

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19576

研究課題名(和文)活性化リンパ球特異的な抑制法の開発

研究課題名(英文)Development of Inhibitory method specific for activated T cells

研究代表者

斉藤 隆(Saito, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50205655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患やアレルギー疾患などは、制御を外れて活性化した特異的T細胞が誘導するが、免疫抑制剤は全てのT細胞に働き、活性化T細胞だけを特異的に抑制する方法が望まれている。STINGリガンドcGAMPでT細胞を活性化すると、活性化T細胞のみ増殖が抑制されることが分かった。cGAMPによる刺激は、mTORC1活性を抑制し、細胞周期の阻害が誘導された。一方cGAMP刺激はポジティブにも働き、T細胞からI型IFNを産生させた。cGAMPのin vivo投与によって直接T細胞を刺激することで、抗腫瘍活性を増強できることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特異抗原で活性化されたT細胞を特異的に抑制する方法はこれまでなかったが、少なくともin vitroでは、活性化T細胞を抗原とともにSTINGを共刺激すれば、特異的なT細胞増殖抑制が誘導されることがわかり、自己免疫疾患やアレルギーなど異常に活性化されたT細胞を抑制できる方法開発の端緒についた。一方同時にSTING刺激でT細胞から自然免疫を凌ぐ大量なI型IFNが産生され、in vivo投与によってcGAMPは抗腫瘍活性を亢進できることが判明し、I型IFNによる制御に新しい局面を開いた。

研究成果の概要(英文)：Aberrantly activated T cells induce autoimmune and allergic diseases. So far, all immunosuppressive drugs work on all T cells, and the method to specifically inhibit activated T cells is desired. When T cells were stimulated with STING ligand, cGAMP together with antigen, growth inhibition was induced only on activated T cells. cGAMP stimulation induces inhibition of mTOR activation, leading to growth inhibition of T cells. On the other hand, cGAMP stimulation induces positively type I-IFN from T cells. Direct stimulation of T cells by cGAMP inoculation in vivo augments of anti-tumor immunity

研究分野：免疫学

キーワード：STING T細胞 増殖抑制 活性化シグナル mTORC1 IFN-g

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは自然免疫と獲得免疫の二つのシステムから成り立っている。自然免疫は全ての生物が有する原始的な防御システムで、マクロファージ、樹状細胞や好中球が担うのに対して、獲得免疫は、進化した動物で見られる防御システムで、T細胞とB細胞が担う。マクロファージの Toll 様受容体 (TLR) や T細胞の T細胞抗原受容体 (TCR) のように、それぞれ独自の認識系とそれに伴う活性化システムを持っていて、交叉があまりないと考えられていた。我々は T細胞の抗原認識に伴う活性化シグナルの解析を続けてきたが、その中で自然免疫 TLR の下流で働き NF- $\kappa$ B 活性化に必須のキナーゼ IRAK4 が T細胞でも TCR 活性化シグナルに重要であることを見出した (Suzuki et al. Science 2006)。それ以来、自然免疫と獲得免疫では活性化シグナルで進化の上で共有して来たと考えている。そこで、T細胞における自然免疫受容体とそれによる活性化シグナルを調べ、TLR を介した刺激が T細胞の活性化・分化を誘導すること (J. Immunol. 2007, Nat. Commun. 2014) などを見出してきた。自然免疫の核酸を認識するセンサーとして STING が同定され、そのリガンドも解明される中、T細胞にも STING が高発現していることを見出し、STING リガンドで T細胞を刺激したところ、驚いたことに T細胞の増殖を抑制することを見出した。この抑制は活性化 T細胞でのみ誘導されたことから、活性化 T細胞の阻害剤として機能しうる可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

