

令和 3 年 10 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20935

研究課題名(和文) 制御性T細胞におけるDNAM-1の機能解析と炎症性腸疾患の治療応用の検討

研究課題名(英文) Functional analysis of DNAM-1 in Treg and investigation for therapeutic applications

研究代表者

金丸 由美 (Kanemaru, Yumi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：00708688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)におけるDNAM-1の機能を解析した。試験管内ではDNAM-1遺伝子欠損Tregの機能は正常であった。一方で生体内ではDNAM-1遺伝子欠損Tregの機能が亢進していた。分子機構としてはDNAM-1がTIGIT(DNAM-1とリガンドを共有する分子)と競合してTregの機能を抑制していることが明らかになった。これらのことから生体内の環境が本分子機構に影響していることが示唆され、炎症性腸疾患における炎症環境でいかにTregを効率的に働かせるかという点で重要な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰な免疫応答や炎症反応を抑制する細胞の1つである制御性T細胞は、自己免疫疾患や炎症性疾患の治療に有用であることが多くの研究から明らかになっている。制御性T細胞の機能を左右する因子の1つとして細胞表面に存在する受容体タンパク質が挙げられ、本研究で着目したDNAM-1もその1つである。本研究ではDNAM-1が制御性T細胞の機能を弱めてしまっていることを示した。このことは大きな学術的発見であると同時に、制御性T細胞を用いた治療においてDNAM-1を標的とする新たな治療法の可能性を示した点で社会的意義のある研究成果といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the role of DNAM-1 in regulatory T cell (Treg) was investigated. In vitro experiments showed that DNAM-1-deficient Treg function was normal. On the other hand, in vivo experiments showed that DNAM-1-deficient Treg function was enhanced. By reporter cell system, it was demonstrated that DNAM-1 interfered with the binding between TIGIT and its ligand and limited Treg function. Thus, it is strongly suggested that in vivo environment is involved in the molecular mechanisms of DNAM-1-TIGIT axis in Treg. This should be a pivotal mechanism how Treg cells efficiently work in vivo (inflammatory) situation.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 DNAM-1 TIGIT

1. 研究開始当初の背景

(1) クローン病と潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) は、消化管の炎症を主体とする慢性炎症疾患で、患者数が年々増加しており、根本治療法の開発が急務である。腸管上皮細胞が何らかの要因で障害され、腸内細菌叢のバランスが乱れ、腸管免疫系が過剰に活性化することがその発症機序とされている¹。

(2) Treg は、転写因子 Foxp3 の発現で定義づけられる CD4⁺T 細胞サブセットの一つで、CTLA-4 などの抑制性受容体や、IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカインの産生を介して他の免疫細胞を抑制する。Foxp3 に変異がある患者や Foxp3 遺伝子欠損マウスは腸炎を発症することから²、Treg が腸炎における過剰な免疫応答を抑制していると考えられている。CD4⁺ナイーブ T 細胞移入腸炎モデルでは、Treg の移入によって腸炎が抑制される³ が、CTLA-4 遺伝子欠損 Treg は腸炎の発症を抑えることができない⁴。このことから、Treg において免疫受容体が重要な役割を果たしており、免疫受容体を介した Treg の機能を明らかにすることは、IBD 治療へ応用するための重要な課題となる。

(3) DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1/CD226) は、NK 細胞や T 細胞に発現する活性化受容体で、CD112 と CD155 をリガンドとする。申請者らはこれまでに、NK 細胞や CD8⁺ T 細胞上の DNAM-1 が、標的細胞に発現するリガンドを認識し、細胞傷害活性を促進し抗腫瘍免疫や GVHD の増悪に関与することを明らかにした^{5,6}。また CD4⁺ナイーブ T 細胞上の DNAM-1 は Th1 分化に寄与していることが知られている⁷。TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) は活性化 T 細胞、活性化 NK 細胞に発現する抑制性受容体で、DNAM-1 と同様 CD112 と CD155 をリガンドとする⁸。CD8⁺ T 細胞や NK 細胞上の TIGIT が細胞傷害活性を抑制していること^{9,10}、Treg 上の TIGIT が Treg の抑制能の増強に関与していることが示された¹¹。これまでに、リガンドを共有する DNAM-1 が TIGIT の機能に与える影響や、DNAM-1 自身の Treg における機能は明らかになっていない。

