

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22545

研究課題名（和文）分子の高さが規程する免疫チェックポイント分子TIGITのシグナルソーム形成と機能

研究課題名（英文）Signalosome formation and functions of the immune-checkpoint receptor TIGIT regulated by the height of its ectodomain.

研究代表者

横須賀 忠 (Yokosuka, Tadashi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：10359599

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）：第3のチェックポイント分子TIGITの分子イメージング解析を通して、免疫受容体の高さが受容体の細胞表面の分布を決定し、免疫細胞の活性化を担うシグナル伝達の単位「シグナルソーム」を制御することを明らかにした。特にTIGITは、リガンドであるCD155との結合を巡り、同じ抑制性受容体CD96と競合するものの、それぞれ別のシグナルソームとして機能することが分かった。この結果は、構造の違いが生理活性を直接制御するという新たな概念である。また、分子間の高さの違いを利用し、免疫チェックポイント分子間で、協調的にも反発的にも機能させる方法論の創出が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント療法はがんの第四の標準療法としての地位を確立するに至ったが、作用機序に関する知見は非常に乏しい。一方がん免疫の主役であるT細胞においても、TCRと副刺激受容体がどのようにがん抗原の認識やエフェクター細胞への分化誘導を制御しているのか明確に説明できていない。免疫シナプスの固定概念を破った、受容体の高さがその分子の細胞表面局在とクラスター形成さらには機能に直結すること、シグナル伝達の解釈には免疫シナプスとは異なる時間と空間の因子が不可欠であるという新たな概念の提唱し、治療的への応用の観点からも社会性が高い。

研究成果の概要（英文）：Through molecular imaging analysis of the third checkpoint molecule “TIGIT”, we clarified that the height of the immune receptor determines the distribution of the receptors on cell surface and controls the signal unit “signalosome” responsible for the activation of immune cells. In particular, TIGIT competes with the same inhibitory receptor CD96 for binding to the ligand CD155, but they function as independent signalosomes. The result here is a new concept that structural differences directly control biological outputs. In addition, by utilizing the difference in height between molecules, it has become possible to create a methodology that makes immune checkpoint molecules function in a cooperative or competitive manner.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞シグナル 腫瘍免疫 分子イメージング 免疫シナプス 免疫チェックポイント 副刺激受容体
シグナルソーム TIGIT

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2018年度のノーベル医学生理学賞受賞以来、免疫チェックポイント分子阻害 (ICB) 療法の抗腫瘍効果はこれまでの免疫療法の曖昧さを払拭し、瞬く間にがんの標準療法としての地位を確立するに至った。しかし、あまりにも臨床への適応が急がれたため、その効果や副作用の詳細はデータとして蓄積される一方、免疫賦活作用機序、投与適正量と併用療法の検討、他の ICB 薬との併用など、作用機序に関する詳細な知見は皆無である。その理由として、免疫チェックポイント分子いわゆる「T 細胞の抑制性副刺激受容体」は受容体とそのリガンドも免疫細胞の種類によって、またその活性化とがん微小環境の変化によって刻々と発現と分布が変化することであり、それらが複雑にネットワークを構築しながら免疫制御に関わっている点にある。また「副刺激であるがゆえに、主となる T 細胞受容体 (TCR) シグナルとの差別化が非常に難しく、独自のシグナル伝達系があるのか解析の難易度も高い。