自己免疫疾患は、組織抗原などの自己成分に特異的な T細胞が、本来は抑制されているにもかかわらず、活性化されて、自己を攻撃してしまう結果であり、アレルギーも過剰に活性化されたアレルギー原に特異的な T細胞が引き起こす。こうした抑制の効かない活性化 T細胞を特異的に抑制することができれば、これらの疾患への治療になると考えられる。同様に、臓器移植を成功させるために、移植臓器を攻撃する特異的な T細胞の機能を特異的に抑制することは長年の夢である。しかし実際には、T細胞の抑制は免疫抑制剤に依存しており、これまでの免疫抑制剤 (シクロスポリン, FK506, ラパマイシン など) は全ての T細胞の活性化を抑制するものが殆どである。本研究はこうした活性化した T細胞だけを抑制できる方法・薬剤を開発することを目指し、そのためのメカニズム解析を行う。

自然免疫では、ウイルス・細菌などをパターン認識したマクロファージなどが抗菌ペプチドやインターフェロンなどを産生させ、防御機能を司る。獲得免疫の T細胞は、特異的な抗原を TCR によって認識し、細胞を活性化させて、サイトカインを産生する。T細胞にも自然免疫のパターン認識受容体: TLR や STING などが発現しており、我々の解析から、これらは T細胞の中でも機能を発揮し、活性化シグナルを誘導することが判明した。STING は細胞室内の核酸センサーであり、そのリガンドは環状ジペプチド (c-di-GMP, cGAMP など) である。このリガンドで T細胞を刺激すると、驚いたことに T細胞の増殖が抑制されることを見いだした。しかも、予備的実験では、この増殖抑制は活性化した T細胞のみであり、無刺激の ナイーブ T細胞には影響がなかったことから、STING リガンドは、活性化 T細胞特異的に抑制することのできる薬剤になる可能性が示唆された。

以上のことから、本研究は、STING リガンドが T細胞を抑制するメカニズムを解析することを第一の目的とし、明らかになった抑制メカニズムから誘導・演繹されるより良い抑制剤を明らかにすることを更なる目的としている。

## 3. 研究の方法

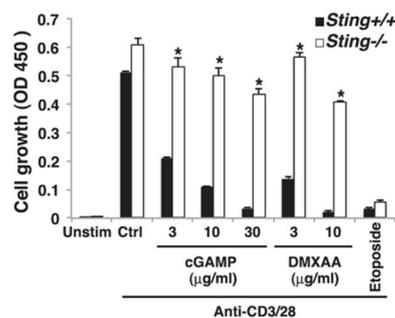
研究方法としては、CD4 T細胞を抗原や TCR 抗体で刺激するとともに、STING リガンドで刺激し、その際に細胞増殖、細胞分化、サイトカイン産生、シグナル伝達系の活性化、などの機能解析を行う。また、STING の活性化にともなう細胞内動態のイメージング解析をし、T細胞の活性化における STING の会合分子を MS/MS で解析する。そして STING 刺激による T細胞活性化の抑制の *In vivo* での解析、を以下のように行う。

- (1) STING 活性化の条件解析: 種々の STING リガンドの異動と T細胞抑制のカイネティクスを解析する。
- (2) T細胞での STING による活性化シグナルの解析: STING 下流のシグナル (TBK1, IRF3, IFN 等) TCR 下流シグナル (ZAP70, LAT, SLP76, PLC $\gamma$ , NFAT, Erk 等) および細胞周期関連分子 (サイクリン, Cdk, p21/27 等) 活性化を解析し、T細胞活性化抑制の標的を検索する。
- (3) T細胞での STING のイメージング解析: STING の細胞内局在ダイナミクスを解析する。
- (4) STING 刺激による T細胞機能の解析: TCR+STING の共刺激で種々サイトカインを産生する Th への機能分化を調べ、T細胞でも IFN 産生が誘導されるか、解析する。
- (5) STING による T細胞増殖抑制の *In vivo* での解析: *In vivo* で STING リガンド投与により抗原特異的な T細胞増殖反応が抑えられるか、また腫瘍に対する抗腫瘍免疫が抑制するかを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) STING 刺激で誘導される T 細胞機能

