

イメージングが拓く 免疫チェックポイント分子による 細胞活性化の 時空間的制御機構



横須賀 忠 先生



中川 和彦 先生

座長

中川 和彦 先生 近畿大学医学部 内科学腫瘍内科部門 主任教授

演者

横須賀 忠 先生 東京医科大学 免疫学分野 主任教授

抗PD-1抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント分子を介した免疫監視機構からの逃避を解除することで、疲弊したT細胞を再活性化させ、抗腫瘍効果を生み出す。イメージング技術の発展や研究の進展により、T細胞受容体(TCR)を介したシグナル伝達および免疫チェックポイント分子によるT細胞活性化の抑制、また、免疫チェックポイント阻害剤によるT細胞再活性化のメカニズムなどが解明されつつある。そこで本講演では、主にイメージングにより明らかとなった、これらシグナル伝達機構の最新の知見についてお話しいただいた。

記載されている薬剤の使用に当たっては添付文書をご参照ください。

イメージングが拓く免疫チェックポイント分子による細胞活性

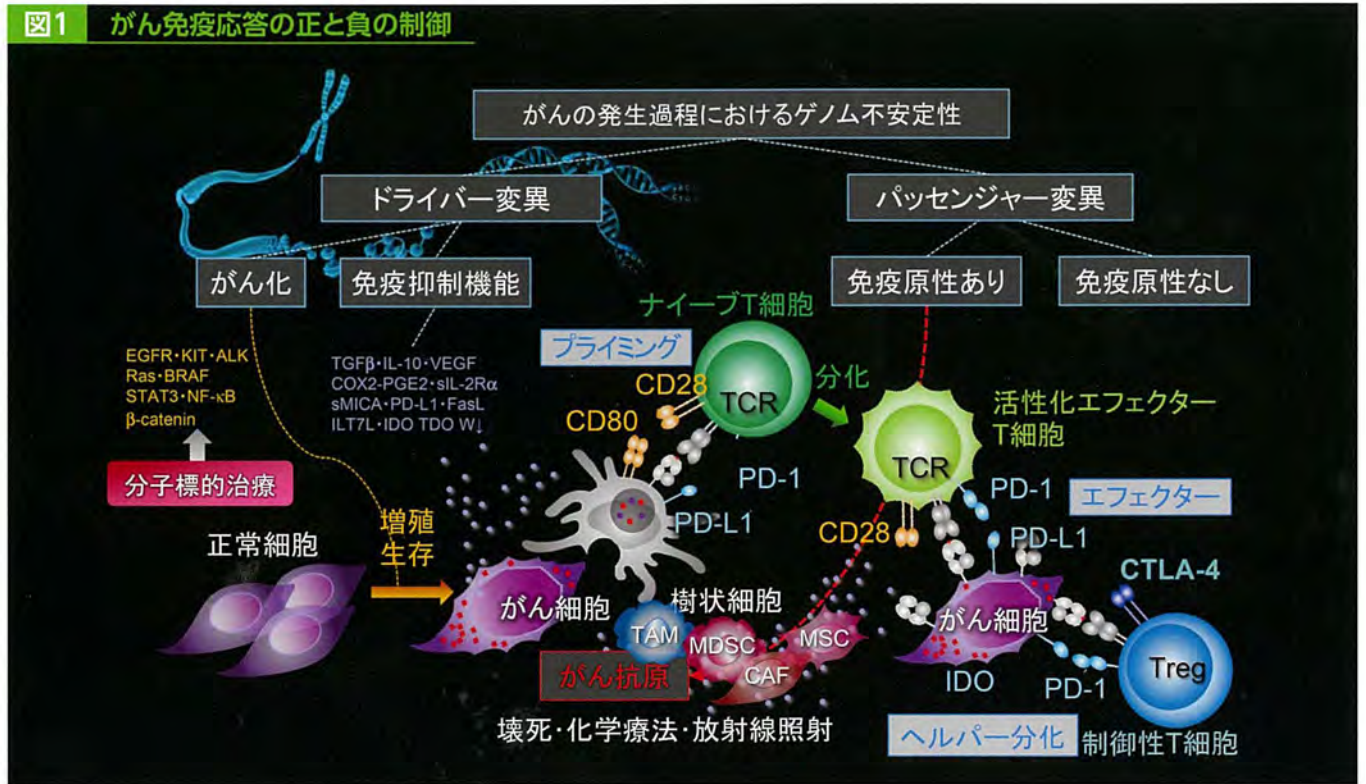
がんに対する免疫応答のメカニズム

がんの3大標準治療として、①外科手術、②化学療法・ホルモン療法、③放射線療法が挙げられるが、免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がん免疫療法が第4の標準治療として浸透しつつある。免疫応答は、T細胞応答をはじめ、T細胞受容体 (TCR) やその補助刺激受容体が司る正と

負のバランスの上に成り立っている。このバランスが正に傾くと免疫反応は亢進し、ウイルスやがん細胞への攻撃が盛んになるが、アレルギー反応を引き起こしたりする。一方、バランスが負に傾くと、免疫応答が抑制され、拒絶反応が軽減したり、リウマチの症状が改善したりする。この正と負のバランスを制御することが免疫療法の根本であるといえる。

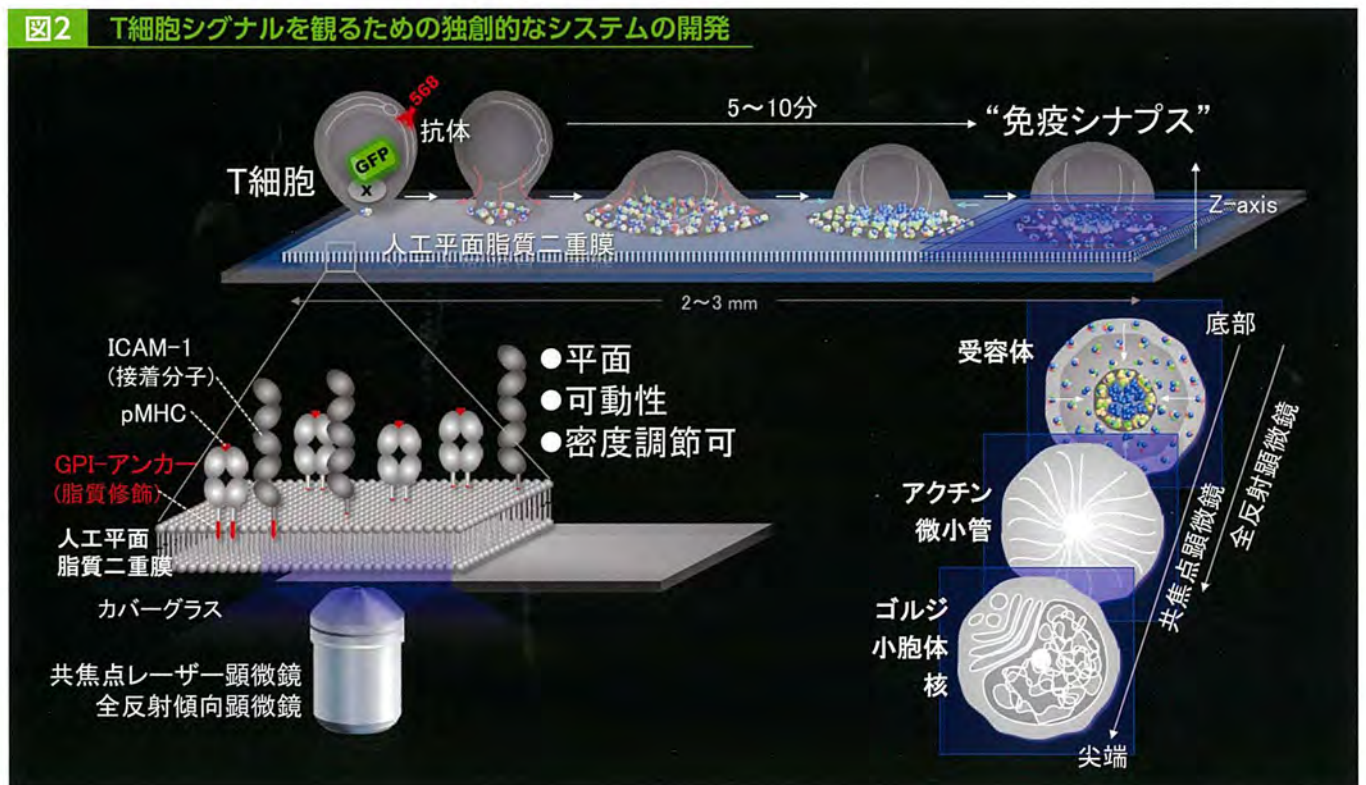
がんに対する免疫応答の概略を図1に示す。ドライバー変異を起こした細胞はがん化し、このがん細胞は分

