

4. Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, **Kanai T**. Cross-talk between ROR γ t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20: 1426-34.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

松岡 克善 慶應義塾大学医学部 内科学消化器内科研究室 専任講師

治療標的としての LRG の全般的評価①

担当責任者 飯島 英樹 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 講師

研究要旨

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、研究施設、製薬企業及び拠点病院の共同体制のもと、LRG（Leucine rich alpha-2 glycoprotein）を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指す。

LRG は業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRG は、IBD の重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望で、エーディア（株）との共同体制で、PMDA の薬事戦略相談と並行しつつ慶應義塾大学及び大阪大学において臨床性能試験を進めている。最近、LRG の血管新生作用について Wang らが Nature 誌に報告するなど、LRG の機能にも注目が集まっている。仲らも LRG が血管新生作用を有することを独自に確認し（特許申請中）、さらに LRG が免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、仲らは LRG 欠損マウスを独自に作製し、IBD 様腸炎を誘導した LRG 欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRG が IBD の新たな治療標的として有望であることを示唆している。

本研究では、LRG 欠損マウスを用いた IBD モデル解析のデータより、LRG が IBD 様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関与していることを明らかにしてきている。また、中外製薬（株）とともに作製した抗 LRG 抗体については、その特性および LRG 阻害活性のスクリーニングを開始した。臨床試験拠点病院である大阪大学では、得られたデータを臨床的視点から評価し、臨床試験への移行を目指して検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

A. 研究目的

炎症性腸疾患においては、サイトカイン TNF- α 等を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しかし、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、研究施設（医薬基盤研究所）、製薬企業（中外製薬）及び臨床試験拠点病院（慶應義塾大学及び大阪大学）の連携体制のもと、新規治療標的分子 LRG に着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用

いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

（1）DSS 腸炎

LRG 欠損マウスおよび野生型マウス（いずれも C57BL/6 系統）に対し、dextran sulfate sodium (DSS; MP biomedical) を溶解させた滅菌水（4% DSS Wt/Vol）を自由飲水で5日間投与した。

（2）HE 染色

ホルマリン固定後のマウス腸組織を、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

(3) ウェスタンブロット解析

蛋白抽出液を SDS-PAGE(5-20%グラジェントゲル(和光純薬))にアプライし、PVDF 膜に転写後、1% BSA/TBST(TBS+ 0.1% Tween20)にてブロッキングし、抗 Ly6G 抗体 (Biolegend) および HRP 標識抗ウサギ抗体 (GE health care)にて処理して、Chemi-Lumi One Super (ナカライ)により検出を行った。

(4) メッセンジャーRNA 解析

マウス組織等より RNeasy mini kit (キアゲン)を用いて mRNA を抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (キアゲン)により cDNA に変換し、SYBR Premix Ex taq (タカラバイオ)により発現定量を行った。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

業務主任者の仲らのグループを中心に行った DSS 腸炎モデルの解析により、DSS 腸炎モデルの解析により腸炎誘導後の粘膜上皮および浸潤する好中球・マクロファージからの LRG が産生されることが明らかになった。また、LRG 欠損マウスにおいては、DSS 腸炎が軽減しており、腸粘膜における好中球などの細胞浸潤が減少していることが明らかになった。さらに、DSS 腸炎誘導後の大腸におけるサイトカイン産生も、LRG 欠損マウスにおいて減少していた。本研究のデータを検討した結果、抗 LRG 抗体の使用により、IBD における炎症性細胞浸潤および炎症性サイトカイン産生が抑制され、IBD への治療効果が期待できるものと考えられた。

担当責任者の飯島らのグループは、研究代表者の仲らのグループとともに、血清 LRG のバイオマーカーとしての可能性について以前から検討している。LRG は IL-6 に依存しない炎症を捉えるマーカーとして、IBD の重症度・疾患活動性を反映する新規マーカーとし

て有望である。さらに、抗 LRG 抗体を実用化するにあたっては、血清 LRG がコンパニオン診断薬として有用であることが考えられ、臨床試験を行う際にも検討すべきと考えられた。

E. 結論

本研究により、IBD 様腸炎において LRG が細胞遊走やサイトカイン産生に重要であるという役割が明らかになってきた。今後、作製中の抗 LRG 抗体のスクリーニングが完了すれば、抗体治療の有効性について検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Mukai A, **Iijima H**, Hiyama S, Fujii H, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Araki M, Hayashi Y, Kondo J, Mizushima T, Kanto T, Egawa S, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Regulation of anergy-related ubiquitin E3 ligase, GRAIL, in murine models of colitis and patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2014;49(12):1524-35.
2. Inoue T, **Iijima H**, Arimitsu J, Hagihara K, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Mukai A, Shinzaki S, Nishida T, Ogata A, Tsujii M, Takehara T. Amelioration of small bowel injury by switching from nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs to celecoxib in rheumatoid arthritis patients: a pilot study. *Digestion.* 2014;89:124-32.
3. Hiyama S, **Iijima H**, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Araki M, Kato M,

