

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 2型TNF受容体シグナルを標的とした制御性T細胞制御薬の探索
(英語) Identification of regulatory T cell modulators targeting TNF receptor-2 signaling
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
創薬デザイン研究センター 副センター長 角田 慎一
- 所属 役職 氏名： (英語) Shin-ichi Tsunoda
Deputy Director, Center for Drug Design Research
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition
- 実施期間： 平成28年9月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) TNFR2選択的阻害に基づくTreg抑制法の検証
開発課題名： (英語) Verification of Treg suppressing methods based on selective inhibition of TNFR2 signaling
- 研究開発代表者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
創薬デザイン研究センター 副センター長 角田 慎一
- 所属 役職 氏名： (英語) Shin-ichi Tsunoda
Deputy Director, Center for Drug Design Research
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition
- 分担研究 (日本語) 化合物ライブラリを用いたTNFR2シグナルPPI阻害剤の探索・バリデーション
開発課題名： (英語) Identification of PPI inhibitors for TNFR2 signaling from chemical compounds library
- 研究開発分担者 (日本語) 学校法人神戸学院 神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門
助手 井上 雅己

所属 役職 氏名： (英 語) Kobe Gakuin University
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Division of Biopharmaceutical Sciences
Researcher
Masaki Inoue

II. 成果の概要 (総括研究報告)

がん細胞は、患者の体内で自らの増殖・生存に有利ながん微小環境を構築し、免疫エスケープ (免疫逃避) 状態を生み出すことで、宿主からの攻撃を防いでいる。本研究は、この免疫抑制状態を解除するため、免疫応答の抑制に関わる制御性 T 細胞 (Treg) を標的としたがん治療戦略の可能性を探るものである。当該研究では、Treg の機能と 2 型 TNF 受容体シグナルとの関連解析及び Treg を制御可能な化合物の探索を試みており、本年度の成果を以下に示す。

「TNFR2 選択的阻害に基づく Treg 抑制法の検証」

(国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター 副センター長 角田 慎一)

ヒト末梢血単核球 (PBMC)、及びマウスの脾臓・リンパ節由来の T 細胞画分を用いて、Treg マーカー発現プロファイル解析を行った。TNFR1/TNFR2 および既存の Treg マーカー分子である CTLA-4 や GITR、OX40 の発現状態をフローサイトメトリーにて調べた結果、TNFR2 が他の分子に比べて Treg で有意に高発現することを見出した。したがって、Treg の標的分子として TNFR2 が有望である可能性が示唆された。また、Treg 増殖能の評価として、マウスリンパ組織から、Treg (CD4+CD25+T 細胞) および Tconv (CD4+CD25-T 細胞) を単離し、TNF および TNFR2 アゴニスト (TNFR2 指向性 TNF 変異体) 刺激条件下での Treg および Tconv の増殖活性を調べた。その結果、TNFR2 シグナルの活性に依存して、Treg の増殖が亢進することがわかった。一方、Tconv は TNFR2 依存的な増殖亢進は認められなかった。したがって、TNFR2 は Treg に高発現するだけでなく、TNFR2 シグナルが Treg の増殖能において機能的に関与することが示唆された。

さらに、マウスリンパ節からエフェクター T 細胞 (CD4+CD25+T 細胞; Tconv もしくは CD8+T 細胞; CTL) を分画し、CFSE 標識した後、同様に単離した Treg と共培養することで、Treg によるエフェクター T 細胞の増殖阻害活性を評価した。その結果、エフェクター T 細胞の細胞分裂は、Treg によって抑制された。現在、TNF 及び TNFR2 アゴニストの刺激条件の最適化を検討しており、Treg の免疫抑制機能における TNFR2 シグナルの関連を調べている。

また、上記の *in vitro* 実験と並行して、ヒト大腸がん 200 症例の組織が搭載されたがん組織マイクロアレイを用いて、TNFR2, FoxP3 等の Treg 発現分子の染色を行い、個々のがん組織におけるこれらの分子の発現プロファイルを解析した。その結果、多くの大腸がん症例で、TNFR2 と FoxP3 陽性細胞が認められた。今後の研究の基礎データとするため、現在、組織での局在部位などを解析している。

