

令和 4 年 4 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07634

研究課題名(和文) 免疫細胞上の機能分子の「着せかえ」による細胞動態の制御と癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Contribution of LFA-1 integrin in T cell trogocytosis

研究代表者

伊藤 甲雄 (Koyu, Ito)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90609497

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)：本研究ではトロゴサイトーシスにおけるLFA-1の役割を解析した。その結果、トロゴサイトーシスはT細胞を抗原刺激することにより亢進し、LFA-1に対する抗体により阻害された。また、CD98抗体による架橋を介したLFA-1の活性化によってトロゴサイトーシスが亢進した。病態におけるトロゴサイトーシスの寄与を解析するため、癌原発巣におけるトロゴサイトーシスを解析した。その結果、腫瘍浸潤CD8T細胞ではCD98が発現亢進するとともにCD80.86がトロゴサイトーシスによる分子獲得が起こっていた。このCD8T細胞は免疫抑制性を示しており、トロゴサイトーシスの阻害により、癌の進展が抑制されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トロゴサイトーシスは細胞間接着を介して比較的容易に誘導することができ、その制御によって病態に応じた新規機能を免疫細胞に付与できると考えられる。本研究ではTCR刺激によるLFA-1活性化はトロゴサイトーシスに寄与すること、CD98抗体はトロゴサイトーシスを亢進させることを明らかにした。さらに、癌微小環境においてはトロゴサイトーシスを介して免疫抑制細胞が形成されることを明らかにし、これを阻害することによって癌の進展が抑制されることを明らかにした。この結果は、トロゴサイトーシスの制御が癌免疫療法の新規標的になる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of LFA-1 in trogocytosis on T cell. When T cells were stimulated with antigen, T cell trogocytosis was enhanced and LFA-1 blocking antibody inhibited antigen-dependent trogocytosis. In addition, integrin activation by cross-linking of CD98 resulted in the enhancement of trogocytosis. These data indicated that LFA-1 activation is involved in T cell trogocytosis. Next, to examine the contribution of trogocytosis in cancer, mice were injected with B16F10 melanoma cells. we found that CD98 expression was increased in tumor infiltrating CD8 T cell, and that these cells acquired CD80 and CD86 molecule by trogocytosis. These "trogocytosed" T cells suppressed activation of another T cell. Cancer progression was suppressed by inhibition of trogocytosis. These data suggested that T cell trogocytosis contributed to generate immune suppressive environment in cancer, and that this event has potential to be novel target in cancer immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード：トロゴサイトーシス インテグリン 癌

1. 研究開始当初の背景

腫瘍形成過程において制御性 T 細胞や Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) など免疫抑制細胞が動員される。癌の進展における免疫抑制環境の形成は、癌治療における大きな障壁となっており、PD-1 抗体を筆頭に新しい免疫療法の開発に向けた研究が盛んに行われている。免疫細胞は自身が発現する分子による機能調節に加え、細胞間接着を介した機能分子の受け渡し(トロゴサイトーシス)が起こり、抗原提示や細胞遊走など新規の機能を現す細胞集団が形成されることが明らかになっている。トロゴサイトーシスは細胞同士を接触させることにより比較的短時間かつ容易に機能分子が受け渡される。そこで、トロゴサイトーシスを利用して細胞特異的にケモカイン受容体など細胞遊走を調節する分子の受け渡しを誘導することにより、免疫抑制性の細胞をその場から遠ざけ、抗腫瘍効果を亢進させることができるのではないかと考えた。トロゴサイトーシスは細胞間接着が必須である。トロゴサイトーシスは様々な免疫細胞間で起こることが報告されており、免疫細胞の機能を異所的に調節している。CD4 T 細胞は抗原曝露した樹状細胞(DC)との接触により MHC 分子及び補助シグナル分子群を獲得することにより、CD8 T 細胞の活性化を誘導する。また、NK 細胞は DC との接触により MHC クラス II 分子を獲得するが補助シグナル分子を獲得しないため、CD4 T 細胞の活性化を抑制する。さらにトロゴサイトーシスは NK 細胞が標的細胞を傷害後に、標的細胞上の NKG2D リガンド Rae-1 を獲得することにより、他の NK 細胞により攻撃を受け、炎症が収束することにも寄与している。人為的なトロゴサイトーシスの利用としては CCR7 発現株を NK 細胞と共培養することにより、NK 細胞が CCR7 を獲得し、リンパ節に遊走する能力を獲得することが報告されている。しかしながら、トロゴサイトーシスが起こるメカニズムは不明のままである。

