

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19132

研究課題名(和文)LAG-3陽性機能性細胞集団の同定による自己免疫疾患発症制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of autoimmunity by LAG-3 expressing cells

研究代表者

岡崎 一美 (OKAZAKI, Ii-mi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・准教授

研究者番号：50452339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制性受容体LAG-3がどのような細胞のどのような機能を制御することによって自己免疫疾患の発症を制御しているのかを明らかにする目的で、LAG-3陽性CD4 T細胞について、多検体単一細胞半網羅的発現解析をもとに機能的分類を行い、特徴的な細胞集団を複数同定した。さらに、自己免疫疾患の発症と関連して増減する、自己免疫疾患の発症に関与する可能性のある細胞集団を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：LAG-3 is an immuno-inhibitory receptor that plays a critical role in the prevention of autoimmunity. To understand cell population(s) and their role(s) on which LAG-3 functions in the regulation of autoimmunity, we analyzed LAG-3 expressing CD4 T cells by single-cell gene expression analysis. We found that LAG-3 expressing cells were clustered into distinct cell populations and identified unique cell populations that may function in the suppression of autoimmunity.

研究分野：免疫学

キーワード：抑制性免疫補助受容体 単一細胞発現解析

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、免疫抑制性受容体LAG-3が自己免疫疾患の発症を抑制し、自己免疫寛容の成立維持に必須の役割を果たすことを明らかとしてきた。しかし、LAG-3が実際にどのような細胞集団のどのような機能を制御することによって自己免疫疾患の発症を制御しているのかは不明であった。

LAG-3は同じく抑制性免疫補助受容体であるPD-1同様、定常状態のT細胞には発現しておらず活性化により発現が誘導されるが、濾胞ヘルパーT細胞におけるPD-1や、制御性T細胞におけるFoxP3やCTLA-4のように、特殊な機能性細胞集団では活性化マーカーが常時発現し、その細胞の機能に重要な役割を果たす場合がある。言い換えれば、濾胞ヘルパーT細胞や制御性T細胞は、何らかの要因により活性化状態が維持されている特殊な細胞集団と言える。我々は、LAG-3に対して極めて高い親和性を有するモノクローナル抗体を作製することにより、生体内でLAG-3を発現する細胞を高感度に検出することに成功している。LAG-3欠損により自己免疫疾患が惹起されることから、これらのLAG-3発現細胞が自己免疫疾患を誘導し得る病原性の細胞集団である可能性、LAG-3を恒常的に発現し自己免疫疾患の制御にかかわる特殊な機能を有している細胞集団である可能性、あるいは両者が混在している可能性が考えられる。さらに、単に一過性に活性化された細胞集団も含まれると考えられる。他のグループにより、LAG-3陽性細胞が抑制性機能を有することが報告されているが、我々が独自に樹立したLAG-3機能不全マウスにおける自己免疫疾患は、抑制性細胞集団の機能不全が原因ではないことを明らかとしている。このように一見矛盾する結果の一因として、機能や状態の異なる細胞にLAG-3が発現し、それらの機能を制御しているためであると考えられる。すなわち、自己免疫疾患の発症に直接関与している細胞集団は、上記細胞集団とは異なる可能性が考えられる。実際、CXCR5とPD-1といった細胞表面分子の発現で定義される濾胞ヘルパーT細胞についても、B細胞による抗体産生をむしろ抑制する集団が含まれていることも示されているが、活性化により発現が変動する分子を用いて細胞集団を定義する場合には、他の細胞集団との分離が本質的に極めて困難であると言える。

近年、マイクロ流路技術により、多検体

に対して多種類の遺伝子発現の定量を極めて効率的に行うこと(多検体半網羅的発現解析と呼ぶ)が可能となった。例えば96個のサンプルについて96種類の遺伝子の発現量を定量するという9,216種類の反応を、同時に行うことが出来る。単一細胞分取と組み合わせることにより、多検体単一細胞半網羅的発現解析を行えば、注目する細胞集団に含まれる数%の細胞集団の特性を、遺伝子発現を指標に正確に決定できる可能性がある。

以上から、多検体単一細胞半網羅的発現解析を用いてLAG-3発現細胞に含まれる細胞を機能的に分類して解析することにより、LAG-3が自己免疫疾患の発症を制御するメカニズムを明らかにできると考えられる。また、特定の免疫応答を特異的に制御する、未同定の細胞集団を同定できる可能性が期待される。