2. 研究の目的

免疫受容体の高さが受容体の細胞表面の分布を決定し、免疫細胞の活性化を担うシグナル伝達の単位「シグナロソーム」を制御する、つまり構造の違いが生理活性を直接制御する新たな概念の創出を目的としている。この仮説を証明するための研究対象として、第 4 のチェックポイント分子 T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) を標的とし、TIGIT は CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) とナチュラルキラー (NK) 細胞に発現しているが、PD-1 や CTLA-4 が TCR や CD28 シグナルを標的としている一方 TIGIT の抑制の標的は不明である。リガンドとして CD155 を有し、一方、CD155 をリガンドとしてもつ T 細胞副刺激受容体には活性化型の DNAM-1 と抑制性の CD96 の 2 つが知られている。これらの分子がどのように同じリガンドを介して T 細胞制御に関わるか、さまざまな報告がなされている。矛盾点を含めたこの違いを説明するには、分子の高さの違いが免疫細胞のシグナル伝達機能を直接制御するという全く新しい概念の提唱が必要であり、分子の高さを調節することで TIGIT を中心として複数の活性化と抑制性の機能をもつ受容体およびリガンドが副刺激受容体ネットワークを制御し、より効率的な腫瘍効果を持つ方法論に結び付ける新規性の高い概念の創出を目指す。

3. 研究の方法

CTL および NK 細胞のシグナルソームの可視化には、既存の生化学的および生理学的手法を併用しながら、主に超解像顕微鏡と抗原提示が可能な人工平面脂質二重膜 (SLB) の融合実験システムを用いた。デバイスの顕微鏡として、HyD を搭載した共焦点レーザー顕微鏡 Leica SP8 と超解像ユニット N-SIM を搭載した全反射蛍光顕微鏡 Nikon TIRFM を用いた。SLB 上には、TIGIT リガンドである CD155 の細胞外領域に、ヒト CD55 の GPI アンカーモチーフを付加したタンパク質精製したリガンドを載せ、他 MHC 接着分子 ICAM-1 と共に用いて解析に使用した。可視化のツールとして EGFP 等の蛍光タンパク質および HaloTag や SNAP Tag を使い、随時 1 分子イメージングに適応させた。得られたイメージングデータは生化学生理学解析の結果と照合し、生物学的意味づけを検討し、ICI 療法の実臨床の現象を説明するメカニズムを考察した。

4. 研究成果

(1) SLB 上の CD155 の発現に伴い、それを上から接着した T 細胞上の TIGIT はクラスター形成した (図 1)。TIGIT のクラスターは、特異的抗原ペプチドを載せた MHC と TCR との結合で誘導される TCR マイクロクラスターと

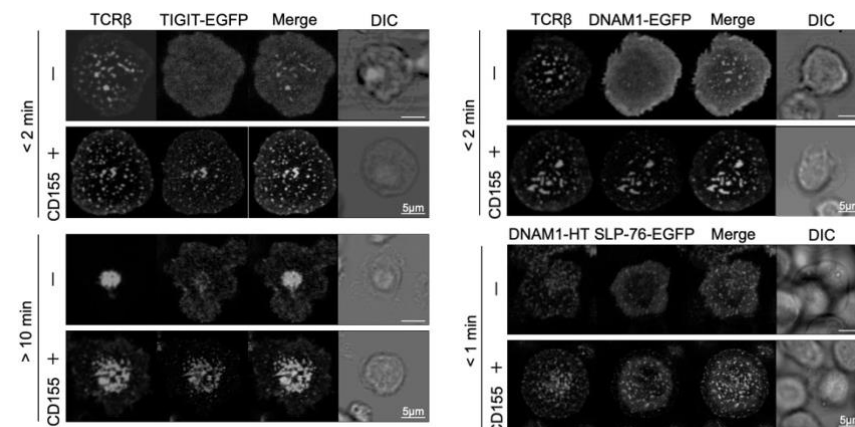


図1 CD155との結合により形成されるTIGITマイクロクラスター

図2 CD155との結合により形成されるDNAM-1マイクロクラスター

同一部位に形成され、T 細胞と SLB との接着面、いわゆる免疫シグナルソームの中心へと 10 分を経過しながら移動した。この TIGIT の挙動は通常の T 細胞の副刺激分子 CD28 や PD-1 と変わりなかった。これまで TIGIT で働く機能分子としてアダプター分子 Grb2 と β -arrestin2 の 2 系統による SHIP1 の活性化が報告されているが、同上の SLB による観察では β -arrestin2 のリクルートは認めず、一方 Grb2 と SHIP1 の TIGIT-CD155 結合による増強効果が認められた。生化学的解析から知られていた経路が、分子の量的解析からは Grb2 優位な TIGIT 抑制シグナルが示唆された。

