

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07718

研究課題名(和文)革新的分子イメージング解析からのLAG3による新規抗腫瘍免疫応答の抑制機構の解明

研究課題名(英文) Using molecular imaging, analysis of LAG-3-mediated suppression of anti-tumor immune response

研究代表者

若松 英 (Wakamatsu, Ei)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40632617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：LAG3は免疫チェックポイント分子阻害剤の標的として注目され、抗LAG3抗体と抗PD1抗体の併用療法は悪性黒色種に対し、高い奏効率を示すことが報告されている。しかし、LAG3の免疫抑制機構は未だ十分には理解されておらず、抗LAG3抗体によるT細胞賦活化機構も不明である。本研究では当研究室で開発した分子イメージング法を用いて、LAG3を介した免疫抑制機構の解明を試みた。本研究結果から、LAG3発現T細胞はMHCクラスIIを抗原提示細胞や腫瘍細胞から取り除き、CD4 T細胞を抑制するというLAG3を介した新たな免疫抑制機構を見出した。これらの成果はがん免疫の減弱機構の理解に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAG3を含めた免疫チェックポイント分子の多くが、分子機構や作用機序に関して十分な理解がなされておらず、臨床応用のみが先行している。そのため、患者選定や複合免疫療法などの可能性を考慮する際の科学的な根拠は十分ではない。本研究では、分子イメージング法という新たな視点からLAG3を研究することで、LAG3発現T細胞の新たな機能を明らかにした。これらの結果は抗LAG3抗体はCD8 T細胞の直接的な活性化、CD4 T細胞を介した間接的な活性化によって抗腫瘍免疫応答を亢進させている可能性が示唆している。このように抗LAG3抗体の免疫賦活化機構を提案できたことは、学術的、社会的に非常に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Blockade of PD-1 and/or CTLA4 has shown outstanding efficacy for tumor immunotherapy, and LAG-3 blocking antibodies have been proposed as the next generation of immune checkpoint inhibitors. However, the mechanism of LAG-3-mediated suppression is still poorly understood. Here, by utilizing high-resolution molecular imaging, we found that LAG-3-bound MHC class II (MHC-II) molecules on antigen-presenting cells (APCs) were gathered at the center of an immunological synapse in both CD4 and CD8 T cells, leading to the trogocytosis of MHC-II by the ectodomain of LAG-3 through clathrin-dependent endocytosis. By using this mechanism, LAG-3-expressing T cells reduced the number of MHC-II molecules on APCs, thus attenuating their antigen-presentation function, and impaired CD4 T cell activation both in vitro and in vivo. These data reveal a novel mechanism of indirect suppression of CD4 T cells by LAG-3-mediated trogocytosis, which could be the next candidate for tumor immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード：LAG-3 T細胞 トロゴサイトーシス MHC class II 免疫チェックポイント分子 腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PD-1 および CTLA-4 に対するチェックポイント分子阻害剤の劇的な効果によって、免疫療法はがん治療における新たな標準治療として期待され、現在さらなる治療効果を求めて、第3のチェックポイント分子阻害剤の開発が進められている。LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3) は PD-1 と同様に疲弊化 T 細胞に高発現していることから新たな標的として注目されており、米国の臨床試験において抗 LAG-3 抗体と抗 PD-1 抗体の併用療法が抗 PD-1 抗体単独よりも強い抗腫瘍効果を示すことが報告された。しかしながら、LAG-3 による免疫抑制作用の詳細なメカニズムは十分に理解されておらず、LAG-3 遮断による抗腫瘍免疫応答の増強メカニズムは不明である。そのため、抗 LAG-3 抗体が治療薬として使用される際の患者選定や、複合免疫療法などの可能性を考慮する際の科学的な根拠が未だ十分には構築されていない。

2. 研究の目的

当研究室では、これまで生化学的手法に加え、先端的分子イメージングを用いてチェックポイント分子の研究を行うことで、CTLA-4 と PD-1 による全く異なる T 細胞制御機構を明らかにした。そのため、先端的イメージングを用いて、時空間的かつ空間的にアプローチすることで、LAG-3 による TCR シグナル抑制機構の新たな解答を導き出せると考えた。先端的イメージングを用いた予備実験から、LAG-3 が細胞内領域を介して抑制シグナルを伝えるのではなく、リガンドである MHC を抗原提示細胞から剥奪 (トロゴサイトーシス) し、間接的に T 細胞受容体 (TCR) シグナルを抑える可能性を見出した。本研究では、分子イメージング解析で得られた新たな知見を基に、LAG-3 を介した MHC トロゴサイトーシスによる T 細胞抑制の作用機序を明らかにし、LAG-3 遮断による免疫賦活化への応用と理解のための基盤を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) I-E^k-GPI、MCCp-I-E^k-GPI、MSA-I-E^k-GPI、H2-K^b-GPI、ICAM-1-GPI を用いて、Supported lipid bilayer (SBL) を作製した。GFP を融合させた LAG-3 を LAG-3 欠損 T 細胞に導入し、ソート後、SBL 上にドロップし、共焦点顕微鏡を用いてライブセルイメージングを行った¹。