図1 がん免疫応答の正と負の制御



提供:東京医科大学 横須賀 忠先生

図2 T細胞シグナルを観るための独創的なシステムの開発



提供:東京医科大学 横須賀 忠先生

化の時空間的制御機構

子標的治療の対象となる。このような治療や自然にも壊死したがん細胞は樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、がん抗原としてナイーブT細胞に提示される。近年、パッセンジャー遺伝子変異を持つがん抗原の方が、強力な免疫原性があることもわかってきた。TCRによるがん抗原の認識と同時にCD28など活性化補助刺激受容体を介して、ナイーブT細胞はエフェクターT細胞（活性化した機能性T細胞）へと分化し、がん細胞を攻撃する。一方、がん細胞は、ドライバ遺伝子変異によって免疫抑制機能を持つ分子を活性化したり、エクソソームや抑制性サイトカインを生成したりすることによって、骨髄由来間葉系幹細胞や線維芽細胞、マクロファージなどを免疫抑制性細胞へと誘導する。その結果としてできたがん微小環境では、T細胞はPD-1を、周囲の細胞はリガンドであるPD-L1を高発現することとなる。このように、PD-1によるT細胞抑制は、①抗原提示細胞からのプライミングフェーズ、②腫瘍を攻撃するエフェクターフェーズ、③制御性T細胞の分化、などのさまざまな段階で寄与し、がん細胞の免疫監視からの逃避を助けている。

イメージングにより明らかになったシグナル伝達の分子メカニズム

二光子顕微鏡の登場により、抗原特異的に起こる、リンパ節内でのT細胞と抗原提示細胞との接着が見られるようになった。この接着部位の詳細な観察を行うと、TCRがその中心部に集まっており、このような構造は「免疫シナプス（受容体とリガンドおよびその下流のシグナル伝達分子が再配列してできた同心円状構造）」とよばれ、T細胞が抗原を認識し活性化するために必要な場と考えられている¹⁾。SMAC

