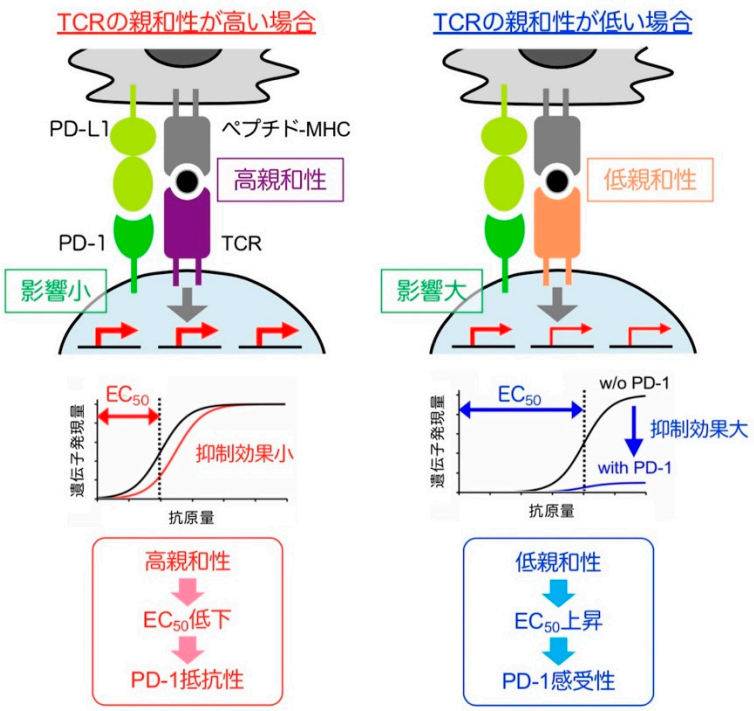
24　PD-1によるT細胞活性化制御機構の解明	岡崎　拓

【目的】獲得免疫応答において主要な役割を担うT細胞は、細胞表面に発現する抗原受容体（T細胞受容体：TCR）が抗原提示細胞上のMHC分子に提示される抗原ペプチドを認識することにより活性化を開始する。抗原特異的なTCRシグナルに、多様な興奮性および抑制性の免疫補助受容体を介した免疫補助シグナルが組み合わさり、T細胞の活性化の程度および活性化後の機能が決定される。近年、抑制性免疫補助受容体であるPD-1およびCTLA-4を標的としたがん免疫療法の成功により、抑制性免疫補助受容体は大きな注目を集めている。実験動物およびヒトを対象とした様々な研究から、PD-1は自己に対する不適切な免疫応答やがん免疫応答を抑制する機能を担うことが明らかになっているが、依然、その機能には多くの謎が残されている。特に、PD-1が実際にどのようなT細胞を抑制しているのか、PD-1阻害によりそれらのT細胞がどのように変化するのかについては、多くの研究報告があるものの、明確な解答は得られていない。そこで本研究では、T細胞の応答特性がPD-1による抑制効果に与える影響を解析した。

【方法】同一の抗原に対して異なる親和性を有するTCRを発現するT細胞を抗原刺激し、発現が誘導される遺伝子のEC_{50}とPD-1感受性を評価した。また、MHCの発現量が異なる抗原提示細胞を用いてT細胞を抗原刺激し、抗原刺激応答性に発現するレポーター遺伝子のEC_{50}とPD-1感受性を評価した。

【結果】TCRの抗原親和性が低い場合ほど、PD-1による抑制効果が強く認められた。MHCの発現量は遺伝子発現誘導に必要な抗原量は大きく変化させたが、PD-1 感受性には影響を与えなかった。これらの結果から、PD-1 は個々のTCRから伝えられるシグナルの強度が低い場合ほど、強い抑制効果を示すことが示唆された。

