ニッポンハム食の未来財団　2022 年度個人研究助成　研究完了報告書

研究課題名	経口免疫寛容を強力に誘導する新規 Treg 標的バイオロジクスの創製
フリガナ	イノウエ　マサキ
代表者名	井上　雅己
所属機関　（機関名） 　　　　　（役職名）	神戸学院大学　薬学部 助教
本助成金による 発表論文，学会発表	井上雅己, TNFR2 を標的に制御性 T 細胞を増殖するバイオロジクス，イノベーション・ジャパン 2022－大学見本市－（オンライン）, 2022.10.4-31. 井上雅己，制御性 T 細胞の増幅を目指した 2 型 TNF 受容体アゴニストタンパク質の創製, BioJapan 2022（横浜）, 2022.10.12-14. 柴田紗弥，井上雅己，屋田萌生，角田慎一. 2 型 TNF 受容体シグナルを介した Treg 制御による食物アレルギー抑制効果，日本薬学会第 143 年会（札幌）, 2023.3.26.

研究結果要約

制御性 T 細胞（Treg）は、末梢性免疫寛容の中心を担うリンパ球であり、腸管粘膜固有層に多く存在する。近年、食物アレルギー患者では Treg の機能不全が認められ、アレルギー発症との関連が注目されている。これは、Treg の機能を適正にコントロールする方法、とりわけ Treg を特異的に活性化する方法を確立できれば、食物アレルギーの予防や治療に有効となる可能性を示唆する。我々は、これまで、2 型 TNF 受容体（TNFR2）シグナルが Treg の制御に重要な役割をもつことを見出しており、高い TNFR2 刺激活性と生体内安定性を有し、生体内で Treg 機能を増強することで過剰な免疫応答を抑制するための新規タンパク質分子として、独自の TNFR2 アゴニスト TNF 変異体にヒト IgG-Fc を融合した「scR2agoTNF-Fc」を創製してきた。本研究では、scR2agoTNF-Fc の生体内外での Treg 増幅効率を調べるとともに、オボアルブミン（OVA）誘導食物アレルギーマウスにおける scR2agoTNF-Fc の病態抑制効果を検証した。scR2agoTNF-Fc は、他のリンパ球に対して Treg を優先的に増幅し、Treg の免疫抑制活性にも寄与した。また、食物アレルギーマウスにおいて、scR2agoTNF-Fc は OVA 摂取後の下痢症状を改善し、リンパ節中の $CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg を増加させたことから、アレルギー病態の抑制に有用であると考えられた。したがって、TNFR2 を標的とした

Treg 増幅は、免疫寛容を強化できる新たな食物アレルギー治療薬の開発に繋がると期待された。

研究目的

Treg は、免疫抑制活性をもつ T リンパ球のサブセットであり、末梢性免疫寛容の中心を担う。腸管粘膜固有層に多く存在しており、食物アレルギー患者では Treg の機能不全が認められるなど、アレルギー発症との関連が注目されている。これは、Treg の機能を適正にコントロールする方法、特に生体内で Treg を特異的に活性化する方法が確立できれば、食物アレルギーの予防や治療に有効となる可能性を示唆する。本観点において、我々はこれまで、TNFR2 シグナルが新たな Treg 制御分子であることを見出し、また、TNFR2 のユニークなシグナル開始機構の解明と TNFR2 選択的アゴニストの創製に成功している[1,2]。

そこで本研究では、これら独自の成果に基づいて、Treg を強力に活性化可能な新規モダリティ医薬を開発し、食物アレルギー治療への応用について可能性を探った。すなわち、高い TNFR2 刺激活性と生体内安定性の両立により、in vivo で Treg 機能を増強し、過剰な免疫応答を抑制する新規分子として、独自の TNFR2 アゴニスト TNF 変異体にヒト IgG-Fc を融合したタンパク質「scR2agoTNF-Fc」[3]の有効性を検証した。scR2agoTNF-Fc を用いて、生体内外での Treg 増殖効果や血中滞留性などの分子特性を解析した。また、OVA 誘発アレルギーモデルマウスを用いて、scR2agoTNF-Fc のアレルギー病態の抑制効果を調べた。scR2agoTNF-Fc の Treg 制御薬としての有用性を明らかにできれば、TNFR2 を標的とした新規食物アレルギー治療薬の開発に繋がると期待される。

