

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19369

研究課題名（和文）免疫受容体を標的とした特発性肺線維症(IPF)に対する抗体医薬の基盤開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) by targeting immune receptors

研究代表者

渋谷 和子 (Shibuya, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00302406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症（Idiopathic Pulmonary Fibrosis：IPF）は、原因不明の難治性で進行性の肺線維症である。患者のQOLは極めて悪く、本疾患の克服は社会的なニーズとなっている。

本研究において、私たちは免疫活性受容体DNAM-1の遺伝子欠損マウスと野生型マウスにIPFを誘導すると、DNAM-1遺伝子欠損マウスにおいて有意にその病態が軽減していることを観察した。また、抗DNAM-1中和抗体を投与して病態を比較結果、抗DNAM-1中和抗体投与群では、コントロール抗体投与群に比較して、病態改善を認めた。以上の結果より、IPF病態へのDNAM-1の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症（Idiopathic Pulmonary Fibrosis：IPF）は、原因不明の難治性で進行性の肺線維症であり、診断確定後の平均生存期間は3～5年と極めて予後不良な疾患である。現在、治療薬としては、ビルフェニドンとニンテダニブなどの抗線維化薬があるが、病気の進行を遅らすのみで、治療下でも2年生存率は62%と低い。症状も呼吸苦を伴うことから、患者のQOLは極めて悪く、本疾患の克服は社会的なニーズとなっている。本研究において、私たちは免疫活性化受容体DNAM-1に対する特異抗体がIPF病態を軽減する結果を得た。DNAM-1を標的としたIPF新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is an intractable, progressive pulmonary fibrosis of unknown cause with an extremely poor prognosis, with an average survival of 3 to 5 years after diagnosis is confirmed. Currently, there are anti-fibrotic agents such as pirfenidone and nintedanib as treatments, but they only slow the progression of the disease, and even under treatment, the 2-year survival rate is as low as 62%. Therefore, overcoming this disease has become a social need.

In this study, IPF was induced in mice lacking the gene for the immune receptor DNAM-1 and wild-type mice, and the pathology was significantly reduced in DNAM-1-deficient mice. In addition, when anti-DNAM-1 neutralizing antibodies was administered, the group of mice treated with anti-DNAM-1 neutralizing antibodies showed improvement in disease condition compared to the control group. These results suggest that DNAM-1 is involved in the pathogenesis of IPF.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫システム 免疫受容体 炎症 特発性肺線維症 分子標的療法

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis : IPF) は、原因不明の難治性で進行性の肺線維症であり、診断確定後の平均生存期間は 3~5 年と極めて予後不良な疾患である。現在、治療薬としては、ピルフェニドンやニンテダニブなどの抗線維化薬があるが、病気の進行を遅らすのみで、治療下でも 2 年生存率は 62% と低い。症状も呼吸苦を伴うことから、患者の QOL は極めて悪く、本疾患の克服は社会的なニーズとなっている。

制御性 T 細胞 (Treg) は、転写因子 Foxp3 を分化のマスターレギュレーターとするヘルパー T 細胞のサブセットであり、炎症応答や自己免疫応答などを抑制している。Treg の免疫抑制機能を人為的に増強できれば、炎症性疾患や自己免疫疾患の病態が制御可能になることが期待される。

DNAM-1 は、T 細胞をはじめ免疫細胞に発現する活性化受容体である。これまでに私たちは DNAM-1 のリガンドが CD155 であることを同定し、DNAM-1 と CD155 との結合がヘルパー T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生を促進し、Th1 免疫応答を活性化することや、NK 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞傷害活性を促進することなどを明らかにしてきた。さらに、最近注目されている自然リンパ球 ILC1 においても、DNAM-1 はその活性化に寄与していることを観察した。

DNAM-1 は Treg にも発現しており、私たちは炎症時にその発現が上昇することを観察した。しかし、Treg 上の DNAM-1 の機能の詳細については不明であった。また、私たちは、炎症性疾患のひとつである IPF を、DNAM-1 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに誘導すると、DNAM-1 遺伝子欠損マウスにおいて有意にその病態が軽減するという予備実験データを得た。このことより、IPF 病態への DNAM-1 の関与が示唆された。

