

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02672

研究課題名(和文) 抑制性レセプターによるT細胞機能の抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Inhibitory mechanism of T cell function by inhibitory receptors

研究代表者

斉藤 隆 (Saito, Takashi)

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・チームリーダー

研究者番号：50205655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性感染やがんでは、T細胞に機能不全状態が誘導され、これはPD-1等の抑制受容体による機能抑制によっている。本研究では抑制受容体LAG-3を介するT細胞活性化と機能の抑制メカニズムを解明した。T細胞活性化に伴ってLAG-3はリガンド依存的にクラスターを形成し、TCRマイクロクラスターと共局在した。LAG-3による抑制活性は細胞内領域に依存するが、クラスターの形成は依存しなかった。LAG-3抗体によりT細胞活性化が亢進され、PD-1との二重特異的抗体はより強い活性化が誘導された。種々の抗体による阻害から、MHC-IIよりTCRとの会合がLAG-3による抑制活性に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対するチェックポイント療法が大きく進み、より良い療法が期待されている。PD-1やCTLA-4以外の抑制性受容体の制御によって疲弊T細胞を活性化が示唆されている。その代表の抑制受容体LAG-3を介したT細胞機能の抑制メカニズムを明らかにすることは、PD-1との異同を含めて、学術的に極めて重要であり、実際に臨床で使用するためにLAG-3の機能機作の解明は必須である。また、今回PD-1とLAG-3のbi-specific抗体についても解析したが、実際にこのbi-specific抗体が、現状のPD-1抗体に替わる日は遠くないと思われ、その基本的性状の解析もまた大変意義のあることである。

研究成果の概要(英文)：T cells are dysfunction in chronic infection and cancer. This dysfunction is induced by inhibitory signals through inhibitory receptors as PD-1. This study analyzed inhibitory mechanism of T cell activation and function by such inhibitory receptor LAG-3. LAG-3 induced cluster formation upon T cell activation which are co-localized with TCR-microclusters. LAG-3-mediated inhibition of T cell activation depends on cytoplasmic region of LAG-3, but the cluster formation did not require the cytoplasmic region. While anti-LAG-3 augmented T cell activation, bi-specific Ab against LAG-3 and PD-1 induced stronger activation. Analysis of inhibitory anti-LAG-3 Abs, it was suggested that inhibitory function of LAG-3 do not require MHC-II association but do need assembly with the TCR complex.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 抑制性レセプター ミクロクラスター PD-1 チェックポイント阻害剤 LAG-3 TIGIT 活性化シグナル

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

T細胞は免疫監視と制御の中心をなし、その活性化・機能発現が重要である。TCRによる抗原認識シグナルによってT細胞は活性化されると共に、副刺激シグナルによって正・負に制御される。副刺激レセプターCD28を介する正の副刺激が、抑制レセプターCTLA-4およびPD-1によって負の制御が行われる。抑制レセプターからの負のシグナルによってT細胞は機能不全または不応答(アナジー)に陥る。慢性感染の状態やがん組織に浸潤したT細胞は、PD-1を発現し、機能不全状態(疲弊、Exhaust)に陥るが、PD-1とそのリガンドPD-Lとの結合を抗PD1抗体などで阻害すると、この疲弊状態が解除されて機能性T細胞が回復し、感染・がんに対抗できるようになることが知られる。抑制性副刺激レセプターを介する抑制シグナルは、T細胞の活性化抑制を誘導するとともに、感染やがんなどの疾病における免疫賦活への制御に重要なことが解ってきた。しかし臨床的には抗PD-1抗体では反応するがん患者は一部であり、反応しない例が多く存在し、PD-1だけでなく、PD-1と同様な抑制性レセプター(免疫チェックポイント)の阻害によって、更にT細胞を賦活化させることが可能であり、有用と考えられる。そうした抑制性副刺激レセプターとして、PD-1の他にLAG3とTIGITが知られる。実際、LAG3の阻害がPD-1と相乗的に働く報告も出てきている。しかし、これらの抑制レセプターを介する抑制のメカニズムに関しては不明な部分が多い。これらの抑制レセプターは、T細胞表面でリガンドと結合して抑制活性を誘導するが、それは我々がこれまで解析してきたPD-1やCTLA-4と同様に、免疫シナプスにおけるTCRシグナルクラスターに共局在して抑制を果たしている可能性が高い。免疫シナプスにおける細胞表面でのこれら種々の抑制レセプターのダイナミクスを解析して、TCR活性化シグナルとの関連を明らかにすると共に、下流のシグナル解析をすることによって、抑制レセプターによるT細胞活性化不全のメカニズムを解明し、これら分子に対する抗体などでの阻害によって、機能抑制の解除が誘導される機序を明らかにすること、が本研究の中心的課題である。