(supra molecular activation cluster: 超分子活性化クラスター)ともよばれ²⁾、2000年代に盛んに研究が行われた。

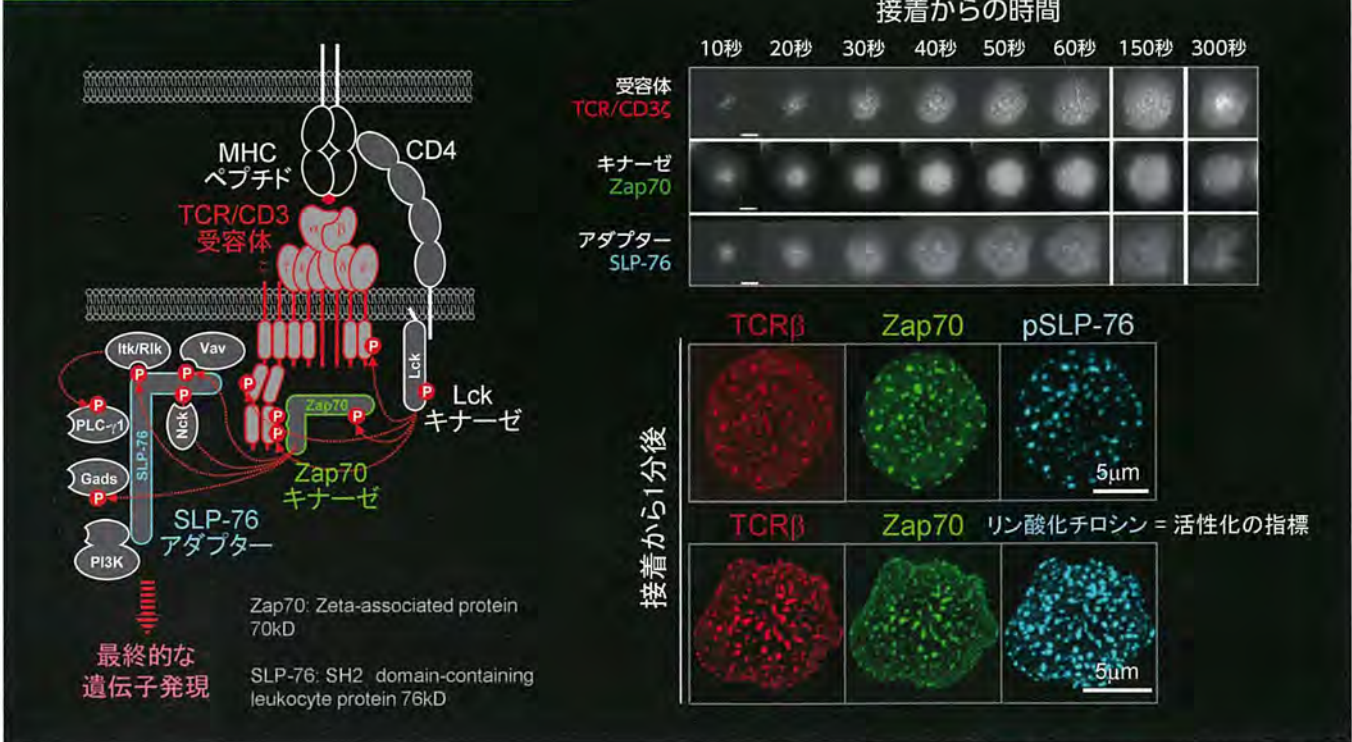
免疫シナプスの形成には5～10分の時間を必要とするが、一方、リン酸化やカルシウムの流入などの細胞応答は1分もかからない³⁾ことも生化学的に知られている。この矛盾を解き明かすため、早期の微細な構造を可視化する新たなイメージングシステムが求められた。そこで我々は、カバーガラス上に人工的な脂質二重膜を作製し、そこに抗原ペプチドを付加した主要組織適合遺伝子複合体(pMHC)分子と接着分子とを可動性を持たせて配置し、この抗原提示膜にT細胞をのせ、免疫シナプスの形成を経時的に観察した(図2)。このシステムにより、さまざまなタンパク質分子や構造を一分子レベルで、また、リアルタイムで観察できるようになった。

このシステムで免疫シナプスを観察すると、シナプスができる前に、既に微小なTCRのクラスターが形成されるのが可視化された。またTCRから遺伝子発現に至る経路のタンパク質であるZap70(キナーゼ)とSLP-76(アダプター)に、異なる色の蛍光タンパク質を結合させて観察したところ、TCRとその下流のタンパク質分子、さらには活性化の指標となるリン酸化チロシンタンパク質が同じクラスターにいることが示された(図3)、我々はこれをT細胞活性化を担う最小シグナルユニット=「TCRマイクロクラスター」として発表した⁴⁾。