(2) (1)と同様に CD155 を発現させた SLB を用いて活性型副刺激受容体 DNAM-1 の挙動を観察した。SLB 上の CD155 ありの場合にのみ、T 細胞上の DNAM-1 は TCR と共にマイクロクラスターとなり、10 分後には免疫シナプスの中心へと移動した (図 2)。DNAM-1 の下流で働く機能分子 PI3K と SLP-76 を、同上の SLB を用いた検証したところ、SLP-76 のみ DNAM-1 のクラスタリングに同期してより明確な凝集を示し、DNAM-1 シグナルの SLP-76 の優位性が示された。

(3) (1)(2)と同様に CD155 を発現させた SLB を用いて抑制性副刺激受容体 CD96 の挙動を観察した。SLB 上の CD155 ありでも CD96 はクラスターを形成せず、むしろ TCR マイクロクラスターから排除され、その他の接着面に一様に分布した (図 3)。一方、細胞-細胞接着を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、CD96 は抗原提示細胞 APC の CD155 発現依存的に T-APC 間に集まっていることから、クラスターは形成しないものの免疫シナプス形成と T 細胞シグナルには寄与していることが考えられた。

(4) (1)-(3)の条件にて CD155 の SLB 上分子密度を変化させた際の TIGIT と DNAM-1 と CD96 とのリガンド CD155 結合を巡る競争をそれぞれの DNAM-1 マイクロクラスター形成から評価した。TIGIT も CD96 も存在しない条件では、CD155 の分子密度が 30 分子/ μm^2 でも DNAM-1 はクラスターを形成したが、TIGIT および CD96 のどちらかが発現していると DNAM-1 は凝集することができなかった (図 4)。次に、CD155 の SLB 上分子密度を変化させた TIGIT と DNAM-1 の競争を、TIGIT マイクロクラスターを観察することで検討した。CD155 の分子密度が 62 分子/ μm^2 までは TIGIT のクラスター形成は認められなかったが、125 分子/ μm^2 では DNAM-1 なしの場合にのみ TIGIT のクラスターが観察された (図 5)。以上の実験から 3 分子の CD155 との親和性を算出すると、これまでの報告とは異なり DNAM-1 > TIGIT > CD96 の順番であった。故に、抑制性副刺激受容体による DNAM-1 のシグナル抑制は比較的弱いと考えられる。

(5) CD155 を発現している SLB 上で、DNAM-1 と TIGIT と CD96 の同時イメージングを行うと、(1)-(3)で示された通り、TCR と共局在する DNAM-1 と TIGIT、それから分画された CD96 に明瞭に局在を異にする。このことから、抑制性副刺激受容体として TIGIT の機能には TCR と DNAM-1 からの活性化シグナルとの黒ストームによる直接的抑制作用が、また CD96 は CD155 との親和性は弱いながらも分子数の多さから CD155 を奪取する競合作用が根本的な抑制機序であると考えられる。

(6) CD96 のみ TCR マイクロクラスターから排除される(3)の結果を参考に、その原因が CD96 の高さ (3つの細胞外ドメイン V1-V2-C と糖鎖修飾を受ける長い Stalk 部位) にあると考え、CD155 との結合能を有する V1 ドメインを残し、3つの欠損 CD96 を作成した (V1-V2-C-Stalk 野生型、V1-V2-C、V1-V2)。CD155 との結合により CD96 野生型および変異体のうち、V1-V2-C は野生型のように拡散することなく、軽度のクラスター形成を示したが、V1-V2 は明瞭なクラスターとなった。TCR マイクロクラスターとも同じ局在を示した。受容体がどこにクラスター形成をするかは、それぞれの受容体下流の共通したシグナルソームによるインサイドアウトシグナルではなく、受容体の高さ (大きさ) が規定因子であった。さらに共局在は受容体とリガンドとの親和性により決定され、完全にマージする受容体同士と近接する分子と、また完全に分画される分子に大別される。故に、右図に示されるとおり、副刺激受容体の作用機序を人為的に操作するには、親和性以外にも高さがあり、ICB やキメラ抗原受容体開発に有用なエンジニアリングできる因子と考える。

