

## PD-1 と CTLA-4 に続く第3の免疫チェックポイント分子 LAG-3 による 免疫抑制機構を解明

徳島大学先端酵素学研究所の丸橋拓海特任助教、岡崎拓教授らの研究グループは、免疫チェックポイント分子であるLAG-3(Lymphocyte Activation Gene-3)による免疫抑制機構を解明しました。PD-1 と CTLA-4に続く第3の免疫チェックポイント分子として注目されているLAG-3が、抑制する標的を選別するメカニズムを明らかにしました。今後、自己免疫疾患の新規治療法や新規がん免疫療法の開発につながることを期待されます。本成果は、10月22日付けで英国科学雑誌【Nature Immunology】オンライン版に掲載されます。

### (報道概要)

徳島大学先端酵素学研究所の丸橋拓海特任助教、岡崎拓教授らの研究グループは、免疫チェックポイント分子<sup>[1]</sup>である LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3) による免疫抑制機構を明らかにしました。

先日、本庶佑博士と James P. Allison 博士が免疫チェックポイント分子 PD-1 および CTLA-4 を介した免疫抑制の阻害によるがん治療法の発見によりノーベル賞を受賞されましたが、LAG-3 は PD-1 と CTLA-4 に次ぐ第3の免疫チェックポイント分子として注目されており、すでに様々な疾患の治療標的として世界中で研究開発が進められています。しかし、LAG-3 による免疫抑制のメカニズムはほとんど知られていませんでした。今回、岡崎教授らのグループは、LAG-3 に結合することで免疫抑制作用を誘導するリガンド<sup>[2]</sup>として、ペプチド-MHC class II<sup>[3]</sup>複合体 (pMHCII) を同定し、さらにこの結合が pMHCII の構造に依存することを見出しました。この特徴的なリガンド認識によって、LAG-3 が自己免疫疾患発症に関わるヘルパーT細胞<sup>[4]</sup>を特異的に抑制していることを明らかにしました。

本研究は、自己免疫疾患発症機構の理解と治療法の開発に貢献するとともに、LAG-3 を標的とした効果的ながん免疫療法の開発につながることを期待されます。

本研究成果は、10月22日付けで英国科学雑誌「Nature Immunology」オンライン版に公開されます。

### (研究の背景)

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ます。このバランスが破綻すると、病原体を排除できなくなる免疫不全や、T細胞が誤って正常な自己組織を攻撃する自己免疫疾患などの重篤な疾患につながります。一方で、一部のがん細胞が抑制性免疫補助受容体 (= 免疫チェックポイント分子) を利用することで T細胞の活性化を抑制し、免疫系による攻撃を回避していることが知られています。実際に、臨床研究の場において PD-1 と CTLA-4 に対する免疫チェックポイント阻害剤が複数のがん種に対して劇的な治療効果を示したことから近年大きな注目を集めています。そのため、他の免疫補助受容体も免疫療法の治療標的として世界

中で研究開発が進められておりますが、LAG-3 は、PD-1 と CTLA-4 に次ぐ第 3 の免疫チェックポイント分子として特に期待されています。

LAG-3 は、ヘルパー T 細胞の補助受容体である CD4 類縁分子として 1990 年に同定されました。これまでに岡崎教授らを含むいくつかのグループによって、LAG-3 は、活性化 T 細胞表面に発現すること、リンパ球の活性化を抑制することにより自己免疫疾患の発症を防いでいること、がん免疫を抑制することなどが報告されていました。しかし、LAG-3 が実際にどのような免疫応答をどのように抑制するかについては、依然、不明な点が多いのが現状でした。また、LAG-3 は CD4 よりも高い親和性で MHC class II (MHCII) と結合し、CD4 と MHCII の結合を競合的に阻害することによって T 細胞の活性化を抑制すると考えられていましたが、直接的な証明はありませんでした。そこで、本研究では LAG-3 のリガンドの探索と免疫抑制機構の解明を試みました。