- Hayashi Y, Nishida T, Fujii H, Mukai A, Shibata N, Sato S, Kiyono H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Tsujii M, Takehara T. Peyer's patches play a protective role in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(5):790-9.
4. Hayashi Y, Nishida T, Tsujii M, Tsutsui S, Yamamoto K, Isohashi F, Yamasaki M, Miyata H, Kato M, Yamada T, Shinzaki S, **Iijima H**, Ogawa K, Doki Y, Takehara T. Lymph node enlargement after definitive chemoradiotherapy for clinical stage I esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:706.
 5. T Inoue, T Nishida, A Maekawa, Y Tsujii, T Akasaka, M Kato, Y Hayashi, S Yamamoto, J Kondo, T Yamada, S Shinzaki, **H Iijima**, M Tsujii, and T Takehara. Clinical features of postpolypectomy bleeding associated with heparin replacement therapy. *Digestive Endoscopy* In press.
 6. K Yoshimoto, K Yamada, K Watabe, M Takeda, T Nishimura, M Kido, T Nagakura, H Takahashi, T Nishida, **H Iijima**, M Tsujii, T Takehara, and Y Ohno. Gastric contraction imaging system using a three-dimensional endoscope. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine* In press.
 7. Sakurai T, Kashida H, Watanabe T, Hagiwara S, Mizushima T, **Iijima H**, Nishida N, Higashitsuji H, Fujita J, Kudo M. Stress response protein Cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *Cancer Res* in press.
- G-2. 学会発表
1. Shinzaki S, **Iijima H**, Fujii H, Kawai S, Araki M, Hiyama S, Hayashi Y, Watabe K, Tsujii M, Miyoshi E, Takehara T. N-acetylglucosaminyltransferase V (GNT-V) exacerbates murine experimental colitis with macrophage dysfunction and enhances colitis-associated tumorigenesis. .The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's& Colitis, Seoul, Korea, 2014.
 2. Kawai S, **Iijima H**, Shinzaki S, Araki M, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. The Effectiveness of Intestinal Real Time Virtual Sonography in Patients With Inflammatory Bowel Disease. DDW, Chicago, 2014.
 3. Kawai S, **Iijima H**, Shinzaki S, Araki M, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. The usefulness of intestinal real time virtual sonography in patients with inflammatory bowel disease. ECCO, Copenhagen, Denmark, 2014.
 4. **Iijima H**, Shiraishi E, Shinzaki S, Inoue T, Hiyama S, Kawai S, Araki M, Nakajima S, Hayashi Y, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Vitamin K-deficiency deteriorates murine dextran sodium salt-induced colitis. The 2nd Annual Meeting of Asian

Organization for Crohn's & Colitis,
Seoul, Korea, 2014.

神戸, 2014.

5. Hiyama S, **Iijima H**, Shinzaki S, Inoue T, Shiraishi E, Kawai S, Araki M, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. Observation of Peyer's Patches Using Narrow Band Imaging With Magnifying Endoscopy Is Useful in Predicting the Recurrence of Ulcerative Colitis, DDW, Chicago, USA, 2014.
6. 日山智史, **飯島英樹**, 荒木学, 川井翔一朗, 白石衣里, 新崎信一郎, 辻井正彦, 竹原徹郎. 腸管狭窄合併クローン病患者に対する生物学的製剤治療の検討 JDDW (内視鏡学会), 神戸, 2014.
7. 荒木学、澁川 成弘、**飯島 英樹**、川井 翔一朗、白石 衣里、日山 智史、井上 隆弘、新崎 信一郎、西田勉、井上 敦雄、辻井 正彦、竹原 徹郎 炎症性腸疾患患者に対する抗 TNF- α 抗体製剤投与中の肝機能障害の特徴について 第 100 回消化器病学会総会, 神戸 2014.
8. 新崎信一郎, **飯島英樹**, 松岡克善, 武下達矢, 世良田聡, 辻井正彦, 金井隆典, 竹原徹郎, 仲哲治. 炎症性腸疾患バイオマーカーとしての Leucin-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)の可能性 第51回消化器免疫学会, 京都, 2014.
9. Shinzaki S, **Iijima H**, Hiyama S, Nishimura J, Mizushima T, Tsujii M, Takehara T. Importance of early endoscopic surveillance for postoperative Crohn's disease patients. JDDW(88回日本消化器内視鏡学会総会)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

新崎 信一郎 大阪大学大学院医学系研究科
消化器内科学 助教

治療標的としての LRG の全般的評価②

担当責任者 田中 敏郎 大阪大学大学院医学系研究科 抗体医薬臨床応用学寄附講座 教授

研究要旨

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、研究施設、製薬企業及び拠点病院の共同体制のもと、LRG (Leucine rich alpha-2 glycoprotein) を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指す。

LRG は業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRG は、IBD の重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望で、エーディア（株）との共同体制で、PMDA の薬事戦略相談と並行しつつ慶應義塾大学及び大阪大学において臨床性能試験を進めている。最近、LRG の血管新生作用について Wang らが Nature 誌に報告するなど、LRG の機能にも注目が集まっている。仲らも LRG が血管新生作用を有することを独自に確認し（特許申請中）、さらに LRG が免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、仲らは LRG 欠損マウスを独自に作製し、IBD 様腸炎を誘導した LRG 欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRG が IBD の新たな治療標的として有望であることを示唆している。

