

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02717

研究課題名（和文）若齢PD-1ノックアウトマウスに誘発される自己免疫性肝炎の研究

研究課題名（英文）Analysis on the autoimmune hepatitis elicited in young PD-1 knockout mice

研究代表者

石田 靖雅（Ishida, Yasumasa）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：10221756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：PD-1の機能を抗体で抑えると、一部のがん患者では、がんを治癒させることが可能である。しかしながら、がんを持たない健康者において、PD-1がどのような役割を果たしているかは、いまだに十分解明されていない。そこで、PD-1を持たないマウスの細胞で、ゲノム変異の蓄積が促進される状況を2種類作り出したところ、その両方で、自己免疫性の炎症疾患が出現した。この観察結果は、PD-1がゲノム変異に由来する「変異タンパク質」に対する免疫応答を抑制している、ということを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者の体内では、がん細胞中のゲノム変異に由来する「変異タンパク質」に対する免疫応答が、PD-1によって抑制されてしまうことが明らかになっているが、なぜそのような「有益な」免疫応答がPD-1によって抑制されなければならないのか？これまでは明らかでなかった。今回の研究により、その理由が解明された。

研究成果の概要（英文）：In some cancer patients, antibody-mediated blockade of the PD-1 function leads to the cure of the disease. However, we still do not fully understand the physiological function(s) of PD-1 in healthy individuals without cancers. When we created two experimental systems in which accumulation of genome mutations is accelerated in mice without PD-1, we observed the development of autoimmune diseases in both of the systems. This observation strongly suggests that PD-1 suppresses immune reactions against mutated proteins originated from genome mutations.

研究分野：免疫病理学

キーワード：PD-1 Msh2 ゲノム変異 neoantigen 自己免疫 肝炎

1. 研究開始当初の背景

PD-1 の発見とその基本機能の解明

1991 年、申請者は、自己-非自己識別のメカニズムを研究する中で、ひとつの新規遺伝子を発見し、胸腺内で自己反応性を獲得した新生 T 細胞がアポトーシスで死滅する際に重要な役割を果たすものであって欲しい、という願いをこめて、programmed death-1 (PD-1) と命名した (Ishida, Y. et al. *EMBO J.* **11**, 3887-3895, 1992)。その後、PD-1 KO マウスの表現型解析などから、過剰な免疫応答を負に制御するという PD-1 の基本生理機能が解明された。

PD-1 とがんの免疫療法

今世紀に入って間もなく、担がんマウスに抗体を投与して PD-1 の免疫制御シグナルを遮断すると、腫瘍の増殖や遠隔転移が顕著に抑制される事実が判明した。その後、ヒトのがん治療への PD-1 抗体の応用が成功し、京都大学の本庶佑博士には 2018 年のノーベル医学生理学賞が授与された。PD-1 の発見者として、申請者はノーベル賞の授賞式と晩餐会に招待された (Ishida, Y. *Cells* **9**, 1376, 2020)。

PD-1 はネオ抗原に対する免疫応答を抑制する？

マウスを用いたがん治療の研究によって、抗体で PD-1 の働きを阻害すると、がん細胞のゲノム変異によってコードされた「ネオ抗原」(neoantigens) を認識する CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が増強されることが分かった (Gubin, M.M. et al. *Nature* **515**, 577-581, 2014)。このことは、裏を返せば、担がん動物・患者の体内では、PD-1 によってネオ抗原への免疫応答が抑制されることを意味する。では一体なぜ、PD-1 はがん細胞のネオ抗原に対する「有益な免疫応答」を抑制しなければならないのか？

PD-1 の生理機能に関する新しい仮説

ヒト (成人) は 10 兆個以上の有核細胞から成り立っている。加齢とともに正常体細胞のゲノムにも遺伝子変異が蓄積するため (Vijg, J. and Dong, X. *Cell* **182**, 12-23, 2020)、成人の体内では、おびただしい数 (種類) の「変異タンパク質」が産生されると予想される。申請者は、ここでひとつの仮説を提示する。

我々は、加齢とともに正常体細胞が生み出すおびただしい数の変異タンパク質を「自己」として再定義 (許容) するために (つまり、新しい「自己」に対する危険な免疫応答を抑制し、個体の恒常性を維持するために)、進化の過程で PD-1 を獲得したのではないかと