インテグリンは 18 種類の α 鎖と 8 種類の β 鎖によってヘテロ 2 量体を形成する膜貫通型タンパク質で、リガンドの結合により多様な細胞機能を誘導する。その中でも LFA-1(α L β 2) は、T 細胞の抗原認識における免疫シナプスの形成において樹状細胞との強固な接着に関わっており、T 細胞のトロゴサイトーシスにおける LFA-1 の重要性が示唆される。インテグリンは抗原認識やケモカイン受容体のシグナリングにより可逆的に活性化を誘導できる。そのため、活性化の調節は比較的容易であり、細胞特異的なインテグリン活性化とそれに引き続くトロゴサイトーシスが誘導できると考えられる。そこで本研究では癌の微小環境においてトロゴサイトーシスが起きているかを検討し、インテグリンの活性化調節によってトロゴサイトーシスをコントロールし、癌治療につなげるための分子基盤を確立する。

2. 研究の目的

トロゴサイトーシスにおける LFA-1 インテグリンの機能解析と癌微小環境における T 細胞トロゴサイトーシスの寄与に関する解析

3. 研究の方法

(1) トロゴサイトーシスにおけるインテグリン活性化の役割

インテグリンは TCR やケモカイン刺激などの inside-out signaling により活性化が誘導される。抗原認識時に形成される免疫シナプスに含まれる LFA-1 インテグリンの活性化が T 細胞のトロゴサイトーシスに重要であるかどうかを検討するために、トリ卵白アルブミン

(OVA)ペプチド特異的 TCR トランスジェニックマウス(OT-I) T 細胞を樹状細胞と共培養し、ペプチドを添加して、TCR 刺激によってトロゴサイトーシスが誘導されるかを検討した。T 細胞トロゴサイトーシスは、T 細胞における MHC クラス II 分子の獲得を指標にフローサイトメトリーにより評価した。また、インテグリン共受容体によるインテグリン活性化を誘導するために、抗 CD98 抗体を用い、上記抗原刺激の実験系に抗 CD98 抗体を添加して CD98 架橋によるトロゴサイトーシスへの影響を検討した。

(2) LFA-1 インテグリン恒常的活性化マウスの作成とトロゴサイトーシスへの影響

過去の報告において、LFA-1 α 鎖の細胞内領域を欠損することにより、インテグリンが恒常的に活性化することが報告されている(J.Exp.Med. (2005) 201: 1987-1998)。そこで、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、LFA-1 活性化マウスを作製した(LFA-1del)。インテグリンの活性化評価は、脾細胞を用いた LFA-1 リガンド ICAM-1 に対する接着試験によって評価した。LFA-1del によるトロゴサイトーシスへの影響は LFA-1del と OT-I あるいは OT-II マウスを交配することにより作成し、(1)の方法でトロゴサイトーシスを評価した。

(3) LFA-1del マウスにおける癌の進展と、癌微小環境におけるトロゴサイトーシスの評価

6-10 週齢雌の LFA-1del マウス及び野生型マウス背部皮下にマウス悪性黒色腫 B16F10 細胞を接種し、腫瘍径を経時的に測定した。また癌細胞接種 13-15 日後に、原発巣を採取し、Percoll によって腫瘍浸潤細胞(TIL)を単離した。TIL 中の CD4, CD8T 細胞上の表面抗原分子をフローサイトメトリー及び、qPCR により解析した。

