

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590538

研究課題名（和文）刺激型抗TLR抗体を用いた免疫賦活作用と感染防御機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of immune activation and protective mechanisms against infection using agonistic anti-TLR4 mAb

研究代表者

木本 雅夫（KIMOTO MASAO）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40153225

研究成果の概要（和文）：病原体認識分子である TLR4 に対する刺激抗体を作成し、その抗体産生に対する効果を解析した。刺激抗体は抗体産生においてアジュバント効果を発揮することを見出した。同じ刺激抗体を免疫前に投与すると抗体産生が抑制された。この抑制効果の細胞機序を解析したところ、抗原提示能は影響を受けなかったが、B 細胞の抗体産生能が減弱していた。このことは、B 細胞抗体産生の制御機序について新たな知見を加えたものであり、ワクチン開発などに有益な情報をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effects of agonistic anti-TLR4 mAb in vivo and in vitro. Anti-TLR4 agonistic mAb showed adjuvant effects in vivo. However, pre-injection of this agonistic mAb inhibited antibody production upon subsequent immunization. Cellular analysis revealed that this inhibitory effects was not due to the defect in antigen presentation to T cells but due to the defect in B cell priming. This finding will provide important information for the vaccine development and clinical use.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：抗体、免疫賦活

1. 研究開始当初の背景

結核菌や百日咳菌などの菌体成分による免疫賦活アジュバントの作用機序は長い間不明であったが、我々の先駆的研究 (Miyake K. et al, J. Immunol. 154, 3333, 1995, Shimazu R. et al, JEM 189, 1777, 1999) を含む多くの研究によって、その分子レベルでの実態がほぼ明らかにされてきた。すなわち、マクロファージや樹状細胞に発現している Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) が病原体共通構造 (pathogen-associated

molecular patterns, PAMPS) を認識することにより、サイトカイン分泌や T 細胞補助刺激分子の発現増強が誘導され、自然免疫系の賦活および獲得免疫系の発動を促すことが明らかにされている (Akira S. et al, Cell, 124, 783, 2006)。これらの研究は、それぞれの免疫系における種々の情報伝達分子とその相互作用に関する新知見をもたらす一方、この仕組みを応用した免疫応答の新しい人為的操作の可能性を示唆している。TLR 刺激による免疫応答の人為操作におい

て、刺激に用いる物質としては、精製菌体成分、人工あるいは天然の菌体成分類似物質などがあげられ、それぞれについて多くの研究がなされている。しかしながら、これらはいずれも生体にとって異物であり、生体の生理活動への影響や異物反応を誘導する可能性など人体応用に当たっての課題が指摘されている。一方、このような異物ではなく、TLR 刺激作用を有ものとして TLR に対する刺激型抗体を用いることが考えられる。抗体は体内で作られる生理的物質であり、他の生体活動への影響や異物反応の可能性が極めて少ない。また、抗体は TLR 分子の種々の部位に結合することで LPS など通常のリガンドと異なった生理活性を誘導することも期待できる（後述、図参照）。長年の研究により、抗体の生体内での産生・代謝などが詳細に解明されており、さらに、最近の種々の疾患に対するモノクローナル抗体 (mAb) 治療の臨床研究などから、そのヒトへの応用における安全性がほぼ明らかになってきている。このような背景のもとに、我々は TLR 分子に対する刺激型 mAb を作製して、そのアジュバント様効果や感染防御効果を解析し、ヒトへの応用の可能性を追求することを計画した。標的 TLR 分子として、我々がこれまでに多くの研究実績と材料を有しているグラム陰性菌成分 LPS の標的分子である TLR4/MD-2 を選び、刺激型 mAb の作製とそれによる生理活性効果の解析と機序解明を試みた。このうちの一つの抗体を用いて、すでに、マウス個体での長期持続 LPS トレランスの誘導を確かめている (Ohta S. et al., Clin Vaccine Immunol. 13, 1131, 2006)。

2. 研究の目的

本研究は、刺激型抗 TLR 抗体を用いて、その (1) サイトカイン産生・補助刺激分子発現誘導機序、(2) *in vivo* アジュバント様効果、(3) 非特異的感染防御効果とその作用機序を解明し、刺激型抗 TLR 抗体によるヒトの感染防御と予防法の確立に向けた研究基盤を樹立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) mAb の作製と特異性解析

すでに樹立した mAb に加えて、新たに刺激型 mAb を作製する。その理由は、目的の項でも述べたとおり、TLR4/MD-2 刺激において個々の mAb が異なった信号伝達をおこなう可能性があり、多種類の抗体を入手することにより、抗体治療の応用範囲が広がるからである。

(2) 抗原

すでに作製済みのマウス TLR4/MD-2 発現トランスフェクタント細胞 (BaF3) を抗原として用いる。TLR4/MD-2 を安定的に発現した細胞を保有している。