### (研究の成果)

本研究ではまず、LAG-3 の細胞外領域を多量体化させた可溶性タンパク質 (LAG-3-EC) との結合を指標にした機能発現クローニング法<sup>[5]</sup>を用いて、LAG-3 リガンドの探索を行いました (図 1 A)。その結果、LAG-3 のリガンド発現に重要な遺伝子として、MHC class II trans activator (CIITA) という MHCII 遺伝子の発現を司る主要制御因子を同定しました。LAG-3-EC は CIITA 遺伝子を導入することで内在性の MHCII を発現した細胞には結合し、MHCII 遺伝子を導入した細胞には結合しませんでした (図 1 B)。さらに、LAG-3-EC が結合する細胞に抗原提示させることで誘導されるヘルパー T 細胞株の活性化は LAG-3 によって抑制されますが、LAG-3-EC が結合しない細胞を用いた場合にはその抑制が認められませんでした (図 1 C)。MHCII 遺伝子を欠損させることで LAG-3-EC の結合が無くなったことから、LAG-3 が MHCII に結合することは確認できましたが (図 1 D)、MHCII がリガンドとなるためには CIITA の発現が必要であることが明らかとなりました。

CIITA は MHCII 以外にも、CD74 や H2-DM といった MHCII の構造的安定性の管理に関わるいくつかのタンパク質の発現も制御しています。この CD74 と H2-DM の遺伝子を欠失させた細胞への LAG-3-EC の結合が著しく低下したことから、LAG-3 は安定な構造を持つ MHCII に選択的に結合することが示唆されました (図 2 A)。MHCII の構造は提示する抗原ペプチドとの親和性に大きく影響されることが知られており、実際に MHCII と複合体を形成させた抗原ペプチドのアミノ酸配列によって LAG-3-EC の結合強度および LAG-3 による抑制強度が変化することが確認できました (図 2 B)。

I 型糖尿病のモデルである NOD マウスにおいて病態発症の原因となる自己抗原のひとつとしてインスリン B 鎖の 9-23 番目のアミノ酸で構成されるペプチドが同定されています。その中でも、13-21 番目までの 9 アミノ酸を介して MHCII と複合体を形成した場合 (pInsB<sub>13-21</sub>/MHCII) は安定な構造、12-20 番目までのアミノ酸を介した場合 (pInsB<sub>12-20</sub>/MHCII) は不安定な構造の pMHCII となることが報告されています。上述の実験によって示唆された通り、LAG-3 は pInsB<sub>13-21</sub>/MHCII を強制発現させた細胞には結合し、pInsB<sub>12-20</sub>/MHCII を強制発現させた細胞には結合しませんでした (図 3 A)。この結果から予想される通り、LAG-3 阻害抗体を投与した NOD マウスにおいて、pInsB<sub>13-21</sub>/MHCII に対するヘルパー T 細胞応答が亢進し、一方で pInsB<sub>12-20</sub>/MHCII に対する応答は変化しませんでした (図 3 B)。一般的に、T 細胞を産生する器官である胸腺において自己抗原が CIITA 依存的に安定な構造を持つ pMHCII として提示されており、これを認識してしまう自己反応性 T 細胞は負の選択と呼ばれる仕組みで除去されると考えられています。すなわち、安定な構造を持つ pInsB<sub>13-21</sub>/MHCII 反応性の T 細

## 様式 1

胞は本来体内に存在しないはずであり、実際に LAG-3 阻害抗体非投与条件では、それら T 細胞応答は pInsB<sub>12-20</sub>/MHCII に対する応答に比べて弱いことが確認されました (図 3)。本研究によって、負の選択は不完全であり、一定数の自己を攻撃しうる T 細胞が負の選択を逃れて胸腺外に漏れ出てきており、これらを LAG-3 が抑制することによって自己免疫疾患の発症を防いでいることが明らかとなりました。