本研究では、LRG 欠損マウスを用いた IBD モデル解析のデータより、LRG が IBD 様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関与していることを明らかにしてきている。また、中外製薬（株）とともに作製した抗 LRG 抗体については、その特性および LRG 阻害活性のスクリーニングを開始した。臨床試験拠点病院である大阪大学では、得られたデータを臨床的視点から評価し、臨床試験への移行を目指して検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

A. 研究目的

炎症性腸疾患においては、サイトカイン TNF- α 等を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しかし、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、研究施設（医薬基盤研究所）、製薬企業（中外製薬）及び臨床試験拠点病院（慶應義塾大学及び大阪大学）の連携体制のもと、新規治療標的分子 LRG に着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用

いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

(1) DSS 腸炎

仲らの項を参照。

(2) HE 染色

ホルマリン固定後のマウス腸組織を、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

(3) ウェスタンブロット解析

蛋白抽出液を SDS-PAGE (5-20% グラジェントゲル(和光純薬)) にアプライし、PVDF 膜に転写後、1% BSA/TBST (TBS+ 0.1% Tween20) に

てブロッキングし、抗 Ly6G 抗体 (Biolegend) および HRP 標識抗ウサギ抗体 (GE health care) にて処理して、Chemi-Lumi One Super (ナカライ) により検出を行った。

(4) メッセンジャーRNA 解析

マウス組織等より RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて mRNA を抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (キアゲン) により cDNA に変換し、SYBR Premix Ex taq (タカラバイオ) により発現定量を行った。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

業務主任者の仲らのグループを中心に行った DSS 腸炎モデルの解析により、DSS 腸炎モデルの解析により腸炎誘導後の粘膜上皮および浸潤する好中球・マクロファージからの LRG が産生されることが明らかになった。また、LRG 欠損マウスにおいては、DSS 腸炎が軽減しており、腸粘膜における好中球などの細胞浸潤が減少していることが明らかになった。さらに、DSS 腸炎誘導後の大腸におけるサイトカイン産生も、LRG 欠損マウスにおいて減少していた。本研究のデータを検討した結果、抗 LRG 抗体の使用により、IBD における炎症性細胞浸潤および炎症性サイトカイン産生が抑制され、IBD への治療効果が期待できるものと考えられた。

田中らの所属する大阪大学グループでは IL-6 を標的とする抗体医薬品トシリズマブの免役難病への適応拡大に関する研究を進めている。また、大阪大学の飯島らのグループは、業務主任者の仲らのグループとともに、血清 LRG のバイオマーカーとしての可能性について以前から検討している。LRG は IL-6 に依存しない炎症を捉えるマーカーとして、IBD の重症度・疾患活動性を反映する新規マーカーとして有望である。本研究のデータを検討

した結果、IL-6 の関与が乏しく従来の炎症性マーカー CRP が余り上昇しない IBD においても、抗 LRG 抗体の効果が期待されるかもしれないと考えられた。

E. 結論

本研究により、IBD 様腸炎において LRG が細胞遊走やサイトカイン産生に重要であるという役割が明らかになってきた。今後、作製中の抗 LRG 抗体のスクリーニングが完了すれば、抗体治療の有効性について検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. **Tanaka T.** Flavonoids for allergic diseases: present evidence and future perspective. *Curr Pharm Des*, 2014 20(6):879-85.
2. Ogata A, Tanimura K, Sugimoto T, Inoue H, Urata Y, Matsubara T, Kondo M, Ueki Y, Iwahashi M, Tohma S, Ohta S, Saeki Y, **Tanaka T**; the Musashi Study Investigators. Phase III study of the efficacy and safety of subcutaneous versus intravenous tocilizumab monotherapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2014 66:344-54.
3. Yoshida Y, **Tanaka T.** Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *BioMed Res Int*, 2014, Article ID 698313.
4. **Tanaka T**, Narazaki M, Ogata A, Kishimoto T. A new era for the treatment