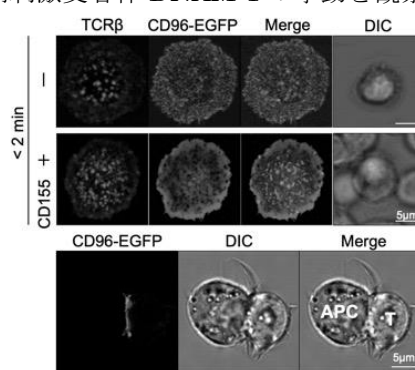


図3 CD155との結合により免疫シナプスに集まるCD96はマイクロクラスターを形成しない

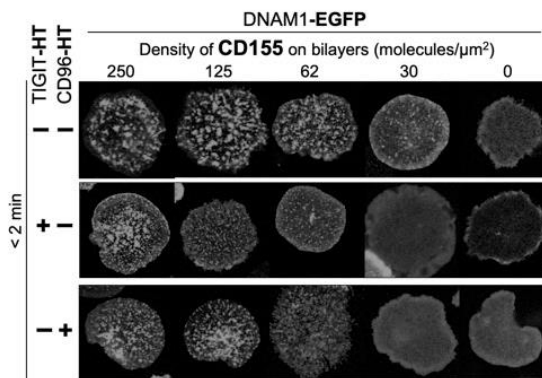


図4 CD155結合を巡るTIGITとCD96の競争

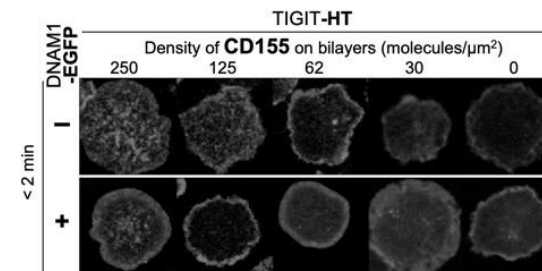
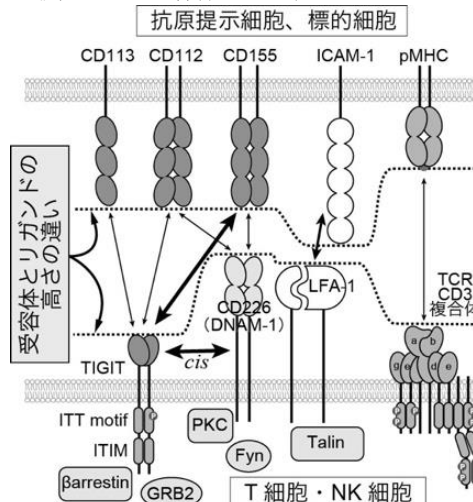


図5 CD155結合を巡るTIGITとDNAM-1の競争



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomohiro Takehara, Ei Wakamatsu, Hiroaki Machiyama, Wataru Nishi, Katsura Emoto, Miyuki Azuma, Kenzo Soejima, Koichi Fukunaga, Tadashi Yokosuka	4. 巻 4
2. 論文標題 PD-L2 suppresses T cell signaling via coinhibitory microcluster formation and SHP2 phosphatase recruitment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02111-3.	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 -

