならず、がんの発症リスクを上げることが知られていた。よって を解決することで がんと自己免疫のバランスを保つ機構の同定と制御方法の開発ができる。 については T 細胞の Tim-3 や LAG3 などの抑制受容体の阻害抗体が臨床試験に入っているが、T 細胞以外の抑制分子に着目した試みは皆無である。研究代表者は、がん免疫と自己免疫の表裏一体の関係を制御するには、T 細胞の免疫チェックポイントとは独立に機能する、他の細胞にも備わる全く新しい免疫チェックポイントを発見し、それを制御する特異性の高い手段、つまりがん免疫だけを狙って活性化させる方法、および自己免疫の病原性細胞が生じる機構に絞った制御方法の開発が不可欠となると考え、この核心的「問い」を解決することを立案した。

## 2. 研究の目的

T 細胞の抑制性受容体である PD-1 等のいわゆる免疫チェックポイントを阻害する抗体が、難治性のがんに有効であり世界的に注目されている。しかしがん免疫を強めると、副作用として自己免疫疾患を誘発するリスクを上げる。逆に、自己免疫患者に免疫抑制剤の投与を続けると、がんの発症リスクが上がるのが懸念されたため、がん免疫と自己免疫の双方をバランスよく調節できる治療薬の開発が不可欠である。そのためには T 細胞免疫チェックポイントだけが注目される現状を打破し、B 細胞 / 骨髄球 (B/My) 系細胞にも備わる免疫チェックポイント機構の理解が必須である。研究代表者らは B/My 系細胞に発現する抑制性受容体タンパク質である LILR (リラ) B 分子群を一貫して研究してきたが、最近リラ B4 (B4) が PD-1 と同様に CD8<sup>+</sup> T 細胞に発現すること、また自己抗体を産生する病原性 B 細胞に B4 が高発現することを見出し、さらに B4 の発見から 30 年のあいだ不明であった生理的リガンドタンパク質、フィブロネクチン (FN)、とりわけその N 末端 30kDa ドメイン (FN30) の同定に成功した。本研究は T/B/My 系細胞の B4-FN が中心軸となる新発見の制御機構を解明して免疫チェックポイントとしての位置付けを確立し、研究期間内にはがん、自己免疫疾患等のモデル実験系でこの免疫チェックポイントの調節による治療効果を評価するとともに、新しいコンセプトに基づく創薬に結びつけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

がんと自己免疫疾患マウスモデル実験系、および *in vitro* の細胞解析系で B4 抗体、FN30 抗体、FN30 組み換えタンパク質などの投与により治療効果や細胞応答を評価して B4-FN 軸の免疫チェックポイントの治療標的としての有効性を明確化する。

(1) 担がんマウスにおける B4-FN の修飾効果の評価として CD8<sup>+</sup> T 細胞、ミエロイド由来サブレッサー細胞 (MDSC)、樹状細胞 (DC)、Treg を標的に、これらの B4-FN システムを抗体などにより阻害し抗がん免疫を増強する。この目的のために Lewis lung carcinoma (LLC) および B16F10 melanoma (B16F10) を接種された担がんマウスに B4 抗体を投与、または FN30 抗体の投与を複数回行い、2 週目の CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性状態を *in vitro* サイトカイン産生量の測定、表面マーカー分子のフローサイトメトリー解析で評価するほか、LLC、B16F10 の腫瘍径、腫瘍内部の血管新生、他組織への転移状態などを病理組織学的、免疫化学的に測定して、抗がん免疫の賦活効果を評価する。

(2) SLE などの自己免疫において病原性自己抗体を産生するプラズマセルには B4 が高発現するが、最近 SLE 様疾患を自然発症する BXSB マウスモデルにおいても裏付けられることが分かっ

た。そこで BXSb マウスに B4 抗体や B4L1-Fc, B4L1 コア抗体を投与することで SLE が緩和されるか否か、それが B4 高陽性の病原性 PC の細胞減少によるものかそれともマクロファージや腎臓メサンギウム細胞など B4<sup>+</sup>の Myeloid 系の細胞の影響であるのかを FCM 解析等によって明らかにする。また SLE の主要症状である糸球体腎炎の重症度を HE 染色, PAS 染色などの手法で免疫組織化学的に評価し, B4<sup>+</sup> 腎臓メサンギウム細胞のポピュレーションの増減, 活性化マーカーの変化も FCM 解析により評価する。予備実験では B4 抗体の投与で自己抗体産生抑制, B4 KO で生存率の向上が見られているため, 病原性細胞の特定に向け準備は整っている。

(3) T 細胞の免疫チェックポイントには DC, 特に制御性 T 細胞 (Treg) の誘導には抑制性の DC である DCreg の役割が興味深い。研究代表者らは DC 上に B4 が発現し, B4 欠損下では DCreg の誘導が野生型マウスの骨髄細胞からの誘導に比べて不十分となる予備的結果を得ている。また pDC の誘導が B4 KO マウス由来の細胞では低下するデータを得ている。これら DC と T 細胞の寛容誘導につながる機構にどのように B4 と FN が貢献するのかを抗 B4 抗体, FN30 抗体, FN30-Fc, B4 KO を独自ツールとして活用して解明する。

