

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08852

研究課題名(和文)細胞質DNAセンサーによるT細胞の活性化制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of the regulation of T cell activation by cytosolic DNA sensor in T cells

研究代表者

今西 貴之 (Imanishi, Takayuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：10513442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫センサーのSTINGが獲得免疫を司るT細胞においても高発現することを見出し、その機能解析を行った結果、T細胞をSTINGリガンドのcGAMPとTCR/CD28で共刺激するとTBK1とIRF3の持続的な活性化を誘導し、IFN- $\gamma$ の産生が誘導されることが明らかになった。さらにcGAMPによるSTINGの活性化はTCR/CD28の下流のmTORC1シグナルを部分的に抑制することによりT細胞の増殖抑制を誘導するとともにmTORC1の部分的な活性化がcGAMPによるIFN- $\gamma$ の産生に必要であることが示された。また、T細胞のSTINGがcGAMPによる抗腫瘍免疫応答に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、T細胞のSTINGは自然免疫細胞のSTINGと異なり、cGAMPによるIFN- $\gamma$ 応答の誘導にはTCR/CD28の共刺激が必要である一方で、T細胞の増殖も抑制することが明らかになった。このようにT細胞のSTINGは自然免疫系とは異なる機能があるため、STINGが関与する様々な病態を理解する上で重要な知見を提供したと言える。また、T細胞のSTINGがcGAMPを介した抗腫瘍免疫にも重要であることを示したため、T細胞のSTINGを標的とした新たながん免疫療法の開発に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：STING plays a key role in detecting cytosolic DNA and induces type I interferon (IFN- $\gamma$ ) responses for host defense against pathogens. Although T cells highly express STING, its physiological role remains unknown. Here we show that a STING ligand cGAMP strongly inhibits T cell growth by inhibiting mTORC1 functions through IRF3 and IRF7. Although cGAMP alone failed to induce IFN- $\gamma$  production, co-stimulation of T cells via TCR and STING induced sustained activation of IRF3, leading to IFN- $\gamma$  production. Effector T cells produce much higher IFN- $\gamma$  levels than innate cells in response to cGAMP. IFN- $\gamma$  production also depends on TCR-induced mTORC1 activation. Finally, we demonstrated that STING stimulation in T cells is effective in inducing anti-tumor responses in vivo. Our studies demonstrate that outputs of STING and TCR signaling pathways are mutually regulated through mTORC1 to modulate T cell functions.

研究分野：免疫学

キーワード：STING mTOR TCR I型インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫系では細胞外から取り込まれた病原体由来の DNA はエンドソーム/リソソームに局在する Toll 様受容体 (TLR) に、細胞質に侵入したウイルス由来の DNA は環状 GMP-AMP (cGAMP) 合成酵素 (cGAS) に認識され、合成された cGAMP が小胞体に局在する STING に結合し、I 型インターフェロン (IFN-I) 応答を誘導する。一方、細胞質に侵入した細菌由来の環状ジヌクレオチド (CDN) や合成小分子の DMXAA は直接 STING に結合し、活性化する。一方で、獲得免疫を担う T 細胞にも TLR が発現していることが報告され、様々な TLR リガンドが共刺激を誘導して TCR 刺激によるナイーブ T 細胞の活性化を増強することが報告されてきた。我々は T 細胞の細胞表面に発現する TLR2 が細胞外の病原体成分を認識することにより Th1 細胞の活性化を直接惹起し、宿主防御に寄与することを報告した。さらに最近では Treg の TLR2 が共生細菌の成分を認識して、腸管内の免疫寛容を誘導することにより、ヒトの腸管内の微生物叢を確立させることが報告されている。

このように、これまで T 細胞に発現する自然免疫受容体の解析は主に TLR に着目して進められてきたが、TLR 以外の自然免疫受容体の T 細胞における役割に関しては、ほとんど明らかにされていない。我々は核酸が T 細胞の活性化・分化に直接及ぼす可能性を検討し、死細胞から放出される DNA がヒストンあるいは抗菌ペプチドと複合体を形成することにより、T 細胞に取り込まれ (エンドソーム/リソソームに集積)、IL-4 などの Th2 関連遺伝子の発現を誘導し、寄生虫の排除やアレルギー反応に重要な Th2 細胞への分化を誘導することを明らかにした。予想に反し、これらの核酸認識に TLR や STING などの既知の核酸受容体が関与していないことが明らかになった。しかしながら STING が T 細胞にも高発現していることから、T 細胞の細胞質に DNA が侵入した際に何らかの役割を果たしていることが示唆される。そこで STING のリガンド (cGAMP 等) のみで T 細胞を刺激したところ、IFN-I の産生はほとんど認められなかったが、TCR/CD28 と一緒に刺激した場合、IFN-I やインターフェロン応答遺伝子 (ISGs) の発現誘導が認められた。興味深いことにこの時の IL-2 の産生は正常であったが、細胞の増殖が著明に抑制された。

