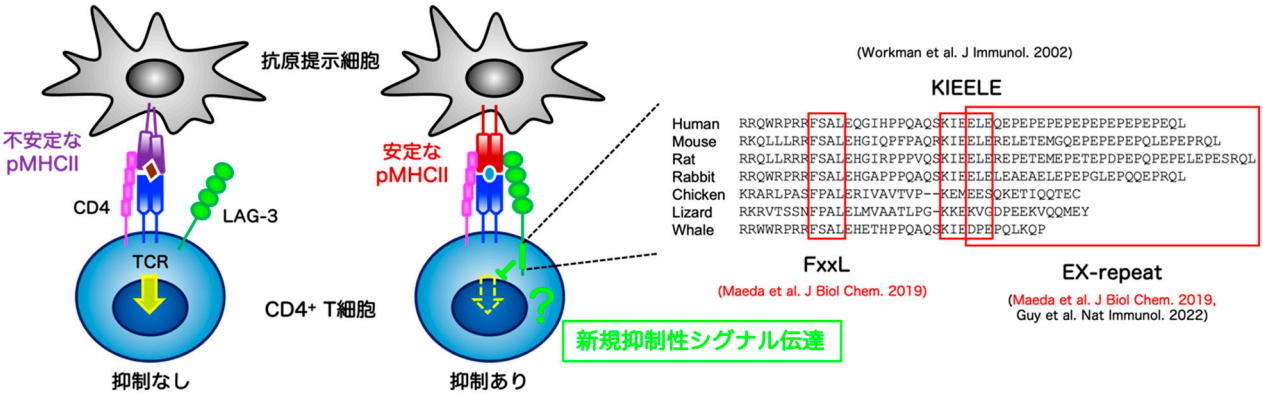
138　LAG-3を介した抑制性シグナルの分子機構解明	丸橋　拓海

【目的】LAG-3（Lymphocyte activation gene-3）はPD-1とCTLA-4に次ぐがん免疫療法の有力な標的として期待され、すでにがん治療薬としてLAG-3阻害抗体の臨床応用が始められているが、LAG-3の免疫抑制の分子機構については多くの謎が残されている。我々はこれまでに、LAG-3がペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスⅡ分子の複合体（pMHCⅡ）を構造依存的に認識することでT細胞の活性化を選択的に抑制する、という特徴的な分子機構を明らかにしてきた。さらに、LAG-3の細胞内領域に抑制能を発揮するのに必須かつ未知のモチーフ（FxxL、EX-repeat）を同定し、抑制性のシグナルを伝達している可能性を見出したが、その作用メカニズムは全く不明であった。そこで本研究では、LAG-3による新規抑制性シグナル伝達の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】これまでに、免疫補助受容体およびそのリガンドがT細胞活性化に与える影響を定量的且つ鋭敏に検出可能な共培養実験系を確立している。本研究では、この実験系に「近接依存性標識法」を組み合わせることで、リガンドとの結合あるいはT細胞活性化依存的にLAG-3の細胞内領域に会合する分子の同定を試みた。

【結果】まず、近接したタンパク質の標識を触媒する酵素を細胞内領域に融合したLAG-3の機能について、共培養実験系を用いて評価したところ、リガンドとの相互作用依存的な抑制機能を維持していることが確認できた。次に、添加する基質濃度、抗原ペプチド濃度および培養時間を検討し、LAG-3による抑制が強く認められ、かつ融合した酵素によって近接タンパク質が十分に標識される条件をELISA法およびウエスタンブロッティングによって決定した。その条件において、酵素融合LAG-3によって標識されたタンパク質を質量分析法によって網羅的に解析したところ、LAG-3自身を含む673種類のタンパク質に由来する891種類のペプチドを同定した。抗原刺激の有無およびリガンドであるpMHCⅡとの結合能を欠くLAG-3-P111A変異体を用いた解析の結果を比較することで、T細胞の活性化あるいはリガンドとの結合依存的にLAG-3細胞内領域に会合する複数の候補分子を得ることに成功した。今後、同定した候補分子についてRNA干渉を用いた遺伝子ノックダウン、またはCRISPR/Cas9法を用いた遺伝子ノックアウトを行い、LAG-3による抑制に与える影響を確認することでLAG-3による抑制性シグナル伝達の分子機構を明らかにしていく予定である。