(3) mAb 作製 (TLR4/MD-2 欠損マウスを宿主とする) これまでの実験で、ラットを宿主とした抗体作製においては、刺激型 mAb はほとんど得られなかったが、TLR4 あるいは MD-2 欠損マウスを宿主とすることにより、効率よく刺激型 mAb を樹立することができている。その理由は、欠損マウスは TLR4/MD-2 のすべてのエピトープを認識することが理論的に考えられ、ラット宿主では作ることができないエピトープ特異性を有する mAb を得ることができるためであると考えられる。TLR4 あるいは MD-2 欠損マウスは免疫不全マウスと考えられるが、これまでの我々の経験では野生型マウスと同等の効率でハイブリドーマの作製が可能である。

(4) mAb の機能的スクリーニング

ハイブリドーマ培養上清を用いて、免疫原である TLR4/MD-2 発現 BaF3 細胞を標的 (非発現 BaF3 細胞を陰性対照) とした蛍光抗体法にて 1 次スクリーニングをおこなう。刺激抗体のスクリーニングは、NF κ B レポーター遺伝子を追加導入した TLR4/MD-2 発現 BaF3 細胞によるレポーター (Luciferase) 活性によりおこなう。これまでの解析で、レポーター活性陰性の mAb がマクロファージや樹状細胞にサイトカイン産生あるいは、B 細胞の増殖反応を誘導することも観察されているので、サイトカイン産生誘導などを指標にしたスクリーニングもあわせておこなう。

(5) エピトープ解析

得られた mAb について、その認識エピトープの解析をすでに報告されている抗体 (MTS510) や LPS および我々が得た刺激抗体 (UT シリーズ) などを使って蛍光抗体法による競合阻害実験によりおこない、認識エピトープによる抗体の分類と、機能との関連について解析する。

(6) サイトカイン産生誘導

腹腔マクロファージ、骨髄由来樹状細胞などを用いたサイトカイン (TNF、IL6、RANTES、IFN など) 産生誘導の測定をおこなう。

(7) 補助分子発現誘導

腹腔マクロファージ、骨髄由来樹状細胞を用いて、mAb 刺激による補助刺激分子 (CD80、CD86 など) 発現誘導を蛍光抗体法により解析する。

(8) B 細胞増殖反応

脾臓 B 細胞を用いて、mAb 刺激による増殖反応を MTT 法により解析する。

(9) *in vivo* アジュバント様効果と機序解析

TLR4/MD-2 を刺激する mAb は、免疫アジュバントに含まれる菌体成分と同様に、TLR4/MD-2 を介した刺激伝達により、アジュバント様活性を発揮することが予想されたため、そのことを以下の *in vivo* および *in vitro* 実験で確かめる。これはヒトへの応用に際し

て、刺激型抗体が免疫応答増強剤として利用できる可能性を検証するものである。また、この現象の機序として、*in vivo*におけるサイトカイン産生や補助刺激分子発現誘導が考えられるので、これらもあわせて解析する。

(10) 抗原特異抗体産生

可溶性抗原卵白アルブミン (OVA) と刺激型抗体を同時にマウス免疫し、経時的に血中抗 OVA 抗体価を ELISA にて測定する。抗体投与なし、あるいは、CFA 使用などと比較し、刺激型抗体がアジュバント様活性を有することを確かめる。予備的実験において、刺激型 mAb は CFA の 30% 程度の抗体産生増強能があることを確かめている。

(11) 抗原特異 T 細胞増殖反応

アジュバント様効果のもう一つの指標として、T 細胞の抗原特異増殖反応を測定する。OVA 抗原を刺激型 mAb とともに皮下投与し、一定期間後の流入リンパ節の T 細胞増殖反応を *in vitro* の抗原再刺激により測定し、CFA を用いた場合と比較する。

(12) *in vitro* リンパ球感作能

マウス脾臓細胞を *in vitro* で OVA とともに培養する際に、刺激型 mAb を共存させ、特異リンパ球応答が誘導できるか否かを、OVA の再刺激による増殖反応および *in vitro* 抗体産生により測定する。刺激型抗体のこのような機能は、ヒト個体へのワクチン接種が困難な感染症において、*in vitro* で活性化させたリンパ球を体内に再注入することにより、疾患抵抗性を誘導できる可能性をもたらすものである。

4. 研究成果

本研究は、刺激型抗 TLR 抗体を用いて、その (1) サイトカイン産生・補助刺激分子発現誘導機序、(2) *in vivo* アジュバント様効果、(3) 非特異的感染防御効果とその作用機序を解明し、刺激型抗 TLR 抗体によるヒトの感染防御と予防法の確立に向けた研究基盤を樹立することを目的とするものである。

まず、刺激型抗体による *in vivo* 抗体産生の増強 (アジュバント) 効果の解析をおこなった。その結果、刺激型抗体を抗原 (卵白アルブミン) とともに投与すると、明らかなアジュバント効果を認めた。さらに、刺激型抗体を単独で免疫前に投与すると、抗体産生は逆に抑制されることが確認された。この実験において、免疫されたマウスに同じ抗原を追加免疫すると抗体産生は増強される。初回免疫の前に刺激型抗体を前投与すると、追加免疫による抗体産生の増強は抑制される。しかし、抗体の前投与なしで免疫を行い動物個体を抗原感作の状態に誘導しておく、追加免疫前に刺激型抗体を投与しても抗体産生の抑制は認められないことがわかった。このこと