TCRの抗原親和性が低い場合ほどPD-1による抑制効果が強く認められる



24. PD-1 による T 細胞活性化制御機構の解明

岡崎　拓

東京大学 定量生命科学研究所 分子免疫学研究分野

Key words：免疫学，T 細胞，免疫補助受容体，EC_{50}

緒　言

獲得免疫応答において主要な役割を担う T 細胞は、細胞表面に発現する抗原受容体（T 細胞受容体 : TCR）が抗原提示細胞上の MHC 分子に提示される抗原（断片化されたペプチド）を認識することにより活性化を開始する。抗原特異的な TCR シグナルに、多様な興奮性および抑制性の免疫補助受容体を介した免疫補助シグナルが組み合わさり、T 細胞の活性化の程度および活性化後の機能が決定される。近年、抑制性免疫補助受容体である PD-1 および CTLA-4 を標的としたがん免疫療法の成功により、抑制性免疫補助受容体は大きな注目を集めている［1］。実験動物およびヒトを対象とした様々な研究から、PD-1 は自己に対する不適切な免疫応答やがん免疫応答を抑制する機能を担うことが明らかになっているが、依然、その機能には多くの謎が残されている。特に、がん免疫療法において、PD-1 が実際にどのような T 細胞を抑制しているのか、PD-1 阻害によりそれらの T 細胞がどのように変化してがん細胞を破壊しているのかについては、多くの研究報告があるものの、明確な解答は得られていない。

PD-1 はチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 をリクルートし、TCR シグナルの上流域で活性化される各種チロシンリン酸化酵素の作用を打ち消すことにより T 細胞の活性化を抑制することから、より下流で引き起こされる転写因子の活性化は一様に抑制され、それらの転写因子によってもたらされる遺伝子発現も一様に抑制されると予想される。一方、PD-1 を高発現している細胞が特定の機能を有することなどから、PD-1 は T 細胞の機能を質的に変化させることが知られている。遺伝子発現を一様に抑制するのであれば、PD-1 は T 細胞の活性化の程度を単純に弱めるだけとなり、質的な影響を説明することができない。最近我々は、T 細胞における活性化に伴う遺伝子発現変化を詳細に解析することにより、発現誘導に必要な抗原量が遺伝子によって異なること、PD-1 が発現誘導に多くの抗原を必要とする遺伝子をより強く抑制することを見出した（図 1）［2］。

T 細胞は、VDJ 組み換えにより、各々が異なる配列の TCR を発現する。TCR の配列により抗原への特異性および親和性が決定されるため、抗原への特異性および親和性は T 細胞ごとに異なる。このことから、抗原刺激応答性の遺伝子発現誘導に必要な抗原量が T 細胞ごとに異なり、それに応じて、PD-1 に対する感受性も T 細胞ごとに異なると予測される。そこで本研究では、T 細胞の応答特性が PD-1 による抑制効果に与える影響を解析した。

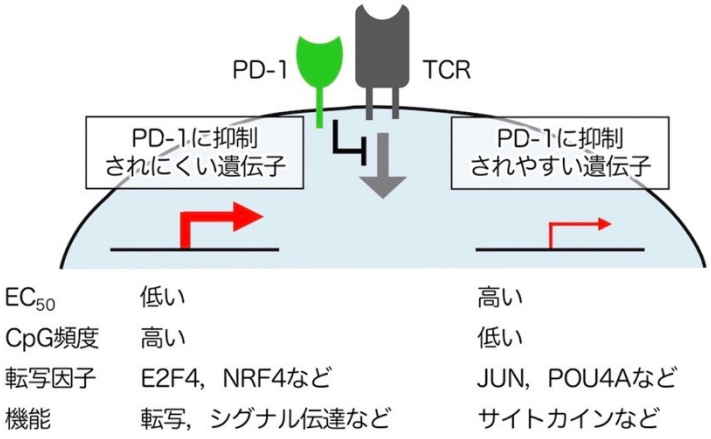


図1. T細胞における抗原刺激応答性の遺伝子発現誘導に対するPD-1の効果
抗原刺激により様々な遺伝子の発現がT細胞において誘導される。従来、PD-1はこれらの遺伝子の発現誘導を均一に抑制すると考えられていたが、PD-1による抑制を受けにくい遺伝子（左）と受けやすい遺伝子（右）が存在することを先行研究において明らかにした。また、これらの遺伝子が異なる特徴を有していることを見出した。