本研究の目的：LAG-3を介した新規抑制性シグナル伝達の分子機構の解明



138. LAG-3 を介した抑制性シグナルの分子機構解明

丸橋　拓海

東京大学 定量生命科学研究所 分子免疫学研究分野

Key words：抑制性免疫補助受容体，免疫チェックポイント，LAG-3，シグナル伝達

緒　言

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。近年、抑制性免疫補助受容体 PD-1 と CTLA-4 を阻害するがん免疫療法、いわゆる免疫チェックポイント阻害療法の成功により、免疫補助受容体群を標的とした治療法の開発が世界中で精力的に進められている。その中でも LAG-3 は、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が、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［1］、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、競争の激化によって基礎研究が後回しにされ、LAG-3 による免疫抑制機構がほとんどわかっていないまま臨床応用が行われるという、極めて歪な状況にあった。近年、我々は、LAG-3 が安定な構造を持ったペプチド–MHCⅡ複合体（pMHCⅡ）を選択的に認識し、安定な pMHCⅡに対する T 細胞応答を選択的に抑制することにより、自己免疫疾患の発症を抑制するとともにがん免疫を減弱させていることを明らかにした［2, 3］。このように、LAG-3 の機能的リガンドや免疫抑制機能についての理解を進めることに成功しているが、LAG-3 による T 細胞活性化抑制の分子メカニズムは未だ不明である。

PD-1 は、細胞内領域のシグナル伝達モチーフを介して脱リン酸化酵素 SHP-2 と会合することによって T 細胞の活性化を抑制する。我々はこれまでに、LAG-3 の細胞内領域に抑制能を発揮するのに必須のモチーフを同定しており、LAG-3 も PD-1 と同様に抑制性のシグナルを伝達している可能性を見出している［4］。しかし本モチーフは種間で保存されているものの、他の免疫補助受容体に認められる既知のシグナル伝達モチーフとは異なる新規のモチーフであり、その作用機序は不明であることから、本研究ではその解明を目的とした。

我々は、免疫補助受容体およびそのリガンドを強制発現させた T 細胞株および B 細胞株を抗原ペプチド存在下で共培養し、その抗原刺激によって産生される IL-2 を定量することにより免疫補助受容体が T 細胞活性化に与える影響を定量的且つ鋭敏に検出する実験系を確立しており、実際に、抑制性（LAG-3、PD-1、CTLA-4）および興奮性（CD28、ICOS、4-1BB、CD27、GITR）の免疫補助受容体の T 細胞活性化制御機能が再現できている。これまでにこの共培養実験系と古典的な免疫共沈降法を用いて LAG-3 の細胞内領域に会合する分子の探索を行ってきたが、決定的な候補分子は得られていない。このことから、抑制性シグナル伝達に関与する分子と LAG-3 細胞内領域との会合が弱い、または一過的なものである可能性が示唆される。近年、生体分子間相互作用を解析する強力な技術として、近接依存性標識法が開発された［5］。この手法は、目的タンパク質に酵素を融合し、その酵素が触媒することで近接した（相互作用した）タンパク質を標識する手法であり、一時的で弱い相互作用をするタンパク質も同定することが可能である。そこで本研究では、近接依存性標識法を用いて LAG-3 の細胞内領域に会合する分子の探索を行うことで、抑制性シグナル伝達の分子機構の解明を試みた。