- of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Semin Immunol*, 2014 26:88-96.
5. **Tanaka T**, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res*, 2014 2:288-94.
 6. **Tanaka T**, Hishitani Y, Ogata A. Monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis: comparative effectiveness of tocilizumab with tumor necrosis factor inhibitors. *Biologics: Targets & Therapy*, 2014 8:141-53.
 7. **Tanaka T**, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014 Sep 4;6(10):a016295.
 8. **Tanaka T**, Narazaki M, Kishimoto T. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy against autoimmune inflammatory diseases. *Molecular Biology of B cell*, Second Edition. Edited by T. Honjo, F. Alt, A. Radbruch, M. Reth. Elsevier. Chapter 27, pp. 515-525, 2014.
 9. Urushima H, Sanada Y, Ogata A, Yoshida M, Lin H, Hagihara K, Narazaki M, **Tanaka T**, Ito T, Maeda K. Tocilizumab increases serum adiponectin and reduces serum fatty acid binding protein 4 in patients with rheumatoid arthritis. *J Endocrinol Metab*, 2014 4(5-6):143-7.
 10. Kang S, **Tanaka T**, Kishimoto T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. *Int Immunol*, 2015 27:21-29.
 11. Shima Y, Hosen N, Hirano T, Arimitsu J, Nishida S, Hagihara K, Narazaki M, Ogata A, **Tanaka T**, Kishimoto T, Kumanogoh A. Expansion of range of joint motion following treatment of systemic sclerosis with tocilizumab. *Mod Rheumatol*, 2015 25:134-7.
- G-2. 学会発表**
1. **Tanaka T**. Therapeutic targeting of interleukin-6 receptor for immune-mediated diseases. 6th International Conference on Drug Discovery & Therapy. Feb 10-12, 2014. Dubai, UAE.
 2. **田中敏郎**, 西岡紘治, 平野亨, 嶋良仁, 檜崎雅司, 緒方篤, 熊ノ郷淳 免疫難病における IL-6 過剰産生の分子機構 シンポジウム 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014, 4 東京
 3. **Tanaka T**. A humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, for the treatment of immune-mediated diseases. MidTerm Conference of ICIS. May 14-17, 2014. Kiel, Germany.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
該当無し。
- I. 研究協力者**
緒方 篤 大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 准教授
檜崎 雅司 大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 講師

炎症性腸疾患における LRG の機能解析と抗体の評価

担当責任者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

バイオ創薬プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、研究所、大学、製薬企業及び拠点病院の共同体制のもと、LRG（Leucine rich alpha-2 glycoprotein）を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指すものである。

LRG は業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRG は、IBD の重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望であり、診断薬メーカーとの共同体制で臨床性能試験を進めている。一方で近年、LRG が血管新生作用も有することが報告されるなど、LRG の機能に注目が集まっている。仲らも LRG が血管新生作用を有することを独自に確認し、さらに LRG が免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、LRG 欠損マウスを作成し、IBD 様腸炎を誘導したところ、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRG が IBD に対する新たな治療標的として有望であることを示唆している。

上記背景をふまえ、本研究では、LRG 欠損マウスに IBD を誘導したモデルを用いて、炎症組織のサイトカイン産生等を解析した。その結果、LRG が IBD 様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関与することが明らかとなった。また同時に、製薬メーカーと共同で抗 LRG 抗体を作製し、抗体の特性解析および LRG 阻害活性によるスクリーニングを開始した。

A. 研究目的

炎症性腸疾患においては、サイトカイン TNF- α を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しかし、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、産学官・臨床試験拠点病院の連携体制のもと、新規治療標的分子 LRG に着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

（1）マウス

野生型マウス（C57BL/6 系統）は医薬基盤研究所実験動物施設にて繁殖中のもの、あるいはオリエンタル酵母から購入して用いた。LRG 欠損マウスは業務主任者仲らが作成し、医薬基盤研究所実験動物施設にて維持繁殖されたものを用いた。

（2）DSS 腸炎

LRG 欠損マウスおよび野生型マウス（いずれも C57BL/6 系統）に対し、dextran sulfate sodium (DSS; MP biomedical) を溶解させた滅菌水（4% DSS Wt/Vol）を自由飲水で 5 日間投与した。

（3）抗体作製

服部らの項を参照

（4）サイトカイン検出

マウス組織より抽出したタンパク質について

て、ELISA キットを用いてサイトカインの定量を行った。測定キットとして、mouse IL-6, mouse TNF- α ELISA Max Standard (バイオレジェンド) を使用した。

(5) 抗体の機能阻害活性評価

コラーゲンコート 96-well plates に LRG 発現 LLC 細胞を 2,000 cells/well でまき、必要に応じて、抗体 1-100 μ g/mL および/またはヒト TGF- β を 1-10ng/mL の濃度で添加した。48 時間後に Cell Counting Reagent SF (ナカライテスク) を加えることで発色させ、Microplate reader (Bio-Rad Model 680) にて主波長 450nm、副波長 630nm の吸光度を測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

業務主任者の仲らのグループを中心に行った DSS 腸炎モデルの解析により、腸炎誘導後の粘膜上皮および浸潤する好中球・マクロファージから LRG が産生されることが明らかになった。また、LRG 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べて DSS 誘導腸炎の病態が軽減しており、腸粘膜における好中球などの細胞浸潤が減少していることが明らかになった。組織中のサイトカインを測定した結果、DSS 腸炎誘導後の大腸における IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生も、LRG 欠損マウスにおいて減少していた (図 1)。これらのデータは、LRG が、炎症性細胞浸潤および炎症性サイトカイン産生を介して、IBD の病態に関与していることを示唆している。

担当責任者の服部のグループが作製した抗 LRG 抗体については、いずれのクローンもマウス血清由来の LRG に良好に結合することが明らかとなっている。これら抗体は、LRG を発現しない細胞に対しては、細胞の生存および増殖に特に問題が生じないことを確認した。

抗体の機能阻害活性については、仲らのグループおよび服部らのグループとともにスクリーニング系の確立と改良を進めている。現時点において LRG を強制発現させた LLC を用いたスクリーニング系が有用と考えられ、最適化を試みている。

これらの研究の成果は、随時、臨床試験拠点病院のグループらとともに評価し、臨床試験に向けた問題点について検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