方法および結果

1. TCR の抗原親和性が PD-1 による抑制効果に与える影響

同一抗原に対して異なる親和性で応答する T 細胞を比較するために、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）の部分ペプチド（$pMOG_{35-55}$）を MHC クラスⅡの $I\text{-}A^b$ 拘束性に認識する TCR である 1MOG9 を利用した。先行研究［3，4］を参考にして、$pMOG_{35-55}/I\text{-}A^b$ への親和性を変化させるアミノ酸変異を 1MOG9 TCR のβ鎖の抗原認識部位に導入し、1MOG9 TCR 変異体（E100S、E100T、G107A/E100S、G107S/E100S、G107A/E100T および G107S/E100T）を作製した（図 2a）。TCR のα鎖およびβ鎖を欠く T リンパ腫細胞株 BW1100.129.237 細胞を用いて、まずは PD-1 の発現量を均一にするため、内在性の PD-1 を CRISPR/Cas9 にて欠損させた後、PD-1 を強制発現させた［5］。さらに CD3δ、CD3ζ、CD28 および CD4 を導入した後、1MOG9 TCR 変異体を導入した。遺伝子の導入は全てレトロウイルスベクターを用いて行なった。マウス肉腫細胞株 MethA 細胞の内在性 PD-L1 を CRISPR/Cas9 にて欠損させた後、$I\text{-}A^b$、CD86、CD48、ICAM-1 および PD-L1 を強制発現させて抗原提示細胞として用いた。抗原提示細胞に $pMOG_{35-55}$ を提示させ、各 1MOG9 TCR 変異体を発現する T 細胞と共培養し、抗原刺激応答性に発現が誘導される遺伝子の発現量を定量的 PCR にて評価した。抗 PD-L1 抗体を用いることにより、PD-1 が機能する条件としない条件を比較し、PD-1 による抑制効果を評価した。様々な濃度の $pMOG_{35-55}$ を用いて刺激することにより、各遺伝子の発現誘導に必要な抗原量を決定した。発現誘導に必要な抗原量は、PD-1 が機能しない条件において、最大発現量の半分の発現量をもたらす抗原量 EC_{50} として算出した。

以前に行なった網羅的な遺伝子発現解析の結果を参考にして［2］、親和性の高い TCR と低い TCR を同時に解析できる遺伝子として *Egr2* を選択した。図 2b に、抗原親和性が最も高い 1MOG9-G107S/E100T-TCR、中程度の 1MOG9-G107S/E100S-TCR、および最も低い 1MOG9-E100S-TCR の例を示す。*Egr2* の発現における $pMOG_{35-55}$ の EC_{50} は、予想通り、1MOG9-G107S/E100T-TCR で低く、1MOG9-E100S-TCR で高かった。一方、PD-1 によって *Egr2* の発現が抑制される程度は、1MOG9-G107S/E100T-TCR で小さく、1MOG9-E100S-TCR で大きかった。そこで、各 1MOG9 TCR 変異体を発現する T 細胞における *Egr2* の EC_{50} と PD-1 感受性を比較すると、強い相関が認められた（図 2c）。このことから、TCR の抗原親和性が高いほど、PD-1 による抑制効果が小さくなるということが明らかになった［6］。