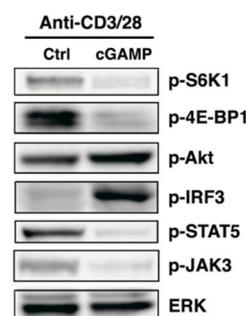
ナイーブ T 細胞は、自然免疫系の樹状細胞 (DC) 等と同程度に STING を発現していた。TCR 刺激 (CD3+CD28 抗体による架橋) と共に STING リガンド cGAMP や DMXAA で刺激すると、T 細胞の増殖が抑制されることが分かった。生理的な STING リガンドの cGAMP 刺激による T 細胞の増殖抑制は、細胞死の誘導ではなく、G1 期の細胞周期の抑制によるものであった。これは Th1 細胞などの CD4T エフェクター細胞だけでなく、活性化された CD8T 細胞でも同様であった。実際、細胞周期関連分子としての、Cyclin や cdc/cdk キナーゼなどの発現が抑制されることが分かった。一方、人工的な STING リガンド DMXAA による刺激では、高濃度では細胞死が誘導されることも分かった。そのため、この研究の目的としては、生理的リガンド cGAMP による細胞周期抑制による増殖抑制を解析することにした。



生理的リガンド cGAMP による細胞周期抑制による増殖抑制を解析することにした。

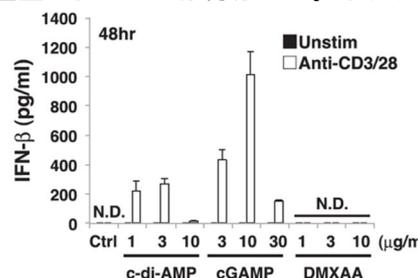
### (2) cGAMP 刺激による mTORC1 活性の制御

細胞周期・増殖の制御に mTORC1 の活性が必須であることが知られるので、cGAMP 刺激による増殖抑制が mTORC1 活性の抑制による可能性を調べた。実際、mTORC1 の下流の 2 つのシグナル分子 S6K と 4E-BP1 の活性化が抑制されていた。STING 欠損マウス由来の T 細胞ではこのような抑制は見られないことから、STING 刺激による特異的な抑制であることが分かった。これら (S6K, 4E-BP1) の mTORC1 活性化シグナルは、細胞周期の誘導および脂質合成に必須であることが知られる。この両者は細胞増殖に必要である。実際、多くの脂質合成に重要な酵素の発現が軒並み抑制されていることが判明した。そのため、DAG やコレステロールなどの脂質の合成が抑制されていた。これらの解析から、活性化された T 細胞 (エフェクター CD4T 細胞, 活性化 CD8 T 細胞) を、TCR 刺激とともに cGAMP により STING を刺激すると、mTORC1 の活性化が抑制されて、その結果として T 細胞の細胞増殖が抑制されることが分かった。



### (3) STING 刺激による抑制機能と活性化機能

TCR 刺激とともに cGAMP で STING を刺激すると、増殖を抑制するネガティブな機能を発揮することが分かったが、同時に I 型 IFN ( $\alpha, \beta, \lambda$ ) を産生するポジティブな機能も誘導することが判明した。T 細胞は IFN- $\gamma$  を産生するが、I 型 IFN は産生しないと考えられてきたものの、STING 刺激によって始めて IFN- $\alpha, \beta$  が産生されることが分かった。しかも、活性化 T 細胞 (Th1, 活性化 CD8 T 細胞) からは自然免疫系 DC よりも多量な I 型 IFN が産生されることが分かった。ポジティブな活性化のメカニズムを解析した結果、自然免疫系と似てはいるが、異なっていた。I 型 IFN 産生に重要な転写因子 IRF の解析から、IRF3 が活性化されることが解り、更にそれを活性化するのは、TBK1/IKK $\epsilon$  の両者が redundant に機能していることが分かった。自然免疫系では、cGAMP 刺激だけで、IRF3 の活性化維持が起こり、IFN 産生にいたるが、T 細胞では、cGAMP 刺激だけではほんの一時的にのみ IRF3 の活性化が起こるが、活性化を長期的に維持するには、TCR 刺激が必要なが分かった。そのメカニズムのために TCR+STING 刺激での co-stimulation が IFN- $\alpha, \beta$  の産生に不可欠であることが分かった。