E. 結論

本研究により、IBD 様腸炎において LRG が細胞遊走やサイトカイン産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、抗 LRG 抗体作製が順調に進んでおり、現在、抗体クローンの各種評価を進めている。担当責任者の服部らのグループでは、抗体医薬品作製および改良に関する技術の蓄積があり、そのノウハウを活用してさらなる抗体の改良を行う予定である。改良型抗体に対しても、今後個別に再評価する必要がある。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Inoue M, Kamada H, Abe Y, Higashisaka K, Nagano K, Mukai Y, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, **Tsunoda S.**: Aminopeptidase P3 (APP3), a novel member of the TNF/TNFR2 signaling complex, induces phosphorylation of JNK. *J. Cell Sci.* in press.
2. Kamada H, Taki S, Nagano K., Inoue M, Ando D, Mukai Y, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, **Tsunoda S.**: Generation and characterization of a

bispecific Diabody targeting EPH receptor A10 and CD3. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun., 456:908-912, 2015.

3. Nagano K, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, **Tsunoda S.** : Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450(1):545-9, 2014.
4. Nagano K, Maeda Y, Kanasaki S, Watanabe T, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, **Tsunoda S.**: Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers, *J. Controlled Release.* 189:72-9, 2014.

G-2. 学会発表

1. 安藤大介, 鎌田春彦, 井上雅己, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, **角田慎一** : 炎症性腸疾患モデルマウスに対する TNFR1 指向性アンタゴニストの治療効果., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
2. 鎌田春彦, 井上雅己, 阿部康弘, 長野一也, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央, **角田慎一** : TNFR2 のシグナル伝達解明に向けたヒト TNFR2 指向性変異体の創製とその応用., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
3. 森 宣瑛, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, **角田慎一**, 堤 康央 : 短期間での抗体取得に向けた

最適な免疫方法の探索., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.

4. 三里一貴, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, **角田慎一**, 堤 康央 : 独自に構築した非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの品質評価., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
5. 森 宣瑛, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, **角田慎一**, 堤 康央 : 短期間での高親和性抗体取得に向けた最適な免疫方法の探索., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

- 鎌田春彦 独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト サブプロジェクトリーダー
- 長野一也 独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト プロジェクト研究員

図1. DSS腸炎誘導後(day 14)の野生型(WT)およびLRG欠損(KO)マウスの大腸におけるサイトカイン産生(ELISA)

