

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07076

研究課題名（和文）LAG-3の抑制機能作動原理および制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigating the contribution of potential ligands to the inhibitory function of 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抑制性免疫補助受容体LAG-3のリガンドとして報告されている複数の分子について、その機能的独立性・代償性・協調性をin vitroおよびin vivoにおいて解析した。本研究によって、LAG-3がその機能を発揮し、T細胞の活性化、自己免疫応答、がん免疫応答を抑制するためには安定な構造のペプチド-MHCクラスII分子複合体との結合が必要十分であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すでに使用が開始されているものに加え、がん患者を対象として複数のLAG-3阻害抗体の臨床試験が進行中であるにも関わらず、リガンド分子との結合に対する阻害活性が正確に評価されているとは言えない状況にあった。本研究結果は、LAG-3と安定なpMHCIIとの結合阻害活性が重要な指標であることの科学的根拠となるものであり、安全性と治療効果の高いLAG-3標的薬の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), a potent inhibitory co-receptor, attracts much attention as a promising target of immuno-therapies. However, its functional ligand remains elusive, as several distinct ligands have been identified. Here, we investigated the relative contribution of potential ligands to LAG-3 activity. We found that binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II complex (pMHCII) induced T cell suppression in vitro. Consistently, LAG-3-mediated suppression of fulminant type 1 diabetes and anti-cancer immunity in mice required its engagement with stable pMHCII. These results indicate that stable pMHCII serves as the functional ligand of LAG-3 to trigger its immuno-inhibitory function.

研究分野：免疫学

キーワード：LAG-3 抑制性免疫補助受容体 免疫チェックポイント リガンド 自己免疫 がん免疫

1. 研究開始当初の背景

抑制性免疫補助受容体 PD-1 および CTLA-4 を標的としたがん免疫療法、いわゆる免疫チェックポイント阻害療法の成功により、免疫補助受容体に関する研究は隆盛を極めていいる。一方で、競争の激化によって分子機能がほとんどわかっていない免疫補助受容体さえも臨床応用の標的とされるなど、基礎研究が置き去りにされているのが現状である。受容体とリガンドとの相互作用は受容体によるシグナル伝達とそれに伴う細胞の活性制御のトリガーとなる重要なステップであり、これを理解せずして免疫補助受容体の機能およびその制御機構を解明することは不可能である。ましてや、治療標的としての有用性の理解、そして新規治療法の開発戦略のためには必須となる知見である。にも関わらず、真に機能的なリガンドが同定され、それらリガンドによる機能制御機構が明確になっている免疫補助受容体は驚くほど少ない。

抑制性免疫補助受容体 Lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) は、当初 Class II major histocompatibility complex (MHCII) に結合すると考えられていたが相反する結果が報告されたり、また他のリガンド候補が複数報告されるなど、リガンド特異性および抑制機能が長らく不明であった分子である。近年我々は、LAG-3 は確かに MHCII に結合するものの、全ての MHCII ではなく、構造的に安定なペプチド - MHCII 複合体 (pMHCII) に選択的に結合することを見出し、LAG-3 による特徴的な免疫抑制機構を明らかとすることに成功した (Maruhashi et al, Nat Immunol, 2018)。しかしその直後、また新たに fibrinogen-like protein 1 (FGL1) という分子が LAG-3 のリガンドとして報告された (Wang et al, Cell, 2019)。LAG-3 は PD-1 と CTLA-4 に次ぐ第3の免疫チェックポイント分子として期待され、本研究開始当初には、すでに LAG-3 を標的とした薬剤の治験が複数開始されていた。しかし、各リガンド候補分子がどのように LAG-3 による免疫抑制機能に寄与しているのか全くわかっておらず、非常に大きな問題を抱えている状況にあった。