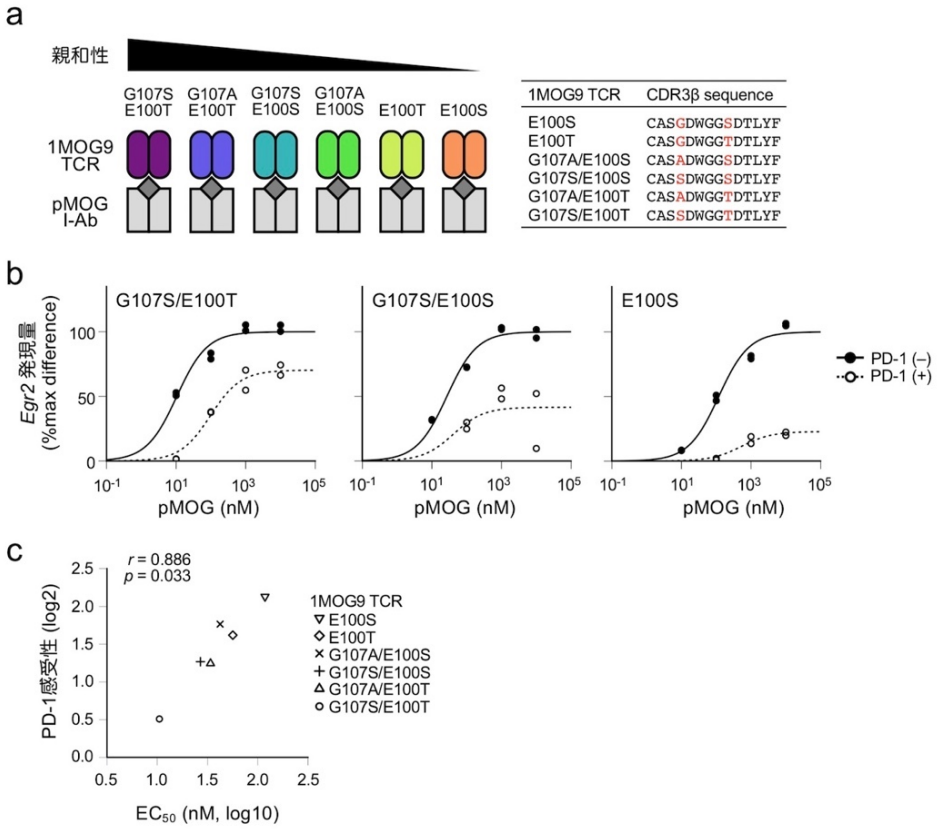


図2. TCRの抗原親和性がPD-1による抑制効果に与える影響

TCRの抗原認識部位にアミノ酸変異を導入することにより、抗原親和性を変化させたTCRを用いて、TCRの抗原親和性がPD-1による抑制効果に与える影響を解析した。その結果、発現するTCRの抗原親和性が弱いほどPD-1による抑制効果が強いことが明らかになった。

a) 使用したTCR変異体の模式図。

b) *Egr2*の発現レベル。

c) *Egr2*発現誘導におけるEC_{50}とPD-1感受性の相関。Spearman's correlation coefficientを用いて評価した。

2. MHCの発現量がPD-1による抑制効果に与える影響

遺伝子発現誘導に必要な抗原量は、TCRの抗原親和性に加えて、様々な要因によって変化する。例えば、MHCの発現量が多いほど、少ない量の抗原ペプチドでも効率的に提示され、T細胞を活性化すると考えられる。実際、MHCの発現量は免疫応答に大きな影響を与える。例えば、樹状細胞は、活性化によりMHCの発現量が増加し、抗原提示能が上昇する。また、がん細胞のMHCの発現量を増加することにより、がん免疫療法の効果が向上することが報告されている。そこで、MHCの発現量がPD-1による抑制効果に与える影響を検討した。

T細胞は、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）の部分ペプチド（$pOVA_{323-339}$）をMHCクラスⅡのI-A^d拘束性に認識するTCRを発現するDO11.10T細胞を利用した。抗原刺激応答性の遺伝子発現誘導を簡便に評価するため、抗原刺激応答性にEGFPを発現するレポーター遺伝子を作製し、DO11.10 T細胞に導入した。抗原提示細胞は、MHCクラスⅡ以外は1と同様にゲノム編集と強制発現を施したMethA細胞を用いた。MHCクラスⅡは、異なるプロモーターの利用とpolyAシグナルの有無によって目的の遺伝子を異なる量で発現させる独自のレトロウイルスベクター系［7］を用いて強制発現させた（図3a）。これらの細胞を用いて1と同様に抗原刺激した後、レポーター遺伝子の発現をフロータイトメータにて検出し、EC_{50}とPD-1感受性を評価した。