## 2. 研究の目的

本研究では STING による T 細胞の増殖抑制の分子機構および STING と TCR/CD28 の共刺激による IFN-I 産生の分子機構を明らかにする。また、T 細胞に発現する STING の生体内における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) STING による T 細胞の増殖抑制の分子機構の解明

ナイーブ CD4T 細胞を cGAMP 存在下で TCR/CD28 刺激した時の遺伝子発現を RNA-Seq 法により解析することにより、cGAMP により影響を受けるシグナル伝達経路を予測し、実際に影響を受けているかウエスタンブロット法により確認する。

### (2) STING による IFN-I 産生の分子機構の解明

ナイーブ CD4T 細胞を cGAMP と TCR/CD28 刺激した時の STING の下流のシグナル伝達分子の活性化をウエスタンブロット法により調べる。

### (3) T 細胞に発現する STING の in vivo における役割の解明

T 細胞を欠損した Rag1 欠損マウスに STING 欠損 T 細胞を移入し、T 細胞特異的な STING 欠損マウス (T-STING 欠損マウス) を作製し、T-STING 欠損マウスに B16 メラノーマ細胞を移入し、cGAMP による抗腫瘍効果を調べる。

## 4. 研究成果

cGAMP が TCR/CD28 刺激による T 細胞の増殖を抑制するメカニズムを調べるためにナイーブ CD4T 細胞を cGAMP 存在下、非存在下で TCR/CD28 刺激した時の遺伝子発現を RNA-Seq 法により調べた。その結果、細胞周期関連遺伝子や脂質合成関連遺伝子の発現が cGAMP により低下することが明らかになった。これらの遺伝子は細胞の増殖に必須でその発現が栄養センサーの mechanistic target of rapamycin 複合体 1 (mTORC1) の活性化により誘導されることが知られている。そこで cGAMP と TCR/CD28 刺激した時の mTORC1 の下流の 4E-BP1 と S6K1 のリン酸化を調べたところ、それらの活性化が部分的に抑制された。また、実際に cGAMP 刺激によりサイクリンや CDK のタンパク発現が低下し、T 細胞に含まれるコレステロールエステルやジアセリグリセロールの量が低下することを質量分析法により明らかにした。さらに mTORC1 シグナルにより発現が誘導される CD98 や CD71 の細胞表面発現も cGAMP により低下することを FACS で確認した。興味深いことに IL-2 の下流で活性化される STAT5 のリン酸化も cGAMP により強く抑制されることが認められた。これらの結果から cGAMP による STING の活性化は TCR/CD28 の下流で活性化される mTORC1 シグナルを抑制することにより、T 細胞の増殖を阻害することが示唆された。

次に STING による mTORC1 シグナルと IL-2 シグナルの抑制に TBK1 および IRF3 が必要か調べた。その結果、TBK1 および IRF3 欠損 T 細胞においても cGAMP による mTORC1 と IL-2 シグナルの抑制が正常に認められた。IRF3 と IRF7 が重複して機能している可能性が考えられたため、IRF3/IRF7 二重欠損 T 細胞を用いて同様に調べたところ、cGAMP による mTORC1 と IL-2 シグナルの抑制が部分的に回復することが認められた。また、IFN-I 受容体 (IFNAR1) 欠損 T 細胞においても cGAMP による mTORC1 と IL-2 シグナルの抑制は正常であったが、T 細胞の増殖の抑制が部分的に回復した。これらの結果から、STING による mTORC1 と IL-2 シグナルの抑制には IRF3 と IRF7 が部分的に必要なことが示唆された。さらに STING による T 細胞の増殖抑制には IFN-I シグナルも部分的に必要なことが示された。

cGAMP と TCR/CD28 刺激による IFN-I 産生の分子機構を調べるために TCR/CD28 刺激存在下、非存在下で cGAMP 刺激した時の TBK1 と IRF3 のリン酸化を調べた。その結果、cGAMP 単独刺激では TBK1 と IRF3 の一過性のリン酸化が観察されるのに対して、TCR/CD28 刺激存在下では cGAMP 刺激による TBK1 と IRF3 の持続的なリン酸化が認められた。TBK1 欠損 T 細胞および IRF3 欠損 T 細胞では cGAMP と TCR/CD28 刺激による IFN-I の産生が減弱することを確認した。興味深いことに合成小分子の DMXAA と TCR/CD28 の共刺激では TBK1 と IRF3 の一過性で強いリン酸化が認められたが、IFN-I の産生は認められなかった。これらの結果から STING を介した IFN-I の産生には TCR/CD28 の共刺激で誘導される TBK1 と IRF3 の持続的なリン酸化が必要であることが示唆された。

