

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18041

研究課題名（和文）免疫寛容を伝承する分子機構の解明—TIGIT-CD155シグナル伝達を軸として—

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanism for serial transmission of tolerant status of T cells -Role of CD155 transducing signaling mediated by TIGIT-

研究代表者

根岸 尚子（NEGISHI, Naoko）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：40784294

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗原特異的抑制性T細胞の伝達機構解明のため、TIGIT-CD155シグナルに焦点を当てて解析を行った。その結果、CD3/CD155シグナルを受けたT細胞は、（1）初期にIL-2の産生が一過性に亢進され、autocrine的にIL-2/IL-2R - STAT5経路を経て、下流のIL-2発現抑制遺伝子を誘導し、IL-2を抑制する事（2）亢進したIL-2に依存してTIGITの発現が上昇することを見出した。さらに、移入したTIGIT発現抑制性T細胞がレシピエントT細胞の活性化を抑制することを明らかにし、TIGIT発現維持解析に有効な抑制性T細胞移入マウスモデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抑制性T細胞のTIGITの発現維持の証明が今まで困難であったin vitro及びin vivo系の両方を使った検証が可能となった。さらに、本研究成果は今まで不明であった免疫記憶の成立と維持機構の解明といった免疫発生学分野に重要な知見をもたらす。

本研究により、TIGIT-CD155シグナルが免疫抑制機能を伝達に重要であることが明らかになったことで、TIGIT-CD155をターゲットとした移植片に対する寛容誘導に関する細胞治療や診断法の開発、アレルギーや自己免疫疾患の治療開発にも重要な知見と情報をもたらす。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated how CD155-mediated signaling induce TIGIT expression in stimulated naive T cells, leading to suppressive function, based on the expression status of TIGIT, key molecules of “infectious tolerance”. we showed, CD3/CD155 double ligated T cells through IL-2/IL-2R - STAT5 axis by rapid expression of IL-2 which leads to the induction of downstream IL-2 expression inhibitory genes, resulting in IL-2 down regulation. Additionally, we found that the upregulation of TIGIT expression in CD3/CD155 double ligated T cells occurs through rapid expression of IL-2.

We transferred TIGIT highly expressed on the tolerant T cells into recipient mouse, result in T cells from recipient mice were suppressed IL-2 expression.

Currently, We are going to confirm that the newly enhanced TIGIT is substantially from the past TIGIT expressing cells or newly stimulated and proliferated cells by using a reporter mouse strain taking advantage of TIGIT promoter-driven Cre recombinase.

研究分野：免疫学

キーワード：TIGIT トランスの伝承 抗原特異的免疫寛容 IL-2/IL-2レセプター CD155

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫現象の基盤は免疫系が認識・反応した抗原に、次回出会った時に迅速かつ効率良く活性化されて反応することに立脚している。この現象は“免疫学的記憶”とよばれ、ワクチンをはじめとする予防医学貢献に向けた研究の基盤となっている。しかし、“免疫学的記憶”をいかにして維持しているのかという基本課題は、十分に明解にされているとは言い難い。一方、免疫系細胞には抗原刺激反応を抑制する機能も備わっており、近年はその主たる役目を担当している細胞として制御性T細胞(Treg細胞)と反応抑制に関わる分子群が同定されている(Sakaguchi et al. J Immunol.1995, Okazaki et al. Curr Opin Immunol. 2002)。しかし、Treg細胞の誘導過程における抑制機能の維持や記憶に関しては多くの不明な点が残されている。このような背景により、抑制性“免疫学的記憶”の維持がいかにして行われているのかは依然として不明である。この機序解明のために、申請者らは“infectious tolerance”という概念に注目した。この概念は、抑制機能を持つT細胞は新しく抗原刺激を受けたナイーブ細胞の活性化をドミノ的に抑制して、次々に次世代の免疫不応答性を持つ細胞を誘導するというものである(Gershon et al. Immunology 1971, Qin et al. Science 1993)。この概念の機序を細胞・分子レベルで証明するため、申請者らは、“infectious tolerance”を再現するin vitro実験系を世界で初めて確立した(Negishi et al. ImmunoHorizons, 2018)。この実験系を用いた結果、抗原刺激を受けたナイーブT細胞を、すでに抗原刺激に対する反応が抑制されている(トレランス状態になっている)T細胞と共培養すると、ナイーブT細胞自身はトレランスになるだけでなく、新たな次世代のナイーブT細胞の活性化を抑制する機能を獲得する事を明らかにした。さらに、この抑制機能の伝承に重要な働きをする分子群の一つとしてTIGITを初めて同定した。TIGITは新しい免疫チェックポイント分子の一つとして注目されている分子で(Dougall WC et al. Immunol. Rev. 2017)、抗原刺激歴を持つT細胞の表面に発現する抑制性レセプターとして知られている。樹状細胞表面やがん細胞上に発現するTIGITのリガンドであるCD155と結合し、TIGIT下流に負のシグナルを伝える事でT細胞活性化を抑制すると報告されている。一方最近の報告では、CD155は抗体によるcross-linkにより活性化T細胞内にシグナルを伝達得ることが示され、TIGITのリガンドとしてだけでなくレセプターとしても機能することが示唆されている(Kanamaru et al. J Immunol.2016)。申請者らも、CD155を介したシグナルが抗原刺激歴T細胞にTIGIT発現を亢進させることを見出している。