(2) I-E^k-HaloTag、MSA-I-E^k-CFP、H2-K^b、PDL1 を各種組み合わせで発現させた CHO 細胞を抗原提示細胞として用い、GFP 融合 LAG-3 もしくは LAG-3-IRES-GFP を LAG-3 欠損 T 細胞に導入し共培養した。その後、共焦点顕微鏡、もしくはフローサイトメトリーで解析を行った。

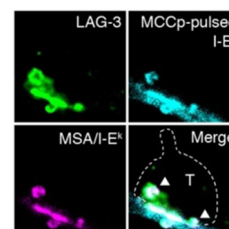
(3) *in vitro* の CD4 T 細胞の増殖能を評価するため、LAG-3-IRES-GFP を導入した LAG-3 欠損 T 細胞と CellTraceViolet で染色した AND T 細胞、splenic B 細胞を共培養した。また、Th1 CD4 T 細胞の IFN 産生能を評価するために、LAG-3-IRES-GFP を導入した LAG-3 欠損 CD8 T 細胞、Th1 OT-II CD4 T 細胞、PDL1/CIITA を発現させた E.G7 を共培養した。培養後、細胞分裂、および IFN 産生能はフローサイトメトリーで解析を行った。

(4) ナイーブ CD4 T 細胞を単離し、Rag2KO マウスに腹腔内投与することで腸炎を誘導した。この際、野生型マウスもしくは Cbl 欠損マウス由来 CD4 T 細胞に細胞内領域を欠失した LAG-3-IRES-GFP を導入し、共移入した。3日毎に体重測定を行い、誘導4週後に大腸の長さの測定、組織学的解析、フローサイトメトリーでの解析を行った。

4. 研究成果

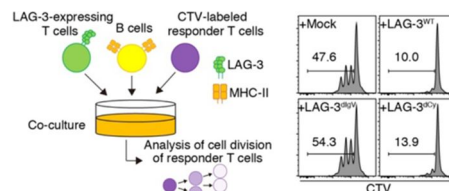
(1) 予備の実験において、SLB を用いて、T 細胞上の LAG-3 および SLB 上の MHC class II (MHC-II) の挙動を観察した。AND-TCR トランスジェニック CD4 T 細胞を用いた場合、LAG-3 および MHC-II (MCCp を提示させた I-E^k: AND-TCR が認識するペプチド/MHC-II 複合体) は TCR マイクロクラスター (TCR-MC) および central supramolecular activation cluster (cSMAC) に局在していた。OT-I-TCR トランスジェニック CD8 T 細胞を用いた解析では、MHC-II が SLB 上に発現している場合のみ LAG-3 は TCR-MC および cSMAC で観察された。また、その際 MHC-II も cSMAC で観察された。これらの結果は LAG-3 が MHC-II に結合することで MHC-II の局在を決定している可能性が示唆された。より詳細に解析するために、AND-TCR が結合できないマウス血清アルブミン由来のペプチドを提示させた I-E^k(MSA-I-E^k) を MCCp-I-E^k と共に SLB 上に発現させた。この結果から、野生型 LAG-3 発現 AND-T 細胞は MSA-I-E^k を cSMAC に集積させた。一方で、MHC-II と結合できない変異 LAG-3 を発現させた AND-T 細胞は MSA-I-E^k を cSMAC に集めなかった。これらの結果から、TCR と結合していない MHC-II も LAG-3 と結合することで cSMAC に集積することができることが明らかとなった。

(2) 次に、LAG-3 によって cSMAC に集められた MHC-II が T 細胞にトロゴサイトーシスされるかを分子イメージング、およびフローサイトメトリーを用いて解析した。右図に示すように、T 細胞の中に LAG-3 に囲まれる形で TCR と結合する MCCp-I-E^k および TCR と結合しない MSA-I-E^k が観察された。また、フローサイトメトリーで定量的に解析した結果、LAG-3 欠損