「化合物ライブラリを用いた TNFR2 シグナル PPI 阻害剤の探索・バリデーション」

(神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門 助手 井上雅己)

TNFR2 シグナルに関わる PPI 阻害剤の探索を行うため、2 種類のスクリーニング系の構築を行った。

一つは、TNFR2 シグナル強度に依存してレポーター分子（アルカリフォスファターゼ）を分泌するレポーター発現細胞を作製した。化合物ライブラリから TNFR2 シグナル抑制化合物を探索するためスクリーニングアッセイ系に利用する予定である。もう一つは、TNFR2-APP3 間の相互作用（PPI）を評価するためのスプリットルシフェラーゼを用いた系である。スプリットルシフェラーゼ分子が融合した TNFR2 および APP3 を細胞に共発現し、ルシフェラーゼによる発光シグナル強度に基づき、PPI 阻害剤を探索するために用いる予定である。発現コンストラクトを設計し、現在、作製を進めている。

Tumor cells prevent attacks from the host by constructing a tumor microenvironment that is advantageous for their proliferation and survival in the body and which creates conditions for immune escape. To overcome this immunosuppressed state, the present research is designed to develop a cancer treatment strategy targeting regulatory T cells (Treg) involved in immune suppression activity. We now report the results to date regarding analysis of Treg function and the search for potential Treg controlling compounds.

Verification of Treg suppressing modalities based on selective inhibition of TNFR2 signaling

(National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Vice-director, Shin-ichi Tsunoda)

CTLA-4, GITR and OX40 are already known to be regulatory T cell (Treg) specific marker molecules. We examined the expression of TNF receptors TNFR1 and TNFR2 and of these molecules, using T cells isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or mouse lymph node, by flow cytometry. Expression levels of TNFR2 on Treg were found to be higher than those of the other molecules.

Furthermore, to confirm cell proliferation, Treg (CD4+CD25+ T cells) and Tconv (CD4+CD25- T cells) isolated from mouse lymph node were stimulated with TNF or TNFR2 agonist. This assay confirmed that Treg numbers increased with increasing TNF or TNFR2 agonist concentration. On the other hand, proliferation of Tconv with increasing TNFR2 signaling was not observed. These results suggest that TNFR2 is a potential target molecule controlling Treg function.

Identification of PPI inhibitors for TNFR2 signaling from a chemical library

(Kobe Gakuin University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Researcher, Masaki Inoue)

We have constructed a reporter expression cell line which secretes alkaline phosphatase as a reporter molecule, depending on the intensity of TNFR2 signaling. Inhibitor molecules of the TNFR2 signaling pathway can be identified from a chemical compound library using this cell line. We are also attempting construction of a cell line for use in the split-luciferase complementation assay. This cell line is to be used to identify PPI inhibitor molecules which can inhibit the interaction between TNFR2 and APP3, employing the chemical compound library. We are now constructing a DNA plasmid vector designed to express split luciferase-fused TNFR2 and APP3.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 2件）

1. Inoue M, Ando D, Kamada H, Taki S, Niiyama M, Mukai Y, Tadokoro T, Maenaka K, Nakayama T, Kado Y, Inoue T, Tsutsumi Y, Tsunoda S. A trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- α mutant enhances molecular stability and enables facile modification. *Journal of Biological Chemistry*. 2017, 292(16), 6438-6451.
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*. 2016, 7, 309-315.
3. 角田慎一. 革新的バイオ医薬品の創製に資する機能性抗体のスクリーニング技術. *日本薬理学雑誌*. 2016, 148, 149-153.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 一本鎖構造と PEG 修飾に基づく TNF 受容体アンタゴニストの高機能化, 口頭, 井上雅己, 安藤大介, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/26, 国内
2. 機能改変タンパク質によるサイトカインシグナル制御と疾患治療への応用, 口頭, 角田慎一, 新適塾「未来創薬への誘い」(千里ライフサイエンス振興財団), 2016/10/31, 国内
3. 機能性人工タンパク質の創製と疾患治療への応用の試み, 口頭, 角田慎一, バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, 2016/9/6, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし