

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460363

研究課題名(和文) 免疫疲弊を起こす、病的PD-1発現機構の解析

研究課題名(英文) The mechanism of strong PD-1 expression leading to immuno-suppression.

## 研究代表者

竹馬 俊介 (CHIKUMA, SHUNSUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50437208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1分子は、Tリンパ球の活性化に伴って発現し、免疫の過剰な活性化による自己組織の傷害を防止するために役立っている。がんや慢性感染症における免疫反応においては、長引く免疫応答の間にPD-1の過剰な発現が誘導され、有用な免疫反応を抑制することがわかっている。当研究では遺伝子改変マウスを用い、PD-1が過剰に発現する仕組みを明らかにしようと試みた。結果、PD-1の発現を詳細に解析するためのレポーターマウスを作成し、サイトカインレセプターのシグナルでPD-1が抑制されることを示した。また、PD-1がマクロファージの抑制を通じて免疫反応を制御することなどを明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：PD-1 is induced on activated lymphocytes, inhibits their excessive activation, and thereby prevents damage on self-tissues. In durable immune reaction, for example, chronic infection and cancer, PD-1 is super-strongly expressed, which prevents useful immune reaction. The mechanism of the strong PD-1 expression was unclear. In this study, I aimed to determine what causes strong PD-1 expression in vivo. (1) I utilized molecular genetic tools to create a reporter mice that allows faithful detection of PD-1 expression in mice. (2) I found that IL-7, a homeostatic cytokine for lymphocytes negatively regulates PD-1 expression. In a separate line of experiment, I showed PD-1 controls innate immune reaction by inhibiting macrophage activation. The current study will bring a useful information to understand the biology of PD-1.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容 自己免疫 がん免疫 抑制レセプター T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

T細胞による獲得免疫は、がんやウイルス感染細胞を直接攻撃する強力な生体防御システムであるが、この過剰な活性化は、リウマチや型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎といった深刻な自己免疫疾患の原因となる。免疫抑制 PD-1 を欠損したマウスは、さまざまな自己免疫疾患を発症することから、PD-1 は、正常な T 細胞活性化の後、自己組織に対する免疫細胞の不必要な活性化を防ぐための、ブレーキを担当する分子であると考えられている。

自己寛容に必須である PD-1 の発現が、幾つかの病態にはマイナスに働くという点が注目されている。例えばがんや慢性ウイルス感染といった、長期的な免疫反応を伴う疾患においては、T 細胞が PD-1 の非常に高い発現 (タンパク量で 100 倍以上) を呈し、一方で、標的となるがんや感染細胞には、PD-1 の生理的リガンドが高発現していることから、がんやウイルスは、PD-1 を利用して宿主から免疫逃避している、とも考えられる。PD-1 は、T 細胞レセプターの刺激によって一過性に発現するが、長期的な免疫反応において PD-1 が高発現するメカニズムは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

以上の背景より、当研究では、PD-1 の発現機構を *in vivo* で解析できる実験系を樹立して、PD-1 の高い発現を起こす生化学的なシグナルを、生体レベルで検討することを目的とした。これとは別に、T 細胞、B 細胞以外における PD-1 の機能について明らかにしようとした。

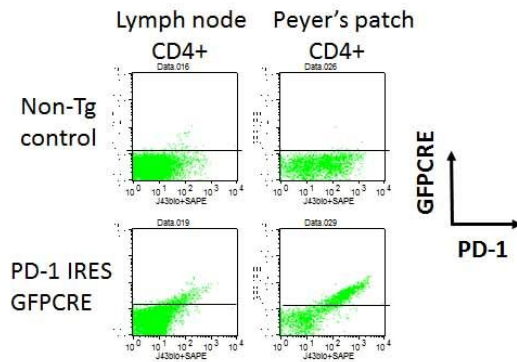
### 3. 研究の方法

マウス PD-1 遺伝子座をコードする BAC を入手し、PD-1 遺伝子の最終エクソンに IRES-GFP-CRE を挿入して、PD-1 の発現を人口遺伝子である GFP-CRE でレポートするコンストラクトを作成した。この BAC をマウスの受精卵にインジェクションし、トランスジェニックマウスを作成する。また、既存の遺伝子改変マウスを用い、PD-1 発現をフローサイトメーターで解析する。RAG2 欠損マウスを用いて、非 T、非 B リンパ球における PD-1 の機能を解析する。

### 4. 研究成果

(1) BAC トランスジェニックマウスを用いた PD-1 発現機構の解析

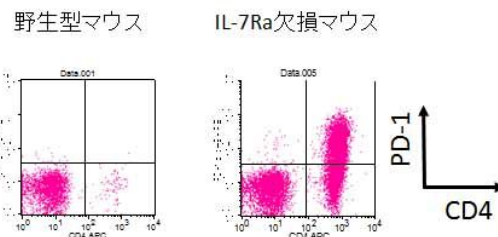
PD-1-IRES-GFP-CRE マウスを 3 ライン樹立した。初期の解析において、内因性の PD-1 発現と、レポーター遺伝子の発現がよく相関することを示した。(右上図) PD-1-GFP-CRE マ



ウスを ROSA-STOP-RFP マウスと交配し、発生の過程で PD-1 を発現した細胞が、RFP で恒久的に標識されるマウスを作成した。このマウスでは、体内で活性化した T 細胞が確かに RFP 標識されることを確認した。当該マウスは、PD-1 を発現した細胞の生体内でのトラッキングを可能にし、がんや自己免疫疾患において、PD-1 による制御を受けた免疫担当細胞の運命を解析する上で今後有用なツールとなり得る。具体的な成果については(3)で報告する。