4 . 研究成果

(1) 初めに、トロゴサイトーシスにおけるインテグリン活性化への影響を検討した。インテグリンは TCR やケモカイン刺激など inside-out signaling により活性化が誘導される。そこで、OVA ペプチド特異的 TCR トランスジェニックマウス(OT-I) T 細胞を OVA ペプチド存在下で樹状細胞と共培養し、その後の T 細胞トロゴサイトーシスを検討した。その結果、抗原ペプチド刺激によって、T 細胞における MHC クラス II 分子の発現が増加することが分かった。これは抗 α L インテグリン抗体によって阻害された。この結果は、抗原刺激によるトロゴサイトーシスが、LFA-1 活性化に依存することを示している。次に細胞特異的なインテグリン活性化に引き続く、トロゴサイトーシスが誘導できるかを検討するため、インテグリンの共受容体に着目した。インテグリンの活性化を調節する共受容体として、テトラスパニンや CD98 などが報告されている。CD98 は Rap1 活性化によるインテグリンの活性化を誘導することが報告されている。そこで、抗 CD98 抗体を用いた LFA-1 活性化によりトロゴサイトーシスが亢進できるかを検討した。その結果、OT-I の抗原依存的トロゴサイトーシスは CD98 抗体の添加により更に増加することが分かった(図 1)。

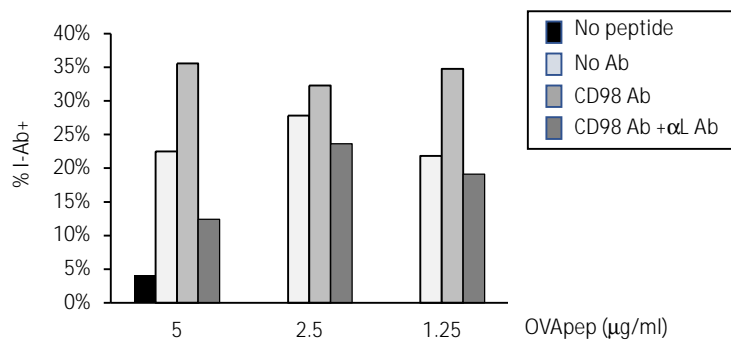


図 1. CD98 抗体によるインテグリン活性化を介したトロゴサイトーシス誘導

OT-I マウス脾臓細胞を OVA ペプチドで刺激すると同時に CD98 に対する抗体で架橋してインテグリンの活性化を誘導した。

37 2 時間培養の後に、CD8 T 細胞のトロゴサイトーシスを、MHC クラス II 分子(I-Ab)の獲得で評価した。その結果、抗原刺激によるトロゴサイトーシスは CD98 抗体架橋により更に増強され、この効果は、LFA-1 インテグリンの阻害により減少した。

(2)トロゴサイトーシスにおけるインテグリンの活性化の役割をさらに検討するために、LFA-1 恒常的活性化マウスを作製した。過去の報告に基づいて、LFA-1 活性化マウスを作製した(LFA-1del)。このマウス脾臓細胞は既報通り、野生型マウスと比較して LFA-1 リガンドに対する接着が増加していた。このマウスにおけるトロゴサイトーシスを検討するために、OT-I マウスと交配した後に、(1)と同じ方法で、トロゴサイトーシスを検討した。その結果、当初の予想に反して、LFA-1del マウスではトロゴサイトーシスが著明に低下していることが分かった。この結果は、(1)の CD98 架橋によるインテグリン活性化によるトロゴサイトーシスの亢進とは相反する事象であり、この違いについては今後のさらなる検討が必要である。

(3)野生型マウスに B16F10 細胞を背部皮下接種し、腫瘍浸潤細胞 TIL における T 細胞トロゴサイトーシスを検討した。その結果、TIL CD8 T 細胞は脾臓 T 細胞と比較して、CD80,CD86,CD98 のタンパク質発現が亢進している一方で、CD80,CD86 は mRNA レベルでの発現変化は認められなかった(図 2)。この結果は、癌微小環境においてトロゴサイトーシスを含む新規分子獲得が起こったことを示唆している。そこで、このトロゴサイトーシスにより、新規分子を獲得した T 細胞が免疫応答にどのような影響があるか解析した。TIL CD8 T 細胞をソーティングにより単離し、OT-II マウス脾臓細胞と OVA ペプチド存在下で共培養した。その結果、TIL CD8 T 細胞は OT-II CD4 T 細胞の活性化を抑制することが分かった。(2)の結果により、LFA-1del は抗原依存的トロゴサイトーシスが抑制されることが分かった。そこで、LFA-1del マウスに B16F10 細胞を背部皮下接種し、腫瘍径を経時的に計測した。その結果、野生型マウスと比較して、LFA-1del マウスでは癌の進展が抑制されることが分かった。さらに LFA-1del マウスにおける TIL を解析した結果、CD8 T 細胞における CD80, CD86 の発現が抑制されていることが分かった。この結果は、トロゴサイトーシスにより新規分子を獲得した CD8 T 細胞が、他の T 細胞に対して抑制効果を示し、LFA-1del ではトロゴサイトーシスが抑制されることにより、原発巣における T 細胞活性化が起こり、癌が退縮したことを示唆している。これらの成果の一部は第 50 回日本免疫学会学術集会において発表を行った。