2. 研究の目的

Treg 上の DNAM-1 の機能を、TIGIT との関係性に着目して明らかにし、DNAM-1 の IBD 治療への有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* における Treg 機能評価のための実験系の確立：Foxp3-GFP マウスより CD4⁺CD25⁺GFP⁺細胞を分離し、同マウスより分離し Cell Trace Violet でラベルした CD4⁺CD25⁺GFP⁺コンベンショナル T 細胞

(Tconv)、および同系マウスより分離した脾臓細胞を、抗 CD3 抗体存在下で 3 日間培養し、Tconv の増殖を解析し Treg の機能を評価した。

(2) *In vivo* における Treg 機能評価のための実験系の確立：Foxp3-GFP マウスより CD4⁺CD25⁺GFP⁺細胞を分離し、同系マウスより分離した CD4⁺ナイーブ T 細胞と同時に Rag-1 遺伝子欠損マウスに移入し IBD を誘導した。移入後の Rag-1 遺伝子欠損マウスの体重減少で Treg の機能を評価した。

(3) Treg 特異的 DNAM-1 遺伝子欠損マウスの樹立：Treg における DNAM-1 の機能を *in vivo* で解析するため、Treg 特異的 DNAM-1 遺伝子欠損マウスを用いる。CRISPR/Cas9 を用いて B6 背景の DNAM-1 flox マウスを作製し、Foxp3-cre マウスと交配した。

(4) マウス TIGIT 特異的中和抗体の樹立および特性の解析：Treg における DNAM-1 の機能を、TIGIT とのリガンドの競合に着目して解析するため、TIGIT の機能を阻害する抗マウス TIGIT 特異的中和抗体が必要である。マウス TIGIT Fc キメラ蛋白およびマウス TIGIT 発現トランスフェクタントをラットに完全フロイントアジュバントと共に免疫した。上記を免疫したラットよりリンパ節細胞を採取し、SP2/0 ミエローマ細胞と融合させ、マウス TIGIT 特異抗体産生ハイブリドーマを得た。ハイブリドーマをヌードマウスに腹腔内投与し、その後回収した腹水より抗体を精製した。マウスプライマリ細胞への抗 TIGIT 抗体の結合はフローサイトメトリーで観察した。TIGIT とリガンドである CD155 との結合阻害実験はマウス TIGIT トランスフェクタントおよびマウス CD155 Fc キメラ蛋白を用いて行った。またマウスプライマリ細胞における TIGIT の機能阻害を、NK 細胞と標的細胞を共培養する細胞傷害活性の実験系で評価した。

(5) *In vitro* における DNAM-1 遺伝子欠損 Treg の機能評価：(1) の方法を用いて、野生型 Treg と DNAM-1 遺伝子欠損 Treg の抑制機能を比較した。

(6) *In vivo* における DNAM-1 遺伝子欠損 Treg の機能、増殖および安定性の評価：放射線照射した異系マウスに野生型骨髄細胞および Tconv 細胞、野生型 Treg 細胞ならびに DNAM-1 遺伝子欠損マウスの Treg を移入し、8 日目に脾臓および腸間膜リンパ節を採取し、Tconv の数、Treg の増殖 (Ki-67 の発現) および Foxp3 の発現を観察した。

(7) Treg 上の DNAM-1 を介したシグナルによる Treg の増殖および機能の検証：Treg 上の DNAM-1 が Treg にシグナルを伝えているか検証するため、野生型 Treg を抗 CD3 抗

体と抗 DNAM-1 抗体で同時に刺激し、Treg の増殖および機能を示すマーカーの mRNA の発現を観察した。

(8) DNAM-1 と TIGIT のリガンド (CD155) の競合の検証: DNAM-1 と TIGIT が細胞外領域依存的にリガンドを競合しているか検証するため、細胞内領域欠損 DNAM-1 と TIGIT-FcγR を同時発現させた NFAT-GFP レポーター細胞を、抗 DNAM-1 阻害抗体存在下で、CD155 Fc キメラ蛋白と反応させ、TIGIT を介したシグナルの強さを GFP の発現で評価した (図 6a)。

4. 研究成果

(1) *In vitro* における Treg 機能評価のための実験系の確立: Tconv、脾臓細胞、Treg を抗 CD3 抗体存在下で共培養した結果、Treg の数依存的に抑制機能が亢進 (Tconv 細胞の増殖が抑制) するのが観察され、実験系の確立に成功した。

