

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790356  
 研究課題名（和文） 免疫抑制受容体PD-1がT細胞にもたらす不応答性プログラムの解析  
 研究課題名（英文） Mechanistic basis for induction of T-cell anergy by PD-1, an immuno-regulatory receptor  
 研究代表者 竹馬 俊介  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号 50437208

研究成果の概要：ガンや、ウイルス感染においては、これと闘うTリンパ球が、初期活性化した後、徐々に無反応になることが問題となる。この不応答性が、活性化T細胞に発現するPD-1レセプターによって引き起こされること、PD-1が、活性化初期のIL-2産生を調節することによって、T細胞を不応答に陥れることを明らかにした。この研究によって、免疫反応の調節機構と、それに関連した難病の治療につながる知見が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：免疫学・免疫寛容

キーワード：T細胞、免疫寛容、免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

(1) T細胞の活性化に始まる抗原特異的な一連の反応は、ガンやウイルスから生体を防御するために必須であるが、ガンと闘っているT細胞が、次第に力をなくし、不応答となることが問題となっている。その一方、健常人においてT細胞の過剰な活性化は、T細胞免疫の強すぎる活性化は、自己免疫性（タイプ1）糖尿病やリウマチ性関節炎といった、深刻な自己免疫疾患の原因となる側面を持つ。よって、これらの問題を解決するために、T細胞の活性化制御システムをより理解する

ことが必須であった。

(2) PD-1は申請者の所属研究室において1992年に、TおよびB細胞に発現する免疫グロブリン様レセプターとして同定された。次いで樹立されたPD-1ノックアウトマウスは、生後まもなくT細胞の異常活性化を伴う、糖尿病、唾液腺炎、リウマチ性関節炎、腎炎、拡張型心筋症、心筋炎など、さまざまな臓器特異的自己免疫疾患を自然発症することが明らかになった。一方でPD-1ノックアウトマウスは、ガンやウイルス特異的なT細胞免疫が増強しており、移植ガンの

生着が拒絶されたり、転移が抑制されること、また、ウイルス感染に抵抗性であることが分かっていた。このことより、PD-1は、生理的なT細胞の活性化の後、それを抑制するキーマンであると考えられるようになった。しかしながら、ノックアウトマウスの表現系は、多種の免疫担当細胞が、複雑な反応を起こし、その結果引き起こされるものであり、CD4（ヘルパー）およびCD8（キラー）T細胞、そしてB細胞という、個別の免疫担当細胞におけるPD-1の詳細な解析は途上であった。

(3) 研究を開始した当初、持続感染を特徴とするHIVやヘルペスウイルス感染症では、慢性化にともなって多数のPD-1陽性の不応答性T細胞が集積すること、マウスの実験では抗PD-1のブロックでこのアナジーが解除され、ウイルスの排除が起こることが報告され、患者に対する応用療法がまさに行われようとしていた。このため、PD-1がはたらくメカニズムを個々の免疫細胞で明らかにしていくことは、最重要課題であった。

## 2. 研究の目的

当研究の目的は、PD-1分子が、CD8陽性細胞傷害性T細胞による免疫反応を、どのように調節するか、また、そのメカニズムを探求することであった。よって、単一のモデル抗原を用いてCD8陽性T細胞の反応を追跡できる実験系を独自に構築し、これを明らかにしようと試みた。

## 3. 研究の方法

(1)体内に、CD8陽性、単一クローンのT細胞のみを有する、2C TCRトランスジェニック、RAG2ノックアウトマウスに、PD-1ノックアウトマウスを交配し、単一の抗原に対するCD8細胞の反応、およびこれにおけるPD-1の機能を解析することを可能にした。このマウス、およびPD-1陽性のコントロールマウスに、抗原エピトープとして同定されているペプチド（アミノ酸配列：S I Y R Y Y G L）を腹腔注射することによって、人為的にアナジーの誘導刺激を行った。ペプチド投与一週間後、犠牲死させたマウスのリンパ節より、マグネティックセルソーターにてCD8陽性細胞を分離し、同系マウスの脾臓細胞とS I Y R Y Y G Lペプチドに対する増殖活性をトリチウムチミジンの取り込み試験で測定することによって、抗原特異的な不応答性（アナジー）誘導の有無

を確認した。

(2)研究の過程において、PD-1陽性、および陰性のマウスでは、この反応に大きな差を認めたので、抗原投与時、および1週間後における細胞表面抗原の変化をFACS法によって比較した。また、抗原投与時における、サイトカイン発現の変化をELISA法、FACS法、およびBioplex法によって解析した。

(3)内因性IL-2産生と、そのシグナルのコントロールを行うため、抗IL-2抗体、および抗IL-2レセプター抗体を、抗原ペプチドと同時に投与し、これらを中和した際におけるCD8陽性T細胞反応を、2次刺激時（1週間後）において比較した。また、IL-2をマウス体内で補完する実験を行うため、抗マウスIL-2抗体を、試験管内で組み換え型マウスIL-2と混合し、抗体—サイトカイン複合体を形成させた。これを、抗原と同時に投与し、2次刺激時におけるCD8陽性T細胞の反応を比較した。