最後に、LAG-3 がどのような作用機序でヘルパー T 細胞応答を抑制するのかを検討しました。CD4 の MHCII への結合を LAG-3 がほとんど阻害しなかったことから、LAG-3 は CD4 との競合阻害とは異なるメカニズムでヘルパー T 細胞を抑制することがわかりました (図 4 A)。LAG-3 は T 細胞の表面に存在しますが、細胞の外側でリガンドに結合する部分と細胞の内側で働く部分 (細胞内領域) に分かれています。LAG-3 の細胞内領域を欠失させた変異体が抑制能を失ったことから、LAG-3 は細胞内領域を介して能動的に抑制性のシグナル伝達を行うことで抑制能を発揮していることが明らかとなりました (図 4 B)。

### (研究成果の意義・今後の展望)

本研究によって、LAG-3 による免疫抑制機構が明らかとなりました。これは他の免疫チェックポイント分子とは異なり、LAG-3 は提示される抗原ペプチドによって多様な構造を持つ pMHCII を構造依存的に認識することでその pMHCII 反応性のヘルパー T 細胞を選択的に認識する、つまり多様性の無い単一の分子が免疫系の多様性を制御するという点で非常に特徴的であると言えます。

本研究は、I 型糖尿病を含む自己免疫疾患発症機構の理解と治療法の開発に貢献できると期待されます。さらに、LAG-3 を標的とすることによって、既存の免疫チェックポイント阻害剤とは異なる視点の新規がん免疫療法の開発が可能になると考えられます。

掲載誌 : Nature Immunology

論文題目 : LAG-3 inhibits the activation of CD4+ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII

論文著者 : Takumi Maruhashi, Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Suzuka Takahashi, Takeo K. Maeda, Kenji Shimizu, Taku Okazaki

### (用語解説)

#### [1] 免疫チェックポイント分子

過剰な免疫応答から生体を守るために免疫系にブレーキをかける抑制性の分子のこと。近年、がんが免疫チェックポイント分子を利用することで免疫系からの攻撃を回避していることが明らかになった (2018 年 ノーベル医学・生理学賞)。代表的なものに PD-1 や CTLA-4 がある。

#### [2] リガンド

特定の受容体の特定の結合部位に特異的に結合する物質のこと。一般的に、リガンドが受容体に結合すると細胞へとシグナルが伝達され、遺伝子発現などの応答が起こる。

#### [3] MHC class II (MHCII)

主要適合組織遺伝子複合体、MHC (major histocompatibility complex) は細胞膜貫通型の糖タンパク質であり、抗原ペプチドを細胞表面に提示する分子である。中でも MHCII は抗原提示細胞に発現しており、細胞内に取り込まれた後に分解された外来抗原由来のペプチドを、CD4 を発現するヘルパー T 細胞へと提示し、活性化させる。

[4] ヘルパーT 細胞

細胞表面に CD4 を発現する T 細胞であり、MHCII とペプチドの複合体を認識することで活性化する。一方で、CD8 を発現する T 細胞は細胞障害性 T 細胞と呼ばれ、MHC I-ペプチド複合体を認識することで活性化する。ヘルパーT 細胞は活性化に伴ってサイトカインと呼ばれる情報伝達物質を分泌し、B 細胞による抗体産生や細胞障害性 T 細胞の活性化を補助する役割を持つ。

[5] 機能発現クローニング法

細胞に導入した遺伝子（多くの場合は cDNA）が発現することで示す機能を指標として、目的の遺伝子を同定する方法。

(図)