(2) *In vivo* における Treg 機能評価のための実験系の確立: CD4⁺ ナイーブ T 細胞単独投与群では IBD の発症 (著しい体重減少、下痢の症状) が観察された。CD4⁺ ナイーブ T 細胞と Treg の同時投与群では、Treg によって IBD が軽減されているのが観察され、実験系の確立に成功した。また DNAM-1 遺伝子欠損 Treg を移入した際に IBD が軽減されると推測しているため、野生型 Treg を移入した際に IBD が抑制できない程度の Treg の数の条件が決定された。

(3) Treg 特異的 DNAM-1 遺伝子欠損マウスの樹立: CRISPR/Cas9 法により DNAM-1 flox マウスの作製を試みた結果、3 ラインの DNAM-1 flox マウスが樹立された。このうち 1 ラインと Foxp3-cre マウスを交配し、Treg 特異的 DNAM-1 遺伝子欠損マウスを作出することに成功した。

(4) マウス TIGIT 特異的中和抗体の樹立および特性解析: 5 種類のマウス TIGIT 特異抗体 (クローン TX99, TX100, TX103, TX104, TX105) を獲得し、マウスプライマリ細胞への結合解析を行った結果、全てのクローンがマウスプライマリ細胞上の TIGIT と結合することがフローサイトメトリー法により確認された。その中で最も結合親和性が高いと判断された (高い染色性を示した) TX99 について、TIGIT 発現トランスフェクタントとリガンド (CD155 Fc キメラ蛋白) を用いて結合阻害実験を行った。その結果、抗体量依存的に TIGIT とリガンドとの結合が阻害された (図 1)。またこの結合阻害能は、既存 (市場入手可能) の抗マウス TIGIT 抗体よりも強いことが示された。さらに、NK 細胞とターゲット細胞を用いて、NK 細胞における抑制性受容体 TIGIT としての機能を阻害するか解析した

結果、NK 細胞の細胞傷害活性 (CD107a の発現で示される脱顆粒、IFN-γ の産生) の亢進が観察され、TIGIT の抑制機能を阻害していることが示された (図 2)。以上の実験結果より、マウス TIGIT 特異的中和抗体の樹立に成功した¹²。本研究で樹立した抗 TIGIT 抗体は、既存の抗 TIGIT 抗体よりも高いリガンド結合阻害能があることが明確に示され、TIGIT が関与する免疫応答について解析する上で極めて貴重な材料であると言える。

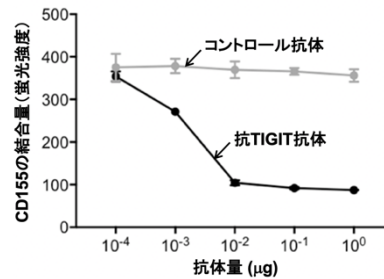


図 1. 抗マウス TIGIT 抗体 (TX99) は TIGIT と CD155 の結合を阻害する

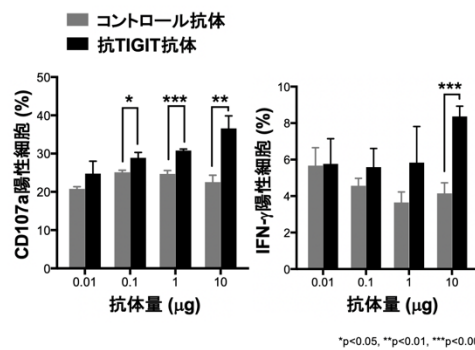


図 2. 抗マウス TIGIT 抗体 (TX99) は NK 細胞における TIGIT の機能を阻害する

(5) *In vitro* における DNAM-1 遺伝子欠損 Treg の機能評価: 本実験システムにおいては、野生型 Treg の抑制機能と DNAM-1 遺伝子欠損マウス Treg の抑制機能は同等であった (図 3)。

