

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：疾患特異的マクロファージを操る中分子創薬

Discovery of drug(s) with medium-sized molecules that can regulate disorder-specific macrophages

研究開発実施期間：2018年10月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：佐藤 荘

Takashi Satoh

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 自然免疫学研究室 准教授

Associate professor

Laboratory of Host Defense, Immunology Frontier Research Center Osaka University

II 研究開発の概要

(和文)

これまではマクロファージが発見されてから100年以上もの間1種類しかないと考えられてきたが、最近の研究から、生体内には様々な種のマクロファージサブタイプが存在しており、各々が異なる分化経路を辿る全く異なる細胞であるということが分かりつつある。したがって、これらの疾患ごとの細胞を狙った創薬、及びそれらの細胞の特異的な制御因子を狙った創薬はその疾患特異性の高さから、著しく副作用の低い薬の開発に繋がると考えられる。そこで、本申請では第4の標的疾患として癌に絞った。この癌の抑制・排除に関わる疾患特異的マクロファージ及び、その制御因子を同定することが免疫細胞を標的とした新しい薬の創出につながると考えられる。本研究課題では、様々な疾患の発症や増悪に重要な役割を果たしている疾患特異的マクロファージの中でも、研究代表者が同定した“癌の病態の抑制に特異的なマクロファージサブタイプ”の研究を行うことにより創薬をめざす。研究代表者はこれまで、メラノーマやカルシノーマの癌のマウス病態モデルに着目し、この疾患に関わる疾患特異的マクロファージの探索研究を行ったところ、病態が進行する際に体内でその割合が著しく変化する新規なマクロファージ様の細胞集団を同定し、さらに担癌マウスへのマクロファージ移植実験により、それらの新規のマクロファージが癌の発症、増悪を著しく抑制する現象を発見した。また、創薬を行うにあたりマウス由来のこの新規マクロファージによる癌抑制効果が、マウスだけでなくヒトにおいても確認される必要があるため、ヒト型 SatM2 の同定を行って、その癌抑制効果の有無を確認しなければならない。そこでヒトの血液の収集を行い、ヒト抗体を用いて網羅的なヒト型カウンターパートの探索を行ったところ、候補となる細胞を発見し形態的特徴からヒト型カウンターパート細胞の候補を選定した。最終的に成体における癌抑制効果を確認するために、

ヒトの癌細胞である Prostate Cancer 3 (PC3) 株を移植した免疫不全マウスにヒト型カウンターパートの候補細胞を移植すると、PC3 株の成長を著しく抑制することが分かった。このように、ゼノグラフトのヒト由来癌の抗腫瘍効果の評価系を立ち上げ、同マクロファージのヒトにおけるカウンターパートを同定し、ヒトでも同様の癌抑制効果を示すことを明らかにしたことからこの細胞を介した癌治療は画期的な創薬シーズとなりえると判断した。この新規マクロファージが抗腫瘍効果を示す分子メカニズムを検討するために、再度マウスの細胞を用いて実験を行った。該当のマクロファージをマウスから回収し、*in vitro* でメラノーマと共培養する系をもちいて、この細胞が癌を直接的に攻撃しているのか、他の免疫細胞を介して間接的に攻撃しているのかについて研究を進めた。また、それ以外にもこのマクロファージによる癌の貪食の有無についても検討を行った。その結果、計画していた項目は順調に全て達成し、この新規マクロファージを介した抗腫瘍効果の作用機序が明らかとなった。*in vivo* の系でも、中和抗体を用いて、このマクロファージを介した抗腫瘍効果の機序を検討し、*in vitro* のデータを裏付ける結果を得ることができた。また、癌の馴らし培地をもちいてこの細胞を培養して経時的に得た網羅的遺伝子発現データや、生体内から取り出した様々な免疫細胞及びこのマクロファージから取得した網羅的遺伝子発現データを **bioinformatics** を用いて解析することにより、細胞の新たな性質についても明らかにすることができた。またそれらの遺伝子発現データを用いて、細胞の分化に関わる分子の探索も行った。同分子の遺伝子欠損(KO)マウスは胎生致死になることから、**Crispr/Cas9** の系を用いて **conditional KO** マウスを作製した。現在、この **Flox** マウスと **LysM-Cre** マウス、**CD11b-Cre** マウスとの交配を行っており、**conditional KO** マウスが得られ次第、該当のマクロファージについて **FACS** 解析、遺伝子発現解析、そして病態モデルによる評価を行う予定である。