2. 研究の目的

慢性感染やがん組織浸潤組織などでは、T細胞がPD-1抑制レセプターを高発現しており、機能的不全状態に陥っている。この不全状態は抑制レセプターPD-1などによる抑制シグナルによると考えられている。実際にはPD-1のみならず他の抑制レセプターTIGITやLAG3もエフェクターT細胞では発現し、T細胞の活性化・機能の抑制に関与していることが示唆されており、特にIn vivoで抗腫瘍免疫機能がこれら抑制レセプターに対する抗体の投与で昂進することが知られるにも関わらず、その抑制メカニズムは未だ不明な点が多い。

そこで、本研究の目的は、これら新規TIGITおよびLAG3を介するT細胞活性化と機能の抑制メカニズムを解析して、PD-1を介する抑制との関係を明らかにする。planar 膜とTIRF顕微鏡を用いて、TIGITやLAG3のダイナミックな動態を調べ、T細胞活性化を誘導するTCRシグナルクラスターとの関係を解析する。またTIGITやLAG3に対する抗体によってこれら抑制レセプターによる抑制を阻害した場合、T細胞が機能抑制から解除されるのか、また種々の抗抑制レセプター抗体の併用や多架抗体によって、より強く抑制解除・免疫昂進がえられるか、などをチェックポイント療法への応用も見据えた形で解析する。

3. 研究の方法

- (1)TCR ミクロクラスターとそれを介するシグナル伝達、および副刺激によるシグナル制御などは、pMHC、ICAM1 を GPI 型として発現させた人工脂質二重膜に T 細胞を反応させて、TIRF 顕微鏡でイメージング解析を行った。クラスター解析は IMARIS ソフトウェアにて解析した。
- (2)LAG3 の構造・機能相関解析は、変異 LAG3 を発現させた 抗原特異的 T 細胞ハイブリドーマに抗原ペプチドをパルスした DC-1 細胞で刺激して産生する IL-2 を ELISA にて解析した。
- (3)活性化の解析は PD-1 抗体や LAG3 抗体の存在下で、T 細胞を活性化し、細胞ライセートをリン酸化シグナル分子に対する特異抗体にてプロットして解析した。

(4)LAG3 会合分子の同定のために、LAG3-streptag を発現したマウス由来の CD4+T 細胞を活性化して、プルダウンし、特異的に溶出した蛋白質のマススペクトロメーター解析を行った。

4. 研究成果

(1) LAG3 および TIGIT の免疫シナプスでの動態解析

これまで T 細胞活性化に伴って、TCR ミクロクラスター (MC) が形成されて、TCR 近傍のシグナル分子がリクルートされて活性化シグナルを伝達することを解析してきた。LAG3 および TIGIT の動態解析のために、これらをレトロウイルスにて発現誘導した T 細胞を MHC-II/抗原ペプチド、および ICAM-1 を GPI 型で発現させた planar 膜の上で 抗原/MHC で刺激し、動態をイメージ解析した。抑制性副受容体 PD-1 も活性化に伴ってクラスターを形成して、TCR-MC と共局在することを示した。そこで、LAG3 および TIGIT の免疫シナプスにおける動態を調べた。抗原刺激に伴って TCR-MC が形成され、LAG3-GFP も同様にクラスターを形成し、TCR-MC とオーバーラップした (図 1)。その後 cSMAC が形成される際にも cSMAC に集積した。一方、TIGIT も同様に活性化に伴ってクラスターを形成し、TCR-MC と重複した。更に異なる蛍光でラベルした分子を発現させ、LAG3-Halo/PD-1-GFP, TIGIT-Halo/PD-1-GFP 等の組合せで同時蛍光解析を行い、相互関係を解析した。活性化に伴う LAG3 クラスター、TIGIT クラスター、TCR ミクロクラスターは完全に共局在した。