#### 4. 研究成果

概要: ミエロイド免疫チェックポイント B4 が SLE 患者の病原性自己抗体を産生するプラズマセル特異的に高発現するという発見に基づいて解析を開始し, B4 はフィブロネクチン N 末端 30kDa ドメイン (FN30) を認識することを世界に先駆けて発見した。

B4-FN30 の阻害抗体投与で SLE マウスモデルの自己抗体の産生抑制, 糸球体腎炎の緩和が見られることを証明した。この効果のひとつは, B4-FN30 阻害が病原性 IgG 型自己抗体へのクラススイッチを抑制するためであることを示した。最近, ヒトあるいはマウス B4 のリガンドに関して, ApoE や CD166 がヒト B4 のリガンドである, などの単発的ないくつかの報告があったものの, 唯一ヒトとマウス B4 に共通した生理的リガンド FN30 を本研究で同定し, 自己免疫疾患との関連を示したことは特筆に値する。

B4 免疫チェックポイント阻害抗体の抗がん効果に欧米の製薬企業が注目し創薬開発を行っているが, 本研究では独自に B4-FN30 を基軸としてその機構を解析し, 主な責任細胞のひとつとしてミエロイド由来サプレッサー細胞 (MDSC) 上の B4-FN30 が阻害されることによる抗がん効果であり, 抗がん性マイクロ RNA が関係することを突き止めた。これら SLE への効果, FN30 の発見, 抗がん効果を統合して国際特許出願した。

これらに加え, さらに学術的に B4 の免疫チェックポイントとしての制御機構の本質を分子レベルで解明することを目指し, その結果, B4 が特定のシグナルを制御していることを突き止めた。

(1) リガンドの同定: B4 の生理的リガンドを発現する細胞を見出し, さらにその分子の実体を LC-MS/MS 解析により FN であることを同定した。さらに B4 結合ドメインが FN30 であることを特定した。この成果は, ヒトおよびマウス B4 に共通する初めてのリガンドの報告であり, B4 の免疫チェックポイントとしての機能の理解に向けて重要な位置づけにある。

(2) 自己免疫: まず, 自己抗体を高産生する SLE 病原性プラズマセル特異的に発現変化する B4 が未治療 SLE 患者プラズマセルに高発現することを見出した。その後, 上述のように生理的リガンドが FN, とりわけ FN30 であることを同定した。マウス SLE モデルにおいてこの FN30-Fc 融合タンパク質および B4 阻害抗体の投与, B4 遺伝子欠損 SLE モデルマウスにおける病態の解析を進め, とりわけ SLE モデルマウスで B4 が欠損することで病原性自己抗体産生細胞数が減少し, 糸球体腎炎が緩和されることを見出した。自己免疫モデルでは B4<sup>high</sup> プラズマセルが自己抗体を高産生するが, B4-FN30 軸の阻害が病原性 IgG 型自己抗体へのクラススイッチを抑制するためであることを示した。したがって, SLE 患者で病原性プラズマセル上に B4 が高発現することを病的に考察すると, 高発現している B4 がリガンド FN30 を周辺組織などから受容して, プラズマセル前駆細胞の段階でクラススイッチが誘導され, 病原性自己抗体 IgG が高産生され, さらに B4-FN30 軸のまだ同定できていない機構によりこれが安定化することによると考えられた。

(3) がん: さらに担がんモデルマウスに抗 B4 抗体などを投与することで, がんの転移, 増殖が抑えられ, また B4 欠損マウスでは特にがん転移が強く抑制されていることが見出された。抗 PD-1 抗体と併用することでさらにがんの進展が阻止されることも示された。B4 免疫チェックポイント阻害抗体の抗がん効果については欧米の製薬企業が注目し創薬開発を行っているが, 本研究では独自に B4-FN30 を基軸としてその機構を解析し, 主な責任細胞のひとつとしてミエロイド由来サプレッサー細胞 (MDSC) 上の B4-FN30 が阻害されることによる抗がん効果であることを突き止めた。上述の SLE への効果, FN30 の発見, 抗がん効果を統合して国際特許出願した。

(4) がんにおけるミエロイド由来サプレッサー細胞 (MDSC), 自己免疫における B 細胞およびプラズマセル, そして T 細胞への抗原提示を行う樹状細胞 (DC) それぞれの B4 と FN との関連性をモデル実験系に落とし込むことを発想し, マクロファージやそのセルライン RAW264.7, 単球系白血病細胞 THP-1 などで *in vitro* での活性化実験系に落とし込んで B4 と FN の効果として抽出し検討した。