1. 著者名 Wataru Nishi, Ei Wakamatsu, Hiroaki Machiyama, Ryohei Matsushima, Kensho Saito, Yosuke Yoshida, Tetsushi Nishikawa, Tomohiro Takehara, Hiroko Toyota, Masae Furuhashi, Hitoshi Nishijima, Arata Takeuchi, Miyuki Azuma, Makoto Suzuki, Tadashi Yokosuka	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of therapeutic PD-1 antibodies by an advanced single-molecule imaging system detecting human PD-1 microclusters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Communications	6. 最初と最後の頁 3157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-38512-7.	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 12件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横須賀忠、若松英、西嶋仁、竹内新、竹原朋宏、西航、西川哲史、Maksim Mamokin、Malcolm K Brenner、町山裕亮
2. 発表標題 分子イメージングによるT細胞活性化機構の解明とがん免疫
3. 学会等名 第61回日本リンパ網内系学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横須賀忠、若松英、西嶋仁、竹内新、竹原朋宏、西航、西川哲史、Maksim Mamokin、Malcolm K Brenner、町山裕亮
2. 発表標題 CAR-T細胞の抗原認識と活性化を担うCARマイクロクラスターの分子イメージング解析
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若松英、町山裕亮、豊田博子、古畑昌枝、西嶋仁、竹内新、横須賀忠
2. 発表標題 LAG-3発現CD4+ T細胞はMHC class IIのトロゴサイトーシスを介して間接的にCD4+ T細胞の活性化を抑制する
3. 学会等名 第30回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Machiyama, Ei Wakamatsu, Masae Furuhata, Hiroko Toyota, Mamonkin Maksim, Brenner Malcolm K, Tadashi Yokosuka
2. 発表標題 The kinase Lck activate CAR-T cells independently upon co-receptor association.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishi Wataru, Ei Wakamatsu, Nishiakwa Tetsuji, Takehara Tomohiro, Toyoda Hiroko, Furuhata Masae, Hiroaki Machiyama, Nishijima Hitoshi, Azuma Miyuki, Suzuki Makoto, Tadashi Yokosuka
2. 発表標題 Establishment of a molecular imaging system to evaluate the T cell exhaustion releasing function of human PD-1/PD-L1 antibodies.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ei Wakamatsu, Hiroaki Machiyama, Hiroko Toyota, Masae Furuhata, Hitoshi Nishijima, Arata Takeuchi, Tadashi Yokosuka
2. 発表標題 LAG-3-mediated trogocytosis of MHC class II indirectly regulates CD4+ T cell activation
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitoshi Nishijima, Arata Takeuchi, Ei Wakamatsu, Wataru Nishi, Hiroaki Machiyama, Tadashi Yokosuka
2. 発表標題 Human T cells illustrate TCR microclusters by triggering with bispecific antibodies, blinatumomab
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Machiyama H, Wakamatsu E, Yokosuka T
2. 発表標題 Role of cytoskeleton in Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横須賀忠
2. 発表標題 分子イメージングが拓くT細胞活性化機構の解明とがん免疫療法
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹原朋宏, 若松英, 町山裕亮, 副島研造, 福永興壱, 横須賀忠
2. 発表標題 分子イメージングによるPD-1-PD-L2を介するT細胞抑制機構の解明
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 町山裕亮, 若松英, 秦喜久美, 矢那瀬紀子, 竹原朋宏, 西航, Mamonkin M, Brenner MK, 横須賀忠
2. 発表標題 Visualizing of neo-self phenomena in chimeric antigen receptor (CAR)-T cells.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 町山裕亮, 若松英, 矢那瀬紀子, 横須賀忠
2. 発表標題 一分子動態解析法を用いたT細胞活性化におけるシグナルソームの時空間的制御機構の解明～簡単・簡便なキメラ抗原受容体CAR-T細胞療法に向けて～
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takehara T, Wakamatsu E, Machiyama H, Yanase N, Hata K, Toyoda H, Furuhashi M, Yasuda H, Soejima K, Yokosuka T.