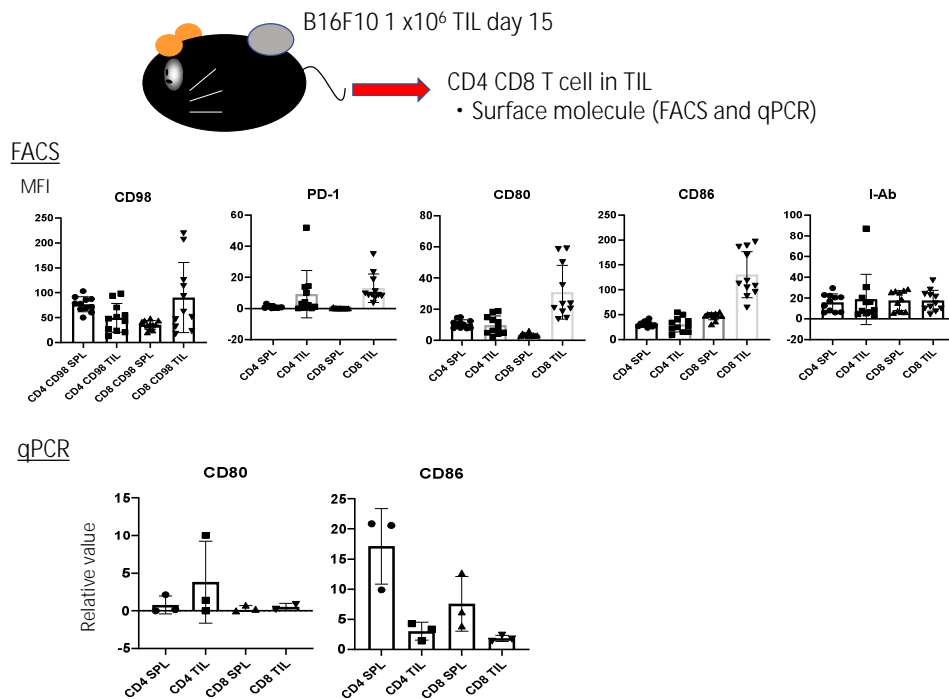


図 2. 癌原発巣浸潤 T 細胞におけるトロゴサイトーシスの検討

B16F10 細胞(1x10⁶ cell)をマウス背部皮下に接種した 15 日後に、Percoll を用いて腫瘍浸潤細胞を単離した。フローサイトメトリーにより CD4,CD8 T 細胞上の表面分子を検討した。また、CD4,CD8 T 細胞をソーティングにより単離後、RNA を抽出し、cDNA 合成の後に、CD80,86 の発現を検討した。その結果、腫瘍浸潤 CD8T 細胞においてタンパク質レベルでは CD80,86,98 の発現上昇が認められた一方で、mRNA レベルでの発現上昇は見られなかった。これは腫瘍浸潤 CD8 T 細胞においてはトロゴサイトーシスを含む新規機能分子を獲得していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 伊藤甲雄、小笠原康悦
2. 発表標題 パラジウムに対する金属アレルギー発症における新規抗原提示機構の解析
3. 学会等名 第73回細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤甲雄、小笠原康悦
2. 発表標題 Contribution of LFA-1 integrin activation in T cell trogocytosis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------