

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06943

研究課題名（和文）免疫受容体CD96による T細胞の活性化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of gdT cell activation by immunoreceptor CD96

研究代表者

林 杏子（大岡杏子）（Kyoko, Hayashi）

筑波大学・革新的創薬開発研究センター・研究員

研究者番号：50569019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：CD96は、リンパ球系細胞に発現し、活性化を制御する免疫受容体である。CD96は、T細胞にも発現しているが、T細胞上のCD96の機能は不明であった。我々は、野生型、またはCD96欠損T細胞をRag1欠損マウスの皮膚に移入後、乾癬を誘導すると、CD96欠損T細胞を移入したマウスの病態が軽度であったこと、また、in vitroの実験系において野生型マウスの皮膚から単離したT細胞をCD3抗体と共にCD96抗体で刺激すると、IL-23刺激によるIL-17の産生量が増加したことからT細胞上のCD96は活性化受容体として機能していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は慢性炎症性皮膚疾患であり、T細胞から産生されるIL-17Aが、病態の悪化に強く関与することが知られている。我々は、免疫受容体CD96がT細胞上に発現しており、T細胞の活性化受容体として機能していることを明らかにした。抗CD96中和抗体を投与したマウスでは、コントロール抗体を投与したマウスと比較して、真皮T細胞からのIL-17A産生が減少し、IMQ誘発皮膚炎が軽快した。つまり、CD96が乾癬治療のための潜在的な分子標的となりうることを見出した点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：CD96 is an immunoreceptor which functions as an activating or inhibitory receptor is controversial, although it is reported to be expressed on lymphoid cells and to regulate their activation. However, the function of CD96 on T cells has not been clarified. We induced psoriasis in Rag1-deficient mice by transferring wild-type or CD96-deficient T cells into their skin and showed that the disease was milder in mice with CD96-deficient T cells. In addition, stimulation of T cells isolated from the skin of wild-type mice with CD3 and CD96 antibodies in vitro experimental system enhanced IL-17 production upon IL-23 stimulation. These results indicate that CD96 on T cells functions as an activation receptor.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 免疫受容体 抗体医療 乾癬

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫受容体 CD96 は、NK 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞に高発現する免疫受容体である。研究開始当初、腫瘍モデルマウスを用いた研究から、CD96 は NK 細胞の活性を抑制するチェックポイント受容体として注目を集めていた (Chan CJ. et. al., *Nat. Immunol.* 2014)。CD96 は、NK 細胞と同様、 $\gamma\delta$ T 細胞にも高発現しているが、 $\gamma\delta$ T 細胞における CD96 に関する報告は全くない。我々は、これを明らかにするために、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化が病態の誘導、増悪に強く関与する事が報告されている乾癬モデルマウスを用いて、WT マウスと CD96 欠損マウスの背部の皮膚に、イミキモド (IMQ) を連日塗布し乾癬を誘導したところ、CD96 欠損マウスでは、紅斑や鱗屑、皮膚の肥厚などの乾癬の重症度を表すスコアが、WT マウスと比較して顕著に低かった。IMQ 塗布によって活性化された樹状細胞から産生される IL-23 が、IL-23 受容体を介して $\gamma\delta$ T 細胞を活性化させ、IL-17 を産生させる。樹状細胞からの IL-23 産生量や $\gamma\delta$ T 細胞上の IL-23 受容体の発現量は WT マウスと CD96 欠損マウスで同レベルだったが、IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の数や $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17 産生量が、WT マウスと比較して CD96 欠損マウスで顕著に少なかった。以上の結果から、マウス $\gamma\delta$ T 細胞において、CD96 は、活性化受容体として機能する事が示された。この予備的実験結果は、CD96 が乾癬治療の標的となりうる可能性を示唆するものである。治療開発を目指す上で詳細なシグナル伝達経路を明らかにする事は、基礎的、臨床的に極めて重要な意義を持つため、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

ヒト、マウスの $\gamma\delta$ T 細胞を用いた CD96 のシグナル伝達経路の解明を行い、CD96 を標的とした乾癬治療の基盤開発を行う。

3. 研究の方法

(1) $\gamma\delta$ 細胞上の CD96 が乾癬の悪化に寄与しているかどうかの確認。

背景に示したように、乾癬誘導時、野生型マウスと比べて CD96 欠損マウスで病態が減弱したが、この表現系は、 $\gamma\delta$ T 細胞上の CD96 が関与していることを確認した。具体的には、野生型、または CD96 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞を Rag1 欠損マウスの皮膚に移入し、乾癬を誘導した。

