

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06526

研究課題名（和文）シスPD-L1/CD80結合が自己免疫応答に与える影響の解明

研究課題名（英文）Analysis of cis-PD-L1/CD80 interaction in autoimmune diseases

研究代表者

杉浦 大祐（Sugiura, Daisuke）

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：80743963

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）：抑制性免疫補助受容体PD-1の機能阻害により抗腫瘍免疫応答を高めるがん免疫療法が臨床的に成功を収め、大きな注目を集めている一方、PD-1の機能誘導により自己免疫疾患を治療する方法の開発は進んでいない。本研究は、PD-1の機能制限メカニズムに着目し、PD-1の機能制限を解除することで、PD-1の機能を誘導する新しい手法を開発した。この方法により、PD-1の機能誘導を介して自己反応性T細胞を抑制し、様々な自己免疫疾患の治療に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、自己免疫疾患の治療法は大きく進歩しているものの、治療効果は限定的であり、より効果の高い治療法の研究開発が求められている。本研究で報告したPD-1機能作動性CD80抗体による治療法は、既存の治療法とは作用点が全く異なり、複数のモデルマウスにおいて高い治療効果を示したことから、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：While cancer immunotherapy targeting immune inhibitory co-receptor PD-1 has achieved great clinical success and attracted considerable attention, the development of methods to treat autoimmune diseases by inducing PD-1 function has not progressed. In this study, we focused on the functional restriction mechanism of PD-1 and developed a novel method to potentiate PD-1 function by removing restriction of PD-1. This method successfully alleviated various autoimmune diseases by suppressing autoreactive T cells through induction of PD-1 function.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫補助受容体 PD-1 T細胞

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 獲得免疫応答において主要な役割を果たす T 細胞の活性化は、細胞表面に発現する T 細胞受容体 (TCR) による刺激に加え、様々な興奮性もしくは抑制性の補助受容体を介した刺激によって厳密に制御されている。抑制性免疫補助受容体 PD-1 は T 細胞の活性化に伴い発現誘導される I 型膜タンパク質で、様々な種類の細胞表面に発現する PD-L1 もしくは PD-L2 といういずれかのリガンドに結合することが知られている。リガンドと結合した PD-1 は TCR 近傍にリクルートされた後、細胞内領域にあるチロシン残基がリン酸化を受け、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、SHP-2 を介して TCR シグナルを抑制する。近年、PD-1 機能阻害により抗腫瘍免疫応答を高めるがん免疫療法が臨床的に成功を収め、大きな注目を集めている。一方で、PD-1 による抑制機能を誘導・増強する手法が開発できれば、自己反応性 T 細胞を抑制することが可能となり、自己免疫疾患の治療に応用できると期待されているが、PD-1 機能誘導法の開発は途上段階にあった。

(2) 我々は、CD28 および CTLA-4 のリガンドとして知られる CD80 が、抗原提示細胞上で PD-1 のリガンドである PD-L1 とシス結合すること、CD80 が PD-L1 にシス結合すると PD-1 が PD-L1 に結合できなくなることで、その結果 PD-1 による抑制が回避され、T 細胞が適切に活性化されることを見出した。また CD80 と PD-L1 がシス結合できない遺伝子改変マウスでは、ワクチンに対する免疫応答が減弱し、自己免疫疾患の症状が軽減していた。以上から、T 細胞が抗原提示細胞に活性化される段階においては、CD80 が興奮性補助受容体 CD28 を活性化する一方で、PD-L1 とシス結合することにより PD-1 による抑制シグナルを制限し、強く免疫応答を誘導することができるという巧妙なメカニズムが解明された。

2. 研究の目的

PD-1 機能誘導法の開発が進んでいない原因として、上記の PD-1 による複雑な抑制機構を再現することのできるアゴニスト抗体を作成することが困難であることが考えられた。そこでシス PD-L1-CD80 結合が PD-1-PD-L1 結合を阻害することで PD-1 の機能を制限することに着目し、この PD-1 機能制限を解除することができれば PD-1 の機能誘導を介した画期的な自己免疫疾患治療法になるのではないかと考えた。以上から、シス PD-L1-CD80 結合を阻害することのできる CD80 抗体を作製し、自己免疫疾患治療への応用することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) シス PD-L1-CD80 結合を阻害する抗体の作製