免疫チェックポイント分子とマイクロクラスターの形成

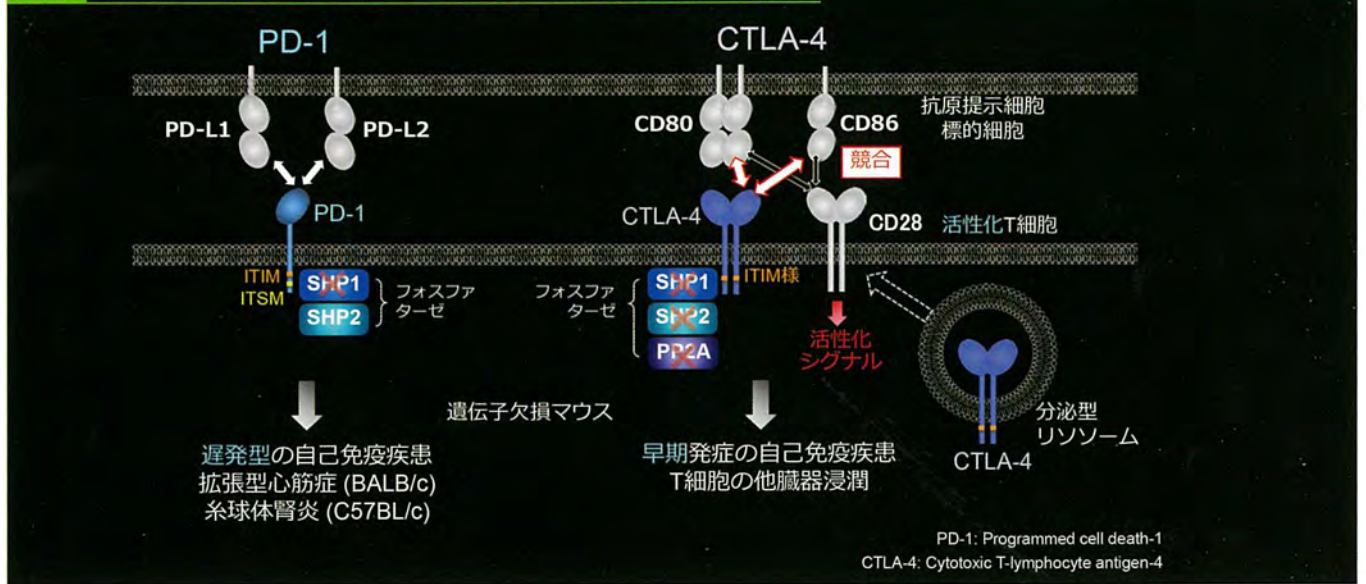
免疫チェックポイント分子として注目されているT細胞の代表的な抑制性補助刺激受容体には、PD-1とCTLA-4があ