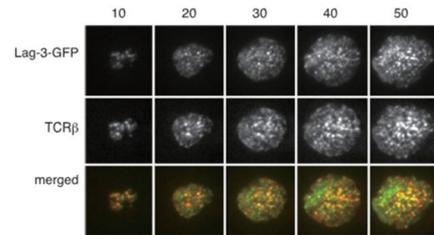


図 1. 活性化によって TCR ミクロクラスターと共局在する LAG3

(2) LAG3 および TIGIT による T 細胞活性化の抑制解析

LAG3 および TIGIT を発現した T 細胞の活性化に伴うサイトカイン IL-2 の産生を調べた。LAG3+T 細胞では、IL-2 産生の明らかな亢進が観察された。一方、TIGIT+T 細胞においては、もとの T 細胞と全く変化なかった。これは、抗原濃度を変化させても変化なく、CD4+T 細胞の抗原特異的刺戟においては、TIGIT を介する抑制は見られないと考えられた。クラスター形成と抑制活性を解析するために、LAG3 に集中して、構造と機能の関連の解析を進めた。

(3) LAG3 変異分子の機能解析

LAG3 を介する抑制機能とミクロクラスター形成に必要な LAG3 の領域を解明するために、まず細胞内領域を欠失した LAG3 CP を解析した。活性化に伴うクラスターは野生型と同様に形成されるので、細胞内領域は不要であることが判明した。一方、IL-2 産生の機能解析では、LAG3 CP 発現 T 細胞は、IL-2 産生の亢進活性が失われた。LAG3 による抑制活性には細胞内領域が必須であり、ここを

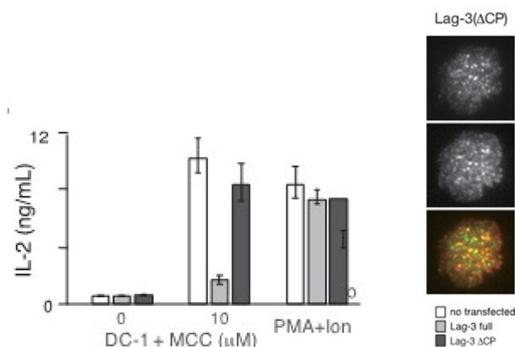


図 2. 細胞内領域を欠失した LAG3 発現 T 細胞の活性化に伴うクラ運指スタ 形成 (右) および IL2 産生抑制 (左)

介した抑制シグナルが誘導されることが明らかになった。

更に LAG3 の各ドメイン欠失分子を解析した。MHC-II 会合に重要である N 末端の Ig ドメインを欠失させた変異分子は、活性化にともなうクラスターは正常に形成され、更に活性化を亢進する機能は野生型と同様であった。これらから、リガンド MHC-II が無くても LAG3 はクラスター形成をし、抑制活性を示すことが示唆された。

そこで、T 細胞を抗原/MHC ではなく、抗 CD3/CD28 抗体によって T 細胞を活性化する系で解析してみた。この刺激において、TCR-MC も形成され、同様に LAG3 クラスターも形成されることが判明した。更に、弱いながら活性化の亢進も観察された。即ち LAG3 はリガンド MHC-II が存在しない状況でも、LAG3 クラスターが形成され、活性化の抑制機能を発揮できることも可能であることが示唆された。

(4) LAG3 の細胞内領域への会合分子の解析

LAG3 との共刺激による TCR 活性化シグナルへの効果を見るために、TCR 下流のシグナル分子のリン酸化状態を解析した。PD-1 を介しての刺激は、シグナル分子のリン酸化 (PLC γ , Erk, Akt など) を大きく亢進させたものの、LAG3 を介する共刺激では大きな差は見られなかった。IL-2 産生においては明らかな亢進を誘導することができることを考えると、より後期に働くシグナル分子の活性化の亢進などが関与する可能性が考えられる。そのため、LAG3 に会合する分子群を直接プルダウン、Mass 解析を行い、多くの会合分子を得た。これらから、T 細胞での発現、細胞内局在、などを考慮して、抑制シグナルに関与しそうな数個の候補を解析してきたが、残念ながら、LAG3 特異的で抑制活性に関与しそうな標的分子の同定には至っていない。