(2) 既存の遺伝子改変マウスを用いた PD-1 発現機構の解析

これまでの研究で、PD-1 がコモンガンマサイトカインによって制御されることを見出していたため、このうちの一つである IL-7 レセプター鎖の欠損マウスにおける、PD-1 の発現を解析した。IL-7 は、T 細胞の発生、および抹消での維持に必要であるため、IL-7R 欠損マウスは、非常に少数の T 細胞を持つ。しかしながら、この減少した T 細胞には、非常に高頻度、かつ高い PD-1 の発現が見られることがわかった。(下図)



T 細胞の疲弊状態では、PD-1 の発現を伴い、PD-1 の高発現がクローナルな免疫不全を起こすと考えられているが、T 細胞の維持に不可欠な IL-7 シグナルの欠損によっても PD-1 が誘導されるデータは、むしろ T 細胞の恒常性が破綻することによって、PD-1 が誘導されるという逆のデータである。がんや慢性感染症では、長期的な T 細胞活性化と、それに伴うサイトカインの消費が起こると考えられるため、このような状態が PD-1 の発現を起こし、さらに免疫反応にマイナスに働く可能性がある。

### (3)自然免疫における PD-1 機能の解析

これまでの研究で、PD-1 欠損マウスが結核死菌をアジュバントとして誘発する、実験的脳脊髄炎モデルに強い感受性を示すことがわかってきた。そこで、PD-1 欠損マウスを、T 細胞を持たない RAG2 欠損マウスに交配し、非リンパ系細胞における PD-1 の機能を解析した。結果、PD-1 を欠損した RAG2 欠損マウスは結核死菌に対し、強い自然免疫反応を起こし、炎症性サイトカインを大量に産生することが明らかになった。PD-1 欠損 RAG2 欠損マウス由来の骨髄を移入したマウスにおいては、実験的脳脊髄炎が悪化したことから、PD-1 欠損化で起こる、自然免疫系の炎症が、T 細胞性の免疫（特に IL-17 産生性 T 細胞の分化）を増強し、自己免疫疾患の成立に関与することが明らかになった。（論文 7）さらには(1)のレポーターマウスを RAG2 欠損マウスに交配し、PD-1 を発現する非リンパ系細胞を明らかにしようと試みた。結果、PD-1 はマクロファージ、樹状細胞といったミエロイド細胞にはほとんど検出できず、自然リンパ球系細胞（ILC やナチュラルキラー細胞）で高い PD-1 の発現がみられることがわかった。

つまり、T リンパ球が無い環境においては、これら ILC が PD-1 によって抑制され、PD-1 欠損下では炎症を悪化させる一因となることが示唆された。PD-1 は、その阻害療法が新規癌治療法としてにわかに脚光を浴びているが、自然免疫系における PD-1 の機能についてはほとんど解析がなされていない。

本研究の成果は、PD-1 の隠れた一面を明らかにしただけでなく、PD-1 阻害療法でしばしば問題となる、副作用としての自己免疫疾患の発現メカニズムにせまり、これを回避するための有用な成果と言える。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Chikuma S. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *Int J Clin Oncol.* 2016 Feb 10. (査読あり)
2. Sakaguchi R, Chikuma S, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Ouyang W, Ueda T, Seki H, Morisaki H, Yoshimura A. Innate-like function of memory Th17 cells for enhancing endotoxin-induced acute lung inflammation through IL-22. *Int Immunol.* 2015 Dec 8. pii: dxv070. [Epub ahead of print] (査読あり)
3. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, Kanai M, Mori Y, Matsumoto S, Chikuma S, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Yamaguchi K, Ueda A, Hosoe Y, Morita S, Yokode M, Shimizu A,

Honjo T, Konishi I Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015 Sep 8. pii: JCO.2015.62.3397 (査読あり)

4. Stumpf M, Zhou X, Chikuma S, Bluestone JA Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. *Eur. J. Immunol.* 44: 1737-46, 2014. (査読あり)
5. Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, \*Honjo T, Kobayashi M Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int. Immunol.* 26: 397-406, 2014. (査読あり)
6. Rui Y, Honjo T, Chikuma S Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110:16073-8, 2013. (査読あり)
7. Rui Y, Honjo T, Chikuma S Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110:16073-8, 2013. (査読あり)
8. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.* 14:1212-8, 2013 (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 竹馬 俊介 「免疫抑制受容体 PD-1 の基礎」 癌治療増感研究シンポジウム、奈良県文化会館（奈良県奈良市）、2016 年 2 月 5 日. (招待講演)
2. 竹馬 俊介 「PD-1 による、自己免疫、がん免疫の制御機構」 第 40 回呼吸器内科セミナー、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）、2016 年 1 月 15 日. (招待講演)
3. 竹馬 俊介 「免疫抑制受容体 PD-1 の基礎研究と今後の課題」 富山リサーチフォーラム、富山大学（富山県富山市）、2015 年 11 月 13 日. (招待講演)
4. 竹馬 俊介 「抑制受容体 PD-1 による自己免疫、がん免疫の制御機構」 東海大

学医学会講演会、 東海大学（神奈川県伊勢原市） 2015 年 7 月 23 日．（招待講演）

〔図書〕（計 0 件）  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）  
該当なし

取得状況（計 0 件）  
該当なし

〔その他〕

免疫のブレーキ PD-1 が、自然免疫反応の調節によって免疫難病の発症を抑制することを解明（京都大学広報）

[http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news\\_data/h/h1/news6/2013/130917\\_2.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130917_2.htm)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

竹馬 俊介（CHIKUMA, Shunsuke）  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：5 0 4 3 7 2 0 8

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

宮地 均（MIYACHI, Hitoshi）  
京都大学・ウイルス研究所・技術専門職員  
研究者番号：9 0 5 9 9 2 0 0