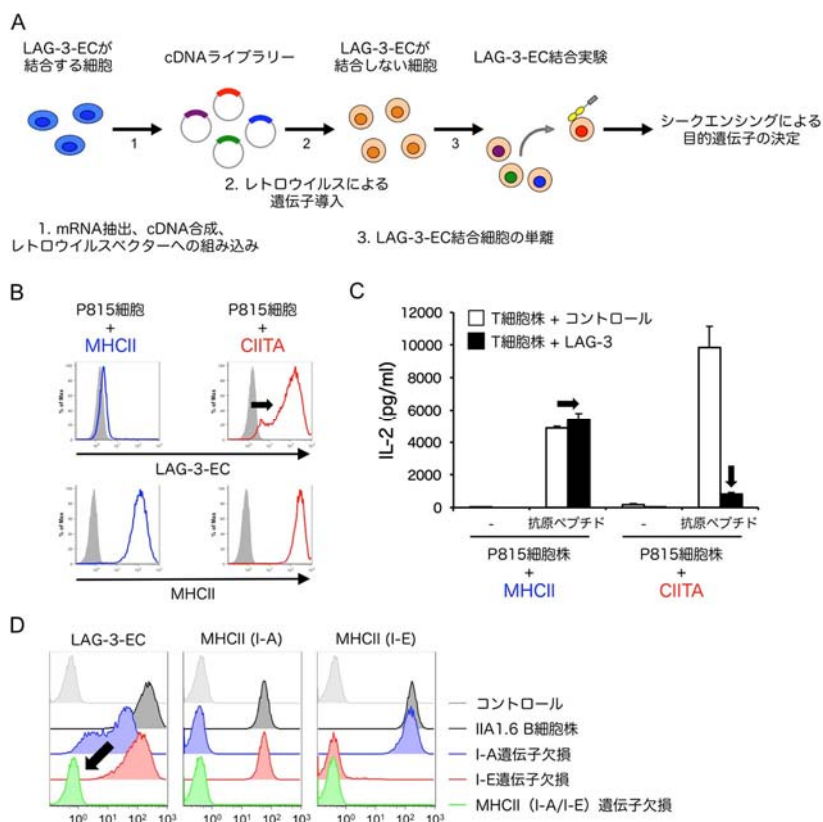


図 1 : LAG-3 は CIITA 発現細胞上の MHCII に選択的に結合する

(A) 機能発現スクリーニング法の模式図。

(B) MHCII または CIITA 遺伝子を導入した肥満細胞腫株 P815 細胞における MHCII 発現と LAG-3-EC 結合解析。CIITA 遺伝子の導入によって内在性 MHCII の発現が誘導された。どちらの細胞も MHCII を発現しているにもかかわらず、LAG-3 の細胞外領域を多量体化した可溶性タンパク質 (LAG-3-EC) は CIITA を導入した細胞にのみ結合した (黒矢印)。

(C) LAG-3 による T 細胞活性化抑制の評価。(B) で作製した細胞株を抗原提示細胞として用いることで LAG-3 を発現させた T 細胞株を刺激した。LAG-3-EC が結合する CIITA 導入細胞株を用いて刺激した場合にのみ、LAG-3 による IL-2 産生の抑制が認められた (黒矢印)。

(D) MHCII 欠損細胞株における MHCII 発現と LAG-3-EC 結合解析。MHCII (I-A および I-E) の遺伝子を欠失させた IIA1.6 B 細胞株に LAG-3-EC は結合しなかった (黒矢