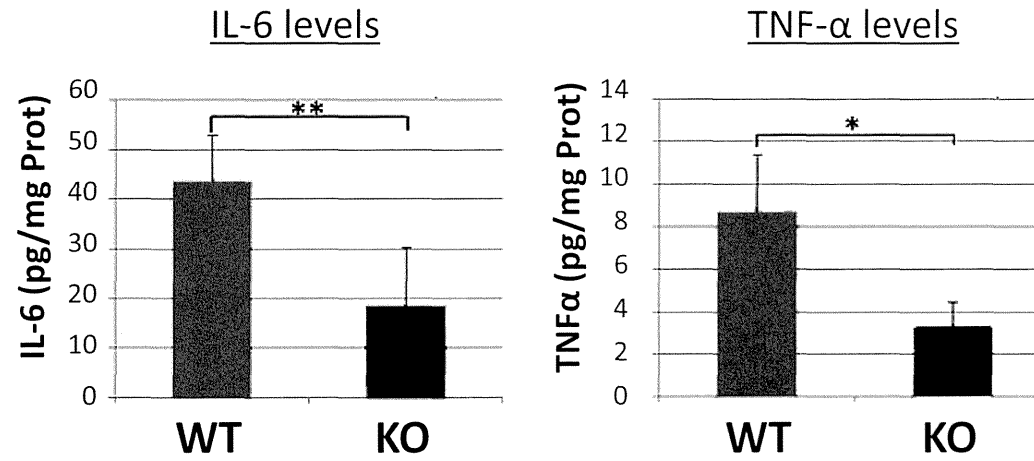
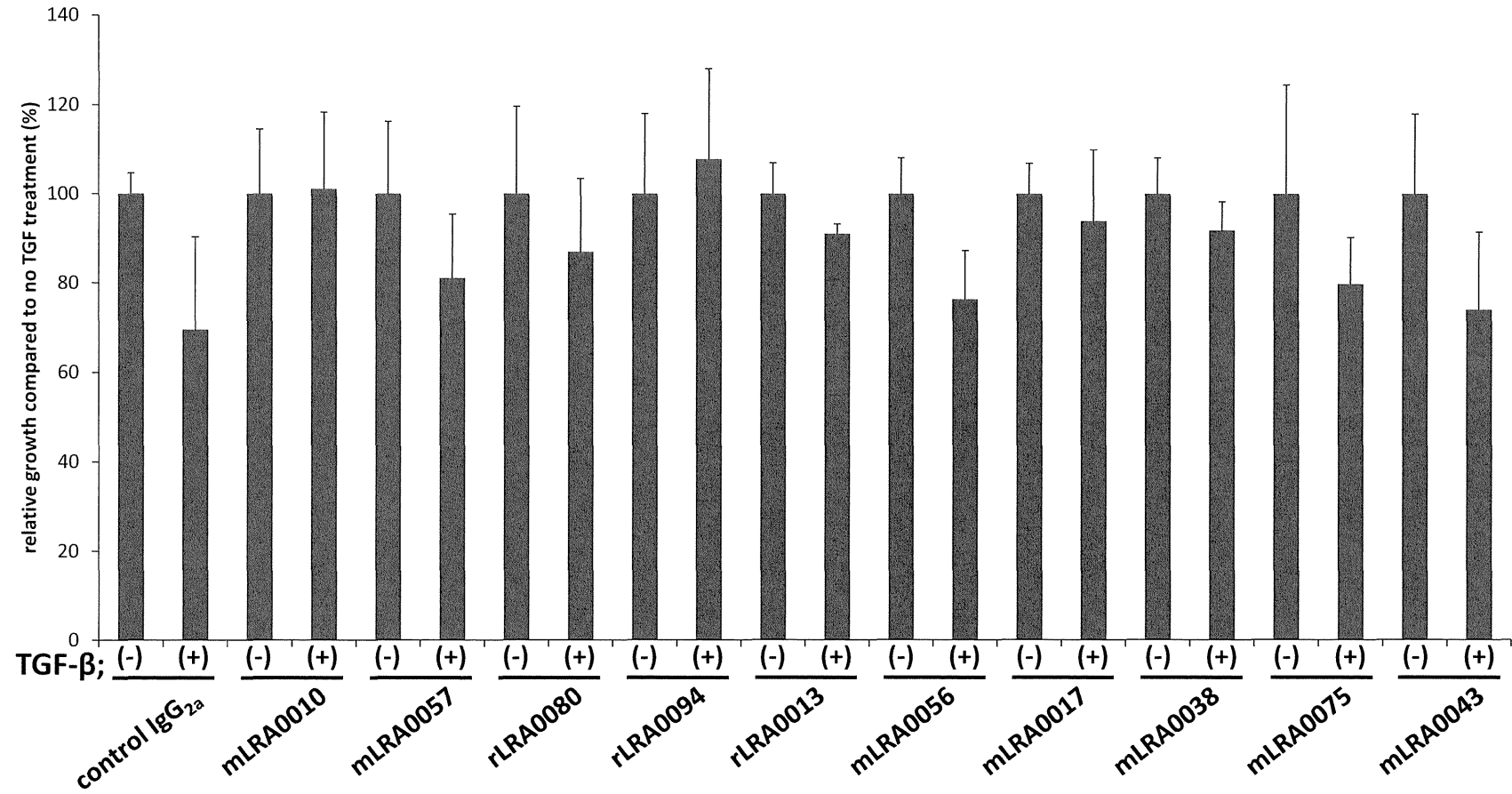


図2. LRG発現LLC細胞を用いた、抗LRG抗体の機能阻害活性のスクリーニング



阻害抗体のプロトタイプ作製

担当責任者 服部有宏 中外製薬株式会社 富士御殿場研究所

研究本部 探索研究部 探索研究部長

研究要旨

近年、炎症性腸疾患（IBD）等の免疫難病に対して様々なバイオ医薬品が実用化され、強力な治療効果を発揮している。一方、現行バイオ医薬品に抵抗性の難治症例も認められ、新たな治療標的の探索が急務である。本研究は、研究施設、製薬企業及び拠点病院の共同体制のもと、LRG（Leucine rich alpha-2 glycoprotein）を標的とする抗体医薬品の実用化に向け、前臨床試験の完遂及び臨床試験への橋渡しを目指す。

LRGは業務主任者である仲らが免疫難病患者血清の網羅的解析により同定した糖蛋白質である。LRGは、IBDの重症度・疾患活動性を反映する血清バイオマーカーとして有望で、エーディア（株）との共同体制で、PMDAの薬事戦略相談と並行しつつ慶應義塾大学及び大阪大学において臨床性能試験を進めている。最近、LRGの血管新生作用についてWangらがNature誌に報告するなど、LRGの機能にも注目が集まっている。仲らもLRGが血管新生作用を有することを独自に確認し（特許申請中）、さらにLRGが免疫系に直接的に作用することを示す実験結果を得ている。また、仲らはLRG欠損マウスを独自に作製し、IBD様腸炎を誘導したLRG欠損マウスにおいて、野生型マウスよりも炎症が軽度であることを明らかにしている。一連の結果は、LRGがIBDの新たな治療標的として有望であることを示唆している。

本研究では、LRG欠損マウスを用いたIBDモデル解析を進め、LRGがIBD様病態において炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカイン産生に関わることを明らかにした。また、抗LRG抗体作製を行い、抗体の特性およびLRG阻害活性のスクリーニングを開始した。本研究成果をもとに、臨床試験に向けた問題点について検討を加えながら、実用化を最終目標として進めている。