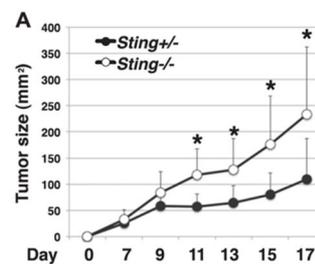


STING 刺激によって mTORC1 の抑制を通して細胞増殖抑制が起こる一方、同時に I 型 IFN の産生にいたる活性化が誘導される。I 型 IFN 産生には mTORC1 の活性化が必要であることが、mTORC1 の阻害剤の rapamycin を用いることで明らかになった。mTORC1 の阻害での増殖抑制と活性化での IFN 産生、一見矛盾するよう見える。しかし、詳細な解析から、cGAMP 刺激は mTORC1 下流の 4E-BP1 は完全に阻害するが、S6K の活性化は部分的に保持しており、この保持された S6K の活性が IFN 産生に不可欠であることが判明した。これにより 2 面性の制御を mTORC1 が行っている巧妙な実態が判明した。

### (4) *In vivo* における STING 刺激の効果

cGAMP による TCR との共刺激によって誘導されるネガティブ制御：細胞増殖の抑制、とポジティブ制御：I 型 IFN 産生が生体内でも整理的な状況で誘導されているのか、を検討した。マウスを OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス由来の OVA 特異的 T 細胞をマウスに静注して、抗原 OVA をアジュバンドと共にフットパッドから免疫する際に、同時に cGAMP を投与して、所属リンパ節における、T 細胞の抗原特異的活性化による増殖が抑制されるか、を調べた。結果的には抑制は観察されていないが、cGAMP がリンパ節に十分届いているかなど条件にまだ問題がある

と思われた。一方、cGAMP による直接の効果を見るために、腫瘍免疫の系で解析した。野生または STING 欠損マウス由来の T 細胞だけを移入した免疫不全 Rag 欠損マウスの背中に B16 メラノーマ細胞を少数植え、処置群では腫瘍を植えた部位に直接 cGAMP を投与して、腫瘍の増殖を毎日観察・測定した。その結果、STING 欠損マウスの T 細胞を投与した群では腫瘍の増殖が有意に増強された。cGAMP を投与しない対照群では腫瘍増殖の更新はなかった。このことから、cGAMP は *in vivo* において、抗原特異的 T 細胞を刺激して I 型 IFN を大量に産生して抗腫瘍免疫応答に寄与したものとされた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito T.	4. 巻 1189
2. 論文標題 Molecular Dynamics of Co-signal Molecules in T-Cell Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 135 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-32-9717-3_5	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 -

1. 著者名 Imanishi T. and Saito T.	4. 巻 41
2. 論文標題 T cell co-stimulation and functional modulation by innate signals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Immunology	6. 最初と最後の頁 200, 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.it. 2020. 01.003	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 -

1. 著者名 Nemeth T, Futosi K., Szabo M., Aradi P., Saito T., Mocsai A. and Jakus Z	4. 巻 10
2. 論文標題 Importance of Fc Receptor $\gamma$ -Chain ITAM Tyrosines in Neutrophil Activation and in vivo Autoimmune Arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fimmu.2019.00252	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 -

1. 著者名 Kong Mei S*, Hashimoto-Tane A*, Kawashima Y., Sakuma M., Yokosuka T., Kometani K., Onishi R., Carpino N., Ohara O., Kurosaki T., Phua K.K. and Saito, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of T cell activation and function by the adaptor protein CIN85.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaav4373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1126/scisignal.aav4373.	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 -