がん細胞のネオ抗原も、PD-1 のこの働きによって新しい「自己」として再定義 (許容) されてしまうからこそ、我々はがんとの闘いに常に敗北すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、PD-1 の生理機能に関する上記の仮説の是非を実験的に検証し、肉芽腫病変を伴う自己免疫性肝炎の発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究の基本的デザイン

研究対象としては、PD-1 KO マウスと WT マウス (ともに遺伝的背景は C57BL/6) を用意し、それぞれのマウスの体内で、ゲノム変異の蓄積が加速される状況を作り出す。ENU 投与や Msh2 欠失の場合、PD-1 の非存在下では、肝臓において肉芽腫様のリンパ球浸潤巣が観察されたため、その発生メカニズムを解析し、PD-1 の未知の生理機能の解明を目指す。

自己免疫性肝炎の経時的変化の観察

PD-1 KO マウスへの ENU 投与の場合も、PD-1/Msh2 DKO マウスの場合も、これまでの解析では、肝臓の肉芽腫様炎症巣がある程度完成されてからマウスを解剖しているため、炎症の初期段階の病理像が未解析となっている。まずは、通常の HE 染色と、凍結標本の免疫組織学的染色によって、より早期に PD-1 KO マウスの肝臓に出現する炎症性変化を捉え、それらが肉芽腫様になる過程を理解するために、浸潤細胞の種類や性質を解析する必要がある。

抗体による PD-1 経路の遮断

PD-1 KO マウスの体内では、出生前より PD-1 が慢性的に欠如しているため、何らかの代償的 (compensatory) なメカニズムが働き、PD-1 欠損の影響が観察されにくくなっている可能性がある。この問題を克服するために、ENU を投与した WT マウスや、Msh2 シングル KO マウスに「機能阻害型」PD-1 抗体を投与し、急性的 (acute) な PD-1 欠損の影響を調べる。その抗体には、ラットで作製した抗マウス PD-1 モノクローナル抗体の定常領域を、遺伝子組換えによってマウス IgG1 の Fc + C κ 部分に置き換えたもの (clone 4H2) を用いる (Melinda, B.L. et al. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1623-1634, 2009)。

PD-1 KO マウスの肝臓における非自己タンパク質の安定的発現

ENU 投与や Msh2 欠失の場合、マウスのゲノムに導入される変異はランダムであり、個々の体細胞ごとにパターンが異なるため、たとえ狙い通り PD-1 KO マウスに自己免疫病態が誘発されたとしても、その原因となった変異を、その他の無数の変異の中から割り出すことは非常に難しい。この問題点を部分的に克服するために、PD-1 KO マウスの肝臓において、既知の非自己タンパク質を発現させる実験も並行させる。

[実験手法] マウスの尾静脈から *Sleeping Beauty* (SB) トランスポゾン (外来遺伝子の発現ベクター) とその transposase (SB100X) 発現ベクターを共注入する hydrodynamic 法を活用する (Bell, J.B. et al. *Nat. Protocols* **2**, 3153-3165, 2007)。通常のプラスミドではなく、cut-&paste 型 DNA トランスポゾンをベクターとして用いることにより、肝細胞内に導入されたベクターが、同細胞のゲノムへ安定的に挿入される割合が飛躍的に高まる。

[非自己タンパク質] マウス MHC クラス I 分子 (H-2K^d: C57BL/6 マウスにとって allogeneic となる) と EGFP-2A-luciferase 分子を用いる。これらの非自己タンパク質を肝臓の一部の細胞で安定的に発現させた場合、前述の仮説が正しければ、PD-1 を持つ WT マウスでは、それらの分子を標的とした免疫応答が抑制されると考えられる。しかし PD-1 を持たない KO マウスでは、それらの外来分子を新しい「自己」として再定義できないため、それらに対する免疫応答が引き起こされる可能性が高い。

