

研究題目

PD-1 による T 細胞活性化抑制の分子メカニズムの解明

研究組織

研究代表者：岡崎 拓（東京大学定量生命科学研究所）
共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）
研究分担者：清水 謙次（東京大学定量生命科学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

抑制性免疫補助受容体 PD-1 および CTLA-4 の機能阻害によるがん免疫療法、いわゆる免疫チェックポイント阻害療法の成功により、未治療の状態でもがん細胞に対する免疫応答が既に誘導されているものの抑制性免疫補助受容体により無力化されていること、抑制性免疫補助受容体の機能を阻害するだけで、体内で無力化されていたがん細胞特異的 T 細胞を活性化し、がんを治療し得ることが明らかにされた。免疫チェックポイント阻害療法の出現はがん治療およびがん研究に大きな変革をもたらしたが、その奏効率は限定的であり、大幅な改良が望まれている。治療法の改良および新規治療法の開発には、標的分子の機能を正確に理解することが必須であるが、PD-1 をはじめとした抑制性免疫補助受容体による T 細胞活性化の抑制メカニズムには、依然、多くの謎が残されている。

そこで我々は、PD-1 および PD-1 と協調的に作用することを見出している LAG-3 が T 細胞の活性化を抑制するメカニズムを解明することを目的として研究を展開している。本研究では、質量分析法を利用して、抗原刺激により形成される免疫シナプスに集積する分子を網羅的に同定する方法の開発を試みた。また、定量的質量分析法を用いて、抑制性免疫補助受容体 LAG-3 のシグナルシーケンス切断部位を同定することにより、成熟 LAG-3 タンパク質の N 末端がリガンド候補分子との結合に関与することを明らかにした。

[1-2]研究の方法・経過

我々はこれまでに、T 細胞ハイブリドーマおよび抗原特異性が既知の TCR を導入した T リンパ腫細胞株を、特異的な抗原ペプチドを提示させた B リンパ腫細胞株などと共培養することにより活性化する実験系を複数構築している。また、T 細胞に PD-1、抗原提示細胞に PD-1 リガンド (PD-L1 あるいは PD-L2) を発現させることにより、T 細胞の活性化を PD-1 依存的に抑制することに成功している。

これらの実験系を用いて、抗原刺激により免疫シナプスに集積することが知られている分子の近傍に存在する分子を BioID 法にてビオチン修飾し、ビオチン化ペプチドをプロテオーム解析により同定した。

一般的に抑制性免疫補助受容体は、リガンドと結合することにより抑制機能を発揮する。LAG-3 は、強い抑制機能を有し、がん免疫療法の有望な標的分子と考えられているが、何が LAG-3 のリガンドであるかについて意見の一致が得られていない。我々は近年、LAG-3 が抗原ペプチドと MHC クラス II の安定な複合体 (安定な pMHC クラス II) を選択的に認識することを明らかにしたが、その後、別のグループによって FGL1 という分子が LAG-3 の機能的なリガンドであると報告された。そこで、安定な pMHC クラス II と FGL1 がどのような免疫応答において、どの程度、LAG-3 の機能的なリガンドとして機能しているのかを解析するために、各々への結合能を欠く変異体の作製を試みた。その結果、FGL1 との結合能を選択的に欠く変異体として、LAG-3 のシグナルシーケンスと思われる領域に変異を有するもの (LAG-3-

L14Q:V20A) が得られた。そこで、野生型 LAG-3 および LAG-3-L14Q:V20A の細胞外領域を培養細胞株に発現させ、培養上清からアフィニティー精製した後、キモトリプシンにて消化し、N 末端のペプチドを並列反応モニタリング (parallel reaction monitoring、RPM) 法によるターゲット質量分析により定量した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

免疫シナプスには多くの分子が密に集積するため、タンパク質の可溶性および抗体の浸透度が低く、生化学的な解析が困難である。BioID 法を利用することにより、免疫シナプスに存在する分子を効率的に同定することに成功した。

膜タンパク質および可溶性タンパク質のシグナルシーケンス切断部位を決定するには、従来の方法では高純度の精製タンパク質を大量に必要としたが、未精製の少量サンプルから高精度に決定することに成功した。野生型 LAG-3 は、23 番目のセリンと 24 番目のグリシンの間でシグナルシーケンスが切断され、成熟 LAG-3 の N 末端は 24 番目のグリシンであることが明らかになった。一方、FGL1 との結合能を欠く LAG-3-L14Q:V20A では、20 番目のアラニンと 21 番目のバリンの間でシグナルシーケンスが切断され、N 末端が 21 番目のバリンに変化していた。

この結果をもとに、切断部位が知られている免疫グロブリン軽鎖のシグナルシーケンスを 21 番目のバリンあるいは 24 番目のグリシンの上流につないだキメラ分子を作製して解析したところ、24 番目のグリシンを N 末端とする際にのみ FGL1 と結合できることが確認された。

さらに、LAG-3-L14Q:V20A と同様に FGL1 との結合能を選択的に欠く別の変異体や安定な pMHC クラス II との結合能を選択的に欠く変異体を用いて免疫学的な解析を行い、LAG-3 による T 細胞の活性化抑制、自己免疫疾患の抑制およびがん免疫の減弱には安定な pMHC クラス II との結合が必須であり、FGL1 との結合は不要であることを明らかにした。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

免疫チェックポイント阻害療法の成功により、各種免疫補助受容体を標的とした新規治療法の開発競争が世界中で激しく繰り広げられている。一方、基礎研究は後回しにされており、

各分子の機能について基本的な情報さえ不足している。LAG-3 の機能が発揮されるメカニズムの解明などにより、効果的かつ安全な治療法の開発が促進されると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, Yoshikawa H, Maenaka K, Ishimaru N, Kosako H, Takemoto T, and Okazaki T. Binding of the inhibitory co-receptor LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity*. 2022 in press.

Shimizu K, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Takemoto T, and Okazaki T. PD-1 preferentially inhibits the activation of low affinity T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 118(35): e2107141118, 2021

[3-2] 学会発表

Okazaki T, Shimizu K, Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM. Regulatory mechanisms of T cell activation by immuno-inhibitory co-receptors. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec. 9, 2021, Nara

Shimizu K, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Okazaki T. PD-1 preferentially inhibits the activation of low affinity T cells. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec. 8, 2021, Nara

Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Okazaki T. LAG-3 engagement with stable pMHCII is essential for the exertion of its inhibitory function. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec. 8, 2021, Nara

[3-3] 成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今回開発した方法を用いて、免疫シナプスに集積する分子の動態をより詳細に解明するとともに、PD-1 などによる影響を明らかにしていく予定である。また、LAG-3 が安定な pMHC クラス II を選別するメカニズムなどについても解明が期待される。