

研究題目 LAG-3 とそのリガンド分子による自己免疫応答制御機構の解明

研究組織

研究代表者：丸橋 拓海（東京大学定量生命科学研究所）

共同研究者：竹本 龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

免疫システムの司令塔であるT細胞の活性化は、T細胞受容体（TCR）を介した抗原刺激に加え、正または負のシグナルを伝達する免疫補助受容体によって厳密に制御されている。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、免疫補助受容体の機能およびその制御機構の理解のためには必須となる知見である。それにも関わらず、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限られている。抑制性免疫補助受容体LAG-3もそのひとつで、当初抗原ペプチドをTCRに提示する分子である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るなど、リガンド特異性が長らく不明のままであった。近年申請者らは、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MHCII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にした（Maruhashi et al, *Nat Immunol*, 2018）。一方で、その直後、新たに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）。現在まで、MHCIIおよびFGL1がそれぞれどのように、そしてどの程度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ると言える。

申請者らは、独自に樹立した実験系、研究材料を駆使して、LAG-3と各リガンド候補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、免疫学的に検証してきた。その中で、MHCIIまたはFGL1それぞれとの相互作用を特異的に欠くLAG-3変異体の同定に成功してい

る。また、所属研究室において、LAG-3遺伝子欠損によってNODマウスが自然発症する自己免疫性1型糖尿病が増悪化することを明らかにしている（Okazaki et al, *J Exp Med*, 2011）。そこで、本研究では、同定したアミノ酸変異をゲノム編集技術によってNODマウスに導入し、LAG-3と各リガンド分子との相互作用が1型糖尿病の発症および病態に与える影響を比較解析することで、LAG-3による自己免疫応答抑制機能を担う真のリガンドの同定、そして機能的独立性・代償性・協調性を明らかにすることを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

CRISPR/Cas9システムを利用し、各リガンド分子との結合を消失させるアミノ酸変異をLAG-3遺伝子に導入したノックインマウスをNOD背景で作出した。具体的には、マウス受精卵にCas9タンパク質とガイドRNA、および変異を導入するための鋳型となるオリゴDNAを混合し、エレクトロポレーション法によって導入した。受精卵を仮親マウスに移植して得られた仔マウスの遺伝子を解析し、変異が導入された個体をスクリーニングした。変異が高頻度に導入されたマウスを交配してホモ変異マウスを得た。

野生型マウスと各ノックインマウスを比較することにより、LAG-3による1型糖尿病の発症抑制に各リガンドがどの程度寄与しているのかを比較検討した。具体的には、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。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

MHCII との相互作用を特異的に消失させるアミノ酸変異をLAG-3 遺伝子に導入したNOD-Lag3-P111A マウス、FGL1 との相互作用を特異的に消失させるアミノ酸変異をLAG-3 遺伝子に導入したNOD-Lag3-K27E マウスの作出に成功した。

MHCII との相互作用を特異的に消失させるアミノ酸変異の導入により糖尿病の増悪化を認め、NOD-Lag3-P111A マウスはLAG-3 遺伝子欠損NOD (NOD-Lag3-KO) マウスと同様の時間経過および頻度で、糖尿病を発症した。また、野生型NOD マウスに比べ、NOD-Lag3-P111A マウスにおいて膵臓浸潤T細胞の数、増殖、IFN- γ 産生が亢進しており、その亢進の程度はNOD-Lag3-KO マウスとほぼ同じであった。一方で、NOD-Lag3-K27E マウスにおいて糖尿病の増悪化は認められなかった。以上の結果から、LAG-3による糖尿病発症抑制にはMHCII との相互作用が必要且つ十分であり、FGL1 との相互作用は不要であることが明らかになった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究によって、LAG-3による自己免疫応答制御における真の機能的リガンドがMHCIIであること、そしてFGL1は不要であることを明確に示すことができた。LAG-3とMHCIIとの相互作用を標的とすることで、自己免疫疾患に対するより効果的な新規治療法開発につながることを期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Takeo K. Maeda, Jun Ikubo, Harunori Yoshikawa, Katsumi Maenaka, Naozumi Ishimaru, Hidetaka Kosako, Tatsuya Takemoto, Taku Okazaki. Binding of the inhibitory co-receptor LAG-3 to stable peptide-MHCII limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity*. 2022 in press.

[3-2]学会発表

1) Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Taku Okazaki. LAG-3 engagement with stable pMHCII is essential for the exertion of its inhibitory function. 第50回日本免疫学会学術集会、奈良県、奈良春日野国際フォ

ーラム 薨、12月8日、2021年

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

本共同研究では1型糖尿病を自然発症するNOD マウスにおいて、LAG-3の機能を発動させて自己反応性T細胞の活性化を抑制するリガンドを決定した。自己免疫疾患の発症メカニズムは使用するモデルによって異なる。また、LAG-3は自己免疫応答のみならず、感染およびがん免疫応答の制御にも重要な分子であることが知られている。そこで今後は、発症メカニズムの異なる自己免疫疾患モデル、感染モデルなどを用いて同様の解析を行うことで、各疾患において重要なリガンドの同定、そして機能的独立性・代償性・協調性を明らかにしていくことが重要である。