図 3b に発現量が最も高い条件（LTR）、中等度の条件（EF1α）、および最も低い条件（MC1＋pA）の例を示す。レポーター遺伝子の発現における pOVA$_{323-339}$の EC$_{50}$は、予想通り、MHC クラスⅡの発現量によって大きく影響を受け、MHC クラスⅡの発現量が最も高い条件と最も低い条件では、100 倍以上の差が認められた（16.8 nM vs. 1,930.5 nM）。一方、PD-1 によってレポーター遺伝子の発現が抑制される程度には、差は認められなかった。実際、全ての条件における MHC クラスⅡの発現量とレポーター遺伝子の EC$_{50}$を比較すると強い逆相関が認められたが（図 3c）、レポーター遺伝子の EC$_{50}$ と PD-1 感受性には優位な相関は認められなかった（図 3d）。これらの結果から、MHC の発現量は遺伝子発現誘導に必要な抗原量は大きく変化させるが、PD-1 感受性には影響を与えないということが明らかとなった［6］。

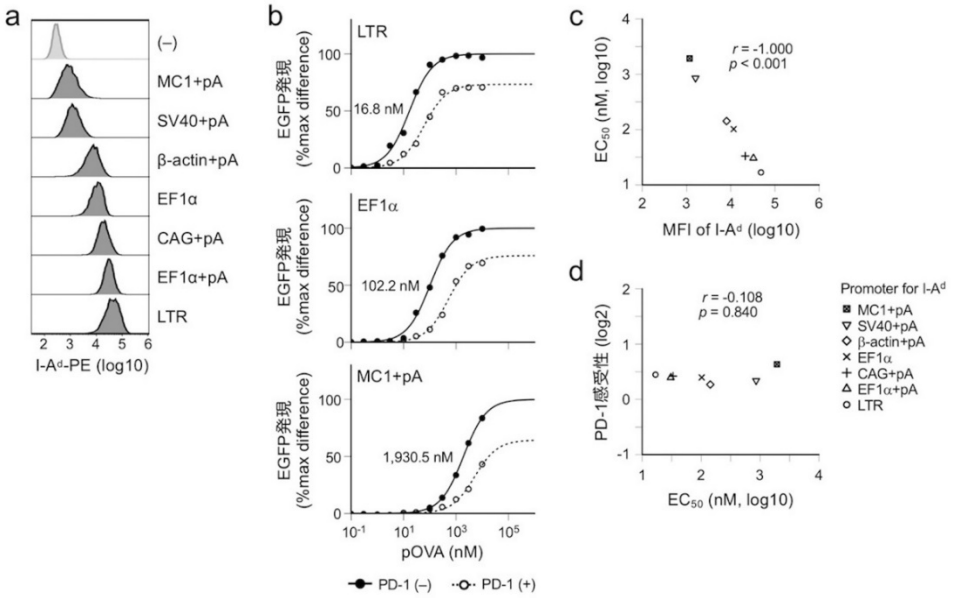


図3. MHCの発現量がPD-1による抑制効果に与える影響

異なるプロモーターを用いてMHCを強制発現させることにより、抗原提示細胞上に発現するMHCの量を変化させ、MHCの発現量がPD-1による抑制効果に与える影響を解析した。その結果、MHCの発現量はレポーター遺伝子のEC$_{50}$とは逆相関を示したが、PD-1感受性とは相関を示さなかった。

a） MHC の発現レベル。

b） レポーター遺伝子の発現レベル。図中の数字は EC$_{50}$の値を示す。

c） レポーターの発現誘導における EC$_{50}$と MHC 発現量の相関。Spearman's correlation coefficient を用いて評価した。

d） レポーターの発現誘導における EC$_{50}$と PD-1 感受性の相関。Spearman's correlation coefficient を用いて評価した。