2. 研究の目的

本研究ではまず、独自に樹立した実験系、研究材料を駆使して、LAG-3 - 各リガンド分子間の相互作用を生化学的、分子生物学的、細胞生物学的、免疫学的に詳細に検証する。そして、各リガンドの機能的独立性・代償性・協調性を *in vitro* および *in vivo* で包括的に解析することにより、LAG-3 による抑制機能の作動原理およびその制御機構の全貌解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) LAG-3 と各リガンド候補分子の結合の検証

LAG-3 のリガンド候補分子である pMHCII、FGL1、LSECtin、Galectin-3 の多量体化タンパク質を購入、または作製し、LAG-3 強制発現細胞株への結合能をフローサイトメトリーによって比較検討した。Bio-Layer Interferometry (BLI) 法を用いて、LAG-3 と各リガンド候補分子タンパク質間の相互作用のカイネティクス解析を行い、定量的に比較した。各リガンドが LAG-3 に同時または相互排他的に結合する可能性についてフローサイトメトリーを用いて検討した。

(2) LAG-3 と各リガンドの結合を阻害可能な抗体および変異体の探索

各リガンドの機能を生体内において個別に解析することを可能にするために、市販あるいは我々がこれまでに樹立した LAG-3 の各ドメインに特異的な数十に及ぶ抗体クローンの中から、いずれかのリガンドとの結合のみを阻害可能な抗体の探索を行った。また同時に、LAG-3 ランダム変異体ライブラリーを作製し、各リガンドとの結合を特異的に欠く LAG-3 変異体の探索も行った。具体的には、Error-prone PCR を用いて作製した LAG-3 ランダム変異体ライブラリーを細胞に導入し、各リガンドの多量体化タンパク質との結合能を失った細胞をセルソーティングによって選別した。それら細胞の中から抽出したアミノ酸変異が各リガンドとの結合に及ぼす影響について、フローサイトメトリーおよび BLI 法によって検証した。

(3) LAG-3 の抑制機能に対する各リガンド候補分子の *in vitro* 機能評価

我々は、免疫補助受容体およびそのリガンドを強制発現させた T 細胞株および B 細胞株 (抗原提示細胞) を抗原ペプチド存在下で共培養し、その抗原刺激によって産生される IL-2 を定量することにより免疫補助受容体が T 細胞活性化に与える影響を鋭敏かつ定量的に評価可能な *in*

in vitro 培養系を確立している。この実験系を用いて、(2) で得られた LAG-3 変異体の抑制機能を評価および比較することで、各リガンド候補分子の機能を検証した。

(4) LAG-3 と各リガンドの相互作用による自己免疫応答およびがん免疫応答制御機構の解析

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって、(2) で得られたアミノ酸変異をノックインした NOD マウスを作製し、糖尿病の発症を経時的に観察するとともに、所属リンパ節や炎症部位における T 細胞の活性化の程度を評価した。また、C57BL/6 背景のノックインマウスに大腸がん細胞株 MC38 細胞を接種し、腫瘍の大きさを経時的に計測するとともに、腫瘍浸潤 T 細胞の活性化の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) LAG-3 と各リガンド候補分子の結合の検証

フローサイトメトリーによって、市販の pMHCII テトラマーおよび作製した多量体化 FGL1 タンパク質が LAG-3 強制発現細胞株に強く結合することを確認した。一方で、多量体化した LSECtin および Galectin-3 タンパク質の LAG-3 特異的な結合は認められなかった。また、多量体化 FGL1 タンパク質は LAG-3 を発現する活性化初代培養 T 細胞に強く結合し、LAG-3 遺伝子欠損により結合の程度が減弱したことから、確かに FGL1 は LAG-3 と結合することが確認された。しかし、LAG-3 の発現を欠くにも関わらず FGL1 の結合は完全には消失しなかったことから、FGL1 は LAG-3 以外の分子にも結合することが示唆された。

精製タンパク質を用いた BLI 法によって、LAG-3-pMHCII および LAG-3-FGL1 相互作用の親和性 (平衡解離定数、Kd) を決定したが、大きな差異は認められなかった。また両分子は LAG-3 との結合においてほとんど競合しなかったことから、pMHCII と FGL1 は LAG-3 に同時に結合可能であることが示唆された。