4. 研究成果

PD-1 KO マウスへの ENU の投与

ENU は、マウスに投与した場合、正常体細胞のゲノムに点突然変異を引き起こす。本研究では、生後2ヶ月の野生型 WT マウスと PD-1 KO マウスを用意し、ENU の投与 (85 mg/kg BW) を (1週間の間隔を空けて) 二度行った。その後、ENU 投与マウスの主に肝臓に出現する炎症病変を観察し、リンパ球浸潤の程度や肉芽腫性病変の出現頻度が経時的に変化することを確認した。その結果、ENU の投与から1ヶ月が経過したタイミングでは、まだ PD-1 KO マウスの肝臓には肉芽腫性病変は出現せず、病理学的に single-cell necrosis と呼ばれる炎症の初期病変のみが出現することが判明した。ENU の投与から2ヶ月が経過した頃から、炎症巣に集まるリンパ球の数が増し、一部の炎症巣は肉芽腫性の形態を示すようになることが分かった。肝臓以外では、腎臓、膵臓、唾液腺、などにリンパ球浸潤を主体とする炎症巣が観察されたが、肝臓以外の組織では、肉芽腫性の病変は見出されなかった。一方、WT マウスに ENU を投与した場合には、PD-1 KO マウスに見られたような炎症性病変を誘発することはできなかった。

PD-1 と Msh2 に関するダブルノックアウト (DKO) マウスの作製

本研究では、PD-1 & Msh2 のダブルノックアウト (DKO) マウスを作製し、肝臓をはじめとする複数の臓器に出現する自己免疫性の病変を病理学的、あるいは免疫組織化学的手法を用いて解析した。その結果、PD-1 & Msh2 DKO マウスの肝臓では、生後5ヶ月頃から、リンパ球浸潤を主体とする肉芽腫性炎症病変が観察され始めることが判明した。一方、Msh2 のみの KO マウスには、炎症性病変は全く誘導されなかった。PD-1 のみの KO マウスの肝臓では、非常に低い頻度ではあるものの、一部が肉芽腫様となった炎症性病変が観察された。

抗体による PD-1 経路の遮断

Msh2 シングル KO マウスに機能阻害型 PD-1 抗体 (clone 4H2) を投与し、急性的 (acute) な PD-1 欠損の影響を調べた。しかし、PD-1 & Msh2 DKO マウスに観察されるような炎症性病変は、これまでのところ観察されていない。同量の 4H2 抗体を WT マウスに投与した場合には、抗腫瘍免疫応答は予想通り増強されるため、抗体が機能していないという可能性は否定することができる。今後は、さらに抗体の投与量や投与回数を増加させ、HE 染色に免疫蛍光染色を組み合わせた高感度な手法を導入することにより、Msh2 シングル KO マウスに自己免疫応答が引き起こされるかどうか、注意深く観察する必要がある。

PD-1 KO マウスの肝臓における非自己タンパク質の安定的発現

マウスの尾静脈から *Sleeping Beauty* (SB) トランスポゾン (外来遺伝子の発現ベクター) とその transposase 発現ベクターを共注入する HTVi 法を採用し、マウス MHC クラス I 分子 (H-2K^d & H-2K^b) や EGFP-2A-luciferase 分子を強制発現させるためのベクターを構築した上で、肝臓における強制発現実験を実施した。その結果、PD-1 の有無によって、肝臓で発現させた外来性の非自己分子に対するマウスの応答性に差異を確認することができた。具体的には、たとえ非自己分子であっても、この HTVi という手法を採用する限り、PD-1 を持つ WT マウスの肝臓では炎症性応答が抑制される傾向にあることが判明した。一方、PD-1 KO マウスの肝臓では、強制発現させた非自己分子に対する炎症性応答は抑制されることはなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石田靖雅	4. 巻 72
2. 論文標題 自己と非自己の認識：PD-1 による T 細胞応答の制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アレルギー	6. 最初と最後の頁 1093-1098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田靖雅
2. 発表標題 自己と非自己の認識
3. 学会等名 日本アレルギー学会・第9回総合アレルギー講習会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田靖雅
2. 発表標題 PD-1 とがん、T 細胞による自己と非自己の識別
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会（ワークショップ）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田靖雅
2. 発表標題 PD-1 の発見と新しいがん治療
3. 学会等名 日本免疫学会・免疫ふしぎ未来 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiro Osaki and Yasumasa Ishida
2. 発表標題 PD-1 is required for the suppression of inflammatory responses in aged mice
3. 学会等名 日本免疫学会・学術集会（熊本）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田靖雅
2. 発表標題 PD-1 とがん、T 細胞による自己と非自己の識別
3. 学会等名 日本免疫学会・第22回免疫サマースクール（招待講演）
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