考　察

T 細胞において、抗原刺激による発現誘導が PD-1 によって強く抑制される遺伝子と抑制を受けにくい遺伝子が存在すること、PD-1 によって強く抑制される遺伝子は、そもそも発現誘導に強い抗原刺激を必要とすることなどを先行研究において見出したことから［2］、本研究では、T 細胞の抗原応答特性が遺伝子発現および PD-1 感受性に与える影響を解析した。その結果、TCR の抗原親和性が高いほど、PD-1 による抑制効果が小さくなるということが明らかになった。一方、MHC の発現量が高いほど遺伝子発現誘導に必要な抗原量は低減するものの、PD-1 感受性は影響を受けないということが見出された［6］。MHC の発現量が増加すると抗原ペプチドの提示効率が向上するために、少な

い　抗原ペプチドでも十分な抗原ペプチドーMHC 複合体が形成されて T 細胞を活性化し、遺伝子発現を誘導すると考えられる。しかし、MHC の発現量が低い細胞と高い細胞で、前者でより多い量の、後者ではより少ない量の抗原を培養液中に添加することで、同程度の T 細胞の活性化が誘導された場合を考えると、抗原提示細胞上に存在する抗原ペプチドーMHC 複合体の量は同程度と考えられる。従って、MHC の発現量が EC_{50}を変化させるものの、PD-1 による抑制効果には影響を与えないことも当然と言える。TCR の抗原親和性が高い場合には、TCR が抗原ペプチドーMHC 複合体とより安定的に結合するために、個々の TCR からより強いシグナルが伝えられる。すなわち、個々の TCR から伝えられるシグナルの強度が、PD-1 による抑制効果の大きさを決定していると考えられる。

今回の解析では、PD-1 が分子として固有する特徴を明らかにするために、様々な条件を固定した実験系を構築して用いた。生体における免疫応答では、関与する分子の種類と量が大幅に変動することから、今後、今回見出した特性が実際の免疫応答においてどのように反映されるのかを検証していく予定である。

近年、がん免疫研究は大きな発展を遂げており、PD-1 以外にも、様々な分子を標的とした治療法が多数開発されている。しかし、各分子の基礎的な研究はあまり進んでおらず、リガンドやシグナル伝達機構が不明なまま臨床応用が開発されているような免疫補助受容体も多数存在する。また、上述の通り、PD-1 についても多くの謎が残されている。今後、基礎研究により各分子の特性および分子間の協調的な作用が解明されることにより、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。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学定量生命科学研究所分子免疫学研究分野の清水謙次、杉浦大祐、丸橋拓海、岡崎一美である。

文　献

1) 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. 2013 Dec; 14(12): 1212-8. PMID: 24240160 DOI: 10.1038/ni.2762

2) Shimizu K, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi TM, Takegami Y, Cheng C, Ozaki S, Okazaki T. PD-1 imposes qualitative control of cellular transcriptomes in response to T cell activation. Mol Cell. 2020 Mar 5; 77(5): 937-950.e6. PMID: 31926851 DOI: 10.1016/j.molcel.201912.012

3) Udyavar A, Alli R, Nguyen P, Baker L, Geiger TL. Subtle affinity-enhancing mutations in a myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific TCR alter specificity and generate new self-reactivity. J Immunol. 2009 Apr 1; 182(7): 4439-47. PMID: 19299745 DOI: 10.4049/jimmunol.0804377

4) Alli R, Zhang ZM, Nguyen P, Zheng JJ, Geiger TL. Rational design of T cell receptors with enhanced sensitivity for antigen. PlosOne. 2011 Mar 23; 6(3): e18027. PMID: 21455495 DOI: 10.1371/journal.pone.0018027

5) Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazki T. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. Science. 2019 May 10; 364(6440): 558-566. PMID: 31000591 DOI: 10.1126/science.aav7062

6) Shimizu K, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Takemoto T, Okazaki T. PD-1 preferentially inhibits the activation of low-affinity T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35):e2107141118. PMID: 34433672 doi: 10.1073/pnas.2107141118.

7) Maeda TK, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Okazaki T. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. J Biol Chem. 2019 Apr 12; 294(15): 6017-6026. PMID: 30760527 DOI: 10.1074/jbc.RA119.007455