

平成 23 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790465

研究課題名 (和文) PD-1 によって調節される、新規免疫寛容関連遺伝子の解析

研究課題名 (英文) A novel molecule that regulates T-cell tolerance under PD-1.

研究代表者

竹馬 俊介 (CHIKUMA SHUNSUKE) 京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437208

研究成果の概要 (和文)：今までに、Tリンパ球上のPD-1レセプターによって強く抑制されていた、未知のITAG-1遺伝子を見出し、ITAG-1のコンディショナルKOマウスを作製した。この解析から、ITAG-1分子はがん細胞と直接戦うキラーTリンパ球への最終分化を制御する証拠を得ている。本研究の結果は、キラーTリンパ球分化の仕組みを解明し、Tリンパ球がどのように、自己またはがん細胞に対す寛容を起こすかという、重要な疑問に答える第一歩となると考えている。

研究成果の概要 (英文)：ITAG-1 was first identified as a novel molecule that was uniquely suppressed by PD-1 mediated inhibitory signal in T-cells. Analyses using newly generated ITAG-1 knockout mice revealed ITAG-1's role in the terminal development of cytotoxic T-cells. Although, the precise mechanism is still under investigation, current data suggested PD-1 mediated modulation of ITAG-1 expression is involved in T cell activation, differentiation and tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,690,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫寛容、自己免疫、免疫抑制受容体

## 1. 研究開始当初の背景

人類を悩ませる、がんや自己免疫疾患は、Tリンパ球 (T細胞) による免疫を増強、あるいは減弱させることによって克服されることが考えられ、そのためには免疫の中心となるT細胞

の制御機構を、まず理解することが重要である。PD-1は、活性化T細胞の膜に発現し、T細胞を抑制させる信号を伝達する、いわば「スイッチ」の役割を担うことがわかっている。PD-1による抑制信号を受けた

T細胞は、その後機能不全に陥るが、この機能不全がどのように起こるか、については明らかになっていない。

研究代表者は、これまでに行った解析で、CD8陽性T細胞におけるPD-1の機能解析を行うため、体内の100パーセントのT細胞がすべてCD8陽性、かつ単クローンとなっているMHC ClassI 拘束性のTCRトランスジェニックマウス(rag2ノックアウト背景)にPD-1ノックアウトマウスを交配した(以下、2CPD1KOマウス)。このマウスに、2CTCRが認識するエピトープペプチドを腹腔注射することにより、体内のT細胞にアナジーを獲得させる実験系で、2CPD1KOから分離したT細胞はアナジーの誘導に抵抗性であることを見出した。この表現形は、たとえば腫瘍免疫において、PD-1阻害を行うと、不応答になっていたT細胞の再活性化を行うことが出来るという、これまでに提唱されている仮説を端的に表すものであると考えられた。

そこで、アナジー感受性の2CPD-1WT(PD-1遺伝子は野生型)と、アナジー抵抗性の2CPD1KOから分離したT細胞の、網羅的な発現遺伝子比較(マイクロアレイ解析)を行い、PD-1シグナルの存在によって強く抑制されていた、未知のITAG-1遺伝子(Immune-Tolerance Associated Gene-1:仮名)を、2007年に同定した。マイクロアレイ解析の結果だけではなく、T細胞上のPD-1遺伝子を実際に刺激すると、この抑制シグナルによって、ITAG-1遺伝子の発現が強く抑制された。

## 2. 研究の目的

ITAG-1が、PD-1の信号で制御される、機能的遺伝子であるという仮説に基づいてT細胞株への強制発現、およびノックダウン実験を行った。結果、ITAG-1が、T細胞の活性化、分化、ひいては寛容に深く関わっているという証拠を得た。しかしながら多くの細胞が相互反応する免疫系は、典型的な複雑系であり、*in vitro*の実験のみでは、ITAG-1の生理機能を明らかにすることは難しい。よって、本研究では、ITAG-1遺伝子のコンディショナルKOマウスを用いた*in vivo*での解析、およびITAG-1タンパクの生化学的解析を行い、PD-1によって調節されるITAG-1遺伝子をもたらす、T細胞アナジーの本態を究めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) T細胞特異的ITAG-1KOマウスの作出

ITAG-1のデータベース解析より、ITAG-1は、個体初期発生に必要な遺伝子であることが予想された。よって、まず大腸菌由来lox-P配列で、機能ドメインをサンドイッチした、ITAG-1loxマウス(以下、lox)を作出した。研究期間には、このloxマウスを、近親交配して、lox alleleがホモ接合したマウス(lox/lox以下Floxx)、およびこのマウスを大阪大学、竹田教授より提供を受けた、Lck-CREマウスと交配し、T細胞特異的なKOマウス(以下CKO: conditional KO)を作出した。

### (2) ITAG-1KOマウスの解析

マウスリンパ節および脾臓より、定法で単細胞を調整し、プラスチック製培養ディッシュで短時間培養することにより、接着性細胞を除去した。抗体マイクロビーズで標識後、磁気細胞分離装置であるAUTO-MACSにてCD8陽性T細胞を分離した。固層化抗CD3および抗CD28抗体によって、初期活性化を誘導した。刺激後3日で、細胞を回収し、組み換えマウスIL-2の存在下で、さらに3日培養した。完全な細胞傷害性T細胞の誘導を期して、組み換えIL-12を上記培養系に添加した。

