

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07185

研究課題名（和文）MHCIIとCD8+T細胞による免疫チェックポイント機構の解明

研究課題名（英文）Immune checkpoint pathways function between MHC class II and CD8+ T cells

研究代表者

宮武 昌一郎（MIYATAKE, Shoichiro）

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：30239420

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）：T細胞で重要な転写因子GATA3にZnフィンガーの欠失という変異を導入することで、皮膚炎を発症する疾患モデルを樹立した。GATA3変異により、癌や感染症での慢性炎症において見られるResident memory T cell（TRM）が誘導されやすいことが皮膚炎の原因と考えられた。MHC class IIによる免疫チェックポイント機構が、CD8+T細胞による皮膚炎の抑制に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイントは、自己免疫性疾患、癌、感染症などの慢性炎症における免疫応答の抑制に重要であり、免疫チェックポイントを制御することは、これらの疾患の治療につながる。疾患モデルを樹立し、CD8+T細胞に対するMHC class IIによる抑制という新たな免疫チェックポイント機構を明らかにした。MHC class IIを標的とした免疫チェックポイント制御法の開発に有用である。

研究成果の概要（英文）：Novel dermatitis model was established by the T cell specific expression of transcription factor GATA3 mutant. The mutant GATA3 induces Resident memory T cells (TRM), leading to the pathogenesis of dermatitis. Immune check point mechanism of MHC class II is important to suppress dermatitis induction by CD8+ T cells.

研究分野：免疫学、T細胞の関与する免疫疾患の発症機序や抑制機構

キーワード：GATA3 皮膚炎 免疫チェックポイント CTL 転写因子 カルシポトリオール

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1、研究開始当初の背景

T細胞の分化や機能に重要な転写因子の一つ、GATA3をT細胞やリンパ球特異的に欠失するマウスは複数の研究室で樹立され、CD4+T細胞分化に重要であること、Th2サブセットの分化に重要であること、自然リンパ球の分化にも重要であることなどが報告された。GATA3の持つ2個のZnフィンガードメインの両方をT細胞やリンパ球特異的に欠失したマウスである。一方、DNA結合に必須のZnフィンガーである、C末側のZnフィンガーのみをT細胞特異的に欠失したマウスを樹立したところ、これまでの2個のZnフィンガーを欠失したマウスと共通に見られる表現型に加えて、炎症性疾患の発症など、新たな表現型が見られた。本研究では、この新たなGATA3欠失マウスと既存のGATA3欠失マウスを比較解析することで、複数の研究テーマの解明を目指す。これらの研究テーマに関して、背景となる研究状況を以下に列挙する。GATA3の2個のZnフィンガーの両方を欠失するマウスを $\Delta 2$ GATA3、C末のZnフィンガー1個を欠失するマウスを $\Delta 1$ GATA3と表記する。

(1) $\Delta 2$ GATA3マウスは低頻度で腸炎などの炎症を起こすが、多くは正常である。それに対して $\Delta 1$ GATA3マウスは、高頻度に皮膚炎を発症する。 $\Delta 2$ GATA3マウスでは、T細胞活性化の低下、感染症モデルに対する免疫応答の低下など、免疫不全を示す。一方、 $\Delta 1$ GATA3マウスは炎症性疾患を発症することから、明らかにT細胞特異的なGATA3欠失のストラテジーの差異が、T細胞に異なる影響をもたらしていると考えられ、新たなT細胞が原因となる炎症性疾患モデルと考えられる。

(2) $\Delta 1$ GATA3マウスは、高頻度に皮膚炎を発症する。低頻度に腸炎が見られるが、他の臓器や組織の炎症はほとんど見られない。T細胞のGATA3欠失が原因であることから、炎症の場が皮膚になることは興味深い。T細胞悪性リンパ腫（菌状息肉症／セザリ－症候群、成人T細胞白血病など）の多くが皮膚行性を示すことが知られており、T細胞と皮膚の関係は重要な研究分野であるが、未知な点が多い。

(3) T細胞を中心に、免疫細胞が発現する抑制性受容体が多数、同定され、免疫チェックポイント機構として認識されている。CTLA4（CD154）およびPD1（CD279）からの抑制シグナルを阻止するブロッキング抗体が、癌免疫を強化、癌に対する治療効果が見られ、癌に対する免疫療法の一つとして確立された。さらにLAG3、TIGIT、TIM3などに対するブロッキング抗体が、癌に対する抑制効果があるか、治験が行われている。LAG3は、MHC class IIと結合することが知られている。またLAG3に抑制シグナルを与える分子として、Galectin3、LSECtin、Fibrinogen-like protein1（FGL1）が報告されている。免疫チェックポイント機構に属する分子は多数、存在するが、全体として免疫応答をどのように制御しているのか、その全体像は未知な点が多い。MHC class IIはCD4+T細胞に対して抗原提示を行う分子であり、それがLAG3を介して免疫細胞の機能抑制を担うことは、全く異なる機能と考えられる。正常な、あるいは病的な免疫応答において、MHC class IIの異なる二つの機能が、どのように制御されているのかは未知な点が多い。