(2) LAG-3 と各リガンドの結合を阻害可能な抗体および変異体の探索

市販あるいは我々が独自に樹立した LAG-3 の D1 から D4 までの各ドメインに対する抗体の中から、LAG-3 と pMHCII および FGL1 いずれかとの結合のみを阻害可能な抗体の探索を行った。その結果、D1 特異的抗体は強く、D2 特異的抗体は弱く、pMHCII および FGL1 と LAG-3 の結合を阻害した。一方で、D3、D4 に特異的な抗体はほとんど阻害活性を示さなかったことから、どちらの分子も主に D1、一部 D2 を介して LAG-3 と結合していることが示唆された。これら D1、D2 特異的抗体は、in vitro、in vivo において LAG-3 による免疫抑制機能に対する阻害活性を有するが、両分子の LAG-3 との結合を阻害してしまうため、各リガンドの機能を個別に解析するために使用することができなかった。

pMHCII と FGL1 は LAG-3 との結合において競合しなかったことから、両分子は近い異なる領域に結合していることが示唆され、いずれか一方にしか結合できない LAG-3 変異体を得られる可能性が高いと考えた。予想通り、我々が作製した LAG-3 変異体ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、FGL1 との結合能を欠き pMHCII にのみ結合する変異体を 2 種類 (K27E、L14Q:V20A) および pMHCII との結合能を欠き FGL1 にのみ結合する変異体を 2 種類 (P111A、G103R) 得ることに成功した

(3) LAG-3 の抑制機能に対する各リガンド候補分子の in vitro 機能評価

In vitro 培養系に FGL1 タンパク質を添加し、LAG-3 による T 細胞活性化抑制機能に与える影響を検討したところ、FGL1 単独で LAG-3 の抑制機能を惹起することはできず、また安定な pMHCII との結合によって誘導される LAG-3 の抑制機能を増強することもなかった。

(2) で得られた LAG-3 変異体を T 細胞株に発現させ、抗原特異的活性化に対する抑制機能を in vitro 培養系において評価したところ、FGL1 との結合を欠く LAG-3 変異体は両分子に結合する野生型の LAG-3 と同等の抑制活性を示した。一方で、pMHCII との結合を欠く LAG-3 変異体は抑制機能を完全に失っていた。

以上の結果から、LAG-3 が in vitro において T 細胞の活性化を抑制するためには pMHCII との結合が必要不可欠であることが示された。一方で、LAG-3 は FGL1 との相互作用のみでは機能を発揮できず、また pMHCII との相互作用によって発揮される LAG-3 の抑制機能に FGL1 との結合は不要であることも明らかとなった。

(4) LAG-3 と各リガンドの相互作用による自己免疫応答およびがん免疫応答制御機構の解析

(2) で得られた LAG-3 変異体由来のアミノ酸変異をノックインしたマウスを作製すること

で、各リガンドの機能を生体内で個別に解析した。LAG-3 と pMHCII との結合を特異的に欠く NOD マウス (NOD-LAG-3-P111A) は、LAG-3 遺伝子欠損 NOD マウスと同様に 1 型糖尿病の発症率が大幅に悪化した。さらにこれらの NOD マウスの膵島において、野生型に比べて有意に多くの増殖マーカーおよび IFN- γ を発現する活性化 T 細胞の浸潤を認めた。一方、LAG-3 と FGL1 との結合を特異的に欠く NOD マウス (NOD-LAG-3-K27E) においては症状の悪化は認められず、野生型の NOD マウスとほぼ同程度の血糖値および病理組織学的スコアを示した。

LAG-3 と pMHCII との結合を特異的に欠く C57BL/6-LAG-3P111A マウスに MC38 がん細胞株を接種したところ、LAG-3 遺伝子欠損 C57BL/6 マウスと同程度のがん細胞株の増殖抑制が認められ、また腫瘍浸潤活性化 T 細胞数も同程度に亢進していた。