以上に基づいて、本研究課題において、特にT細胞の抑制機能が伝承及び維持される機序を解明するためには、TIGIT-CD155を軸に、従来のCD155 TIGIT方向のシグナル伝達とは逆のTIGIT CD155方向によるT細胞のシグナル伝達機構の解明に焦点を当てて、CD155下流シグナルにおけるTIGITの転写制御及びT細胞活性化抑制に関わる分子を明らかにする事が、重要かつ有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、以上の学術的背景のもとに、“infectious tolerance”という概念に基盤を於いて、抑制性T細胞の誘導・その後の抑制免疫記憶と維持の分子機構を明らかにし、移植組織片生着に向けた治療発展の一助となる事を目指した。そのため本研究ではTIGIT CD155方向によるT細胞のシグナル伝達機構解明のため、CD155下流シグナルにおけるTIGITの転写制御及びT細胞活性化抑制に関わる分子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、研究期間内に以下の研究を実施した。

(1) TIGIT CD155シグナルによるTIGIT発現と抑制機能獲得の検証

TIGITがナイーブT細胞膜表面上のCD155を介して抑制機能を誘導する可能性について、よりsimplyfyしたin vitro実験系を用いて解析をおこなった。具体的には、抗CD155抗体と抗CD3抗体を用いてT細胞を共刺激し、TIGITを含む細胞表面分子、遺伝子発現及び、サイトカイン発現の経時的变化をFACS解析、及びリアルタイムPCRで比較した。

(2) in vivoにおけるTIGIT高発現抑制性T細胞の効果

この研究にはOVAを認識するTCRのみを持つT細胞クローンマウス(OVA-TCR-Tg)と前者と識別が可能なOVA-TCR-Tgかつ全身にGFPを発現するマウス(GFP-OVA-Tg)を用いる。GFP-OVA-Tgマウスの脾臓細胞より、OVA特異的TIGIT高発現抑制性T細胞をex vivoで誘導し、得られた細胞(GFP陽性)をレシピエントと識別可能なOVA-TCR-Tg(GFP陰性)マウスに移入し、移入後OVA/Alumを腹腔に投与し免疫した。2週間及び2ヶ月後にマウスの脾臓細胞を採取した。得られた脾臓細胞におけるドナー細胞の有無及びT細胞の活性化能についてOVAで再刺激し、T細胞のサイトカイン及び発現分子について、リアルタイムPCR及びFACSにて解析した。

(3) TIGIT発現フェイトマッピングマウスの作成

TIGITの発現維持機構解明に有用なTIGIT発現フェイトマッピングマウス作出するため、Tigitプロモーター制御化でCreを発現するマウス(TIGITiCre)マウスを作成した。

4. 研究成果

(1) TIGIT CD155 シグナルによる TIGIT 発現と抑制機能獲得の検証

CD155/CD3 共刺激を受けた T 細胞は IL-2 の初期発現亢進とそれに続く強力な抑制を誘導する。TIGIT がナイーブ T 細胞膜表面上の CD155 を介して抑制機能を誘導する可能性について、より simplyfy した *in vitro* 実験系を用いて解析をおこなった。そこで、CD3/CD155 刺激を受けた T 細胞が抑制的に働く機序を IL-2 発現を指標にして解析した。その結果、ナイーブ CD4T 細胞が CD3 と CD155 抗体により共刺激を受けると、CD3 単独で刺激を受けた T 細胞に比べ、非常に初期の刺激段階（培養開始 4 時間後）で IL-2 発現の一時的な増加を示した。その後、24~48 時間後をピークに急激に IL-2 の遺伝発現が減少した。IL-2 mRNA 発現亢進に相関して、培養上清中の IL-2 cytokine 濃度の順次亢進し、その後減少した（図 1）。