方法および結果

1. 近接依存性標識酵素を融合した LAG-3 の抑制機能の検証

まず、近接したタンパク質の標識を触媒する酵素を細胞内領域（C 末端）に付与した LAG-3 の機能について、上述

の共培養実験系を用いて評価した。具体的には、酵素融合 LAG-3 を強制発現させた T 細胞株と安定な pMHCⅡを発現する B 細胞株を、抗原ペプチドおよび LAG-3 阻害抗体存在下で共培養し、T 細胞活性化にともなって産生される IL-2 を ELISA 法によって定量した。その結果、酵素融合 LAG-3 が抑制機能を維持していることが確認できた（図 1）。

我々はこれまでに、安定な pMHCⅡとの結合を特異的に欠く LAG-3-P111A 変異体を同定している［2, 3］。酵素融合 LAG-3-P111A 変異体についても同様に評価したところ、完全に抑制機能を失っていたことから、酵素融合 LAG-3 はリガンドである安定な pMHCⅡとの結合依存的に T 細胞活性化を抑制しうることが確認できた（図 1）。

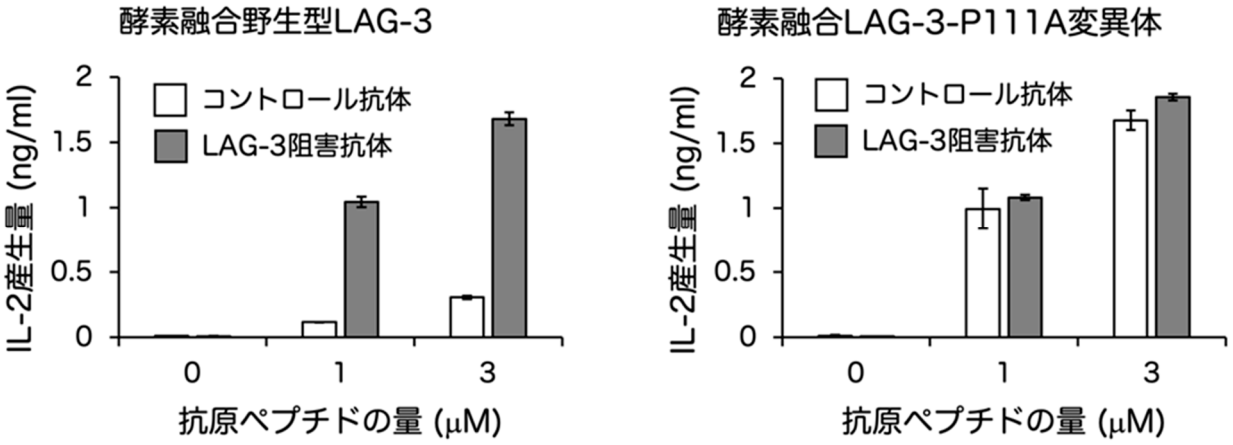


図 1. 酵素融合 LAG-3 の抑制機能の検証

酵素融合野生型 LAG-3 および安定な pMHCⅡとの結合能を欠く酵素融合 LAG-3-P111A 変異体を発現させた T 細胞株を、安定な構造の抗原ペプチドーMHCⅡ複合体を発現する B 細胞株と共培養することで刺激し、活性化に応じて産生される IL-2 の量を ELISA 法を用いて測定した。LAG-3 阻害抗体添加の有無により、LAG-3 依存的な抑制機能を評価した。

