

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16694

研究課題名(和文) 抑制性免疫補助受容体LAG-3によるがん免疫応答制御機構の解析と免疫療法への応用

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of anti-tumor immunity by inhibitory coreceptor, LAG-3

研究代表者

丸橋 拓海 (Maruhashi, Takumi)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：60743961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント分子であるLAG-3は、PD-1とCTLA-4に次ぐがん免疫療法の有力な標的として期待されている。本研究では、がん免疫応答制御へのLAG-3の関与の検証、およびそのメカニズムの解析を行った。本研究を通して、LAG-3が強く寄与するがん免疫マウスモデルを複数樹立することに成功した。それらを用いた解析によって、がん免疫応答においてLAG-3がヘルパーT細胞の活性化を抑制することで間接的に細胞傷害性T細胞の活性化を抑制し、結果としてがんの免疫回避を補助していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヘルパーT細胞による免疫監視機構およびがん細胞がLAG-3を介してその監視機構を回避する新たなメカニズムの一端を明らかにしたものである。また、LAG-3を標的としたヘルパーT細胞活性化制御法、そしてヘルパーT細胞を介したがん免疫応答賦活化という、今までに無い視点のがん免疫療法の開発につながる可能性があり、既存のがん免疫療法に抵抗性のがん腫、患者においても効果を示す可能性があるだけでなく、既存のがん免疫療法と併用することで奏効率の大幅な向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), one of the immune checkpoint molecules, expected as the foremost target next to PD-1 and CTLA-4 in the development of cancer immunotherapy. In this study, I investigated the involvement of LAG-3 in the regulation of immune responses against cancer and tried to elucidate the underlying mechanism. Genetic deletion of LAG-3 exhibited therapeutic effects against tumor growth in several mouse models, which was accompanied by elevated cytokine production from tumor-infiltrating CD4-positive helper T (Th) cells. These results strongly suggest that LAG-3 contributes to immune escape mechanisms in tumors by regulating the activation of tumor-specific Th cells.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫チェックポイント分子 LAG-3 がん免疫 ヘルパーT細胞

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法とは宿主の免疫系を賦活化し、免疫系によるがんの排除を促すことを目的とした治療法である。近年、抑制性免疫補助受容体 PD-1 や CTLA-4 に対する阻害抗体が複数のがんにおいて治療効果を示したことから、がんが宿主の免疫監視から回避する分子機構の一端が明らかとなり、がん免疫療法が大きな注目を集めている。これら免疫チェックポイント阻害剤に加え、樹状細胞ワクチン療法や CAR-T 療法といった免疫細胞療法がすでに FDA に承認されている。さらに、がんワクチン療法や養子免疫細胞療法などの古典的免疫療法についても、大幅な改善が期待される成果が数多く発表されており、基礎・臨床応用の場においてがん免疫研究が精力的に行われていることがわかる。しかしながら、治療効果の個人差や副作用など多くの課題が残されているのが現状であり、未だ発展途上であると言える。

がん細胞を直接攻撃することができる代表的な免疫細胞は CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) であり、上述のがん免疫療法のほとんどが CTL の活性化を目的としたものである。また、CD4 陽性 T 細胞の中に含まれる制御性 T 細胞 (Treg) はがん免疫応答を抑制することが知られており、Treg を除去することでがん免疫応答を促す試みがなされている。一方で、CD4 陽性のヘルパー T 細胞 (Th 細胞) は CTL や B 細胞の働きを補助する役割を持つため、Th 細胞による CTL 補助機能を利用することができれば CTL によるがん免疫応答を相加・相乗的に高められると期待されるが、がん免疫応答における Th 細胞の役割の解析は CTL に比べるとほとんど進んでおらず、実際に Th 細胞を標的としたがん免疫療法が効果を示した例は少ない。

2. 研究の目的

抑制性免疫補助受容体 Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) は CD4 と同様に MHC class II (MHCII) をリガンドとするが、申請者らは LAG-3 が、MHCII と安定な複合体を形成する抗原ペプチドに対する Th 細胞応答を選択的に抑制し、逆に不安定な複合体を形成する抗原ペプチドに対する Th 細胞応答は抑制しない、という非常に特徴的な免疫抑制機構を明らかとしてきた (Maruhashi et al, *Nat Immunol*, 2018)。そのため、LAG-3 を標的とすることで Th 細胞の活性化を特異的に制御できると考えた。本研究では、これまでのがん免疫療法においてあまり注目されてこなかった Th 細胞および LAG-3 に焦点を当て、がん免疫における Th 細胞活性化制御機構の解析、そして Th 細胞の活性化制御による新規がん免疫療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

がん細胞株移植実験において、LAG-3 遺伝子の欠損および LAG-3 阻害抗体投与によって腫瘍増殖抑制が認められることが既にいくつかのグループから報告されているが、その作用メカニズムはほとんど解析されていない。LAG-3 による抑制の標的として CTL が想定されているが、申請者らが最近報告した結果からは LAG-3 阻害による CTL の活性化は Th 細胞の活性化に付随する現象である可能性が高い。そこで本研究では、がん免疫応答において LAG-3 が Th 細胞の活性化を抑制することで間接的に CTL の活性化を抑制し、結果としてがんの免疫回避を補助している可能性を検討した。