T細胞、および MHC-II と結合できない LAG-3 を発現させた T細胞と比較して、野生型 LAG-3 だけでなく細胞内領域を欠失させた LAG-3 を発現した T細胞は抗原提示細胞から MHC-II を取り込んでいた。さらに、LAG-3 発現 T細胞と共培養した抗原提示細胞上の MHC-II は減少していた。LAG-3 を介した MHC-II のトロゴサイトーシスが AND T細胞得意的な機能でないことを除外するために、卵白アルブミン由来ペプチドを認識する OT-II TCR トランスジェニック CD4 T細胞を用いて、解析した。その結果、AND T細胞と同様に OT-II T細胞においても LAG-3 依存的に抗原提示細胞上の MHC-II を減少させた。これらのことから、LAG-3 は MHC-II と結合することで T細胞に効率的にトロゴサイトーシスされることが示された。

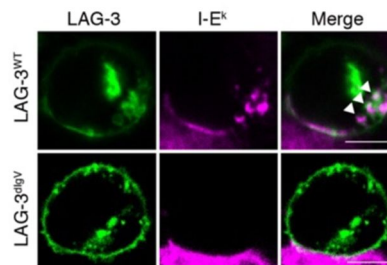
(3) 次に LAG-3 と結合した MHC-II がどのようにして T細胞に取り込まれるかを検証した。細胞内領域を欠失した LAG-3 を発現させた T細胞も MHC-II のトロゴサイトーシスが起きていることから LAG-3 自身のエンドサイトーシスではなく、TCR のエンドサイトーシスの機序を利用している可能性を考えた。そのため、TCR のエンドサイトーシスが抑制される *Cblb* 欠損マウスを用いて解析を行った。野生型 AND T細胞と比較して、*Cblb* 欠損 AND T細胞は LAG-3 結合 MHC-II の取り込みが抑制された。これらの結果から、LAG-3 結合 MHC-II の T細胞へのトロゴサイトーシスは TCR のエンドサイトーシスの機序を利用していることが示唆された。TCR のエンドサイトーシスはクラスリン依存的、非依存的機序によって制御されているため、LAG-3 結合 MHC-II の T細胞の取り込みがどちらの機序に依存しているかを阻害剤を用いて検証した。その結果、クラスリン依存的エンドサイトーシスを阻害する PitSTOP2 を処理することで LAG-3 結合 MHC-II の T細胞への取り込みが減少した。一方で、クラスリン非依存的エンドサイトーシスの阻害剤である Wortmanin 処理は LAG-3 結合 MHC-II の取り込みに影響を与えなかった。これらの結果から、LAG-3 結合 MHC-II は T細胞のクラスリン依存的エンドサイトーシスの機序を利用してトロゴサイトーシスされている可能性が示唆された。



(4) LAG-3 を介した抗原提示細胞上の MHC-II の減少が CD4⁺ T細胞の活性化を抑制するかを *in vitro* で評価した。右図に示したように LAG-3 を発現させた T細胞、抗原提示細胞、CellTraceViolet で染色したレスポナーCD4 T細胞を共培養した。その結果、LAG-3 を発現していない T細胞、および MHC-II と結合できない LAG-3 を発現させた T細胞と比較して、野生型 LAG-3 および細胞内領域を欠失させた LAG-3 を発現させた T細胞との共培養はレスポナーCD4 T細胞の増殖を非常に強く抑制した。LAG-3 発現 T細胞による抑制は抗体刺激（抗原提示細胞フリー）では認められなかった。また、抗原提示細胞存在下にも関わらず、CD8 T細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。さらに、LAG-3 の内在性発現レベルでもレスポナーCD4 T細胞の増殖は抑制された。これらの結果から、LAG-3 発現 T細胞は抗原提示細胞上の MHC-II を減少させ、間接的に CD4 T細胞の増殖を抑制することが示唆された。

(5) LAG-3 発現 T細胞が *in vitro* だけでなく *in vivo* でも CD4 T細胞の活性化を抑制するかを CD4 T細胞誘導腸炎モデルで検証した。細胞内領域を欠失させた LAG-3 を発現させた T細胞を共移入することで、腸炎による体重減少、および大腸の肥厚化が軽減された。腸管膜リンパ節における LAG-3 発現 T細胞は MHC-II が高発現していた。一方で、活性化マーカーの発現、およびサイトカイン産生能はコントロール T細胞と同程度であった。さらに、LAG-3 発現 *Cblb* 欠損 T細胞は腸炎を抑制しなかった。これらの結果から、*in vivo* においても LAG-3 発現 T細胞によって抗原提示細胞上の MHC-II を減少させることで CD4 T細胞の活性化を抑制し、それに伴い、腸炎を軽減させた可能性が示唆された。しかしながら、実際に抗原提示細胞上の MHC-II の減少を捉えることができなかったため、さらなる検証が必要である。