図3 TCRに集まる下流のシグナル伝達分子



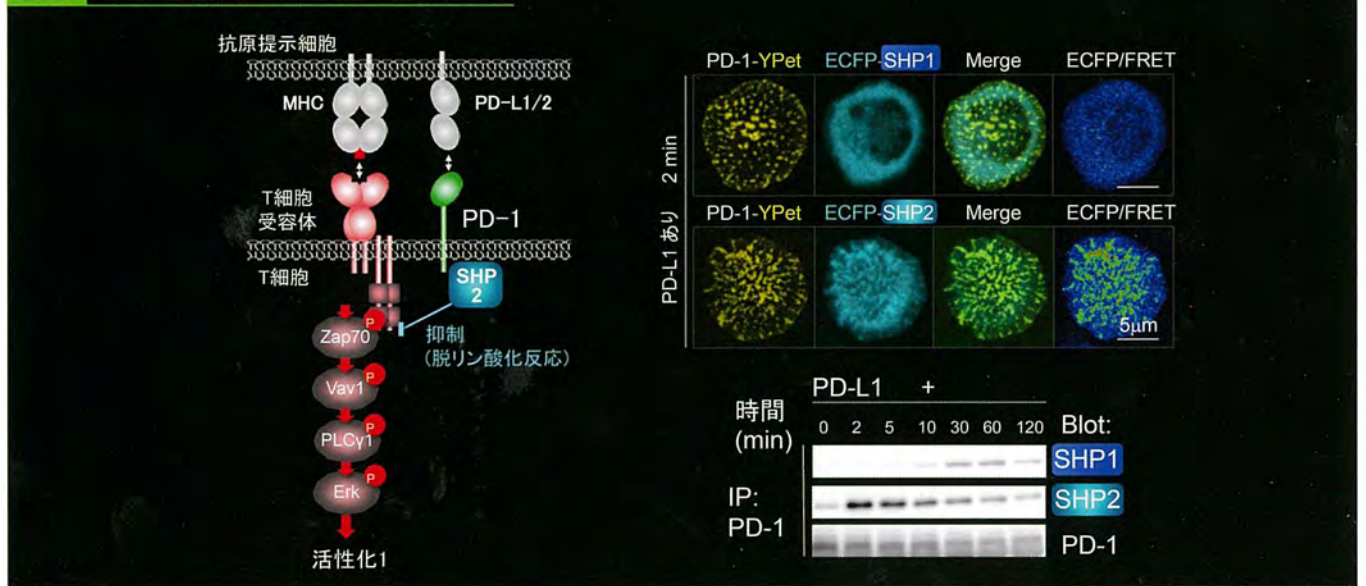
Yokosuka T et al. Nat Immunol 2005; 6: 1253-1262

図4 免疫チェックポイント分子 (T細胞の抑制性補助刺激受容体)