以上の結果から、LAG-3 による自己免疫応答とがん免疫応答の制御において、安定な pMHCII が LAG-3 の機能的リガンドとして中心的な役割を担うことが明らかとなった。

今後、FGL1 を含む複数のリガンド候補分子がそれぞれどんな現象において、どのように、どの程度、LAG-3 による免疫抑制機能に寄与しているのかを慎重に解析していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6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 Kaifu Tomonori, Maruhashi Takumi, Chung Soo-Hyun, Shimizu Kenji, Nakamura Akira, Iwakura Yoichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 DCIR suppresses osteoclastic proliferation and resorption by downregulating M-CSF and RANKL signaling	5. 発行年 2023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.2023.1159058	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 Maruhashi Takumi, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Shimizu Kenji, Maeda Takeo K., Ikubo Jun, Yoshikawa Harunori, Maenaka Katsumi, Ishimaru Naozumi, Kosako Hidetaka, Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 55
2. 論文標題 Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 912 ~ 924.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2022.03.013	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 Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maeda Takeo K., Maruhashi Takumi, Shimizu Kenji, Arakaki Rieko, Takemoto Tatsuya, Ishimaru Naozumi, Okazaki Taku	4. 巻 23
2. 論文標題 PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 399 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-01125-7	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 Kaifu Tomonori, Yabe Rikio, Maruhashi Takumi, Chung Soo-Hyun, Tateno Hiroaki, Fujikado Noriyuki, Hirabayashi Jun, Iwakura Yoichiro	4. 巻 218
2. 論文標題 DCIR and its ligand asialo-biantennary N-glycan regulate DC function and osteoclastogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	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) 10.1084/jem.20210435	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 Sugiura Daisuke, Shimizu Kenji, Maruhashi Takumi, Okazaki Il-mi, Okazaki Taku	4. 巻 33
2. 論文標題 T-cell-intrinsic and -extrinsic regulation of PD-1 function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 693 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab077	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 Shimizu Kenji, Sugiura Daisuke, Okazaki Il-mi, Maruhashi Takumi, Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 118
2. 論文標題 PD-1 preferentially inhibits the activation of low-affinity T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2107141118	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 丸橋拓海、岡崎拓	4. 巻 53
2. 論文標題 LAG-3による自己免疫とがん免疫の抑制機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 感染・炎症・免疫	6. 最初と最後の頁 19 ~ 30
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 -

1. 著者名 丸橋拓海、杉浦大祐、岡崎拓	4. 巻 40
2. 論文標題 免疫チェックポイント阻害剤の作用メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 3340 ~ 3345
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7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸橋 拓海
2. 発表標題 Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity
3. 学会等名 第18回血液若手研究者勉強会（麒麟塾）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Taku Okazaki
2. 発表標題 Immune regulation by LAG-3, an inhibitory co-receptor of a unique target selectivity
3. 学会等名 The 32nd Hot Spring Harbor International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Dawei Chen, Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Kenji Shimizu, Taku Okazaki
2. 発表標題 The requirement of dimer-forming ability for LAG-3 to inhibit T cell activation
3. 学会等名 The 52th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Taku okazaki
2. 発表標題 Identification of an MHC class II mutant lacking LAG-3-binding capacity while retaining antigen-presenting ability
3. 学会等名 The 1st AMED SCARDA Joint Symposium of Japan Initiative for World-leading Vaccine Research and Development Centers
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 丸橋 拓海
2. 発表標題 LAG-3の免疫抑制機能作動原理の解明
3. 学会等名 第 31 回東京免疫フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Ii-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Taku Okazaki
2. 発表標題 Stable pMHCII serves as the ligand of LAG-3 to trigger its inhibitory function
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Ii-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Taku Okazaki
2. 発表標題 LAG-3 engagement with stable pMHCII is essential for the exertion of its inhibitory function
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
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
---------	---------