2. 近接依存性標識法を用いた LAG-3 細胞内領域に会合する分子の探索

1. と同様の共培養実験系において、添加する基質濃度、抗原ペプチド濃度および培養時間を検討し、LAG-3 による抑制が強く認められ、かつ融合した酵素によって近接タンパク質が十分に標識される条件を ELISA 法およびウエスタンブロッティングによって決定した。その条件において、酵素融合野生型 LAG-3 および酵素融合 LAG-3-P111A 変異体によって標識されたタンパク質を質量分析法によって網羅的に解析した。この解析は、共同研究者である徳島大学先端酵素学研究所藤井節郎記念医科学センター細胞情報学分野の小迫英尊教授のもとで行った。その結果、LAG-3 自身を含む 673 種類のタンパク質に由来する 891 種類の標識されたペプチドを同定した。さらに、抗原刺激の有無およびリガンドである pMHCⅡと結合できない LAG-3-P111A 変異体を用いた解析の結果を比較することで、リガンドとの結合依存的に LAG-3 の細胞内領域に会合する（野生型 LAG-3 サンプルにおいて強く検出される）（図 2A）、あるいは T 細胞の活性化とリガンドとの結合の両方に依存的して LAG-3 細胞内領域に会合する（抗原刺激ありの野生型 LAG-3 サンプルにのみ強く検出される）（図 2B）、複数の候補分子を得ることに成功した。

