

研究題目 LAG-3 とそのリガンド分子による

自己免疫・がん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

抑制性免疫補助受容体 PD-1 および CTLA-4 を阻害することによってがん免疫応答を賦活化し、免疫系によるがん細胞の排除を促すがん免疫療法、いわゆる免疫チェックポイント阻害療法の成功により、免疫補助受容体群に関する研究・開発は隆盛を極めている。その中でも抑制性免疫補助受容体 LAG-3 は、がん免疫療法において PD-1 と CTLA-4 に次ぐ有望な薬剤標的として期待されてきた。最近、LAG-3 と PD-1 に対する阻害抗体の併用療法が悪性黒色腫の治療に有効であることが臨床試験で確認され、FDA により承認されたことから、注目度がさらに高まっている。しかし、応用研究ばかりが先行しており、LAG-3 による免疫抑制機構の理解が遅れている。特に、我々は先行研究において LAG-3 のリガンドとして安定な構造を持つペプチド-MHC class II 複合体 (pMHCII) を同定したが (Maruhashi et al, Nat Immunol, 2018)、その直後、別の研究グループから fibrinogen-like protein 1 (FGL1) が真のリガンドであるとの報告がなされるなど (Wang et al, Cell, 2019)、機能的リガンドが何であるのかという基礎的な情報すら意見の一致が得られていない。

我々はこれまでに、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、および LAG-3 との結合を欠くがその他の機能は維持する MHCII 変異体を同定することに成功している (一部未発表)。そこで本研究では、それら変異体を発現するゲノム編集マウスを作製・解析することで、LAG-3 による自己免疫およびがん免疫応答抑制機能における各リガ

ンド候補分子の独立性・代償性・協調性を明らかにすることを目指す。

[1-2] 研究の方法・経過

前年度の徳島大学先端酵素学研究所「共同利用」による研究によって、すでに LAG-3 については遺伝子改変マウスの作製に成功している。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 システムを利用し、LAG-3 との結合を消失させるアミノ酸変異を MHCII 遺伝子に導入したノックインマウスを NOD および C57BL/6 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。現在、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が得られたところであり、表現型解析の準備を進めている。

前年度に作製した MHCII との相互作用を特異的に欠く C57BL/6-Lag3-P111A マウスを用いてがん細胞株移植実験を行い、LAG-3 による抗腫瘍免疫抑制に MHCII との相互作用がどの程度寄与しているのかを検討した。具体的には、MC38 がん細胞株を皮下移植した後、腫瘍の大きさを経時的に計測した。また、腫瘍浸潤 T 細胞の活性化マーカーおよびサイトカイン、エフェクター分子の発現をフローサイトメトリーによって評価した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

LAG-3 との結合を欠くがその他の機能は維持する MHCII 変異体を発現する NOD および C57BL/6 背景のノックインマウスの作製に成功した。

MHCII との相互作用を特異的に欠く C57BL/6-Lag3-P111A マウスにおいて、LAG-3 遺伝子欠損 (C57BL/6-Lag3-KO) マウスと同程度の腫瘍増殖遅延が認められた。また、野生型マウスに比べ、C57BL/6-Lag3-P111A マウスにおいて腫瘍浸潤 CD4 陽性 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 C57BL/6-Lag3-KO マウスとほぼ同じであった。以上の結果から、LAG-3 ががん免疫応答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、一方で、LAG-3 は FGL1 との結合のみでは機能を発揮できないこと、pMHCII との結合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が明らかとなった。

[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 によるがん免疫応答制御における真の機能的リガンドが MHCII であることを明確に示すことができた。本研究成果は、LAG-3 と MHCII 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。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1) 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 May 10;55(5):912-924.e8.

[3-2] 学会発表

1) Takumi Maruhashi, Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Kenji Shimizu, Taku Okazaki. Stable pMHCII serves as the ligand of LAG-3 to trigger its inhibitory function. 第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本県、熊本城ホール、12 月 9 日、2022 年

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同研究では、LAG-3 の機能を惹起し、がん特異的 T 細胞の活性化を抑制するリガンドを決定した。今後は、本年度に作出したノックインマウスを用いて、LAG-3 との相互作用を欠く MHCII 変異体が I 型糖尿病の発症および抗腫瘍免疫に与える影響を解析し、さらにこれまでに LAG-3 ノックインマウスの解析から得られた結果と比較検討することで、LAG-3-MHCII 相互作用による免疫制御機構の全貌を明らかにしていく予定である。