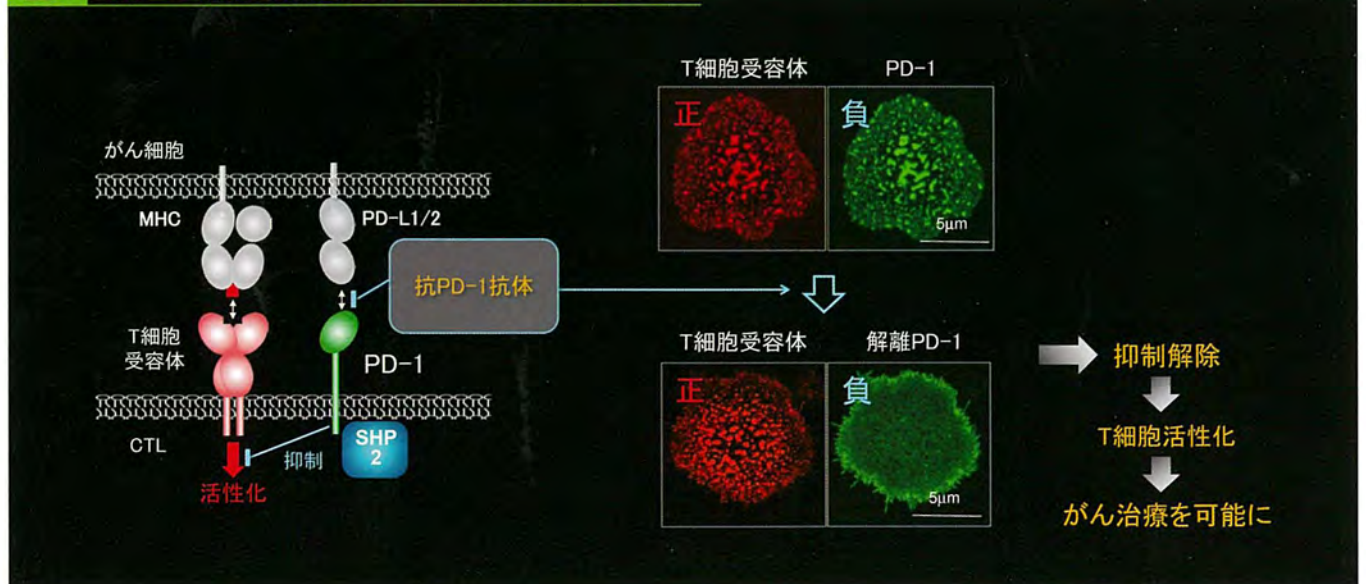
提供: 東京医科大学 横須賀 忠先生

図5 PD-1 抑制性マイクロクラスター



Yokosuka T et al. *J Exp Med* 2012; 209: 1201-1217

図6 抗PD-1抗体で解離するPD-1マイクロクラスター



Yokosuka T et al. *J Exp Med* 2012; 209: 1201-1217

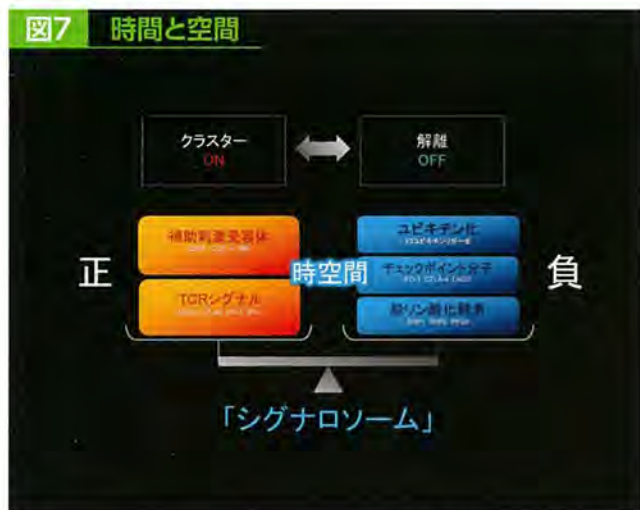
る(図4)。これらはいずれもナイーブT細胞の活性化に伴い転写・翻訳されるが、PD-1が細胞表面に発現しているのに対し、CTLA-4は分泌型リソソームに蓄えられ、再度TCRからの刺激が入ると細胞質から細胞表面へと輸送される。PD-1のリガンドにはPD-L1及びPD-L2が知られており、一方CTLA-4のリガンドにはCD80とCD86が知られている。CD80、CD86はT細胞上の活性化補助刺激受容体CD28とも結合するため、CTLA-4とCD28は競合関係にある。PD-1は、CTLA-4にはない抑制性チロシンモチーフ(ITIM)とスイッチモチーフ(ITSM)を細胞質ドメインに持ち、下流のフォスファターゼをリクルートしてシグナル伝達分子を脱リン酸化する。イメージングで解析すると、PD-1とCTLA-4の明らかなシグナル伝達の違いがわかる。

PD-1は、リガンドPD-L1/PD-L2との結合によってTCRマイクロクラスターに集まり、PD-1自身もクラスターを形成する。PD-1と共に集合したフォスファターゼSHP2は、CD3複