は、刺激型抗体の単独投与による抗体産生の抑制は、免疫記憶には効果を及ぼさないことを示唆している。この現象は、病原体感染あるいはワクチン投与により、一度免疫感作状態を誘導しておく、他の病原体感染がおこってもその免疫記憶は有効であるということを示すものであり、感染症の予防、治療に新しい知見をもたらすものとして重要であると考えられる。

上述した *in vivo* アジュバント様効果と機序解析をおこなった。刺激型抗体による抗原特異 T 細胞増殖反応を測定したが、これまでのところ有意な効果は認められていない。さらに、*in vitro* リンパ球感作能についても、非免疫リンパ球を刺激型抗体と抗原とともに培養したが、明らかな感作を認めなかった。一方、刺激抗体を投与したマウスの脾臓細胞の MHC クラス II 分子および補助刺激分子である CD40、CD86 の発現は非投与の脾臓細胞と比較して発現低下が認められた。しかし、刺激型抗体を投与した脾臓細胞の抗原提示能力を、抗原特異 T 細胞株を用いて測定したが、前投与、非投与のどちらのマウスの脾臓細胞も抗原提示能力に差異は無かった。また、抗体産生を指標にしたヘルパー効果にも差は認められなかった。つまり、この刺激抗体による TLR4 活性化によって、T 細胞への抗原提示及び T 細胞ヘルパー効果には影響が無いことが分かった。次に、B 細胞に対する影響を、投与、非投与マウスから得た細胞とヘルパー効果を有する抗原特異 T 細胞かぶとを共培養した。同じ強力なヘルパー T 細胞により、非投与の脾臓細胞は抗体産生が誘導されたが、刺激抗体投与脾臓細胞からは抗体産生は認められなかった。すなわち、抗体投与による *in vivo* での抗体産生抑制は、B 細胞の抗原に対する応答機能が抑制されたためであることが分かった。この結果は、B 細胞の抗体産生応答における新しい制御機序が存在することを解明したもので、非常に意義あるものと考えられる。

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 9 件)

1. Nagai Y, Yanagibashi T, Watanabe Y, Ikutani M, Kariyone A, Ohta S, Hirai Y, Kimoto M, Miyake K, Takatsu K.: The RP105/MD-1 complex is indispensable for TLR4/MD-2-dependent proliferation and IgM-secreting plasma cell differentiation of marginal zone B cells. *Int Immunol.* 2012 in press.

2. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ihara H, Ikeda Y, Kimoto M.: Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs. Int Immunol. 2012 in press.
3. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R.: Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link β Cell Dysfunction and Islet Inflammation. Cell Metab. 2012 in press.
4. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M.: Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. Int Immunol. 2010 ;22(4):271-80.
5. Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M, Kamochi N, Sonoda E, Soejima H, Fukudome K, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S.:Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue. Pathol Int. 2010;60(4):259-67.
6. Centelles MN, Puy C, López-Sagaseta J, Fukudome K, Montes R, Hermida J.:Blocking endothelial protein C receptor (EPCR) accelerates thrombus development in vivo. Thromb Haemost. 2010 Jun;103(6):1239-44.
7. Minhas N, Xue M, Fukudome K, Jackson CJ.:Activated protein C utilizes the angiopoietin/Tie2 axis to promote endothelial barrier function. FASEB J. 2010;24(3):873-81.
8. Matsushita H, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Arima K, Toda S, Tanaka H, Nagai H, Kimoto M, Inokuchi A, Izuhara K.:Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells. Int Immunol. 2010 ;22(9):739-47.
9. Koarada S, Tsuneyoshi N, Haruta Y, Tada Y, Mitamura M, Inoue H, Ohta A, Fukudome K, Nagasawa K.: Effect of disease activity and corticosteroids on serum levels of soluble endothelial cell

protein C receptor in patients with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol. 2009;19(2):173-9.

[学会発表] (計 3 件)

1. Rachmawati NM, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Uleng B, Ohta S, Kimoto M : Inhibition of primary but not secondary humoral immune responses by pre-injection of an agonistic anti-TLR4/MD-2 antibody. 第 40 回日本免疫学会 2011.11.28, p173
2. Rachmawati NM, Uleng B, Fukudome K, Kimoto M : Agonistic anti-TLR4 monoclonal antibodies function as immunoadjuvants. 第 14 回国際免疫学会議 2010.8.27, PP-001-49
3. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M.: Lipopolysaccharide-bindingprotein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells.第 14 回国際免疫学会議 2010.8.27, PP-001-27

[図書] (計 1 件)

1. 木本雅夫. 伊藤正男, 井村裕夫, 高久史 監編: 医学大辞典. 第 2 版 医学書院. 東京 2009年

[その他]

ホームページ

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/immunol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木本 雅夫 (KIMOTO MASAO)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号 : 40153225

(2) 研究分担者

福留 健司 (FUKUDOME KENJI)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号 : 50284625

研究分担者

塚本 宏樹 (TSUKAMOTO HIROKI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 70423605