

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16131

研究課題名(和文) 抗CD3抗体活性の解明と新規治療法の創出

研究課題名(英文) Investigation of the activity of CD3 antibody and creation of a new therapeutic approach

研究代表者

森田 将史(Morita, Masashi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60817659

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)：各抗体を単回投与した解析ではFc不活化CD3抗体(2C11S)の方が非不活化CD3抗体(2C11C)よりもTCR発現量を長期間減少させた。また2C11S、2C11Cはともに末梢血T細胞を一時的に消失させた。2C11Sは接着分子を介したTrappingによる見かけ上のT細胞数減少を引き起こし、2C11Cはマクロファージ/単球によるT細胞貪食を誘導することが示唆された。またCD3抗体は既報で示唆されるアナジーやアポトーシスを誘導せず、2C11Sの免疫抑制作用はTCR発現量減少が主な機序であると考えられた。NZB/W F1マウスに各抗体を投与すると2C11S群で自己抗体価低下、腎炎改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fc不活化を施すことで副作用を低減したCD3抗体が近年臨床試験で用いられ、例えば 型糖尿病患者の発症を遅延させるなどの成果が報告されている。しかしそのFc不活化CD3抗体自体の活性、免疫抑制機序が曖昧であることを理由に、いまだFDAの承認を受けていないのが現状である。今回の我々の研究で得た結果は、Non-mitogenic Fc silent CD3抗体による免疫抑制作用が、TCR発現量減少を主な機序としていることを示唆しており、その作用がループスを軽減しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Analysis of a single injection of each antibody in C57BL/6 mice showed that 2C11S reduced TCR expression for a longer period than 2C11C. Both 2C11S and 2C11C caused transient decrease in the number of T cells in peripheral blood, suggesting that 2C11S induces an apparent decrease through adhesion molecule-mediated trapping, while 2C11C induces phagocytosis of T cells by macrophages or monocytes. Intraperitoneal administration of each antibody to NZB/W F1 mice showed that only 2C11S reduced the autoantibody titer and improved nephritis.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：SLE Lupus nephritis Autoimmunity Autoantibody 145-2C11 Fc region NZB/W F1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

既報によると CD3 抗体(clone 145-2C11; 2C11)は T 細胞受容体(TCR)発現量を低下させ T 細胞機能を抑制すると考えられているが、それ以外にアポトーシス、刺激に対する応答の欠如(Anergy)、疲弊(Exhaustion)、制御性 T 細胞の分化誘導など、様々な免疫抑制作用を有する可能性が示唆されている。しかし同時に抗 CD3 抗体はその Fc 領域が Fc 受容体 (FcR) を有するマクロファージ等の抗原提示細胞と架橋結合することで抗原提示細胞活性化、T 細胞貪食および活性化、サイトカイン産生等をもたらすと考えられ、抗体投与による生体反応を複雑にしている。そこで我々は Fc 領域の FcR 結合および補体結合能を除去した Fc 不活化抗体(2C11 Fc-silent; 2C11S)を用い、本来の 2C11(conventional 2C11; 2C11C)と抗体活性を比較した。CD3 抗体投与後の TCR 架橋レクチン刺激によるサイトカイン産生能、T 細胞活性化マーカーの発現、細胞増殖や各種遺伝子発現等を検討した。

また全身性エリテマトーデス (SLE) は、抗核抗体をはじめとする自己抗体が病態形成に関与すると考えられている自己免疫疾患であり、抗体産生 B 細胞を標的とした分子標的薬を中心に治療法開発が進んでいる。一方で T 細胞の病態への寄与も重要であり、B 細胞成熟やサイトカインを介した炎症反応増幅など様々な報告がなされている。SLE 患者の T 細胞では T 細胞受容体(TCR)の重要なコンポーネントである CD3 $\zeta$ の発現が低下しており、我々は CD3 $\zeta$ 発現低下そのものが SLE 病態に与える影響を検討するため、C57BL6/J (B6)マウスに変異型 Fas を発現させた B6Ipr ループスモデルに、CD3 $\zeta$ 遺伝子をヘテロで欠損させた B6Ipr-*Cd3z*<sup>-/-</sup>マウスを作成し、その表現型を調べた。その結果 B6Ipr-*Cd3z*<sup>-/-</sup>マウスの自己抗体価、糸球体腎炎傷害スコアがいずれも B6Ipr-wild type と比較して軽減され、T 細胞の表現型解析では TCR 発現量が約 40%低下していた。また T 細胞依存性抗原(NPCGG)免疫後の濾胞性 T 細胞(Tfh)分化は保たれ、胚中心 B 細胞(GCB)分化は抑制された。この結果より TCR 発現量を減少させることがループスに有効ではないかと我々は考えた。