A. 研究目的

炎症性腸疾患においては、サイトカインTNF- α を標的とする抗体医薬品が実用化され、既存薬にない効果を発揮している。しかし、今なお寛解導入が困難な症例、更には治療に不応の難治症例も認められ、新規治療標的の探索が世界的規模で進められている。本研究の目的は、研究施設（医薬基盤研究所）、製薬企業（中外製薬）及び臨床試験拠点病院（慶應義塾大学及び大阪大学）の連携体制のもと、新規治療標的分子LRGに着目し、炎症性腸疾患に対する抗体医薬品開発を最終的な目標として、炎症性腸疾患モデルマウスを用

いた病態解明及び前臨床試験を実施することである。

B. 研究方法

(1) マウスLRGに対する抗体の作製

ウサギにマウスLRGタンパク質を4回免疫し、末梢血リンパ球と脾臓よりIgG陽性B細胞をMACSで精製し、LRGと結合する抗体を持つB細胞をFACSにて選択した。抗体の可変領域のDNA配列解析を行い、動物細胞に抗体遺伝子を導入して培養上清から抗体を精製した。Octetシステムを用いた相互作用解析によりマウスLRGと強く結合する抗体を選別した。

(図1)

(2) 抗体の機能阻害活性評価

角田らの項を参照

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

担当責任者の服部（中外製薬）のグループでは、ウサギにマウス LRG タンパク質を免疫し、LRG に結合する B 細胞を分離し、B 細胞から分泌された抗体と LRG の結合評価を行い、B 細胞を選抜した。得られた 94 種類の B 細胞から抗体遺伝子をクローニングし、各抗体の競合 ELISA 解析により分類し、抗 LRG 抗体を分類した（図1）。これらの抗体を用いて、仲らのグループではマウス血清を用いた免疫沈降実験により、いずれも生体内の LRG と良好に結合することを確認した。

現在、抗体の機能阻害活性についてスクリーニングするため、実験系を構築中である。ひとつのスクリーニング系として仲・角田らのグループおよび服部らのグループが連絡を取りながら LLC 細胞等を用いた実験系の構築を進めている。

強力な LRG 阻害活性をもつクローンはまだ同定されていないが、抗体が選択出来れば、生体における動態や活性の評価を行う。LRG が高濃度に血液中に存在することを考え、最終的に選択した抗体については、服部らがもつ抗体改変技術（図2）を適用し、さらなる抗体の改良を行う予定である。具体的には、リサイクリング抗体技術により体内動態を改善させ、スウィーピング抗体技術により標的に対する生理活性を向上させる予定である（図3）。

E. 結論

抗 LRG 抗体作製が順調に進んでおり、現在、

抗体クローンのスクリーニングを進めている。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, **Hattori K**. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood*. 2014 Nov 13;124(20):3165-71.

2. Igawa T, Mimoto F, **Hattori K**. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1844(11):1943-1950.

3. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y, Haraya K, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, **Hattori K**. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost*. 2014 Feb;12(2):206-213.

4. Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, **Hattori K**. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol Immunol*. 2014 Mar;58(1):132-8.

G-2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

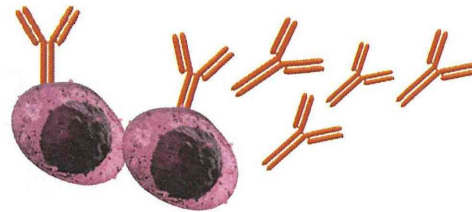
該当無し。

図1 抗LRG抗体作製

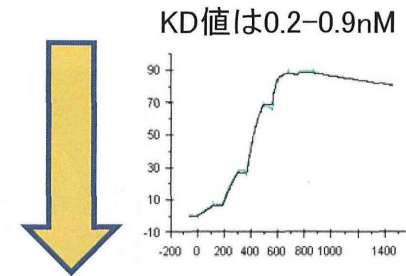
リコンビナント
LRGをウサギ
に免疫し抗体
を誘導



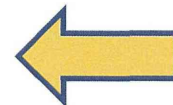
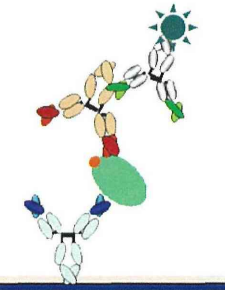
B細胞ソーティングにより
細胞レベルでのクローン
選択(>20,000クローン)