2. 研究の目的

多検体単一細胞半網羅的発現解析を用いてLAG-3陽性細胞を複数の細胞集団に分類して各細胞集団の機能を解析することにより、LAG-3が実際にどのような細胞集団のどのような機能を制御することによって自己免疫疾患の発症を制御しているのかを明らかとすることを目的とした。この際、特定の免疫応答を特異的に制御する、未同定の細胞集団を同定できる可能性が期待される。また、同様の手法を用いて、高親和性抗体の産生において中心的な役割を果たす濾胞ヘルパーT細胞の多様性を理解し、その機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析

単離した細胞からtotal RNAを調製し、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)を用いて逆転写、増幅、cRNAの調製およびCy3標識化を行った。Cy3標識cRNAをMouse SurePrint G3 8x60K (Agilent Technologies)にハイブリダイズさせ、洗浄後、マイクロアレイスキャナー(Agilent Technologies)を用いてスキャンした。得られたデータを、GeneSpring (Agilent Technologies)を用いて解析した。

(2) 単一細胞半網羅的遺伝子発現解析

Fluidigm社C1単一細胞分離システムおよびC1 Single-Cell Auto Prep Array for Pre-Amp (5-10 μm)、Ambion Single Cell-to-CT Kit (Life Technologies)を用いて、単

離した細胞から単一細胞を得て、各々の細胞からcDNAを調製し、発現解析に用いるPCRプライマーを用いてプレ増幅を行った。得られたC1 ampliconを用いて、Fluidigm社 BioMark HDシステムおよび2X Sso Fast EvaGreen Supremix With ROX (Bio-Rad Laboratories)によりリアルタイムPCRを行った。

(3) 統計解析

リアルタイムPCRにより得られた遺伝子発現データを、統計解析言語R上でSingular™ツールセット (Fluidigm) およびPCA、t-SNE、ANOVA等の各種統計学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) LAG-3陽性CD4 T細胞のマイクロアレイ解析

LAG-3 陽性 CD4 T細胞およびLAG-3 陰性 CD4 T細胞における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較した。LAG-3 陰性 CD4 T細胞と比較してLAG-3 陽性 CD4 T細胞で $2^{1.5}$ 倍(約2.8倍)以上発現が上昇している遺伝子は、約570-810個であり、これはアレイ全体の約2.0-2.8%と、ごく限られていた。また、LAG-3 陰性 CD4 T細胞と比較してLAG-3 陽性 CD4 T細胞で $2^{1.5}$ 倍(約2.8倍)以上発現が低下している遺伝子は、約440-480個あった。

(2) 濾胞ヘルパーT細胞のマイクロアレイ解析

これまでの知見から、B細胞による長期抗体産生応答を誘導する濾胞ヘルパーT細胞がCXCR5^{hi}PD-1^{hi}CD4 T細胞に濃縮されていると考えられている。そこで、マウスの腸管リンパ組織由来CXCR5^{hi}PD-1^{hi}CD4 T細胞およびCXCR5^{PD-1}CD4 T細胞における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較した。CXCR5^{PD-1}CD4 T細胞と比較してCXCR5^{hi}PD-1^{hi}CD4 T細胞で $2^{1.5}$ 倍(約2.8倍)以上発現が上昇している遺伝子は、約910個あり、これはアレイ全体の約3.2%であった。また、CXCR5^{PD-1}CD4 T細胞と比較してCXCR5^{hi}PD-1^{hi}CD4 T細胞で $2^{1.5}$ 倍(約2.8倍)以上発現が低下している遺伝子は、約930個あった。

(3) LAG-3 陽性 CD4 T細胞の単一細胞半網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析をもとに、注目する細胞集団に含まれる細胞を機能的に分類す

るのに有用と思われる、ケモカイン受容体、サイトカイン、転写因子、その他の遺伝子を、後述の濾胞ヘルパーT細胞の解析とあわせて192種類選定した。候補遺伝子の選択にあたっては、主に以下の条件を重要視した。母集団において中程度に発現している。ナイーブT細胞及び活性化T細胞には発現していない。機能的な関連が疑われる。転写因子や機能未知の遺伝子を優先した。外来抗原で免疫した野生型マウスの所属リンパ節由来の抗原特異的LAG-3陽性CD4 T細胞および自己免疫疾患を発症したマウスのリンパ節由来のLAG-3陽性CD4 T細胞を母集団とし、これらのLAG-3陽性CD4 T細胞について、多検体単一細胞半網羅的発現解析を行った。この解析によって明らかになった各遺伝子の発現パターンをもとに、階層的クラスタリング解析を行い、LAG-3陽性CD4 T細胞を機能や状態が異なると考えられる複数の細胞集団に分類した。特徴的な細胞集団が複数同定され、さらに、各細胞集団は、外来抗原免疫時に見出されるLAG-3陽性CD4 T細胞が主に構成する細胞集団、自己免疫疾患発症マウスに見出されるLAG-3陽性CD4 T細胞が主に構成する細胞集団、両者が均等に構成する細胞集団に分類されることが明らかとなった。自己免疫疾患の発症と関連して増加することから、自己免疫疾患発症マウスに見出されるLAG-3陽性CD4 T細胞が主に構成する細胞集団は、自己免疫疾患の発症に関与する可能性がある細胞集団であると考えられる。