IL-2 の抑制メカニズムとして、IL-2 は自身の発現する IL-2 レセプター（IL-2R）と結合することによって、オートクライン的に TCR 刺激 T 細胞の下流にシグナルを伝達することが知られ、その経路に関しても過去多数の報告がされている。その 1 つで広く受け入れられているのが、Jak/STAT 経路による signaling pathway である。そこで、TCR 刺激後の T 細胞の STAT5 の活性化状態を解析した。その結果、STAT-5 のリン酸化は IL-2 存在化で、TCR 刺激後 30 分で検出された。その後 4 時間以降はほぼ同等となった。さらに、CD3+CD155 抗体による共刺激を行った T 細胞では、STAT-5 の活性化は CD3 抗体単独刺激に比べ早期にリン酸化していた。さらに、STAT5 の標的遺伝子である CD25、Blimp1 といった IL-2 発現をレギュレートする分子が高度に発現していた。以上の結果から、CD155/CD3 共シグナルを受けて IL-2 発現亢進を誘導された T 細胞は autocrine 的に IL-2R との interaction により STAT-5 リン酸化を経て、下流の IL-2 発現抑制遺伝子の誘導を亢進し、その結果 IL-2 が培養後半に低下したことが示唆された。

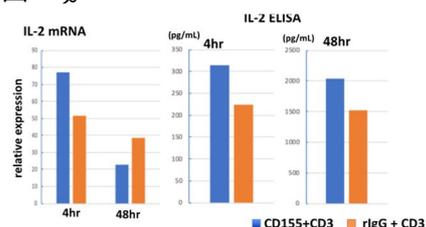


図1. CD155/CD3 共刺激T細胞のIL-2の発現及び産生

CD155/CD3 共刺激を受けた T 細胞は IL-2 の発現に依存して TIGIT を発現する。

TIGIT 遺伝子が IL-2 発現量に依存した STAT-5 の標的として発現亢進するかを解析するために、両者の発現を継時的に比較解析した。CD3/CD155 の double ligation により CD155 共刺激を受けた T 細胞では、CD3 単独刺激に比し TIGIT 発現は刺激直後から漸次亢進し（図 2）、その経緯は前出の IL-2 発現及び SUP 中の IL-2 cytokine 濃度（図 1）の亢進と相関していた。

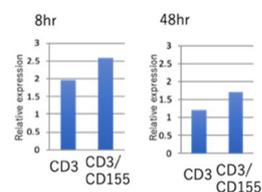


図2. CD155/CD3刺激後のT細胞のTIGITmRNA発現

(2) *in vivo* における TIGIT 高発現抑制性 T 細胞の効果

・移入した TIGIT 発現抑制性 T 細胞は、レシピエント T 細胞の活性化を抑制する。

in vitro 実験系で誘導された抑制機能を伝承する TIGIT 高発現抑制性 T 細胞の *in vivo* での効果について検討した。その結果、抗原特異的に TIGIT を高発現する抑制性 T 細胞を移入後、レシピエントマウスの T 細胞の反応を観察できる抑制性 T 細胞移入マウスモデルを樹立することができた。そのマウスを用いて解析すると、TIGIT を高く発現する抑制機能を持つ細胞を移植したマウスのレシピエント T 細胞は抗原再刺激による反応が抑えられるのみならず、マウス内に移植した TIGIT 高発現ドナー抑制性 T 細胞が長期にわたり生存していた。以上の事から、抑制能伝承機能を持つ抑制性 T 細胞は長期に生存する事で再び抗原刺激が加わった際、抗原特異的な抑制機能を次世代ナイーブ細胞に抑制機能を伝達する可能性が示唆された。