## 2. 研究の目的

炎症時に発現が上昇する Treg 上の DNAM-1 が炎症制御にどのような役割を担っているのかを明らかにし、その分子メカニズムを解析する。また、IPF 病態に DNAM-1 がどのように関与しているのか、その病態メカニズムを明らかにする。さらに、DNAM-1 を標的とした IPF の新規治療法開発の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

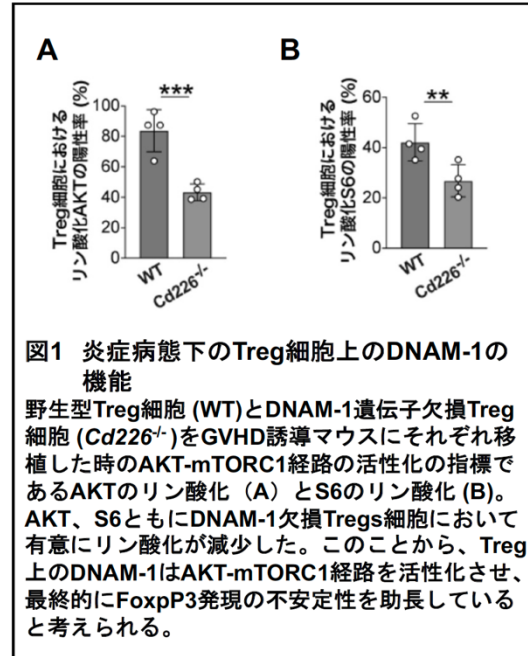
炎症性病態における DNAM-1 の役割を *in vivo* と *in vitro* の両側面から解析する。具体的には、DNAM-1 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに炎症性疾患を誘導し、その病態を比較検討する。また、それらのマウスにおける Treg の機能を比較検討する。さらに、*in vitro* の系において、Treg 上の DNAM-1 を刺激し、その機能とシグナル伝達経路を解析する。

また、IPF 病態における DNAM-1 の機能を検証するために、DNAM-1 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに種々の濃度のプレオマイシンを投与して、線維化病態を比較検討する。また、肺ならびに気管支洗浄液中の免疫細胞の分画、遺伝子発現、サイトカイン産生を比較検討し、病態に関わる責任細胞や、病態発症の分子メカニズムを明らかにする。さらに、IPF を発症した野生型マウスに種々の濃度の抗 DNAM-1 中和抗体を投与し、その病態改善効果を呼吸機能、肺浸潤免疫細胞のサイトカイン産生、病理組織の線維化所見などを指標に検討する。また既存薬ニンテダニブとその効果を比較検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 炎症性病態における Treg 細胞上の DNAM-1 の機能解析

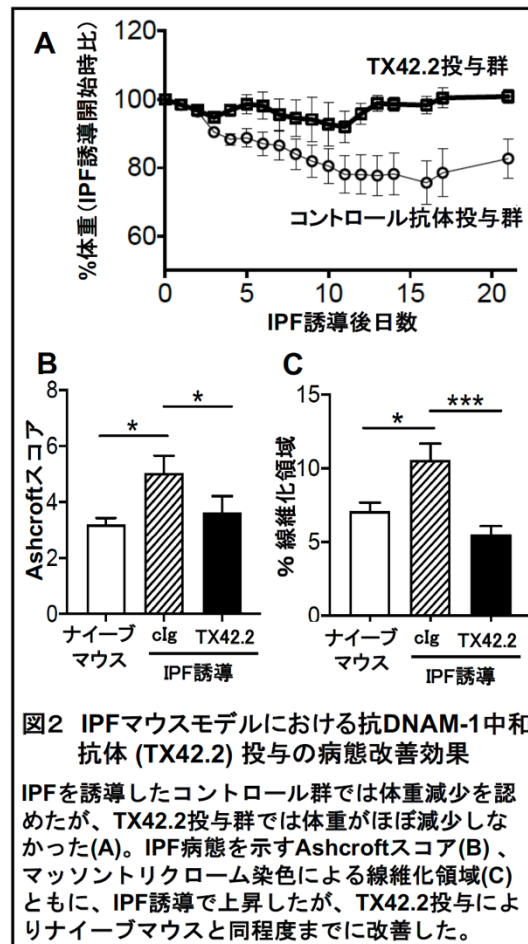
炎症性病態における Treg 細胞上の DNAM-1 の機能を検証するため、移植片対宿主病 (Graft-vs-Host Disease, GVHD) マウスモデルを用いた。放射線照射により骨髄破壊的な処置を行った Balb/c マウスに、野生型 C57BL/6 より単離した骨髄細胞と Tconv 細胞を移植することで GVHD を誘導すると同時に、野生型、もしくは DNAM-1 欠損 Treg 細胞を移入し、生存率を比較した。その結果、DNAM-1 欠損 Treg 細胞は野生型 Treg 細胞と比較して、レシピエントマウスの生存期間を延長させたことから、DNAM-1 欠損は Treg 細胞の免疫抑制機能を促進させることが示された。DNAM-1 が Treg 細胞の機能を制御する分子機構を解明するために、シングルセル RNA シーケンス解析を行なった結果、DNAM-1 は AKT-mTORC1 経路を活性化させることを見出した。さらに、AKT-mTORC1 経路の活性化の指標である AKT と S6 のリン酸化が DNAM-1 欠損 Treg で低下していることを確認した (図 1)。以上より、Treg 上の DNAM-1 は AKT-mTORC1 経路を活性化させ、Foxp3 発現の不安定性を助長していることが明らかになった。