2. 発表標題 Programmed cell death 2 forms coinhibitory microclusters that directly attenuate T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀忠
2. 発表標題 分子イメージングが拓くがん免疫応答とT細胞活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町山裕亮、若松英、秦喜久美、矢那瀬紀子、古畑昌枝、豊田博子、横須賀忠
2. 発表標題 末梢T細胞ではLckと共受容体CD4/CD8との協調的クラスター形成によって初期のTCRシグナルが惹起される
3. 学会等名 Kyot T cell Conference 第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀忠
2. 発表標題 分子イメージングが拓くT細胞活性化機構の解明とがん免疫療法への応用 -チェックポイント分子のとキメラ抗原受容体CARのシグナルソーム形成-
3. 学会等名 Urology Conference at Shinanomachi (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀忠、若松英、矢那瀬紀子、秦喜久美、竹原朋宏、西航、町山裕亮
2. 発表標題 CARマイクロクラスターによる腫瘍抗原の認識とCAR-T細胞活性化の時空間的制御機構
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀忠、若松英、矢那瀬紀子、秦喜久美、竹原朋宏、西航、町山裕亮
2. 発表標題 多様なT細胞シグナルソームによる腫瘍およびネオ・セルフ抗原認識の分子機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀忠
2. 発表標題 分子イメージングが拓くT細胞活性化機構の解明とがん免疫療法
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀忠
2. 発表標題 分子イメージングが拓くT細胞活性化機構の解明とがん免疫療法 -免疫チェックポイント分子とキメラ抗原受容体のシグナルソーム-
3. 学会等名 Scientific Exchange Meeting in 北九州2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanase N, Machiyama H, Toyota H, Furuhata M, Hata K, Takehara T, Wakamatsu E, Yokosuka T
2. 発表標題 Extrinsic and intrinsic inhibition of T cell response by co-inhibitory receptors, TIGIT and CD96.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehara T, Wakamatsu E, Machiyama H, Yanase N, Toyota H, Furuhata M, Koichi F, Soejima K, Yokosuka T
2. 発表標題 Programmed cell death 2 forms coinhibitory microclusters that directly attenuate T cell receptor signaling by recruiting the phosphatase SHP2.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakamatsu E, Machiyama H, Toyota H, Furuhata M, Hata K, Yanase N, Yokosuka T
2. 発表標題 Indirect suppression of CD4+ T cell activation by LAG3-mediated trogocytosis of MHC Class II.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Machiyama H Wakamatsu E, Hata K, Yanase N, Furuhata M, Toyota H, Yokosuka T
2. 発表標題 Different requirement of the coreceptors CD4 and CD8 for initiation of T cell activation.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 横須賀忠、若松英、西嶋仁、西航、松島遼平、西川哲史、町山裕亮、竹内新	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 139
3. 書名 腫瘍内科	

1. 著者名 横須賀忠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 416
3. 書名 標準免疫学第4版	

1. 著者名 横須賀忠, 若松英, 西嶋仁, 竹原朋宏, 西航, 塚本昌子, 町山裕亮	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 241
3. 書名 実験医学増刊号「新規の創薬モダリティ 細胞医薬」	

1. 著者名 横須賀忠, 若松英, 秦喜久美, 竹原朋宏, 西航, 矢那瀬紀子, 町山裕亮	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 268
3. 書名 実験医学増刊号「新・腫瘍免疫学」免疫チェックポイント分子の分子作用機序	

1. 著者名 横須賀忠, 若松英, 町山裕亮	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株NTS	5. 総ページ数 624
3. 書名 「膜タンパク質工学ハンドブック」第7章 第2節 免疫チェックポイント受容体PD-1とCTLA-4	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科大学免疫学分野ホームページ https://tokyo-med-imm.jimdofree.com/ 東京医科大学プレスリリース https://www.tokyo-med.ac.jp/news/2021/0514_180041002672.html https://www.tokyo-med.ac.jp/news/2023/0606_180000003199.html</p>
--

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			
米国	ペイラー医科大学			