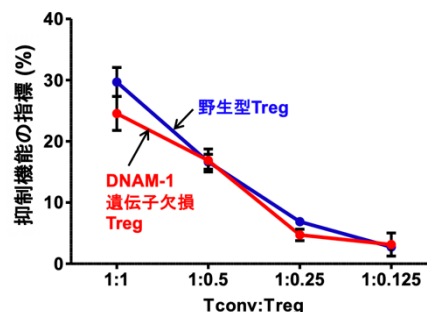


図 3. *In vitro* において、野生型 Treg と DNAM-1 遺伝子欠損 Treg の抑制機能は同等である

(6) *In vivo* における DNAM-1 遺伝子欠損 Treg の機能、増殖および安定性の評価: 野生型 Treg 移入群に比べ、DNAM-1 遺伝子欠損 Treg 移入群において、Tconv の数が少ないという結果を

得た(図4a)。また野生型Tregに比べ、DNAM-1遺伝子欠損Tregの増殖が抑制された(図4a,b)。Foxp3の発現は野生型TregよりもDNAM-1遺伝子欠損Tregの方が高いという結果を得た(図4c)。このことより*in vivo*においてDNAM-1がTregの増殖を促進すると同時にFoxp3の安定性を低下させ、Tregを介したTconvの増殖抑制を阻害していることが示唆された。

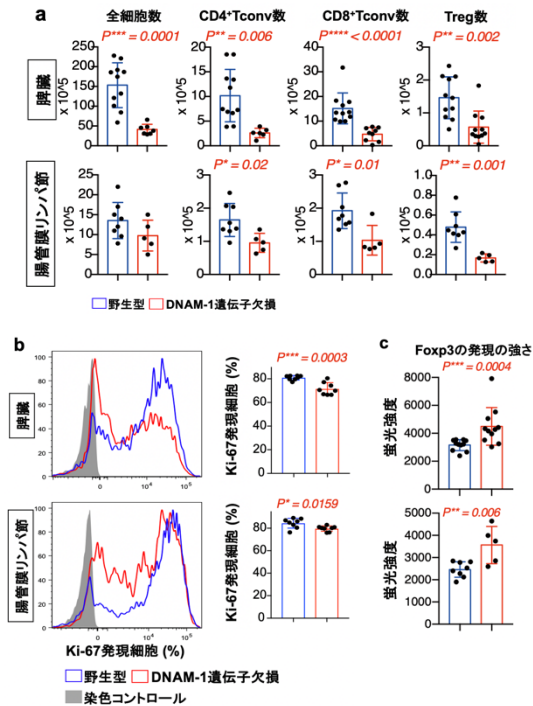


図4. *In vivo*において、DNAM-1遺伝子欠損Tregの増殖は抑制されるが、Foxp3の発現が維持され、野生型Tregに比較してTconvに対する抑制能力が強い

(7) Treg上のDNAM-1を介したシグナルによるTregの増殖および機能の検証：DNAM-1の刺激の有無でTreg細胞の増殖および代表的な抑制機能のマーカーのmRNAの発現は変わらなかった(図5)。このことは、DNAM-1自体がTreg細胞に抑制シグナルを伝えていないことを示唆している。

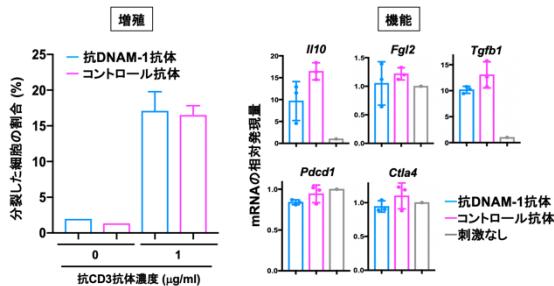


図5. Treg上のDNAM-1を介したシグナルはTregの増殖および抑制機能に関与していない

(8) DNAM-1とTIGITのリガンド(CD155)の競合の検証：抗DNAM-1抗体の濃度依存的にGFPの発現つまりTIGITを介したシグナルが増強することが確認された(図6b)。このことより、DNAM-1が細胞外領域を介してTIGITを介したシグナルを減弱させていることが示