さらに、PCA、t-SNE、ANOVA等の統計学的手法を用いて、単一細胞半網羅的発現解析の結果をより多角的にノンバイアスに解析することにより、注目すべき細胞集団および各細胞集団を規定する候補遺伝子の絞り込みを行った。また、各細胞集団の分化および機能に関連すると思われる遺伝子について、細胞集団間での発現量を比較し、各細胞集団の機能を評価した。

今後、これらの細胞集団の生体内での機能を解析することにより、自己免疫疾患発症制御におけるLAG-3陽性細胞の機能を明らかにできるものと期待される。

(4) 濾胞ヘルパーT細胞の単一細胞半網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析をもとに、注目する細胞集団に含まれる細胞を機能的に分類するのに有用と思われる、ケモカイン受容体、

サイトカイン、転写因子、その他の遺伝子を、前述のLAG-3陽性CD4 T細胞の解析とあわせて192種類選定し、多検体単一細胞半網羅的発現解析を行った。この解析によって明らかになった各遺伝子の発現パターンをもとに、(3)と同様の手法を用いて、CXCR5^{hi}PD-1^{hi}CD4 T細胞を機能や状態が異なると考えられる複数の細胞集団に分類し、各細胞集団を規定する候補遺伝子を同定した。濾胞ヘルパーT細胞について、これまでに存在が指摘されている濾胞制御性T細胞を明確に同定することができた。また、濾胞ヘルパーT細胞には、濾胞制御性T細胞以外にも特徴的ないくつかの細胞集団が含まれていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1件)

岡崎 拓、岡崎一美. 抑制性免疫補助受容体を標的としたがん免疫療法の基礎研究. 医学のあゆみ 256:15861-15864 (2016). 査読なし

[学会発表](計 12件)

Maeda N, Maruhashi T, Shimizu K, Okazaki IM, Okazaki T. Glucocorticoids augment the expression and inhibitory function of PD-1. The 11th International Symposium of the institute network "Frontiers in Biomedical Sciences" 2017年1月26日、徳島大学(徳島県・徳島市)

Shimizu K, Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Okazaki T. Characterization of target genes of inhibitory co-receptors PD-1 by CAGE. The 11th International Symposium of the institute network "Frontiers in Biomedical Sciences" 2017年1月26日、徳島大学(徳島県・徳島市)

Maeda N, Maruhashi T, Shimizu K, Okazaki IM, Okazaki T. Glucocorticoids augment the expression and inhibitory function of PD-1. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月6日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Shimizu K, Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Okazaki T. Characterization of target genes of

inhibitory co-receptors PD-1 by CAGE. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月6日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, Okazaki T. Establishment and maintenance of immune tolerance by immuno-inhibitory receptors. 第39回日本分子生物学会 2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

岡崎一美、清水謙次、岡崎 拓 マイノリティ細胞の同定と解析による自己およびがんに対する免疫制御機構の解明. 第39回日本分子生物学会 2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Shimizu K, Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Okazaki T. Characterization of target genes of inhibitory co-receptors PD-1 by CAGE. The 26th Hot Spring Harbor International Symposium 2016年11月2日、九州大学(福岡県・福岡市)

Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, Kajihara T, Okazaki T. Context-dependent inhibition of antigen-specific T cell activation by LAG-3. International Congress of Immunology 2016 2016年8月24日、メルボルン(オーストラリア)

Kajihara T, Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Okazaki T. Inhibition of T cell activation by human LAG-3. International Congress of Immunology 2016 2016年8月24日、メルボルン(オーストラリア)

Okazaki IM, Okazaki T. Phenotypic characterization of LAG-3 expressing cells. International Congress of Immunology 2016 2016年8月24日、メルボルン(オーストラリア)

Kajihara T, Sugiura D, Mizuno R, Ranawakage CD, Maeda N, Shimizu K, Okazaki IM, Okazaki T. Comparison of human and mouse LAG-3. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月19日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, Kajihara T, Okazaki T. The strength of inhibition by LAG-3 depends on properties of APCs. 第44回日本免疫学

会学術集会 2015年11月19日、札幌コ
ンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 一美 (OKAZAKI, Ii-mi)

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：50452339