2、研究の目的

(1) 変異GATA3による皮膚炎の発症機序の解明

GATA3 の Zn フィンガーを 2 個欠失させた場合 ($\Delta 2$ GATA3) と 1 個欠失させた場合 ($\Delta 1$ GATA3) において、どちらの欠失変異も GATA3 タンパク質を不安定にし、分解を促進し発現が失われる可能性が考えられたが、 $\Delta 1$ GATA3 と $\Delta 2$ GATA3 で表現型が異なることから、GATA3 の発現が消失するとは考えにくく、実際、Zn フィンガーが欠失した変異 GATA3 タンパク質が、正常な GATA3 タンパク質と同程度発現していることが確認された。 $\Delta 1$ GATA3 マウスと $\Delta 2$ GATA3 マウスで共通に見られる表現型として、CD4+T 細胞の分化抑制がある。CD4+T 細胞数が大きく減少しており、 $\Delta 2$ GATA3 マウスでの免疫不全の重要な原因の一つであることが報告されている。一方、CD8+T 細胞数は、正常マウスと同等であり、CD4+T 細胞数の減少が、炎症性疾患発症に関与するのか、あるいは、CD8+T 細胞が、制御性 T 細胞も含めた CD4+T 細胞による制御から解放されたことが、炎症性疾患の発症に結びつくのか明らかにする。

また、 $\Delta 1$ GATA3 のみ皮膚炎を発症するという表現型の差異は、変異 GATA3 タンパク質の機能の差異によると考えられる。T 細胞において 2 種類の変異 GATA3 タンパク質が、正常な GATA3 タンパク質と転写因子としての機能がどのように異なるのか、その差異が、T 細胞の機能にどのような影響をもたらすのか、そして、それが、なぜ炎症性疾患の発症に結びつくのか、このような解析により、T 細胞が原因となる炎症性疾患の病態機序を明らかにする。

炎症の場が皮膚を中心としていること、すなわち皮膚行性に関しても、変異 GATA3 のケモカイン受容体発現に対する影響などを中心に、炎症を起こすと考えられる T 細胞が皮膚組織に誘引される機序を検討する。

(2) MHC class II による免疫チェックポイント機構の解明

$\Delta 1$ GATA3 マウスにおいて、MHC class II を欠失させると、皮膚炎の重症化が認められた。MHC class II 欠失マウスでは、CD4+T 細胞の胸腺における分化が抑制され、CD4+T 細胞数が強く減弱する。したがって Treg の細胞数も大きく低下するが、炎症性疾患を発症することはほとんどない。ヘルパー T 細胞の減少により CD8+T 細胞の活性化が起こりにくくなっているということも考えられる。一方、MHC class II が LAG3 を介して T 細胞を含む免疫細胞を抑制することが、炎症性疾患発症の抑制に重要であることを示している。 $\Delta 1$ GATA3 マウスにおいて MHC class II を欠失させると、CD4+T 細胞はほぼ消失する。したがって、MHC class II が CD8+T 細胞の LAG3 を介して抑制している可能性が考えられる。CD4+T 細胞に対する抗原提示が MHC class II の重要な機能であるが、それに対して、LAG3 への結合を介する抑制作用の免疫応答における重要性や詳細な機序を明らかにする。

3、研究の方法

(1) 変異 GATA3 による皮膚炎の発症機序の解明

皮膚炎の原因となる細胞群を同定するために、 $\Delta 1$ GATA3 マウスから、T 細胞を分離し、Rag 欠失マウスあるいは T 細胞欠失マウスに移入し、皮膚炎が誘導できるか解析する。また、 $\Delta 1$ GATA3 マウスから、CD8+T 細胞や CD4+T 細胞を抗体を用いて除去し、皮膚炎の発症を解析する。

$\Delta 1$ GATA3 マウスでは、皮膚炎を高頻度で発症するが、発症時期や症状の強さなど個体差が大きい。そこで疾患モデルを利用し、炎症を惹起し、免疫応答の差異を解析し、 $\Delta 1$ GATA3 マウスや $\Delta 2$ GATA3 マウスの T 細胞や他の免疫細胞の特徴を解析する。疾患モデルとして、皮膚炎モデルを検討した。抗原で感作するモデルや、薬剤の塗布により炎症を誘導するモデルなど多数あり、検

討した結果、ビタミンD誘導体であるカルシポトリオール (MC903) 塗布による皮膚炎モデルを採用した。カルシポトリオールはケラチノサイトの TSLP 産生を誘導し、ILC2 や好酸球の遊走などの誘導を介して、アトピー性皮膚炎に類似した炎症を惹起する。この皮膚炎モデルで、正常マウス、 $\Delta 1GATA3$ マウス、 $\Delta 2GATA3$ マウスでの炎症の起こり方を比較する。