(2) マウス $\gamma\delta$ T 細胞における CD96 の活性化シグナル伝達経路の解明。

WT マウスの脾臓から単離した $\gamma\delta$ T 細胞を *in vitro* で CD3 抗体、CD96 抗体、IL-23 で刺激し、活性化マーカー分子の発現や IL-17 の産生量の解析を行った。

(3) ヒト $\gamma\delta$ T 細胞における CD96 の活性化シグナル伝達経路の解明。

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 中の $\gamma\delta$ T 細胞も、CD96 を発現しているため、マウスと同様、活性化受容体として機能しているか確認した。健常者の PBMC から単離した $\gamma\delta$ T 細胞を *in vitro* で CD3 抗体、CD96 抗体、IL-23 で刺激し、活性化マーカー分子の発現や IL-17 の産生量の解析を行った。

(4) 抗 CD96 中和抗体を用いた乾癬モデルマウスに対する予防、治療効果の検討。

マウス個体に投与可能な CD96 中和抗体はないため、マウス CD96 の Fc 融合タンパク質を CD96 欠損マウスに免疫する事で、複数の抗 CD96 抗体を作製した。これらの中からリガンドである CD155 との結合を阻害できる抗体のスクリーニングを行った。スクリーニングによって得た抗 CD96 中和抗体を、乾癬の誘導前、あるいは誘導後に投与し、病態の解析を行い、予防、治療効果の解析を行ない、既存薬である IL-17 抗体投与群との比較を行った。また、IL-17 抗体と CD96

抗体を同時投与する事で、相乗的治療効果が見られるか検討した。

4. 研究成果

(1) $\gamma\delta$ 細胞上の CD96 が乾癬の悪化に寄与した。

野生型、または CD96 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞を脾臓から単離し、Rag1 欠損マウスの皮膚に移入し、乾癬を誘導したところ、CD96 欠損 $\gamma\delta$ T 細胞を移入したマウスの病態が軽度であった (Fig.1)。

(2) マウス $\gamma\delta$ T 細胞で、CD96 は、co-stimulatory 分子として機能していることがわかった。

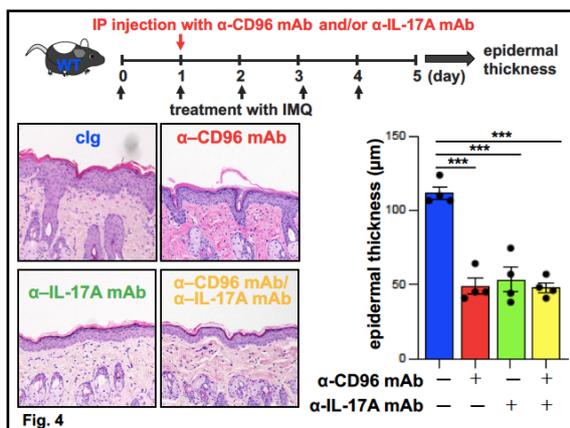
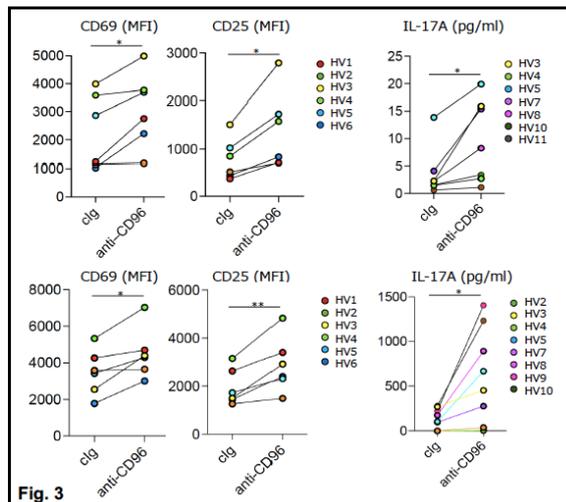
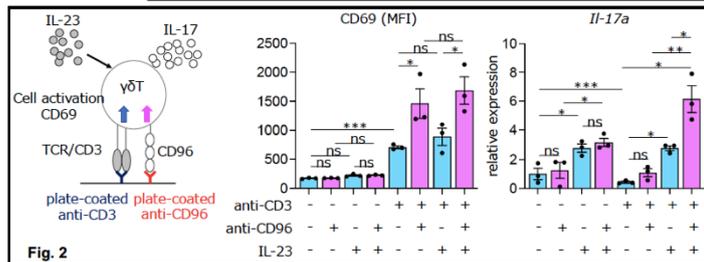
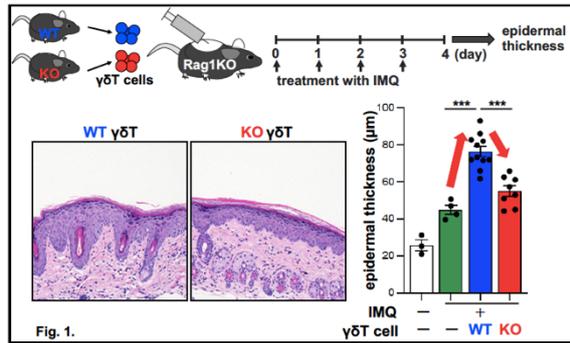
WT マウスの脾臓から単離した $\gamma\delta$ T 細胞を *in vitro* で CD3 抗体と共に CD96 抗体で刺激すると、活性化マーカー分子である CD69 の発現が上昇し、さらに、IL-23 刺激によって IL-17 の産生量が増加した (Fig.2)。