研究計画及び研究手法

本研究では、scR2agoTNF-Fc の Treg 増殖・活性化を介した食物アレルギーの抑制効果について解析した。scR2agoTNF-Fc の in vivo／ex vivo における Treg 増幅作用を調べるとともに、食物アレルギーモデルマウスを用いて、治療効果の検証及び in vivo でのアレルギー抑制メカニズムの解明を行った。

scR2agoTNF-Fc の「生体内での Treg 増幅効率」

- B6 マウスに、scR2agoTNF-Fc を経時的に投与（50 µg/mouse, 週 2 回, 1-2 週）した後、リンパ節から細胞を調製し、フローサイトメトリーにより $CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg ポピュレーション増加や抑制性サイトカイン（IL-10）上昇など、Treg 数や機能が向上することを確かめた。
- B6 マウスに scR2agoTNF-Fc の 4 週間（週 2 回）の長期反復投与を行い、Treg 増殖活性が低下しないことを確かめた。

scR2agoTNF-Fc の「生体外での Treg 増幅効率」

- B6 マウスのリンパ節から細胞を調製し、セルソーターを用いて $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg を単離した。得られた Treg を細胞増殖トレーサー試薬（Carboxyfluorescein succinimidyl ester: CFSE）で蛍光標識し、scR2agoTNF-Fc を作用させた時に CFSE-Treg が増殖するか確かめた。また、増殖活性が、Fc 非融合体である R2agoTNF に比べて向上することを確かめた（ex vivo 増殖アッセイ）。
- $CD4^{+}$ヘルパーT 細胞を単離した後、CFSE 標識し、scR2agoTNF-Fc 存在下で Treg と共培養する。scR2agoTNF-Fc 濃度依存的な Treg 増殖・活性化によって、CFSE-$CD4^{+}$ ヘルパーT 細胞の増殖が抑制されることを確かめた（CFSE 細胞増殖抑制アッセイ）。
- TNFR2 を介したヒト Treg の増幅作用を調べるため、scR2agoTNF-Fc と同様の構造をもち、ヒト TNFR2 に対するアゴニスト活性をもつヒト型 TNFR2 agonist-Fc を用いて、ヒト末梢血単核球（PBMC）を 3 日間刺激した後、$CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg の増殖率を確かめた（ヒト PBMC アッセイ）。

scR2agoTNF-Fc の in vivo における動態解析・薬理解析

- scR2agoTNF-Fc（50 µg/mouse）をマウスへ単回投与した後、尾静脈より経時的に採血し、血中濃度を抗ヒト IgG-Fc ELISA 法で測定し、血中滞留性を調べた。R2agoTNF と比較し、Fc 融合により血中半減期が延長することを確かめた。

● 食物アレルギーモデルとして、オボアルブミン（OVA）腸管アレルギー誘発マウスを用いて、scR2agoTNF-Fc のアレルギー抑制作用を検証した。BALB/c マウスに OVA (100 μg/mouse)/Alum を腹腔内投与して感作（Day0 および Day14）した後、OVA を経口投与（Day28）することでアレルギーを発症させた。scR2agoTNF-Fc（50 μg/mouse）投与は、抗原感作前（Day-7）から週 2 回腹腔内投与を行う予防プロトコルとした。以下の項目を指標として、scR2agoTNF-Fc によるアレルギー症状の改善を評価した。

- 下痢の重症度スコアの測定（0:普通便, 色調変化, 軟便, 3:水様便・下痢）
- フローサイトメトリー解析による腸間膜リンパ節での $CD4^+Foxp3^+$ Treg 増加及び Th2 減少
- ELISA 解析による血中の抗 OVA-IgG 価, 抗 OVA-IgG 価の低下