ヒトもしくはマウス CD80 リコンビナントタンパク質をマウスに免疫した後、リンパ節細胞をミエローム細胞と融合させることで、抗 CD80 抗体産生ハイブリドーマを作製し、シス PD-L1-CD80 結合を阻害することのできる抗体をスクリーニングした。抗原提示細胞上に PD-L1 と CD80 が同時に発現し、シス結合していると PD-L1 は PD-1 と結合できなくなることを利用し、CD80 存在下で PD-1 と PD-L1 の結合促進作用を有する抗 CD80 抗体をフローサイトメトリーでスクリーニングした。

(2) シス PD-L1-CD80 結合阻害抗体による PD-1 依存的な *in vitro* T 細胞の活性化抑制

新しく得られた CD80 抗体が実際に PD-1 の機能を促進させ、T 細胞の活性化を抑制することができるかを検討するために、*in vitro* T 細胞刺激実験を用いた。D011.10 T ハイブリドーマ細胞は、OVA ペプチド存在化で抗原提示細胞と共培養すると、活性化し IL-2 を産生する。D011.10 T ハイブリドーマ細胞は内在性に PD-1 を発現しているため、PD-L1 発現抗原提示細胞で刺激されると、PD-1 により活性化が抑制され IL-2 の産生が低下するが、PD-L1-CD80 発現抗原提示細胞ではシス PD-L1-CD80 結合により PD-1 の機能が制限され、T 細胞は強く活性化される。この実験系に精製 CD80 抗体を添加し、PD-1 を介した T 細胞抑制が誘導されるかどうか検討を行った。

(3) CD80 抗体投与によるマウス T 細胞の活性化抑制

シス結合阻害 CD80 抗体が生体内で機能するか評価するため、蛍光ラベルされたモデル抗原 OVA タンパク質をマウスに免疫し、同時に CD80 抗体を腹腔内に投与した。24 時間後に所属リンパ節細胞を解析し、OVA タンパク質を取り込んだ樹状細胞の活性化状態、シス PD-L1-CD80 結合をフローサイトメトリーにて評価した。さらに、抗体投与による T 細胞の活性化抑制を評価するために、アジュバントと混合した OVA を免疫したマウスに CD80 抗体を腹腔内投与した。1 週間後に、リンパ節内の OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の数を OVA テトラマーで染色し評価した。また、リンパ節細胞を OVA ペプチドで再刺激することで産生される IL-2 や IFN-g を ELISA にて測定し、T 細胞の活性化を評価した。

(4) CD80 抗体による自己免疫疾患の治療

シス結合阻害 CD80 抗体を様々な自己免疫疾患モデルマウスに投与し、治療効果を検討した。ヒト GPI ペプチドをマウスに免疫するモデル、および SKG マウスに Zymosan を投与して誘導される 2 種類の関節リウマチのマウスモデルにおいて効果を検討した。また、作用点の異なるリウマチ治療薬である CTLA-4-Ig との併用効果についても検討した。さらに、ヒトの多発性硬化症およびシェーグレン症候群に類似した症状を発症する疾患モデルマウスにおいても効果を検討した。

4. 研究成果

(1)シス PD-L1-CD80 結合を阻害する抗体の作製

約 3000 クローンの高ブリドーマ細胞の中から、シス PD-L1-CD80 結合を阻害する抗マウス CD80 抗体である TKMG48 と名付けたクローンを得ることに成功した。また、同様にヒト PD-L1-CD80 結合を阻害する抗ヒト CD80 抗体、TKMF5 も得られた。フローサイトメトリーによる解析により TKMG48、TKMF5 はともに、濃度依存的にシス PD-L1-CD80 結合を阻害し、PD-L1-PD-1 結合を促進すること、CD28-CD80 および CTLA-4-CD80 結合にはほとんど影響を与えず、PD-L1-CD80 結合のみを阻害する抗体であることが明らかになった。

(2)シス PD-L1-CD80 結合阻害抗体による PD-1 依存的な T 細胞の活性化抑制

in vitro T 細胞刺激実験系に TKMG48 を添加すると、抗原提示細胞上に PD-L1-CD80 の両方が発現していても T 細胞の活性化が抗体の濃度依存的に抑制されていた。また、この抑制は PD-L1 を発現していない抗原提示細胞や、PD-1 欠損 T 細胞を用いた場合には全く認められなかったことから、TKMG48 は、シス PD-L1-CD80 結合を阻害し、PD-L1-PD-1 結合を促進することで T 細胞の活性化を抑制していることが明らかになった。同様に TKMF5 はヒト PD-L1-CD80 結合を阻害し、ヒト PD-1 の機能を誘導することができることも確認された。