(1)がん免疫応答における LAG-3 の関与の検証

がん抗原特異的な Th 細胞応答を解析するために、モデル抗原発現がん細胞株とモデル抗原ワクチンを用いることとした。野生型および LAG-3 遺伝子欠損 C57BL/6 または Balb/c マウスにモデル抗原として HEL または OVA タンパク質を強制発現させた B16、MC38 (C57BL/6)、MethA、CT26 (Balb/c) 等のがん細胞株を皮下移植した後、HEL または OVA タンパク質をアジュバンドとともに複数回皮下投与し、腫瘍の大きさを経時的に計測した。腫瘍浸潤 CTL および CD4 陽性 Th 細胞の活性化マーカーおよびエフェクター分子の発現をフローサイトメトリーによって評価した。

(2)がん免疫応答における Th 細胞の関与の検証

(1)の解析結果より、LAG-3 遺伝子欠損マウスにおける腫瘍増殖抑制、または腫瘍浸潤 T 細胞の活性化亢進が効率よく認められるモデル抗原発現がん細胞株、モデル抗原ワクチンおよびアジュバンドの組み合わせを選別し、検証に用いた。抗 CD8 抗体または抗 CD4 抗体投与による CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞の除去を行い、腫瘍の増殖に与える影響を評価することでがん免疫応答への Th 細胞の関与を検証した。

4. 研究成果

(1)がん免疫応答におけるLAG-3の関与の検証

モデル抗原、がん細胞株の種類・組み合わせについて検討したところ、LAG-3 遺伝子欠損マウスにおいて複数のモデル抗原発現がん細胞株の増殖が有意に遅延あるいは抑制されたことから、LAG-3 阻害によってがんワクチンの効果が増強されることが明らかとなった。一方、ワクチン投与無しの条件においてLAG-3 遺伝子欠損による腫瘍増殖の有意な抑制が認められるがん細胞株は稀であった。

次に、腫瘍浸潤 CD4 陽性 Th 細胞についてフローサイトメトリーによって解析したところ、LAG-3 遺伝子欠損マウスにおいて、CTL の活性化に重要とされている IFN- γ を産生する Th1 細胞が野生型に比べて有意に増加していることを見出した。これらの結果から、がん免疫応答においてLAG-3 がTh細胞の活性化を抑制することで、間接的にCTL等による抗腫瘍免疫応答を間接的に抑制していることが示唆された。

(2)がん免疫応答におけるTh細胞の関与の検証

(1)の解析を通して、LAG-3 によるがん免疫応答制御が顕著に認められる複数の実験系を確立することに成功した。これら実験系において抗 CD8 抗体を投与すると、過去の報告の通り、がん細胞を直接攻撃する CTL が除去されてしまったことによる腫瘍の顕著な増大が認められた。一方で、抗 CD4 抗体投与による CD4 陽性 T 細胞の除去を行ったところ、期待に反して腫瘍の顕著な退縮が認められた。これはがん免疫応答を強力に抑制する CD4 陽性 Treg も同時に除去されたためであると考えられ、がん免疫応答における Th 細胞の関与を検証することができなかった。現在、野生型およびLAG-3 遺伝子欠損 Th 細胞の移入を行うことで、がん免疫応答におけるLAG-3 およびTh細胞の機能解析を行うことを計画している。

今後、LAG-3 阻害抗体とTh細胞を標的としたがんワクチンを用いて、Th細胞活性化を介した抗腫瘍効果の増強の可能性を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 8
2. 論文標題 LAG-3: from molecular functions to clinical applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001014 ~ e001014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-001014	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 -
1. 著者名 Shimizu Kenji, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maruhashi Takumi, Takegami Yujiro, Cheng Chaoyang, Ozaki Soichi, Okazaki Taku	4. 巻 77
2. 論文標題 PD-1 Imposes Qualitative Control of Cellular Transcriptomes in Response to T Cell Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 937 ~ 950.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.12.012	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 Maeda Natsumi, Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 294
2. 論文標題 Glucocorticoids potentiate the inhibitory capacity of programmed cell death 1 by up-regulating its expression on T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19896 ~ 19906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010379	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 Okamura Hikari, Okazaki II-mi, Shimizu Kenji, Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Mizuno Reina, Okazaki Taku	4. 巻 105
2. 論文標題 PD-1 aborts the activation trajectory of autoreactive CD8+ T cells to prohibit their acquisition of effector functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102296 ~ 102296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2019.06.007	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 -

1. 著者名 Mizuno Reina, Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Maruhashi Takumi, Watada Mizuki, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00630	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 -

1. 著者名 Sugiura Daisuke, Maruhashi Takumi, Okazaki II-mi, Shimizu Kenji, Maeda Takeo K., Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 364
2. 論文標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 558 ~ 566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aav7062	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 Mizuno Reina, Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Watada Mizuki, Okazaki II-mi, Okazaki Taku	4. 巻 511
2. 論文標題 PD-1 efficiently inhibits T cell activation even in the presence of co-stimulation through CD27 and GITR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 491 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.004	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 Maeda Takeo K., Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maruhashi Takumi, Okazaki Taku	4. 巻 294
2. 論文標題 Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6017 ~ 6026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007455	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 1件）

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Ii-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Suzuka Takahashi, Takeo K. Maeda, Kenji Shimizu, Taku Okazaki
2. 発表標題 LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII
3. 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Jun Ikubo, Daisuke Sugiura, Ii-mi Okazaki, Taku Okazaki
2. 発表標題 Binding properties between LAG-3 and two potential ligands, stable pMHCII and FGL1
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------