Octetシステムによる
抗体クローンの選択
=94クローンを取得



競合ELISA評価によ
りエピトープを分類

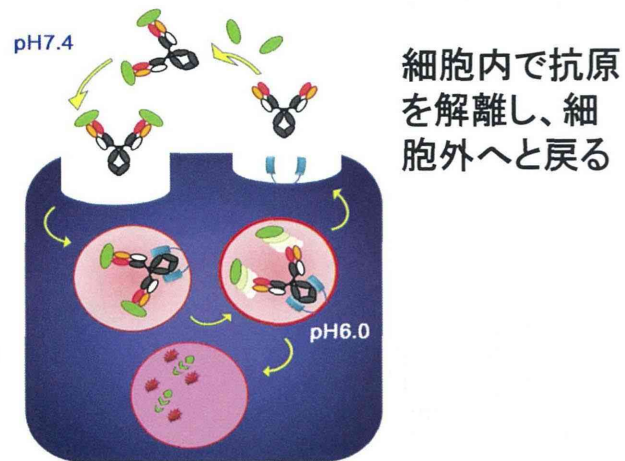


代表的なクローンを選抜し、順次発現精製

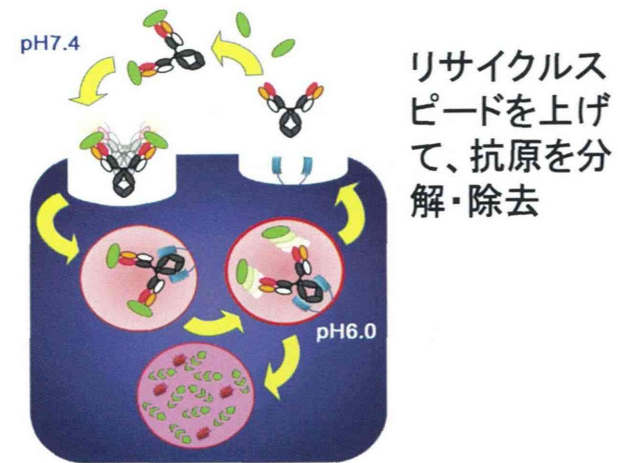
- 候補クローン第1群: #0010, #0057, #0013, #0080, #0032, #0094
- 候補クローン第2群: #0056, #0017, #0058, #0038, #0075

図2 抗体改変技術

リサイクリング抗体



スウィーピング抗体



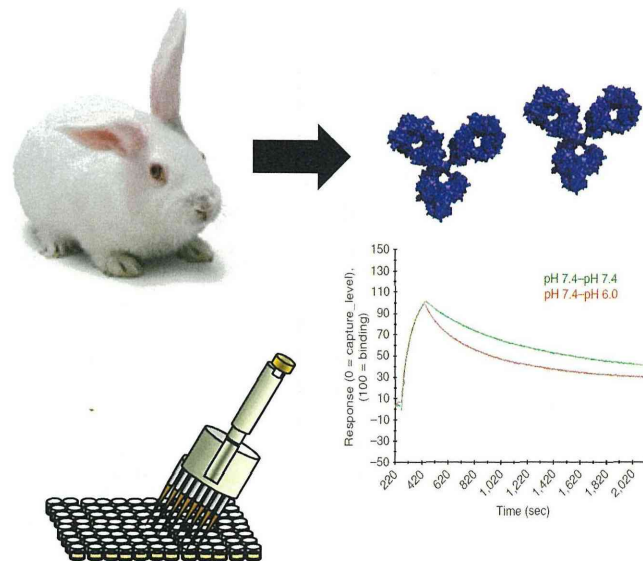
- 抗体医薬品の薬物動態を制御する新技術(リサイクリング抗体)
- 抗体医薬品の薬効を増強する新技術(スウィーピング抗体)

図3 抗LRG抗体取得とリサイクリング抗体作成の流れ

完了

抗LRG抗体取得(終了)

LRGタンパク質の調製→ウサギへの免疫→
B細胞からの抗体取得→結合活性の解析→
エピトープの解析



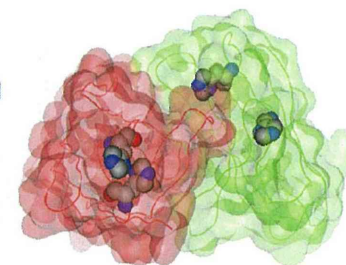
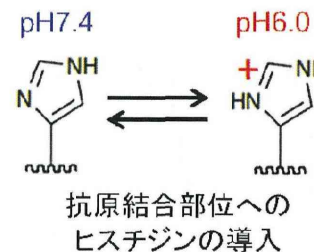
進行中

In vitro, In vivo 生物活性の評価

準備中

pH依存性抗体の創製

アミノ酸改変(ヒスチジン置換)によるpH依存性の付与→アミノ酸改変による親和性の向上



予定

In vitro, In vivo 生物活性の評価



様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目：「新規治療標的分子LRGの炎症性腸疾患における役割の解明と創薬への応用」

機関名：独立行政法人 医薬基盤研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis. (Poster) <業務主任者>	Takahashi Y, Fujimoto M, Serada S, <u>Naka T.</u>	2014 ACR/ARHP Annual Meeting: Massachusetts Boston Convention & Exhibition Center	2014 November 14 - 19	国外
Leucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein promotes TGF $\beta 1$ -induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines. (Poster) <業務主任者>	Takemoto N, Matsumoto T, Serada S, Fujimoto M, <u>Naka T.</u>	2014 ICIS: Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne	2014 October 26 - 29	国外
Measurement of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein a novel disease activity biomarker in rheumatoid arthritis for the detection of biologic-associated tuberculosis. (Poster) <業務主任者>	Ohkawara T, Fujimoto M, Serada S, <u>Naka T.</u>	EULAR 2014: Paris	2014 June 14	国外
A Phase 2b study of an oral JAK Inhibitor ASP015K monotherapy in Japanese patients with moderate to severe rheumatoid arthritis. <担当責任者>	Nishikawa A, <u>Takeuchi T.</u>	The European League Against Rheumatism. Paris, France	2014. 6. 13	国外