### (3) *In vivo*でのT細胞分化誘導と検出

マウスMHC H2-b背景で、実験的に細胞傷害性T細胞を誘導することが知られているペプチド(アミノ酸配列:SIYRYYS)を、完全Freund's adjuvantと共に免疫し、10日後に、免疫マウスより脾臓細胞を調整した。抗原特異的なCD8T細胞の検出は、MBL社提供の、蛍光標識、抗原特異的ペプチドテトラマーで行った。必要に応じて多重染色を行い、FACS解析で検出した。

### (4) ITAG-1モノクローナル抗体の作出

ITAG-1の生化学的性質を明らかにするため、ITAG-1特異的抗体の作成を行った。抗原タンパクを迅速、かつ大量に用意するため、ITAG-1由来エピトープペプチドと、glutathione-S-Transferase(GST)との融合タンパクを調整した。免疫動物のスクリーニングには、受託合成したエピトープペプチドに対して、血清を用いたELISA法を用いた。抗体価が上がった

動物の血清はポリクローナル抗体として使用、脾細胞は、ミエローマ細胞株 SP2/0 と融合し、ハイブリドーマを得た。ELISA を用いて1次スクリーニングを行い、反応性株より、ITAG-1を強制発現させた293T細胞のライゼートを用いて、ウェスタンブロットや、免疫沈降法に使える株を選別した。

#### 4. 研究成果

##### (1) T細胞特異的 ITAG-1KOマウスの解析

C57BL/6 x CBA 背景で、ITAG-1-lox マウスを作成し、C57BL/6 に3回バッククロスした。これを近親交配して得たFlox マウスでは、予想外に、メンデルの遺伝法則に従わないFlox マウス出生数の低下、および、出生したFlox マウスの成長不全が認められた。その後の解析で、Flox マウスでは、ES細胞の選択に用いたNeo 遺伝子の干渉により、全身性にITAG-1のノックダウンが起こり、個体発生および成長に影響を及ぼしていることが示唆された。その後、Neo 遺伝子を除外する遺伝的操作によって、CKO マウスを作出することに成功した。驚くべきことに、全身性にITAG-1がノックダウンされているFlox マウス、およびneo 遺伝子を削除した、CKO で、現在のところ、T細胞の胸腺分化に、明らかな表現系は認められていない。

##### (2) CD8陽性T細胞の分化不全

上記の、全身性にITAG-1がノックダウンされているFlox マウス、およびneo 遺伝子を削除した、完全なconditional KOで、抹消T細胞のin vitroでの反応を見た。初期の解析で、KO由来の細胞では、TCR刺激による増殖には特に欠陥が見られなかった。初期活性化したCD8陽性細胞を、IL-12で刺激すると誘導される、granzyme-Bの増加に、KO由来T細胞は欠陥を示した。この結果を、実際の免疫反応で確かめるため、KOマウスに、モデル抗原を投与し、抗原特異的な細胞傷害性T細胞の生成を検討した。免疫後、10日後の抗原特異的T細胞の数は同じだったが、これらの細胞は、いくつかの活性化マーカーの発現が現弱していた。

##### (3) ITAG-1の生化学的性質

作出された抗体を用いて、免疫沈降とウェスタンブロット法により、胸腺細胞から、内因性のITAG-1を検出することに成

功した。ITAG-1は、分子量60Kda程の核タンパクで、T細胞株からの共沈降実験により、内因性のLSD-1, Rest corepressor 1といった、既存のクロマチン修飾因子と会合することがわかった。

##### (4) 本研究の成果と意義、将来の展望

PD-1による、初期のT細胞抑制機構は、生化学的アッセイによって明らかにされているが、この抑制「スイッチ」によって、T細胞が長期に抑制される機構は不明であり、国内外で高い注目を集めているトピックである。本研究では、PD-1が抑制するITAG-1の同定によって、標的と闘うT細胞がどのように弱っていくか、という、いまだ解明されていない疑問を解くきっかけを作ることが出来た。会合因子より、ITAG-1は、核内ではたらくエピジェネティック制御因子であることが予測され、この機能をさらに深く解析すれば、T細胞機能のエピジェネティック制御が大幅に明らかになる可能性も考えられる。今後は生化学的解析とともに、ITAG-1KOマウスに、腫瘍細胞を投与する実験を行って、実際の腫瘍免疫に、PD-1-ITAG-1の制御がどのように関わるかを解析する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Terawaki S\*, Chikuma S\*, Shibayama S\*, et al. (\* Equal contribution) IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol.* Vol. 186 2772-2779 (2011) 査読あり
2. Wang J et al. (Chikuma S is the 4th out of 9 authors) PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int Immunol.* Vol. 22 443-452 (2010) 査読あり
3. Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, Okazaki T, Honjo T  
PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J. Immunol.* (2009) Vol. 182

[学会発表] (計 2 件)

1. Shunsuke Chikuma In search of molecules that regulate PD-1 mediated inhibition of T cell function. 14<sup>th</sup> International congress of Immunology Aug 23-27, 2010, Kobe, Japan.
2. Shunsuke Chikuma Type I interferon promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. 98<sup>th</sup> Annual Meeting, The American Association of Immunologists. May 13-17, 2011 San Francisco, U. S. A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹馬 俊介 (ちくま しゅんすけ )

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437208