(3) ヒト $\gamma\delta$ T 細胞で、CD96 は、co-stimulatory 分子として機能していることがわかった。

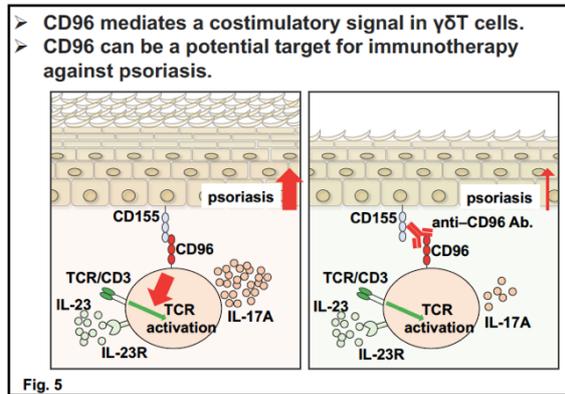
健常者 PBMC から単離した $\gamma\delta$ T 細胞を *in vitro* で CD3 抗体と共に CD96 抗体で刺激すると、活性化マーカー分子である CD69 の発現が上昇し、さらに、IL-23 刺激によって IL-17 の産生量が増加した (Fig.3)。

(4) 抗 CD96 中和抗体は、乾癬モデルマウスの IL-17 産生を抑制する事で、予防、治療効果が見られた。

抗 CD96 中和抗体を、乾癬の誘導前、あるいは誘導後に投与し、病態の解析を行い、予防、治療効果が見られるか解析したところ、乾癬が顕著に抑制された。また、この抑制は、既存薬である IL-17 抗体投与群、IL-17 抗体と CD96 抗体の同時投与群でほぼ変わらなかった (Fig.4)。この事は、CD96 抗体が IL-17 産生を抑制している事を示唆している。



これらの結果から、 $\gamma\delta$ T 細胞上の CD96 は活性化受容体として機能し、乾癬病態を増悪しており、乾癬治療の標的となりうる事が明らかとなった (Fig.5)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oh-oka Kyoko, Abe Fumie, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 209
2. 論文標題 CD96 Blockade Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis via Suppression of IL-17A Production by Dermal T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2313 ~ 2321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200502	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 Yumi Yamashita-Kanemaru, Kyoko Oh-Oka, Fumie Abe, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya	4. 巻 40
2. 論文標題 Suppression of Th1 and Th17 Proinflammatory Cytokines and Upregulation of FOXP3 Expression by a Humanized Anti-DNAM-1 Monoclonal Antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2020.0042.	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 Oh-oka K, Shibuya A, Shibuya K
2. 発表標題 CD96 blockade ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via suppression of IL-17A production by dermal T cells
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 Oh-oka K, Shibuya A, Shibuya K
2. 発表標題 CD96 mediates a costimulatory signal in dermal T cells and exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis.
3. 学会等名 第86回 日本インターフェロン、サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大岡 杏子、渋谷 彰、渋谷 和子
2. 発表標題 乾癬における免疫受容体CD96の作用機序の解析。
3. 学会等名 第9回 筑波大・理科大合同リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kyoko Oh-oka;Akira Shibuya;Kazuko Shibuya
2. 発表標題 Involvement of CD96 immunoreceptor on dermal gdT cells in the development of imiquimod-induced psoriasis
3. 学会等名 The 50th Annual meeting of the Japanese society for immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岡 杏子、渋谷 彰、渋谷 和子
2. 発表標題 乾癬における免疫受容体CD96の作用機序の解析
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://immuno-tsukuba.com 筑波大学 免疫学研究室 http://immuno-tsukuba.com

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
---------	---------