(3)CD80 抗体投与によるマウス T 細胞の活性化抑制

マウスに蛍光ラベル OVA と TKMG48 を投与すると、抗原を取り込んだ樹状細胞上で、シス PD-L1-CD80 結合が阻害され、PD-L1-PD-1 結合が促進されていることをフローサイトメトリーにて確認した。一方で樹状細胞の数、抗原の取り込み、活性化の程度は TKMG48 投与による影響は受けていなかった。さらに、マウスを OVA で免疫することにより誘導される OVA 特異的 T 細胞の増殖およびサイトカインの産生は、マウスに TKMG48 を投与することにより強く抑制されていた。以上から、PD-L1-CD80 結合を阻害する CD80 抗体は、マウス生体内で抗原提示細胞に作用し、PD-L1-PD-1 結合を促進することで抗原特異的な T 細胞応答を抑制できることが明らかになった。

(4)CD80 抗体による自己免疫疾患の治療

2 種類の関節リウマチのマウスモデルにおいて TKMG48 の投与効果を検討したところ、いずれのモデルでも T 細胞の活性化が抑制され、関節の腫れと炎症が大幅に軽減された。病態発症前から抗体投与を開始することで得られる予防的効果だけでなく、病態が進行した状態から抗体投与を開始しても治療効果が認められた。また、TKMG48 と CTLA-4-Ig を併用すると、相乗効果が確認できたため、TKMG48 と CTLA-4-Ig は作用点異なることが確認された。PD-1 の機能制限機構を標的とした薬剤は、今回開発した治療法以外には存在しないことから、TKMG48 は他の既存薬と併用して使用することによる相乗効果も期待できる。さらに、ヒトの多発性硬化症およびシェーグレン症候群に類似した症状を発症する疾患モデルマウスにおいても、TKMG48 の投与により症状の軽減が認められた。PD-L1 や PD-1 に対する阻害抗体を同時に投与した場合、あるいは PD-L1 ノックアウトマウスを使用した場合には TKMG48 の治療効果が認められなくなったことから、TKMG48 は PD-L1-PD-1 結合を介して機能していることが確認された。これらの実験結果から、自己反応性 T 細胞が病態の原因となる自己免疫疾患において TKMG48 による治療の有用性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Shimizu Kenji, Maeda Takeo K., Ikubo Jun, Yoshikawa Harunori, Maenaka Katsumi, Ishimaru Naozumi, Kosako Hidetaka, Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 55
2. 論文標題 Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 912 ~ 924.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2022.03.013	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 -

1. 著者名 Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maeda Takeo K., Maruhashi Takumi, Shimizu Kenji, Arakaki Rieko, Takemoto Tatsuya, Ishimaru Naozumi, Okazaki Taku	4. 巻 23
2. 論文標題 PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 399 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-01125-7	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 -

1. 著者名 Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Maruhashi Takumi, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 33
2. 論文標題 T-cell-intrinsic and -extrinsic regulation of PD-1 function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 693 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab077	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 -

1. 著者名 Shimizu Kenji, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maruhashi Takumi, Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 118
2. 論文標題 PD-1 preferentially inhibits the activation of low-affinity T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2107141118	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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Sugiura
2. 発表標題 Regulation of T cell activation by cis-PD-L1-CD80 interactions
3. 学会等名 第52回 日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Takumi Maruhashi, Kenji Shimizu, Taku Okazaki
2. 発表標題 Regulation of T cell activation by cis-PD-L1-CD80 interactions
3. 学会等名 The RIKEN-IMS International Symposium on Immunology 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Takumi Maruhashi, Kenji Shimizu, Naozumi Ishimaru, Taku Okazaki
2. 発表標題 PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sugiura Daisuke, Okazaki Il-mi, Maruhashi Takumi, Shimizu Kenji, Arakaki Rieko, Ishimaru Naozumi, Okazaki Taku
2. 発表標題 PD-1 elicitation by the dissociation of cis-PD-L1/CD80 duplex inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------