印)。

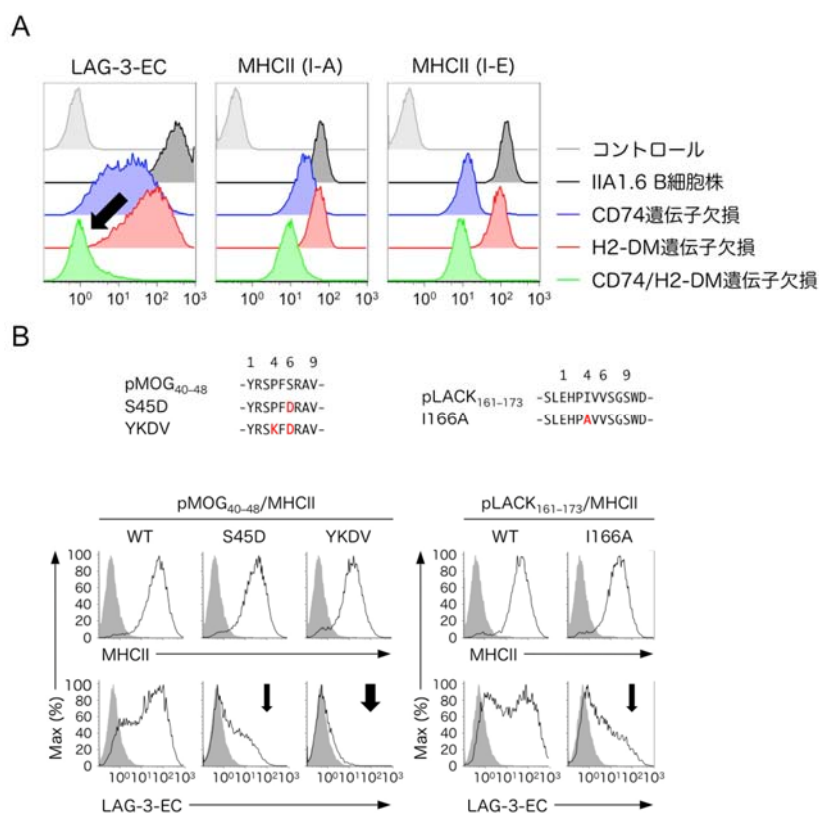


図 2 : LAG-3 は pMHCII と構造依存的に結合する

(A) CD74 および H2-DM 遺伝子欠損細胞株における MHCII 発現と LAG-3-EC 結合解析。CIITA によって発現誘導され、pMHCII の構造的安定性の管理において重要な分子である CD74 および H2-DM の遺伝子を欠失させた IIA1.6 B 細胞株は LAG-3-EC との結合が著しく低下した (黒矢印)。

(B) 様々なペプチドと MHCII の複合体を発現させた細胞株における MHCII 発現と LAG-3-EC 結合解析。MHCII との親和性が高いペプチドを MHCII に提示させると、安定な pMHCII 複合体が形成され、LAG-3-EC が強く結合した。一方、MHCII に提示されるペプチドに、MHCII との親和性が低下するようなアミノ酸変異を導入することで、LAG-3-EC の結合強度が大きく低下した (黒矢印)。