##### (2) IPF 病態における DNAM-1 の機能解析

IPF 病態における DNAM-1 の機能を検証するために、DNAM-1 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに種々の濃度のプレオマイシンを投与して、病態を比較検討した。その結果、DNAM-1 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比較して、IPF の病態が軽減していることを観察した。この現象が DNAM-1 とリガンドとの結合によるものかを検証するために、次に野生型マウスに IPF を誘導し、抗 DNAM-1 中和抗体 (TX42.2) を投与して病態を比較した。その結果、TX42.2 投与群では、コントロール抗体投与群に比較して、体重減少率の改善を認めた (図 2 A)。また、病理組織所見では、線維化病態の指標となる Ashcroft スコアの有意な低下を認めた (図 2 B)。さらに、マッソントリクローム染色においても線維化領域の有意な減少を認めた (図 2 C)。以上より、IPF 病態への DNAM-1 の関与が示唆された。

抗 DNAM-1 中和抗体投与により病態が改善できることから、DNAM-1 を標的とした IPF 新規治療法の開発が期待される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Murata Rikito, Kinoshita Shota, Matsuda Kenshiro, Kawaguchi Atsushi, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 209
2. 論文標題 G307S DNAM-1 Mutation Exacerbates Autoimmune Encephalomyelitis via Enhancing CD4+ T Cell Activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2304 ~ 2312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200608	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 Oh-oka Kyoko, Abe Fumie, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 209
2. 論文標題 CD96 Blockade Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis via Suppression of IL-17A Production by Dermal T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2313 ~ 2321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200502	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 Matsuo Tomohei, Iguchi Manaka Akiko, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 113
2. 論文標題 CD155 mutation (Ala67Thr) increases the binding affinity for and the signaling via an inhibitory immunoreceptor TIGIT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4001 ~ 4004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15526	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 新谷 優歩, 渋谷 和子	4. 巻 78
2. 論文標題 炎症性発がんにおける免疫活性化受容体DNAM-1の役割	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 231
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 Nakamura-Shinya Yuho, Iguchi-Manaka Akiko, Murata Rikito, Sato Kazuki, Vo Anh Van, Kanemaru Kazumasa, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 34
2. 論文標題 DNAM-1 promotes inflammation-driven tumor development via enhancing IFN- production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 149 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab099	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 Sato Kazuki, Yamashita-Kanemaru Yumi, Abe Fumie, Murata Rikito, Nakamura-Shinya Yuho, Kanemaru Kazumasa, Muratani Masafumi, Veillette Andre, Goto Motohito, Ito Mamoru, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 118
2. 論文標題 DNAM-1 regulates Foxp3 expression in regulatory T cells by interfering with TIGIT under inflammatory conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2021309118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021309118	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 Yamashita-Kanemaru Yumi, Oh-oka Kyoko, Abe Fumie, Shibuya Kazuko, Shibuya Akira	4. 巻 40
2. 論文標題 Suppression of Th1 and Th17 Proinflammatory Cytokines and Upregulation of FOXP3 Expression by a Humanized Anti-DNAM-1 Monoclonal Antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 52 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2020.0042	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 奥村 元紀、渋谷 和子	4. 巻 278
2. 論文標題 腫瘍由来可溶性CD155を介した新規免疫逃避機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 977-978
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 佐藤和貴、渋谷和子	4. 巻 29
2. 論文標題 炎症下におけるDNAM-1を介した制御性T細胞のFoxp3発現制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 383-390
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 Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 33