(3) TIGIT 発現フェイトマッピングマウスの作成

前述した (1) の結果は、一旦 TIGIT 発現が低下した細胞に TIGIT が再発現したのか、TIGIT 発現維持細胞が再度の刺激で（特に IL-2 発現亢進で）増加したのか。あるいは、新たに naïve T 細胞から TIGIT が発現したのか、を証明できない。また (2) の結果から得られた、移植可能な TIGIT 発現抑制性 T 細胞が TIGIT が高発現のまま長期に生存が可能なのが明らかでないため、TIGIT 発現を経験をした T 細胞の運命の追跡が可能となる TIGIT 発現フェイトマッピングマウスを作成した。まず、Cre-loxP システムを利用した、TIGIT-iCre マウスを作成し、理研 BRC より入手した、Rosa26-Dsred レポーターマウス（Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-EGFP/tDsRed)Utr>/Rbrc）と交配した。得られたマウスの脾臓細胞の CD4T 細胞より、Dsred 陰性の CD4 T 細胞を CD3+CD155 抗体による共刺激しフローサイトメーターで確認したところ、TIGIT を細胞表面に発現した細胞は赤色のレポーター遺伝子（Dsred）由来の色素を発現する細胞となった。これにより、TIGIT プロモーター制御下でレポーター遺伝子を発現することが確認できた。また、このマウスの脾臓には Dsred 陽性の T 細胞が少量であるが存在しており、この細胞の一部は細胞膜表面に TIGIT を発現していないことから、マウスの脾臓 CD4 T 細胞には過去に TIGIT を発現し、その後に細胞膜表面の発現を消失した細胞（ex-TIGIT CD4T 細胞）が存在することが明らかとなり、現在これらの細胞の詳細を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhu J, Inomata T, Nakamura M, Fujimoto K, Akasaki Y, Fujio K, Yanagawa A, Uchida K, Sung J, Negishi N, Nagino K, Okumura Y, Miura M, Shokirova H, Kuwahara M, Hirosawa K, Midorikawa-Inomata A, Eguchi A, Huang T, Yagita H, Habu S, Okumura K, Murakami A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-CD80/86 antibodies inhibit inflammatory reaction and improve graft survival in a high-risk murine corneal transplantation rejection model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4853-4583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08949-9	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 Zhu Jun, Inomata Takenori, Fujimoto Keiichi, Uchida Koichiro, Fujio Kenta, Nagino Ken, Miura Maria, Negishi Naoko, Okumura Yuichi, Akasaki Yasutsugu, Hirosawa Kunihiko, Kuwahara Mizu, Eguchi Atsuko, Shokirova Hurrarnhon, Yanagawa Ai, Midorikawa-Inomata Akie, Murakami Akira	4. 巻 62
2. 論文標題 Ex Vivo Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.7.3	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 Shino Uchida, Kumi Izawa, Tomoaki Ando, Hiromichi Yamada, Koichiro Uchida, Naoko Negishi, Ayako Kaitani, Akie Maehara, Masakazu Nagamine, Anna Kamei, Ayako Takamori, Keiko Maeda, Nobuhiro Nakano, Toshiaki Shimizu, Hideoki Ogawa, Ko Okumura, Akihito Nagahara, Sumio Watanabe, Jiro Kitaura	4. 巻 75(2)
2. 論文標題 CD300f is a potential therapeutic target for the treatment of food allergy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 471-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14034	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 Inomata T, Fujimoto K, Okumura Y, Zhu J, Fujio K, Shokirova H, Miura M, Okano M, Funaki T, Sung J, Negishi N, Murakami	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Novel immunotherapeutic effects of topically administered ripasudil (K-115) on corneal allograft survival.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76882-w.	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根岸尚子, 内田浩一郎, 渋谷和子, 北浦次郎, 奥村康、垣生園子
2. 発表標題 Suppressive function in TIGIT+ iTreg cells is serially transmitted into newstimulated T cells via CD 155 signaling with recall of TIGIT expression.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根岸尚子、佐藤健人、渋谷和子、内田浩一郎、亀谷美恵、北浦次郎、奥村康、垣生園子
2. 発表標題 TIGIT plays a critical role as a ligand for inducing CD155 mediated suppressor potential to be tolerance
3. 学会等名 第 50 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根岸尚子、佐藤健人、金丸由美、渋谷和子、内田浩一郎、亀谷美恵、奥村康、垣生園子
2. 発表標題 Tolerant status of T cells via TIGIT-CD155 axis is transferable in vivo
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸尚子, 垣生園子
2. 発表標題 免疫寛容を伝達する分子機構 - CD4+ T 細胞の抑制機能の伝承はTIGIT CD155経路を介する -
3. 学会等名 第29回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸尚子
2. 発表標題 “ Infectious suppression ” の機序-TIGIT->CD155シグナルを介して伝承されるT細胞の抑制機能は生体内でも誘導される-
3. 学会等名 第34回 自己免疫研究会
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
---------	---------