(6) 予備実験で、LAG-3 発現 CD8 T細胞も LAG-3 を介して MHC-II を cSMAC に集積させることを見出している。そのため、CD4 T細胞と同様に CD8 T細胞も LAG-3 結合 MHC-II をトロゴサイトーシスするかを検証した。右図に示したように、CD4 T細胞と同様に、CD8 T細胞においても、LAG-3 に囲まれた MHC-II が細胞内で確認された。また、フローサイトメトリーを用いた解析でも LAG-3 発現 CD8 T細胞は MHC-II を抗原提示細胞上から取り込んでいた。さらに、LAG-3 発現 CD8 T細胞と CD4 T細胞との共培養によって、CD4 T細胞の増殖能の低下が認められた。これらの結果から CD4 だけでなく CD8 T細胞においても LAG-3 は MHC-II と結合することで、抗原提示細胞上から MHC-II の発現を減少させ、CD4 T細胞の活性化を減弱することが示唆された。



(7) LAG-3 は PD-1 と共に活性化 CD8 T細胞や疲弊化 T細胞で高発現することが報告されている。そこで、PD-1 によって活性化が抑制された CD8 T細胞でも LAG-3 を介した CD4 T細胞の活性化の減弱を誘導できるかを検証した。PDL1 と MHC-II を発現させた抗原提示細胞と LAG-3/PD-1 発現 CD8 T細胞を共培養させた結果、CD8 T細胞からのサイトカイン産生能は減弱したが、抗原提示細胞から MHC-II をトロゴサイトーシスしていた。さらに、PD-L1 と MHC-II を発現させた腫瘍細胞と LAG-3/PD-1 発現 CD8 T細胞、および Th1 CD4 T細胞を共培養した結果、Th1 CD4 T細胞中の IFN 産生細胞が減少した。これらのことから、PD-1 による CD8 T細胞の活性化の抑

制は完全にはLAG-3を介したMHC-IIのトロゴサイトーシスを抑制できない可能性が示唆された。

本研究によって、LAG-3 発現 T 細胞による CD4 T 細胞の間接的な活性化抑制という LAG-3 を介した新たな免疫抑制機構を明らかにすることができた。また、これらの成果は抗 LAG-3 抗体が CD8 T 細胞を直接的に活性化するだけでなく、CD4 T 細胞を活性化させることで間接的に活性化させることでがんの排除に寄与している可能性を示唆し、抗 LAG-3 抗体による免疫賦活化機構の理解に繋がるだろう。

< 引用文献 >

1. Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, Dustin ML, Saito T. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol*, vol.6, 1253-62 (2005)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takehara Tomohiro, Wakamatsu Ei, Machiyama Hiroaki, Nishi Wataru, Emoto Katsura, Azuma Miyuki, Soejima Kenzo, Fukunaga Koichi, Yokosuka Tadashi	4. 巻 4
2. 論文標題 PD-L2 suppresses T cell signaling via coinhibitory microcluster formation and SHP2 phosphatase recruitment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02111-3	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ei Wakamatsu, Hiroaki Machiyama, Hiroko Toyota, Masae Furuhashi, Hitoshi Nishijima, Arata Takeuchi, Tadashi Yokosuka
2. 発表標題 LAG-3-mediated trogocytosis of MHC class II indirectly regulates CD4+ T cell activation
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松英、町山裕亮、豊田博子、古畑昌枝、西嶋仁、竹内新、横須賀忠
2. 発表標題 LAG-3発現CD8+ T細胞は抗原提示細胞からMHC class IIをトロゴサイトーシスすることでCD4+ T細胞の活性化を間接的に抑制する
3. 学会等名 がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松英、町山裕亮、豊田博子、古畑昌枝、西嶋仁、竹内新、横須賀忠
2. 発表標題 LAG-3発現CD4+ T細胞はMHC class IIのトロゴサイトーシスを介して間接的にCD4+ T細胞の活性化を抑制する
3. 学会等名 Kyoto T cell conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松英、町山裕亮、豊田博子、古畑昌枝、西嶋仁、竹内新、横須賀忠
2. 発表標題 LAG-3発現T細胞は抗原提示細胞からMHC class IIをトロゴサイトーシスすることでCD4+ T細胞の活性化を間接的に抑制する
3. 学会等名 サイトカインインターフェロン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wakamatsu Ei, Machiyama Hiroaki, Toyota Hiroko, Furuhashi Masae, Hata Kikumi, Yanase Noriko, Yokosuka Tadashi
2. 発表標題 Indirect suppression of CD4+ T cell activation by LAG3-mediated trogocytosis of MHC Class II.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------