(5) PD-1 と LAG3 による抑制の関係 種々抗体による阻害の解析

PD-1 抗体によるがんの免疫療法が画期的な成果を収めている一方、反応する患者はまだ一部であることから、LAG3 など他のチェックポイント抗体を用いた免疫療法が望まれている。実際に、PD-1 抗体と LAG3 抗体の併用および両者に特異性をもつ bi-specific 抗体によって T 細胞活性化の亢進がどうなるか、解析した。上述のように、PD-1 抗体の処理によって、生化学的には活性化シグナル分子のリン酸化の亢進が顕著に起こるが、LAG3 抗体は単独で加えても明らかな効果がなく、更に PD-1 抗体と一緒に加えても PD-1 抗体による効果以上の亢進は見られなかった。しかし、機能的には効果があった。両抗体による同時の処理によって IL-2 産生が、明らかに増強した。更に、抗 PD-1 抗体と抗 LAG3 抗体の同時処理と共に、両者の特異性を持つ bi-specific 抗体を解析してみたところ、両抗体の処理とほぼ同様な結果が得られ、bi-specific 抗体の有用性、臨床への応用が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Takashi	4. 巻 1189
2. 論文標題 Molecular dynamics of co-signal molecules in T cell activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 135-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-32-9717-3_5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto H., Saito Y., Ohuchida K., Kawasaki E., Fujiki S., Watanabe T., Takagi S., Ono R., Kaneko A., Takagi S., Najima Y., Hijikata A., Cui L., Ueki T., Oda Y., Ohara O., Nakamura M., Saito T. and Ishikawa F.	4. 巻 200
2. 論文標題 Deregulated Mucosal Immune Surveillance through Gut-Associated Regulatory T Cells and PD-1+ T Cells in Human Colorectal Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3291-3303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1701222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto T., Masuta Y., Momota M., Kanekiyo M., Kanuma T., Takahama S., Moriishi E., Saito T., Yasutomi Y., Graham B. S., Takahashi Y. and Ishii K. J.	4. 巻 31
2. 論文標題 A unique nanoparticulate TLR9 agonist enables a HA split vaccine to confer Fc R-mediated protection against heterologous lethal influenza virus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 81-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imanishi T, Unno M, Kobayashi W, Yoneda N, Matsuda S, Ikeda K, Hoshii T, Hirao A, Miyake K, Barber GN, Arita M, Ishii KJ, Akira S, Saito T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T cell activation and function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201800282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kong Mei S., Hashimoto-Tane A., Kawashima Y., Sakuma M., Yokosuka T., Kometani K., Onishi R., Carpino N., Ohara O., Kurosaki T., Phua K.K. and Saito, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of T cell activation and function by the adaptor protein CIN85.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaav4373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aav4373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nemeth T, Futosi K., Szabo M., Aradi P., Saito T., Mocsai A. and Jakus Z	4. 巻 10
2. 論文標題 Importance of Fc receptor -chain ITAM tyrosines in neutrophil activation and in vivo autoimmune arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontier of Immunology	6. 最初と最後の頁 252-252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Imanishi Takayuki, Saito Takashi	4. 巻 41
2. 論文標題 T Cell Co-stimulation and Functional Modulation by Innate Signals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Immunology	6. 最初と最後の頁 200-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.it.2020.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imanishi Takayuki, Unno Midori, Kobayashi Wakana, Yoneda Natsumi, Akira Shizuo, Saito Takashi	4. 巻 32
2. 論文標題 mTORC1 Signaling Controls TLR2-Mediated T-Cell Activation by Inducing TIRAP Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107911-107911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Saito T., Hashimoto-Tane A., Kong M.S.
2. 発表標題 Negative regulation of T cell activation and function by the CINB5 adaptor protein
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto-Tane A. and Saito T.
2. 発表標題 自己免疫関連脱リン酸化酵素PTPN22がT細胞活性化に伴って形成する抑制性コンプレックスの解析
3. 学会等名 第29回学術集会 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto-Tane A. and Saito T.
2. 発表標題 T細胞受容体クラスターとPTPN22(Lyp)を含む自己免疫関連分子集合体の解析
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and functions
3. 学会等名 TOLL Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Hashimoto-Tane, Takashi Saito
2. 発表標題 Molecular assembly and function of PTPN22 in T cell receptor signaling
3. 学会等名 FASEB Immunoreceptors and Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Dynamic regulation of inhibitory signals on T cell activation
3. 学会等名 EMBO Workshop: Lymphocyte antigen receptor signalling (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Saito, Mei Suen Kong, Akiko Hashimoto-Tane
2. 発表標題 Negative regulation of T cell activation and function by the CINB5 adaptor protein
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Hashimoto-Tane, Takashi Saito
2. 発表標題 Functional analysis of autoimmune-associated phosphatase PTPN22(TCPTP) in T cells
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T cell activation and functions
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Dynamic negative regulation of T cell activation by co-inhibitory receptor and adaptors
3. 学会等名 Seminar in Hokkaido University (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imanishi Takayuki, Saito Takashi
2. 発表標題 mTORC1 signals control TLR2 pathways in T cells by inducing TIRAP expression
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imanishi T., Saito. T.
2. 発表標題 Regulation of T cell function by innate immune signals
3. 学会等名 14th World Immune Regulation Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Regulation of cell adhesion and activation at Immune synapse
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------