### 2. 研究の目的

CD3 抗体活性の評価を行い、ループスモデルマウスに CD3 抗体を投与して、その有効性を評価する。

### 3. 研究の方法

B6 マウスに各抗体を単回腹腔内投与し、その後末梢血および脾臓内 T 細胞を採取して TCR 発現量や T 細胞数を評価する。また採取した T 細胞に免疫負荷を行い、T 細胞の活性化や機能を評価する。SLE モデルマウスである NZB/W F1 マウスに各抗体を腹腔内投与し、lupus 様病態に対する治療効果を早期投与、後期投与と、病期をわけて調べる。

### 4. 研究成果

B6 マウスに各抗体を単回投与した解析では 2C11S の方が 2C11C よりも TCR 発現量を長期間減少させた。また 2C11S は 2C11C でみられたサイトカインリリース、および T 細胞増殖を誘導しなかった。これらの結果から 2C11S は Non-mitogenic であり、TCR 発現量減少を有意に誘導しうる抗体であることがわかった。抗体投与後の末梢血 T 細胞数を調べると 2C11S、2C11C ともに末梢血 T 細胞を一時的に消失させたが、2C11S は接着分子を介した Trapping による見かけ上の T 細胞数減少を引き起こし、一方で 2C11C はマクロファージ/単球による T 細胞貪食を誘導することが示唆された。各抗体を投与した B6 マウスに NPCGG 免疫し、CD3 抗体が抗体産生反応にどう影響するかを調べると、2C11S、2C11C いずれも Tfh 分化抑制はみられず、2C11S のみ GCB 分化抑制

を認め、いずれの群でも抗体産生抑制を認めた。これより各 CD3 抗体は T 細胞依存性抗体産生に異なる効果を与えられたと考えられた。また CD3 抗体は既報で示唆されているようなアナジーやアポトーシスを誘導せず、2C11S の免疫抑制作用は TCR 発現量減少が主な機序であることが示唆された。この結果をもとに 2C11S による TCR 発現量減少がループスにおける自己抗体産生に有効であると予想し、NZB/W F1 マウスに 10 週齢(早期)もしくは 20 週齢(後期)から週 1 回 1 か月間、各抗体を腹腔内投与したところ、早期治療では 2C11S 群で GCB 分化抑制および抗体価低下を認め、後期治療では 2C11S 群で GCB 分化抑制を認めたものの、抗体価の有意な低下はみられなかった。またループス腎炎が形成される後期での治療において、2C11S 群のみ有意な腎炎改善を認めた。脾臓の制御性 T 細胞(Treg)および各エフェクター T 細胞の比率を解析すると、CD3 抗体は有意な Treg 分化亢進を誘導せず、また 2C11S は IFN $\gamma$  / IL-17 産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞分化を有意に抑制しなかった。以上より Non-mitogenic Fc silent CD3 抗体による TCR 発現量減少はループスを軽減しうると考えられた。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Masashi, Mizui Masayuki, Masuyama Satoshi, Tsokos George C., Isaka Yoshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Reduction of Cell Surface T-Cell Receptor by Non-Mitogenic CD3 Antibody to Mitigate Murine Lupus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.855812	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masashi Morita, Masayuki Mizui, Satoshi Masuyama, Yoshitaka Isaka
2. 発表標題 Efficacy and safety of non-mitogenic anti-CD3 antibody administration in the treatment of lupus-prone mice
3. 学会等名 EULAR 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Masashi Morita, Masayuki Mizui, Satoshi Masuyama, Yoshitaka Isaka
2. 発表標題 Efficacy and safety of non-mitogenic anti-CD3 in the treatment of lupus-prone mice
3. 学会等名 ASN 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Masashi Morita, Masayuki Mizui, Satoshi Masuyama, Yoshitaka Isaka
2. 発表標題 Efficacy and safety of non-mitogenic anti-CD3 in the treatment of lupus-prone mice
3. 学会等名 日本腎臓学会 2021
4. 発表年 2021年～2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------