この新規マクロファージを用いた創薬シーズを探索するためにこの細胞の制御因子について検討し、網羅的遺伝子発現解析結果から、この細胞の制御因子である遺伝子 X を同定した。この分子が欠損すると生体内で該当マクロファージが著しく増殖し、その結果として癌の増殖が著しく抑制することを明らかにした。さらに遺伝子 X はマウスとヒトとで 90%以上という著しく高い相当性を示している。新規マクロファージの制御因子遺伝子 X は、複数のメンバーが存在するファミリータンパク質の構成分子のひとつであり、各メンバー間のアミノ酸配列の相同性も高いが、各々のファミリータンパク質の個々の機能を持っていることが研究から明らかになってきている。基質認識部位の構造類似性も高いことから遺伝子 X に対して特異性の高い低分子化合物を取得するのは困難であることが予測された。一方で、抗体医薬品は、標的分子に対する特異性が高い特徴を持つが、細胞膜を透過しないため、細胞内タンパク質である遺伝子 X に作用することは不可能である。本プロジェクトの参加企業である中外製薬が開発している中分子創薬は、細胞内移行性を持ちながら、抗体と同様に標的分子に特異的に結合できることが確認されている。そこで、本研究課題では、この細胞の活性化機構を応用した創薬に展開すべく、発見した制御因子遺伝子 X の機能を阻害する中分子化合物を同定し、抗がん剤の開発を目標としてきた。阻害化合物取得のための、遺伝子 X の発現システムを確立するために、Flag、Myc、8×His の様なタグを N 末端、及び C 末端に付けて 10 種類以上の発現コンストラクトを作製し、細胞に導入してその発現量を検討した所、スクリーニングに必要な十分量のタンパクが確認された。続いて、スクリーニングに用いる評価系の構築を行った。遺伝子 X は、そのファミリー分子も含め、タンパク質の翻訳後修飾に関わっていることが報告されている。また、ファミリーのいくつかは自己修飾の報告もなされている。そこで、この遺伝子 X が自己修飾するかどうかを指標の一つとして、HEK293 に本分子を発現させて検討した。当初、計画書に記載していた方法では、遺伝子 X を細胞に強制発現させるとその細胞の性質が変化してしまうために、上手く評価できないことが分かった。そこで次の検討方法として、細胞内での自己修飾を見るのではなく、HEK293 に遺伝子 X を発現させて細胞を一旦破碎してタンパク質として *in vitro* で自己修飾が起きるかについて検討を行ったところ、その自己修飾が確認された。次に質量分析を用い、遺伝子 X の自己修飾がなされている箇所について検討した。その結果、複数の箇所が自己修飾されている事が示唆された。また、その中の一ヶ所は、遺伝子 X の酵素活性部位と重複していることが明らかとなった。そこで、自己修飾を確認するために、遺伝子 X の自己修飾されていると予測された部位に point mutation

を入れた変異体を作製し、野生型と変異体とを HEK293 に発現させて、細胞を破碎し、再度 *in vitro* での自己修飾を検討したところ、野生型では修飾が確認されたものの、変異体ではその修飾が確認されなかった。変異体はタンパク質自体の発現は確認されていることから、この分子の自己修飾の部位を特定し、自身のタンパク質翻訳修飾がその修飾に必要であることを明らかにし、この *in vitro* の自己修飾系を化合物スクリーニングの系として確立することができた。

(英文)

Monocytes and macrophages comprise a variety of subsets with diverse functions. It is thought that these cells play a crucial role in homeostasis of peripheral organs, key immunological processes and development of various diseases. Among these diseases, cancer is a life-threatening disease of unknown aetiology. Its pathogenesis is poorly understood.