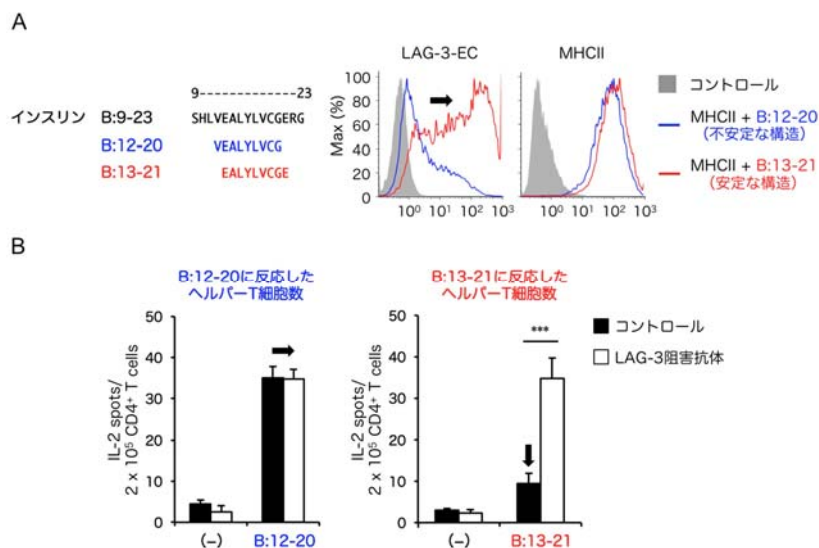


図 3 : LAG-3 は安定な構造を持つ自己抗原ペプチド-MHCII 複合体を特異的に認識することで自己反応性ヘルパー T 細胞を抑制する

(A) 自己抗原ペプチド-MHCII 複合体を発現させた細胞株における MHCII 発現と LAG-3-EC 結合解析。インスリン B 鎖の 9-23 番目のアミノ酸で構成されるペプチドは I 型糖尿病のモデルである NOD マウスにおける自己抗原のひとつである。LAG-3 は、インスリン B 鎖の 13-21 番目までの 9 アミノ酸を介して安定な複合体を形成した pMHCII (MHCII+B:13-21) に強く結合したが、12-20 番目までのアミノ酸を介して不安定な複合体を形成した pMHCII (MHCII+B:12-20) にはほとんど結合しなかった (黒矢印)。

(B) NOD マウスの生体内における自己抗原ペプチド反応性ヘルパー T 細胞応答および LAG-3 による抑制の評価。NOD マウスの生体内において、B:12-20 ペプチド反応性ヘルパー T 細胞が、B:13-21 ペプチド反応性ヘルパー T 細胞に比べて、多数検出された。LAG-3 阻害抗体投与によって、B:13-21 ペプチドに対するヘルパー T 細胞応答が亢進した (黒矢印、右)。一方で、B:12-20 ペプチドに対する応答に変化は認められなかった (黒矢印、左)。

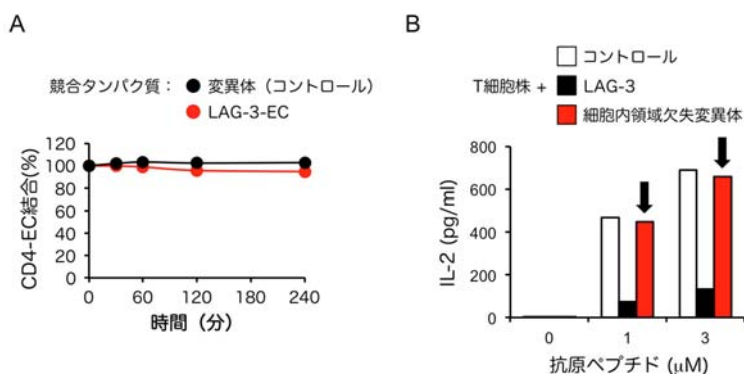


図 4 : LAG-3 は細胞内領域を介してヘルパーT 細胞を抑制する

(A) LAG-3-EC による CD4-EC と MHCII 間の結合の競合阻害解析。B 細胞株に CD4-EC を十分量結合させた後、LAG-3-EC およびコントロールとして MHCII 結合能欠失変異体を加え、B 細胞株との結合を維持した CD4-EC を経時的に定量した。LAG-3-EC は CD4 の MHCII への結合を競合阻害しなかった。

(B) 細胞内領域を欠失した LAG-3 変異体による T 細胞活性化抑制の評価。細胞内領域を欠失させると、LAG-3 は抑制能を失った (黒矢印)。

#### (特記事項)

本研究は、革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業「多機能複合分子標的物質の作製による細胞運命操作技術の開発」(文部科学省 (2014 年度)、日本医療研究開発機構 (AMED) (2015 年度以降))、戦略的創造研究推進事業 CREST (科学技術振興機構)、新学術領域研究「シンギュラリティ生物学」等の支援を受けて行われました。

#### (研究に関するお問い合わせ先)

徳島大学 先端酵素学研究所 免疫制御学分野  
 責任者 岡崎 拓  
 担当者 岡崎 拓  
 Tel : 088-633-9158  
 E-mail : tokazaki@genome.tokushima-u.ac.jp

#### (AMED 事業に関するお問い合わせ先)

革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
 日本医療研究開発機構 (AMED)  
 創薬戦略部 医薬品研究課  
 〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-7-1  
 Tel : 03-6870-2219 Fax : 03-6870-2244  
 E-mail : kaku-bio27@amed.go.jp