次に cGAMP と TCR/CD28 刺激による IFN-I の産生に mTORC1 シグナルが必要か調べたところ、mTORC1 の阻害剤である rapamycin で T 細胞を処理すると cGAMP と TCR/CD28 刺激による IFN-I の産生が著しく抑制された。また、mTORC1 の構成タンパクである Raptor 欠損 T 細胞においても cGAMP と TCR/CD28 刺激による IFN-I の産生がほとんど認められなかった。さらに rapamycin で T 細胞を処理した時の cGAMP と TCR/CD28 刺激による IRF3 のリン酸化は正常であった。これらの結果から cGAMP による IFN-I の産生には TCR/CD28 刺激による mTORC1 の活性化が必要であることが示唆された。興味深いことに cGAMP による 4E-BP1 のリン酸化の抑制は rapamycin と同程度であったが、S6K1 およびその下流の S6 のリン酸化の抑制は rapamycin と比較して部分的であった。これらの結果と一致するように S6K1 の阻害剤で T 細胞を処理すると cGAMP と TCR/CD28 刺激による IFN-I の産生が著明に抑制されることが認められた。これらの結果から cGAMP による STING の活性化は TCR/CD28 の下流の mTORC1 シグナルを部分的に抑制することにより T 細胞の増殖抑制を誘導するとともに mTORC1 の部分的な活性化が cGAMP による IFN-I の産生に必要なことが示された。

次にエフェクター Th1 細胞および活性化 CD8T 細胞における STING の役割を調べたところ、ナイーブ T 細胞と異なり、cGAMP 単独刺激で IFN-I の産生が認められ、IL-2 により IFN-I の産生が相乗的に増強することが認められた。その分子機構を調べたところ、エフェクター Th1 細胞および活性化 CD8T 細胞では cGAMP 単独刺激で TBK1 と IRF3 の持続的なリン酸化が認められ、IL-2 により増強することが明らかになった。驚くべきことにエフェクター Th1 細胞および活性化 CD8T 細胞を cGAMP と TCR/CD28 刺激した時の IFN-I の産生量は自然免疫細胞の骨髄由来の樹状細胞 (BMDC) を cGAMP で刺激した時よりも高かった。

cGAMP の投与は強い抗腫瘍効果を示すことが報告されているため、cGAMP による抗腫瘍免疫における T 細胞の STING の役割を T-STING 欠損マウスを用いて検討した。その結果、cGAMP を投与した T-STING 欠損マウスは cGAMP を投与した正常マウスと比較して B16 メラノーマ細胞の増殖が早く、生存率も低いことが示された。これらの結果から T 細胞に発現する STING が cGAMP による抗腫瘍効果に重要な役割を果たすことが示された。

以上の結果から cGAMP による T 細胞の STING の活性化は mTORC1 シグナルの部分的な抑制を介して T 細胞の増殖抑制を誘導するとともに TCR/CD28 刺激により TBK1 と IRF3 の持続的な活性化と mTORC1 シグナルの活性化により IFN-I の産生が誘導されることが示された。さらに T 細胞の STING が cGAMP による抗腫瘍免疫に重要であることが示唆された。このように T 細胞の STING と TCR のシグナルは mTORC1 を介して相互に影響し合うことにより、シグナルのアウトプットが決定し、そのことが T 細胞の活性化と機能に影響することが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Takayuki Imanishi, Midori Unno, Wakana Kobayashi, Natsumi Yoneda, Satoshi Matsuda, Kazutaka Ikeda, Takayuki Hoshii, Atsushi Hirao, Kensuke Miyake, Glen N. Barber, Makoto Arita, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, and Takashi Saito

Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T cell activation and functions

*Life Science Alliance* (DOI: 10.26508/lsa.201800282/Jan 25, 2019)

査読あり

## 2. 今西貴之

T細胞における STING 活性化と抗ウイルス応答

臨床免疫・アレルギー科 (Vol.69 No.5 May 2018)

査読なし

〔学会発表〕(計 5 件)

### 1. 今西貴之、斉藤隆

Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function

第 47 回日本免疫学会学術総会

2018 年 12 月 10 日-2018 年 12 月 12 日

福岡県福岡市

### 2. 今西貴之、斉藤隆

Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function

TOLL 2018

2018 年 6 月 6 日-2018 年 6 月 9 日

ポルトガル、ポルト

### 3. 今西貴之、斉藤隆

TCR signals control STING-mediated type I IFN responses in T cells

第 46 回日本免疫学会学術総会

2017 年 12 月 12 日-2017 年 12 月 14 日

宮城県仙台市

### 4. 今西貴之、斉藤隆

STING activation in T cells induces cell growth inhibition and antiviral response

第 45 回日本免疫学会学術総会

2016 年 12 月 5 日-2016 年 12 月 7 日

沖縄県宜野湾市

### 5. 今西貴之、斉藤隆

T cell-intrinsic role of the cytosolic DNA-sensing for T cell function

第 16 回国際免疫学会議

2016 年 8 月 21 日-2016 年 8 月 26 日

オーストラリア、メルボルン

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：免疫細胞の制御技術

発明者：今西貴之、斉藤隆

権利者：今西貴之、斉藤隆

種類：特許権

番号：2017-028244

出願年：2017 年 2 月 17 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。