された。

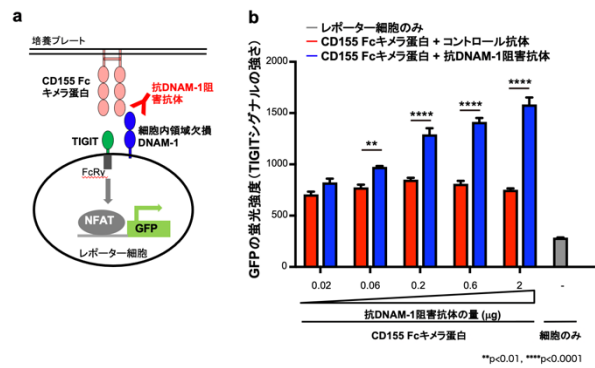


図6. DNAM-1はTIGITとリガンドを競合してTIGITを介したシグナル伝達を制限している

(9) まとめ

本研究では、Tregの機能を評価する*in vitro*の実験系、*in vivo*の病態モデルの樹立を行った。またTregにおけるDNAM-1の機能を解析する上で重要なTreg特異的DNAM-1遺伝子欠損マウスの樹立、またマウスTIGITに対する特異的中和抗体の樹立を行った。

*In vitro*の実験系において、DNAM-1遺伝子欠損Tregの抑制機能が正常であったことは予想外の結果だった。一方で、*in vivo*ではDNAM-1遺伝子欠損Tregの抑制機能が亢進し、Foxp3の安定性が上昇していた。そのメカニズムとして、Treg上のDNAM-1がTIGITとリガンドを競合してTIGITを介したシグナルを減弱させ、Tregの機能を制限していることが明らかになった。*In vitro*ではDNAM-1遺伝子欠損Tregの機能に異常が認められないことから、*in vivo*の環境が本メカニズムに影響していることが示唆され、今後はその詳細な分子メカニズムを解明していく予定である。この点は炎症性腸疾患における炎症環境でいかにTregを効率的に働かせるかという点で重要なポイントになると考えられる。

本研究で得られた材料および知見をもとに、Tregを用いた炎症性腸疾患への治療応用の検討を継続していく予定である。

<引用文献>

- Markus FN, Cytokines in inflammatory bowel disease *Nat. Rev. Immunol.* 14, 329-342 (2014)
- Megan EH, et al. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers, *Immunology* 136, 115-122 (2012)
- Oliver A, et al. CD25⁺ CD4⁺ T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-10. *J. Immunol.* 166: 3008-3018 (2001)
- Sojka DK, et al. CTLA-4 is required by CD4⁺CD25⁺ Treg to control CD4T-cell lymphopenia-induced proliferation. *Eur. J. Immunol.* 39: 1544-1551 (2009)
- Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, et al. Accelerated tumor growth in mice defi

- cientin DNAM-1 receptor. *J. Exp. Med.* 205, 2959-2964 (2008)
- ⑥ Nabekura T, Shibuya K, Takenaka E, Kai H, Shibata K, Yamashita Y, et al. Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18593-18598 (2010)
- ⑦ Shibuya K, et al. CD226 (DNAM-1) Is Involved in Lymphocyte Function-associated Antigen 1 Costimulatory Signal for Naive T Cell Differentiation and Proliferation. *J. Exp. Med.* 198, 1829-1839 (2003)
- ⑧ Yu X, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 48-57 (2009)
- ⑨ Nicole J, et al. TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions. *J. Immunol.* 186, 1338-1342 (2011)
- ⑩ Noa S, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17858-17863 (2009)
- ⑪ Nicole J, et al. Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity* 40, 569-581 (2014)
- ⑫ Nakamura Yuho, Naito Keisuke, Yamashita-Kanemaru Yumi, et al. TX99 Is a Neutralizing Monoclonal Antibody Against Mouse TIGIT. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 37, 105-109 (2018)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yuho Nakamura, Keisuke Naito, Yumi Yamashita-Kanemaru, et al. TX99 Is a Neutralizing Monoclonal Antibody Against Mouse TIGIT. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* (査読有) 37, 105-109 (2018)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 金丸(山下)由美、佐藤 和貴、阿部 史枝、奥村 元紀、伊藤 守、渋谷 彰、渋谷 和子、DNAM-1 はヒト急性 GVHD 治療の分子標的となりうる、第 9 回 血液疾患免疫療法学会 学術集会 (2017 年)

- ② Yumi Yamashita-Kanemaru, Kazuki Sato, Fumie Abe, Yuho Nakamura, Rikito Murata, Akira Shibuya, Kazuko Shibuya, DNAM-1 limits Treg cell function via TIGIT-dependent manner, 第 46 回 日本免疫学会 学術集会 (2017 年)

6. 研究組織

(1)研究代表者

金丸 由美 (Kanemaru, Yumi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号 : 00708688