(4)T細胞の養子移入実験には、Chic beta actin-GFP トランスジェニックマウスと交配したPD-1陽性、およびGFP トランスジェニックマウスと交配していない陰性マウスより、マグネティックセルソーターによってCD8陽性細胞を分離した。これを同系（C57BL/6）マウスに腹腔注射し、抗原ペプチドを同時投与した。1週間後、このレシピエントマウスより、T細胞を、マグネティックセルソーター、およびFACSによって、GFPの蛍光をもとに分離し、2次刺激時における増殖反応を測定した。

(5)抗原を投与したPD-1陽性、および陰性マウスのT細胞よりRNAを抽出し、これをcDNAマイクロアレイ法に供して発現遺伝子の変化を解析した。変化の認められたいくつかの遺伝子に関しては、TAQMAN法によって、この遺伝子発現変化を確認した。

## 4. 研究成果

- a. 抗原投与後、PD-1陽性マウスから採取したT細胞は、担ガン状態に見られるように、不応答になったが、PD-1陰性マウスにおいては、この不応答性の獲得は起こらなかった。つまり、PD-1分子が、CD8陽性細胞においては、不応答性を起こす必須のスイッチであることを見出した。
- b. 前項で、PD-1陽性マウスにおいては、PD-1陰性マウスと比較して抗原投与時における血中のIL-2サイトカインの発現が著しく抑制されることを見出した。また、抗原投与したマウスのT細胞

を特異的抗体で細胞内染色することにより、個々の細胞レベルで、PD-1 依存性に IL-2 産生の抑制が起こっていることを明らかにした。

- c. この結果を踏まえ、PD-1 陽性、陰性マウスにおいて、IL-2 をコントロールする治療を行った。この結果、いずれのマウスにおいても、IL-2 の中和により、T細胞が不応答になること、逆に、IL-2 を生体内で補うことによって、不応答とならないことを見出した。
- d. さらに、PD-1 陰性細胞から過剰産生された IL-2 が、PD-1 陽性細胞における不応答状態に影響を与えるか調べるため、PD-1 陽性、および陰性マウスより T細胞を分離し、混合したのち、同系マウスに養子移入して抗原反応を調べた。その結果、普段は不応答となる PD-1 陽性細胞が、PD-1 陰性細胞の存在下では不応答とならないこと、この効果は IL-2 レセプター抗体の投与によって阻害されることを見出した。つまり、PD-1 レセプターは、抗原応答時の IL-2 産生を抑制することによって、T細胞を不応答化することを明らかにした。
- e. PD-1 陽性、陰性細胞のマイクロアレイ比較によって、T細胞の活性化に影響を与えると考えられる遺伝子を同定した。

T細胞のアナジーという生命現象は、免疫学の本流を行く大きな疑問の一つであり、ウイルス感染、癌や自己免疫の克服という、臨床医学研究の観点からも世界的に注目されている。

本研究によって得られた、a-d の結果は、感染防御、ガン免疫および自己免疫疾患の病理を理解するうえで、非常に重要な成果をもたらすものである。当研究成果は、権威ある、米国免疫学会の機関誌に報告した。また、e で同定した遺伝子群は、PD-1 分子の下流において、T細胞の活性化を調節する分子であることが予測され、これらの分子を今後、詳細に解析することによって、新たな免疫調節のターゲット分子、およびそれを応用した免疫病の治療法につながる可能性が大いにある。

#### 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 4 件)

1. 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 6682-6689 査読あり
2. Jiang F, Yoshida T, Nakaki F, Terawaki S, Chikuma S, Kato Y, Okazaki IM, Honjo T, Okazaki T  
Identification of QTLs that modify peripheral neuropathy in NOD.H2b-Pdcd1-/- mice. *Int. Immunol.* (2009) vol.21 499-509 査読あり
3. Hara-Chikuma M, Takahashi K, Chikuma S, Verkman AS, and Miyachi Y  
The expression of differentiation markers in aquaporin deficient epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* (2009) vol.301 245-252 査読あり
4. Chikuma S and Bluestone J  
Expression of CTLA-4 and FoxP3 in cis protects from lethal lymphoproliferative disease. *Eur. J. Immunol.* (2007) Vol.37 1285-1289 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

Chikuma S, Terawaki S, Okazaki T, Honjo T :  
PD-1 induces T cell anergy by limiting autonomous IL-2 production., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 234, 2008 年 12 月 (京都)

Terawaki S, Chikuma S, Okazaki T, Honjo T :  
Transcriptional mechanisms of mouse PD-1 gene., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, Vol. 38, p. 234, 2008 年 12 月 (京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹馬 俊介

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437208

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者