結果と考察

<u>scR2agoTNF-Fc の「生体内での Treg 増幅効率」</u>

scR2agoTNF-Fc（50 μg/mouse）もしくは生理食塩水を B6 マウスに週に 2 回、1 週間、2 週間および 4 週間投与し、投与期間後に、フローサイトメトリーによって、リンパ節中の $CD4^+Foxp3^+$ Treg、$CD4^+Foxp3^-$ Tconv および $CD8^+$ T 細胞の割合を測定した。投与 1 週間後、scR2agoTNF-Fc 投与マウスにおける $CD4^+Foxp3^+$ Treg の数は、生理食塩水投与マウスと比較して有意に増加した。一方、scR2agoTNF-Fc 投与マウスにおける $CD4^+Foxp3^-$ Tconv および $CD8^+$ T 細胞の数は増加せず、生理食塩水投与マウスと同等であった。さらに、Treg の免疫抑制活性における scR2agoTNF-Fc の作用を調べるために、細胞内染色により、$CD4^+Foxp3^+$ Treg、$CD4^+Foxp3^-$ Tconv および $CD8^+$ T 細胞からの抑制性サイトカイン IL-10 の産生を測定した。その結果、投与 1 週間後、scR2agoTNF-Fc 投与マウスでは、生理食塩水投与マウスに比べて、$CD4^+Foxp3^+$ Treg における $IL\text{-}10^+$細胞が増加した。一方、scR2agoTNF-Fc 投与マウスと生理食塩水投与マウスのいずれも $CD4^+Foxp3^-$ Tconv や $CD8^+$ T 細胞においては $IL\text{-}10^+$細胞の増加は認められなかった。また、投与 1 週間において、scR2agoTNF-Fc の用量依存的にリンパ節における $CD4^+Foxp3^+$ Treg の増加が認められた。

次に、長期投与の Treg 増幅作用を評価するために、scR2agoTNF-Fc 投与後 1、2 および 4 週間

後のリンパ節における Treg の割合を比較した。その結果、2, 4 週間後においても、scR2agoTNF-Fc 投与マウスのリンパ節における $CD4^{+}Foxp3+$ Treg の割合は、生理食塩水投与マウスの Treg の割合に比べて高レベルに維持された。さらに、scR2agoTNF-Fc 投与マウスでは、$CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg における CTLA-4 発現率も 4 週間にわたって有意に高かった。scR2agoTNF-Fc の 4 週間の投与において、マウスの体重減少は観察されず、重篤な副反応などはないと考えられた。以上の結果から、当初の予定通り、scR2agoTNF-Fc の投与によって、in vivo で Treg を優先的かつ効果的に増幅することが可能であるとわかった。

<u>scR2agoTNF-Fc の「生体外での Treg 増幅効率」</u>

scR2agoTNF-Fc の Treg 増幅活性が向上したことを確かめるため、ex vivo での Treg 増殖アッセイを行った。マウスリンパ節から単離した $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg を CFSE で標識した後、抗マウス CD3 アゴニスト抗体の存在下で、scR2agoTNF-Fc（100 ng/mL）および R2agoTNF（100 ng/mL）で刺激した。細胞の分裂がくり返される毎に減衰する CFSE の蛍光量をフローサイトメトリーで測定することで、細胞増殖を評価した。増殖アッセイの結果、scR2agoTNF-Fc は、R2agoTNF と比較して Treg 増殖作用が亢進することがわかった。また、scR2agoTNF-Fc は濃度依存的（1, 10, 100 ng/mL）に WT-$CD4^{+}CD25^{+}$ Treg の増殖を亢進したが、TNFR2$^{-/-}$$CD4^{+}CD25^{+}$ Treg の増殖は亢進しなかったことから、Treg 増殖作用は TNFR2 を介したものであると確かめられた。さらに、scR2agoTNF-Fc は、抗マウス CD3 アゴニスト抗体の存在下で WT-$CD4^{+}CD25^{-}$ Tconv の増殖を亢進したものの、WT-$CD4^{+}CD25^{+}$ Treg に対して、より高い増殖促進作用を示した。これらの結果から、TNFR2 シグナルは、Treg 増殖能に T 重要な役割をもっており、scR2agoTNF-Fc は、in vitro において Treg を優先的かつ効果的に増殖させることを明らかにした。

scR2agoTNF-Fc の Treg に対する増殖促進作用がわかったことから、続いて、Treg の免疫抑制機能への作用について免疫抑制アッセイにより解析した。抗原提示細胞を含む CD90.2-細胞とともに、CFSE 標識した $CD4^{+}CD25^{-}$ Tconv および $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg を 72 時間共培養した後、フローサイトメトリーにより CFSE の蛍光量を測定することで、Treg の免疫抑制活性を評価した。まず、WT-