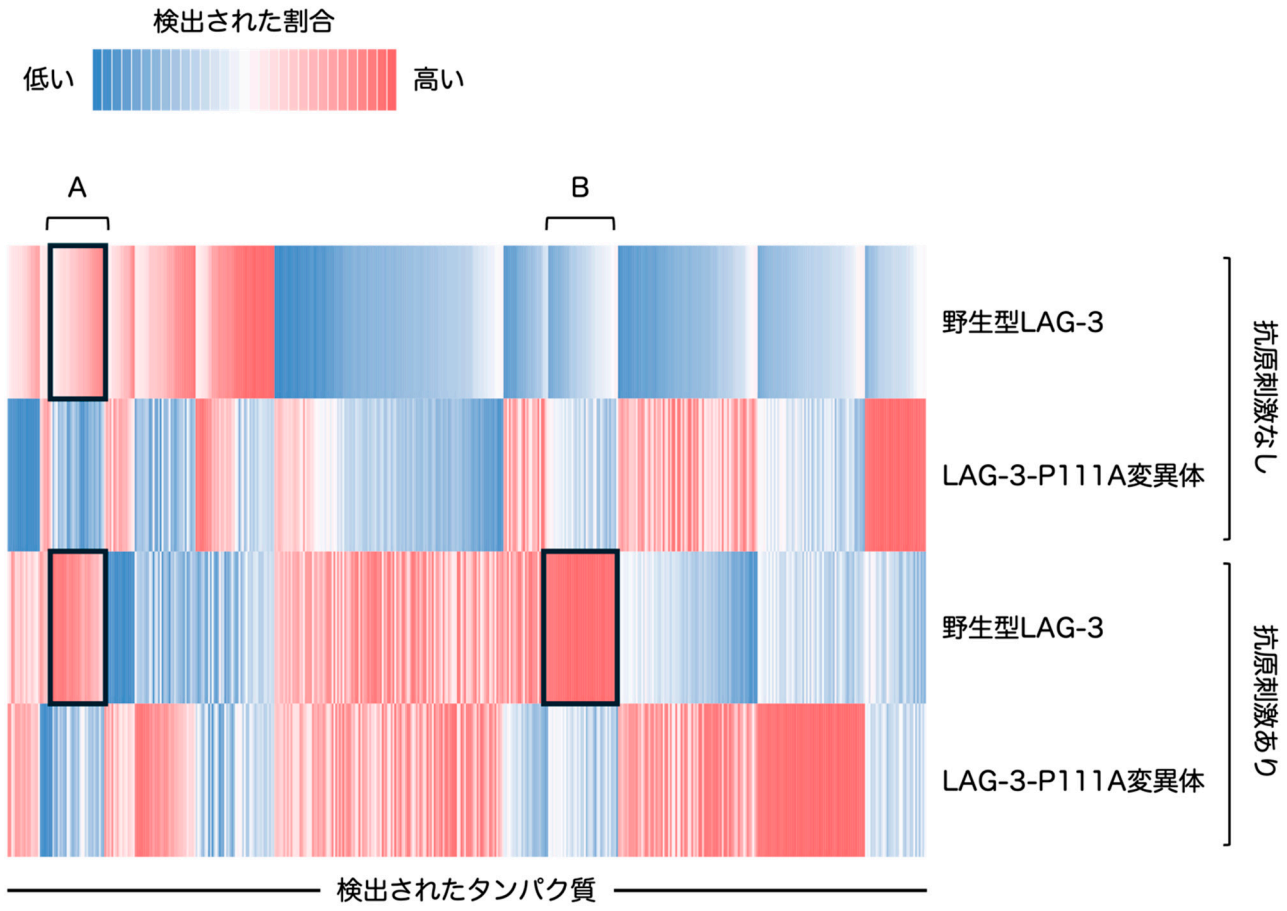


図 2. LAG-3 細胞内領域に近接するタンパク質の網羅的解析

共培養実験系に基質を添加することで、LAG-3 の細胞内領域（C 末端）に付与した酵素に近接したタンパク質の標識を行った。標識されたタンパク質を質量分析法によって網羅的に解析した。野生型 LAG-3 および LAG-3-P111A 変異体を発現させた T 細胞株、抗原ペプチド添加および無添加、の各条件下での解析結果を比較することで、リガンドとの結合に依存的（A）およびリガンドとの結合と抗原刺激の双方（B）に依存的に LAG-3 の細胞内領域に会合する候補分子の絞り込みを行った。

考　察

最新の研究手法を応用した本研究によって、リガンドとの結合および T 細胞活性化依存的に LAG-3 の細胞内領域に会合する複数の候補分子を得ることに成功した。今後、同定した候補分子について RNA 干渉を用いた遺伝子ノックダウン、または CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ノックアウトを行い、LAG-3 による抑制に与える影響を確認することで LAG-3 による抑制性シグナル伝達の分子機構を明らかにしていく予定である。

LAG-3 は我々が独自に見出した未知のシグナル伝達モチーフを有しており、これまでに知られていない分子メカニズムにより T 細胞の活性化を抑制している可能性が高い。そのため、本研究を継続していくことで将来的に新規の抑制性シグナル伝達機構が明らかにできると考えられ、学問的な意義は大きい。さらに、学術的根拠に基づく新たな視点でのアプローチが可能となることから、LAG-3 による抑制性シグナル伝達を担う分子を標的または利用した新規治療法の開発、発展に貢献すると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素学研究所藤井節郎記念医科学センター細胞情報学分野の小迫英尊教授、東京大学定量生命科学研究所分子免疫学研究分野の岡崎拓教授である。

文　献

1） Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, Rutkowski P, Gogas HJ, Lao CD, De Menezes JJ, Dalle S, Arance A, Grob JJ, Srivastava S, Abaskharoun M, Hamilton M, Keidel S, Simonsen KL, Sobiesk AM, Li B, Hodi FS, Long GV; RELATIVITY-047 Investigators. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. N Engl J Med. 2022 Jan 6;386(1):24-34. doi: 10.1056/NEJMoa2109970. PMID: 34986285; PMCID: PMC9844513.

2） Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, Takahashi S, Maeda TK, Shimizu K, Okazaki T. LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. Nat Immunol. 2018 Dec;19(12):1415-1426. doi: 10.1038/s41590-018-0217-9. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30349037.

3） Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, Yoshikawa H, Maenaka K, Ishimaru N, Kosako H, Takemoto T, Okazaki T. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. Immunity. 2022 May 10;55(5):912-924.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2022.03.013. Epub 2022 Apr 11. PMID: 35413245.

4） 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. doi: 10.1074/jbc.RA119.007455. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30760527; PMCID: PMC6463702.

5） Guo J, Guo S, Lu S, Gong J, Wang L, Ding L, Chen Q, Liu W. The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. Cell Commun Signal. 2023 Sep 30;21(1):269. doi: 10.1186/s12964-023-01310-1. PMID: 37777761; PMCID: PMC10544124.