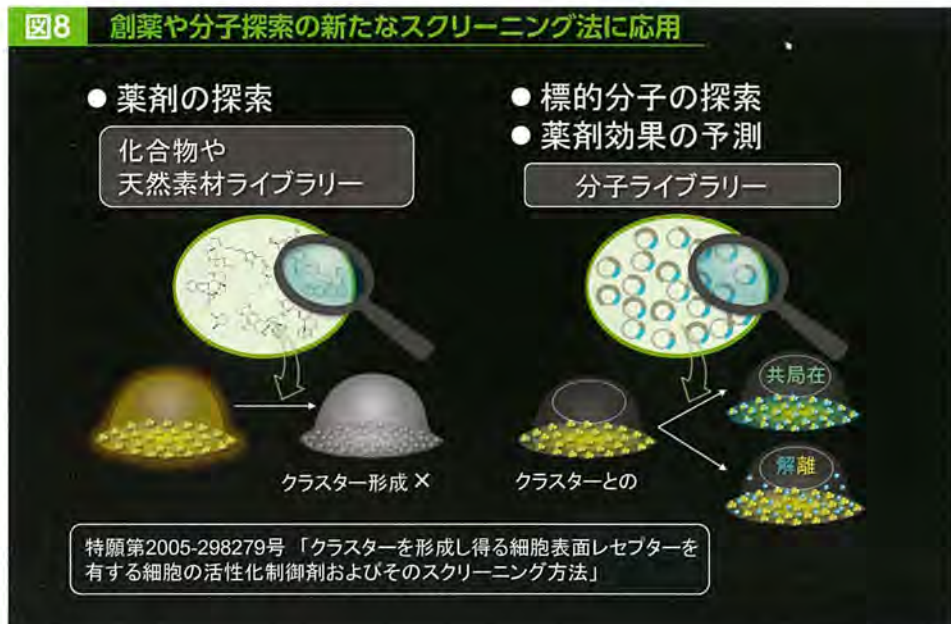
合体の活性型チロシンモチーフ(ITAM)を脱リン酸化する。それによって下流のシグナル伝達分子の脱リン酸化も起こり、TCRシグナルは抑えられる。TCRにキナーゼやアダプター分子がリクルートするまでの時間が1分程度であるのに対し、PD-1にSHP2がリクルートする時間も2分以内である(図5)⁵⁾。よって、一度リン酸化されたTCRマイクロクラスターは、直ちにSHP2によって脱リン酸化されることとなる。またTCRシグナルが抑制された結果、CD28のシグナルも間接的にオフになる。このようにTCRのシグナルが遮断され、行き過ぎたT細胞の反応も適切に抑えられることが、PD-1がT細胞の抑制性マイクロクラスターとして機能すると考える根拠である。現在進行・再発の非小細胞肺癌において承認されている抗PD-1抗体をこの実験系に加えると、TCRマイクロクラスターには全く影響を及ぼさずに、PD-1マイクロクラスターのみを解離させることができた。このことは、抗PD-1抗体がTCRシグナルはインタクトに、PD-1からの抑制のみを解除し、T細胞を再賦活化(図6)、がんに対する攻撃力を増加させることを示唆している⁵⁾。

一方、CTLA-4は、これまで報告されていたようなフォスファターゼを介するシグナル抑制はなく、今日では、活性型補助刺激受容体CD28のリガンドを競合的に奪取し、T細胞を抑制していると考えられている。抗CTLA-4抗体は、CD28の競合相手であるCTLA-4に結合することで、CD28がリガンドCD80/CD86に結合するチャンスを増やし、CD28を介したT細胞の活性化を促進する⁶⁾。CD28は免疫シナプスの中でNF- κ Bシグナル経路の活性中心を作る足場として働き、TCRシグナルによって惹起されたNF- κ Bシグナルを持続させる⁷⁾。このことから、CTLA-4はCD28から続くNF- κ Bシグナルの活性化を、PD-1はTCR下流シグナルの活性化をそれぞれ独立して遮断すると考えられる。

図7に示したように、T細胞の活性化は、さまざまな正と負のシグナル伝達分子が凝集と解離を繰り返すことで時空間的に制御されている。免疫チェックポイント阻害剤は、チェックポイント分子のクラスターを解離させることで免疫応答のバランスを正に傾け、抗腫瘍効果を発揮する。今後はこのようなイメージングシステムを応用し、クラスター形成の有無を調べることによって、より効果的な中和抗体の単離をはじめとする、創薬や分子探索のスクリーニング等に貢献できると考えている(図8)。



提供:東京医科大学 横須賀 忠先生



提供:東京医科大学 横須賀 忠先生

文献

- 1) Grakoui A et al. *Science* 1999; 285: 221-227
- 2) Monks CR et al. *Nature* 1998; 395: 82-86
- 3) Wülfing C et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6302-6307
- 4) Yokosuka T et al. *Nat Immunol* 2005; 6: 1253-1262
- 5) Yokosuka T et al. *J Exp Med* 2012; 209: 1201-1217
- 6) Yokosuka T et al. *Immunity* 2010; 33: 326-339
- 7) Yokosuka T et al. *Immunity* 2008; 29: 589-601