$CD4^+CD25^+$ Treg を scR2agoTNF-Fc（100 ng/mL）および抗マウス CD3 アゴニスト抗体によって 72 時間増殖させた後、さらに CFSE 標識 $CD4^+CD25^-$ Tconv と 72 時間共培養した。その結果、scR2agoTNF-Fc 刺激した Treg は、非刺激 Treg に比べて Tconv の増殖を抑制した。一方、同様に scR2agoTNF-Fc（100 ng/mL）を TNFR2-/--$CD4^+CD25^+$ Treg に 72 時間作用させた後、さらに CFSE 標識 $CD4^+CD25^-$ Tconv と 72 時間共培養した結果、scR2agoTNF-Fc 刺激 Treg と非刺激 Treg における Tconv 増殖抑制作用に差は認められなかった。さらに、CFSE 標識 $CD4^+CD25^-$ Tconv と $CD4^+CD25^+$ Treg の共培養下において、scR2agoTNF-Fc の Treg 増幅作用が Tconv の増殖を抑制するか調べた。WT-Treg と共培養した CFSE 標識 Tconv（Tconv:Treg＝1:0.25）（増殖率 33.3%）は、CFSE 標識 Tconvs 単独（Tconv:Treg = 1:0）（増殖率 67.1%）と比べて、Tconv の増殖率が低下した。本条件下で、scR2agoTNF-Fc（1, 10, 100 ng/ml）を添加すると、濃度依存的に CFSE-Tconv の増殖率が低下した。scR2agoTNF-Fc は、Tconv と Treg の共培養下においても、Treg による Tconv 増殖の抑制を亢進した（論文投稿中,in revision）。

ヒト TNFR2 に対するアゴニスト活性を示す TNFR2 agonist-Fc を用いて、ヒト PBMC における Treg 増幅作用を調べた。PBMC にヒト型 TNFR2 agonist-Fc を作用させた後、フローサイトメトリーによって $CD4^+Foxp3^+$ Treg のポピュレーションを測定した。その結果、TNFR2 agonist-Fc はヒト Treg を増幅することを見出した。

scR2agoTNF-Fc の in vivo における動態解析・薬理解析

scR2agoTNF-Fc は、Fc 融合により血中滞留性が向上すると考えられた。そこで、scR2agoTNF-Fc をマウス腹腔内に単回投与した後、経時的に採血し、ELISA によって血中 scR2agoTNF-Fc 濃度を測定した。Fc 非融合タンパク質である R2agoTNF は、投与後 24 時間以内に血中から消失し、半減期は 4.3 時間であったのに対して、scR2agoTNF-Fc の血中濃度は腹腔内投与の 90 分後にピークに達した後、4 日間以上維持された。scR2agoTNF-Fc の半減期は 80.7 時間であり、R2agoTNF と比べて、血中滞留性が大きく向上したことがわかった。