(2) MHC class II による免疫チェックポイント機構の解明

皮膚炎を発症する $\Delta 1GATA3$ マウスの MHC class II を欠失することにより、皮膚炎が重症化した。免疫チェックポイント機構の一つである LAG3 の関与も含め、MHC class II 欠失の重症化のメカニズムを解明するために、皮膚炎を発症しない $\Delta 2GATA3$ マウスの MHC class II を欠失させ表現型を解析する。LAG3 欠失の導入、あるいは MHC class II/LAG3 ブロッキング抗体の投与により、MHC class II 欠失と同様の皮膚炎の重症化が見られるか検討する。皮膚炎の発症や重症化に Treg が関与するか検討するために、CD4+T 細胞の抗体による除去による影響を検討する。LAG3 を含む、免疫チェックポイント機構に含まれる分子群の発現を解析する。

4、研究成果

(1) 変異 GATA3 による皮膚炎の発症機序の解明

$\Delta 1GATA3$ マウスの T 細胞、あるいは CD8+T 細胞を Rag 欠失マウスに移入したが、皮膚炎の発症は認められず、細胞移入実験によっては、皮膚炎の原因となる細胞群として T 細胞あるいは CD8+T 細胞を同定することはできなかった。

カルシポトリオールを皮膚に投与すると、ケラチノサイトが TSLP を産生し、それが ILC2 や好酸球の遊走を誘導、type2 の炎症を誘導する。 $\Delta 1GATA3$ マウスの皮膚にカルシポトリオールを投与すると、正常マウスより強い炎症が起こる。また、カルシポトリオールの投与を継続すると、正常マウスでは、炎症が増強されていくが、 $\Delta 1GATA3$ マウスでは2週間ほどで炎症の増強が停止することが認められた。 $\Delta 1GATA3$ マウスでは、ケラチノサイトからの TSLP 産生は誘導されるが、ILC2 や好酸球の遊走は抑制されており、CD8+T 細胞の増大が認められる。皮膚組織の発現解析 (RNA-seq) から、転写因子 HOBIT や Eomes の発現が亢進していること、細胞表面抗原である CD69 や CD49a の発現が亢進していること、サイトカイン IFN γ や細胞障害性細胞が発現するグランザイムが亢進していることから、CD8+ Resident memory T cell (TRM) の増大が考えられた。さらに PD1、LAG3、ICOS、Tim3、TIGIT、CTLA4、BTLA といった免疫チェックポイント分子群の発現亢進が見られ、T 細胞の exhaustion が認められた。このような CD8+T 細胞による炎症は、TSLP により誘導される type2 の炎症を抑制すると考えられる。またケモカイン受容体である Cxcr3 や Pセレクチンリガンドである CLA (SELPLG) の発現が亢進しており、皮膚行性を説明できる。皮膚炎を起こさない $\Delta 2GATA3$ マウスの T 細胞では、これらの遺伝子発現の変化が認められるのかは、まだ解析できていない。Zn フィンガーの欠失という GATA3 の変異が、これらの遺伝子発現の変化に直接関与しているのか、解析する必要がある。

(2) MHC class II による免疫チェックポイント機構の解明

$\Delta 1GATA3$ マウスに MHC class II 欠失を導入することで皮膚炎が重症化したことが、Treg を含む CD4+T 細胞の減少によるのか、 $\Delta 1GATA3$ マウスに抗 CD4 抗体を投与し、CD4+T 細胞の除去を行なったが、皮膚炎の悪化は認められず、Treg の関与は否定された。

皮膚炎を発症しない $\Delta 2GATA3$ マウスに、MHC class II 欠失を導入すると、重症の皮膚炎を発症

し、 $\Delta 1$ GATA3 マウスとほぼ同様の結果となった。これは、 $\Delta 2$ GATA3 マウスにおいても、MHC class II が関与する免疫チェックポイントによる抑制が取り除かれると皮膚炎を発症することを示している。 $\Delta 2$ GATA3 マウスで皮膚炎が見られないことが、 $\Delta 2$ GATA3 による T 細胞への影響が、炎症を起こすのに不十分であるのか、MHC class II による抑制に対する感受性がより高いためか解析する必要がある。

MHC class II が LAG3 を介して T 細胞を抑制しているのかを解析するために LAG3 欠失を導入しようとしたが、LAG3 欠失マウスを入手することができなかった。そこで、LAG3 に対するブロッキング抗体の投与を行なったが、皮膚炎の重症化は見られなかった。これは MHC class II による抑制が、LAG3 以外の分子を介している可能性を示唆する。

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 Iguchi T, Miyauchi E, Watanabe S, Masai H, Miyatake S	4. 巻 501
2. 論文標題 A BTB-ZF protein, ZNF131, is required for early B cell development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 570-575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.044.	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iguchi, T., Masai, H., Miyatake, S.
2. 発表標題 ZNF131, one of BTB ZF protein family members, is required for the early signaling of T cell activation through the MTOC formation and relocation
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 Tomohiro Iguchi, Hisao Masai, Shoichiro Miyatake
2. 発表標題 ZNF131, one of BTB ZF protein family members, is required for proliferation as well as activation of both T and B lymphocytes
3. 学会等名 Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018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
---------	---------