(5) その他の展開: 創薬に向けた研究として B4 細胞障害型抗体, FN30 阻害抗体を独自に開発し, *in vitro*, *in vivo* での有効性を評価の上, 改変型抗体の種類によって疾患モデルで有効な例, 無効な例を抽出することに成功した。また, FN30 結合を阻害する抗 B4 抗体を独自に開発し, CDR 配列を決定した。さらになんかの患者臨床検体由来の組織標本で B4 抗体の有用性を組織化学的に評価し, がんの予後予測に有用であるか検討している。これらは当初の見込みを上回る進捗である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 6件）

1. 著者名 Su, MT, Kumata S, Endo S, Okada Y, Takai, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 LILRB4 promotes tumor metastasis by regulating MDSCs and inhibiting miR-1 family miRNAs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e2060907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/2162402X.2022.2060907.	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 Takahashi N, Itoi S, Su M-T, Endo S, Takai T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Co-localization of fibronectin receptors LILRB4/gp49B and integrin on dendritic cell surface.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 in press
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 Mitsune A, Yamada M, Fujino N, Numakura T, Ichikawa T, Suzuki A, Matsumoto S, Mitsuhashi Y, Itakura K, Makiguchi T, Koarai A, Tamada T, Endo S, Takai T, Okada Y, Suzuki S, Ichinose M, Sugiura H.	4. 巻 Aug 23;22(1)
2. 論文標題 Upregulation of leukocyte immunoglobulin-like receptor B4 on interstitial macrophages in COPD; their possible protective role against emphysema formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-021-01828-3.	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 Su M-T, Inui M, Wong YL, Takahashi M, Sugahara-Tobinai A, Ono K, Miyamoto S, Murakami K, Itoh-Nakadai A, Kezuka D, Itoi S, Endo S, Hirayasu K, Arase H, Takai T.	4. 巻 2021; 33(8)
2. 論文標題 Blockade of checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B binding to fibronectin ameliorates autoimmune disease in BXSb/Yaa mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immu	6. 最初と最後の頁 447-458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab028.	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 Wong YL, Su MT, Sugahara-Tobinai A, Itoi S, Kezuka D, Endo S, Inui M, Takai T.	4. 巻 2019; 31(6)
2. 論文標題 p49B is a pathogenic marker for autoantibody-producing plasma cells in lupus-prone BXSB/Yaa mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immu	6. 最初と最後の頁 397-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz017	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 Sugahara-Tobinai A, Inui M, Metoki T, Watanabe Y, Onuma R, Takai T, Kumaki S.	4. 巻 2019; Apr;38(4)
2. 論文標題 Amelioration of Kawasaki disease is coupled with down-regulation of peripheral blood plasmablast/plasmacell subset and its ILT3/LILRB4 expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr. Infect. Dis. J.	6. 最初と最後の頁 431-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002259.	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sakiko Kumata, Mei-Tzu Su, Shota Endo, Yoshinori Okada, Toshiyuki Takai
2. 発表標題 The immune inhibitory receptor LILRB4/gp49B reduces anti-tumor exosomal miRNA levels in plasma through promoting MDSC-mediated immunosuppression
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会(Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mei-Tzu Su, Masanori Inui, Shota Endo, Kouyuki Hirayasu, Hisashi Arase, Toshiyuki Takai
2. 発表標題 Blockade of checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B binding to fibronectin ameliorates autoimmune disease in BXSB/Yaa mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会(Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dai kezuka, Karin Ono, Mei-Tzu Su, Toshiyuki Takai
2. 発表標題 Gp49B-fibronectin interaction negatively regulates osteoclastogenesis through inhibiting RANKL-induced MAPK pathway.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 So Itoi, Shota Endo, Mei-Tzu Su, Yuzuru Sakamoto, and Toshiyuki Takai
2. 発表標題 Immune checkpoint gp49B tethers fibronectin with integrins on macrophage cell surface
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mei-Tzu Su, Masanori Inui, Shota Endo, Toshiyuki Takai
2. 発表標題 Blockade of checkpoint ILT3/LILRB4/gp49B binding to fibronectin ameliorates autoimmune disease in BXSb/Yaa mice
3. 学会等名 VIRTUAL IMMUNOLOGY2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 がん患者の予後を予測するためのバイオマーカー、がん患者の予後を予測するための方法、及び、がん患者の予後を予測するためのキット	発明者 高井俊行, 熊田早希子, 岡田克典, SU MEI TZU 他	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-119757	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 免疫チェックポイントB4-B4L1阻害剤、当該免疫チェックポイント関連疾患（がんや自己免疫疾患など）の治療剤、（中略）及びB4L1またはその部分タンパク質を検出する方法	発明者 高井俊行, 乾匡範, 蘇美慈, 遠藤章太	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/030175	出願年 2020年	国内・外国の別 国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗ヒト免疫抑制性受容体 L I L R B 4 モノクローナル抗体又はその抗体断片、免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤及びヒト免疫抑制性受容体 L I L R B 4 の測定方法	発明者 高井俊行, 蘇美慈, 遠藤章太	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-048355	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------