1. 著者名 Imanishi Takayuki, Unno Midori, Kobayashi Wakana, Yoneda Natsumi, Matsuda Satoshi, Ikeda Kazutaka, Hoshii Takayuki, Hirao Atsushi, Miyake Kensuke, Barber Glen N, Arita Makoto, Ishii Ken J, Akira Shizuo, Saito Takashi	4. 巻 2
2. 論文標題 Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.26508/lisa.201800282	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 -

1. 著者名 Yamamoto Takuya, Masuta Yuji, Momota Masatoshi, Kanekiyo Masaru, Kanuma Tomohiro, Takahama Shoukichi, Moriishi Eiko, Yasutomi Yasuhiro, Saito Takashi, Graham Barney S, Takahashi Yoshimasa, Ishii Ken J	4. 巻 31
2. 論文標題 A unique nanoparticulate TLR9 agonist enables a HA split vaccine to confer Fc R-mediated protection against heterologous lethal influenza virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/intimm/dxy069	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 -

1. 著者名 Hayashi Masayuki, Aoshi Taiki, Haseda Yasunari, Kobiyama Kouji, Wijaya Edward, Nakatsu Noriyuki, Igarashi Yoshinobu, Standley Daron M., Yamada Hiroshi, Honda-Okubo Yoshikazu, Hara Hiromitsu, Saito Takashi, Takai Toshiyuki, Coban Cevayir, Petrovsky Nikolai, Ishii Ken J.	4. 巻 15
2. 論文標題 Advax, a Delta Inulin Microparticle, Potentiates In-built Adjuvant Property of Co-administered Vaccines	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 127 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2016.11.015	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto-Tane Akiko, Yokosuka Tadashi, Saito Takashi	4. 巻 1584
2. 論文標題 Analyzing the Dynamics of Signaling Microclusters	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 51 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-6881-7_4	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 該当する

1. 著者名 Takeuchi Arata, Saito Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2017.00194	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 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Saito T, Hashimoto-Tane A, Kong MS
2. 発表標題 Negative regulation of T cell activation and function by the CIN85 adaptor protein
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imanishi T, Saito T.
2. 発表標題 mTORC1 signals control TLR2 pathways in T cells by inducing TIRAP expression
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 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and functions
3. 学会等名 TOLL Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Hashimoto-Tane, Takashi Saito
2. 発表標題 Molecular assembly and function of PTPN22 in T cell receptor signaling
3. 学会等名 FASEB Immunoreceptors and Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Dynamic regulation of inhibitory signals on T cell activation
3. 学会等名 EMBO Workshop: Lymphocyte antigen receptor signalling (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Saito, Mei Suen Kong, Akiko Hashimoto-Tane
2. 発表標題 Negative regulation of T cell activation and function by the CINB5 adaptor protein
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Hashimoto-Tane, Takashi Saito
2. 発表標題 Functional analysis of autoimmune-associated phosphatase PTPN22(TCPTP) in T cells
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T cell activation and functions
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Dynamic negative regulation of T cell activation by co-inhibitory receptor and adaptors
3. 学会等名 Seminar in Hokkaido University (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 Regulation of T cell activation and function by innate signals -STING activation in T cells induce growth arrest and IFN production
3. 学会等名 FASEB Summer Research conference: Signal Transduction in the Immune System (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Regulation of T cell activation and function by innate signals - STING activation induce growth arrest and IFN production in T cells -
3. 学会等名 大阪大学 IFRc Colloquium
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akiko Hashimoto-Tane, Takashi Saito
2. 発表標題 Molecular assembly and function of PTPN22 in T cell receptor signaling
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 TCR-signals control STING-mediated type 1 IFN responses in T cells
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Saito
2. 発表標題 Regulation of T cell activation and function by innate signals
3. 学会等名 Seminar in Hokkaido University (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Imanishi, Takashi Saito
2. 発表標題 STING activation induces inhibition of cell growth and production of type-I IFN
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference T Cell Dysfunction, Cancer and Infection (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫細胞の制御技術	発明者 Takashi Saito, Takayuki Imanishi	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許2017-028244	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----