2. 論文標題 DNAM-1 versus TIGIT: competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 687 ~ 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab085	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16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 渋谷 和子
2. 発表標題 可溶性免疫受容体による腫瘍免疫逃避機構
3. 学会等名 第19回日本免疫治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oh-oka K., Abe F., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 CD96 blockade ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via suppression of IL-17A production by dermal T cells
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Murata R., Kinoshita S., Matsuda K., Kawaguchi A., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 A gain-of-function mutation of immunoreceptor DNAM-1 exacerbates CD4+ T cell-mediated autoimmune inflammation
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuo T., Iguchi-Manaka A., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 CD155 mutation (Ala67Thr) increases the binding affinity for and the signaling via an inhibitory immunoreceptor TIGIT.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口 研子, 松尾 知平, 渋谷 和子, 渋谷 彰
2. 発表標題 新規免疫チェックポイント阻害療法開発への取り組み
3. 学会等名 第34回日本内分泌外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oh-oka K., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 CD96 mediates a costimulatory signal in dermal T cells and exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis.
3. 学会等名 第86回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 JSICR/MMCB 2022 合同シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大岡 杏子, 渋谷 彰, 渋谷 和子
2. 発表標題 乾癬における免疫受容体CD96の作用機序の解析
3. 学会等名 第9回筑波大学・東京 理科大学合同リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾 知平, 木下 翔太, 井口 研子, 渋谷 彰, 渋谷 和子
2. 発表標題 可溶性CD155を標的とした新規がん治療法の開発
3. 学会等名 第9回筑波大学・東京 理科大学合同リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田 力斗, 木下 翔太, 松田 研史郎, 川口 敦史, 渋谷 彰, 渋谷 和子
2. 発表標題 活性化受容体DNAM-1の機能獲得変異を基軸とした自己免疫疾患の病態形成機構
3. 学会等名 第9回筑波大学・東京 理科大学合同リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下 翔太, 松尾 知平, 渋谷 彰, 渋谷 和子
2. 発表標題 可溶性CD155による免疫チェックポイント阻害剤治療効果の減弱
3. 学会等名 第9回筑波大学・東京 理科大学合同リトリート
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Shibuya K.
2. 発表標題 Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated tumor immunity
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oh-oka K., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 Involvement of CD96 immunoreceptor on dermal T cells in the development of imiquimod-induced psoriasis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuo T., Shibuya A., Shibuya K
2. 発表標題 CD155 mutation (Ala67Thr) reduces NK cell cytotoxicity by enhancing TIGIT signal
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato K., Yamashita-Kanemaru1 Y., Abe F., Nakamura Y., Murata R., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 DNAM-1 interferes with the binding of TIGIT to CD155 and suppresses Foxp3 expression via an excess of the AKT/mTORC1 pathway in regulatory T cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura-Shinya Y., Iguchi-Manaka A., Murata R., Sato K., Vo AV., Kanemaru K., Shibuya A., Shibuya K.
2. 発表標題 DNAM-1 promotes inflammation-driven tumor development via enhancing IFN- production
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷（中村）優歩、井口 研子、村田 力斗、佐藤 和貴、Anh Van Vo、金丸 和正、渋谷 彰、渋谷 和子
2. 発表標題 DNAM-1はIFN-g産生の亢進を介して炎症性発がんを促進する
3. 学会等名 第85回日本日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会JSICR/MMCB 2021 合同シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021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	中村（新谷） 優歩  (Nakamura-Shinya Yuho)		
研究協力者	村田 力斗  (Murara Rikito)		
研究協力者	松尾 知平  (Matsuo Tomohei)		

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