続いて、scR2agoTNF-Fc の in vivo における Treg 増幅作用が食物アレルギーの病態抑制に有効

であるか調べた。OVA 腸管アレルギー誘発マウスを作製するため、BALB/c マウスに OVA/Alum 混合液を腹腔内投与（Day0 及び Day14）し、OVA に感作させた。scR2agoTNF-Fc（50 μg/mouse）及び生理食塩水は、Day0 から週 2 回で 4 週間腹腔内投与した。2 回目の OVA 感作から約 2 週間後（Day31）に 50mg OVA を経口投与し（OVA チャレンジ）、腸管アレルギーを発症させた。Normal 群、OVA/scR2agoTNF-Fc 投与群、OVA/Saline 投与群の 3 群の比較を行った。チャレンジまでの期間、scR2agoTNF-Fc の投与によるマウスの急激な体重減少などの有害反応は認められなかった。OVA チャレンジによる下痢症状のスコアは、Normal 群に対して OVA/Saline 投与群は上昇したが、OVA/scR2agoTNF-Fc 投与群では有意に抑制された。Day31 の各マウスから採血し、血漿中に抗 OVA-IgE 抗体及び抗 OVA-IgG 抗体を測定した結果、OVA/scR2agoTNF-Fc 投与群では、OVA/Saline 投与群に比べて、これらの抗体価が低い傾向が認められた。さらに、Day31 に各マウスから腸管膜リンパ節を回収し、フローサイトメトリー によって $CD4^+Foxp3^+$ Treg 及び IL-4+ T 細胞の割合を測定した。その結果、OVA/scR2agoTNF-Fc 投与群では、Treg の割合が増加していた。また、Normal 群に対して OVA/Saline 投与群では $IL\text{-}4^+$ T 細胞の割合が増加したが、scR2agoTNF-Fc 投与に低下した。したがって、scR2agoTNF-Fc は OVA で誘発された食物アレルギーの病態を抑制することが明らかとした。

以上の結果から、scR2agoTNF-Fc は TNFR2 アゴニスト活性によって、Treg を増幅することがわかった。また、scR2agoTNF-Fc は、食物アレルギーモデルマウスにおいて、抗原摂取による下痢症状などの病態を抑制することを見出した。TNFR2 シグナルを介した Treg 増幅作用は、食物アレルギー症状の抑制・緩和に有用であると考えられたことから、本 TNFR2 アゴニストは、食物アレルギー治療薬のシーズとして期待される。

今後の研究活動について

本研究において、TNFR2 アゴニストによる食物アレルギー抑制効果の一端を示した。しかし、TNFR2 アゴニストの効果を詳しく検証するためには、投与量や投与のタイミングなど最適化が必要

と考える。また、本研究では抗原である OVA の感作前から TNFR2 アゴニストの投与を開始する予防的プロトコルによって効果を調べた。したがって、今後は、実際の食物アレルギー抑制を想定した、感作成立後のアレルギー発症を抑える治療プロトコルでの検証を進めていく必要があると考える。

さらに、オボアルブミンに対する食物アレルギーだけでなく、他の抗原による食物アレルギーや接触皮膚炎などの他のアレルギー疾患に加え、自己免疫疾患や臓器移植時の拒絶反応、移植片対宿主病（GvHD）など、末梢の免疫抑制バランスの破綻が原因である疾患は多く、これらの病態抑制のため、Treg を標的とする治療法の注目度は非常に高い。これらの疾患モデルマウスでの薬理作用も調べていく。現在、特に、生体内で直接 Treg を増やす試みはサイトカインストームの懸念など障壁が高く、実用化には至っていない。そこで、ヒト Treg に対するヒト型 TNFR2 agonist-Fc の増幅作用についても解析し、生体での Treg の"直接的かつ選択的な増幅"の実現を目指していきたい。

参考文献

1）Inoue M., Kamada H., Abe Y., Higashisaka K., Nagano K., Mukai Y., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. Aminopeptidase P3, a new member of the TNF-TNFR2 signaling complex, induces phosphorylation of JNK1 and JNK2., J. Cell Sci, 128: 656-69, 2015.

2）Ando D, Inoue M, Kamada H, Taki S, Furuya T, Abe Y, Nagano K, Tsutsumi Y, Tsunoda S., Creation of mouse TNFR2-selective agonistic TNF mutants using a phage display technique. Biochemistry and Biophysics Reports, 7: 309-15, 2016.

3）Inoue M, Yamashita K, Tsuji Y, Miki M, Amano S, Okumura T, Kuge K, Tone T, Enomoto S, Yoshimine C, Morita Y, Ando D, Kamada H, Mikami N, Tsutsumi Y Tsunoda S, Characterization of a TNFR2-selective agonistic TNF-α mutant and its derivatives as an optimal regulatory T cell expander. The Journal of Immunology, 206(8):1740-1751, 2021.

以上