The purpose of this research project was to study cancer-specific macrophage subtypes with the aim of facilitating discovery of drug(s) that affect disorder-specific macrophage subtypes that play important roles in the onset and exacerbation of various diseases. We have previously used a mouse pathology model to study disorder-specific macrophages associated with cancer and have identified a novel macrophage-like cell population, the proportion of which varies dramatically with cancer progression. In addition, we have discovered that this novel cell subtype markedly suppresses the onset of cancer. Furthermore, we had identified the counterpart of the macrophage in humans and demonstrated that it shows similar cancer suppressing effect in humans as in mice, cancer treatment with this cell may prove to be an innovative starting point for new anti-tumor therapies. In order to investigate the molecular mechanism by which this new macrophage exhibits an antitumor effect, we performed *in vitro* experiments. We first investigated whether these cells attack cancer directly or indirectly through other immune cells by using co-culture system. In addition, the phagocytic ability of cancer by this macrophage was also examined. As a result, all planned *in vitro* studies were successfully achieved, and the mechanism of action of the antitumor effect via this new macrophage was clarified. Even in the *in vivo* system, the neutralizing antibody was used to investigate the mechanism of the antitumor effect via macrophages, and the results supporting the *in vitro* data were obtained. Also we obtained comprehensive gene expression data of the macrophage using a conditioned medium of cancer. By analyzing these gene expression data using bioinformatics, we were able to clarify the new properties of cells. Using these gene expression data, we also identified a molecule involved in the novel macrophage differentiation. Since gene-deficient (KO) mouse of the molecule showed embryonic lethality phenotype, a conditional KO mouse was prepared using the CrispR / Cas9 system. Currently, this Flox mouse is bred with LysM-Cre mouse and CD11b-Cre mouse. As soon as conditional KO mice are obtained, the corresponding macrophages will be evaluated by FACS analysis, gene expression analysis, and pathological model.

Furthermore, we have investigated the factors that regulate the macrophage with the aim of discovering new drugs. We also have identified geneX as a factor that regulates these cells. We have found that, when there is a deficient of this gene, this macrophage proliferates markedly whereas proliferation of cancer is markedly suppressed. Furthermore, geneX shows a remarkably high homology of 97% between mouse and human. We predict that it will be difficult to identify a low molecular weight compound against GENEX because the substrate recognition site of these family is extremely similar structurally. Therefore, we planned to discover a drug that affects the mechanism for activating this cell, a medium-sized molecule that inhibits the function of the discovered regulatory factor geneX. In order to establish an expression system for geneX for obtaining inhibitory compounds, we prepared various type constructs with tags such as Flag, Myc, and 8xHis are attached to the N-terminus and C-terminus. The amount of protein required for screening was confirmed. Subsequently, an evaluation system used for screening was constructed. Gene X, including its family molecules, has been reported to be involved in post-translational modification of proteins. Some families have also been reported to be self-modifying. Thus, we investigated whether this gene X was self-modifying by expressing this molecule in HEK293. Initially, it was found that the method described in the plan document cannot be evaluated well because gene X expressed cell changed the properties. As the next examination method, cells in which HEK293 expressed gene X was disrupted to recover the protein, and whether *in vitro*

self-modification occurred was examined. As a result, we found that self-modification was occurred. Next, mass spectrometry was used to examine the locations where geneX was self-modified. As a result, it was suggested that several places were self-modified. In addition, it was revealed that one of them overlapped with the enzyme active site of gene X. Therefore, in order to confirm the self-modification, a mutant in which a point mutation was inserted at the site where gene X was predicted to be self-modified was prepared. When we expressed wild type and mutants in HEK293 and examine in vitro self-modification of geneX, the modification was confirmed in the wild type but not in the mutant. Since the mutant has been confirmed to express the protein itself, the site of self-modification of this molecule is identified, and it is clarified that its protein translational modification is necessary for the modification. We could established the system for a compound screening system.

III 事後評価総合所見

研究代表者らが同定した新規マクロファージがガン特異的なマクロファージであるという知見およびこの細胞が遺伝子 X という蛋白質によって制御されているという知見は提案者の新規なコンセプトであり、本プロジェクトで、この新規マクロファージの薬づくりにつながる機能が次々と明らかにされ、抗腫瘍マクロファージのバイオロジーに深みが増したことは大きな成果と言える。

一方、目的であった遺伝子 X を阻害する中分子化合物の探索研究が計画通りに開始できず、早期終了となったことは残念であった。今後、産学間の情報共有を継続し、創薬開発の早期再開を期待します。