

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 CD4 陽性 T 細胞における転写因子 Klf1 を介した PD-L1 発現誘導機構

氏名 照屋 周造

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)をはじめとする自己免疫疾患の病態理解の進歩は、各種サイトカインや細胞表面分子の研究進展につながり、分子標的薬である各種生物学的製剤を用いた新規治療法が導入され、成果を上げている。RA に関しては炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や Interleukin-6 (IL-6) を治療標的とした TNF 阻害剤や抗 IL-6 薬、cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 (CTLA-4) を利用した CTLA4-Ig が臨床応用され、RA の疾患活動性を強力にコントロールする。しかし、生物学的製剤の登場にも関わらず治療抵抗性の病態は存在し、その副作用と共に大きな課題となっており、新規の治療標的となる分子を同定し、その制御機構を明らかにすることが求められている。

免疫応答は共刺激分子により、正または負に調節されている。CD28/CD80、CD28/CD86、inducible costimulator (ICOS) とそのリガンドである ICOSL などは免疫応答を賦活化する一方、CTLA4/CD80、CTLA4/CD86、lymphocyte activation gene 3 (LAG3)/major histocompatibility complex class II (MHC class II) などは免疫応答を抑制する。近年ではそのような共抑制分子として programmed death-ligand 1 (PD-L1) と programmed death-1 (PD-1) が注目されている。特に腫瘍免疫の分野においては抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体を使用した薬剤が導入され、皮膚癌や非小細胞性肺癌を標的とする治療が開発されている。

PD-1/PD-L1 による免疫制御機構としては、PD-L1 が T 細胞上の PD-1 と結合することにより、T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) 以下のシグナル伝達を抑制する事が知られている。C57BL/6 (B6) バックグラウンドの PD-1 KO マウスは糸球体腎炎をはじめとするヒト SLE 類似のループス様病態を呈し、BALB/c

バックグラウンド PD-1 KO マウスでは自己免疫性心筋炎を認める。ヒトにおいても *PD1* 遺伝子は SLE、RA の疾患感受性遺伝子として知られており、PD-1 を介した負のシグナル制御は自己免疫疾患発症抑制において重要な役割を果たしていると考えられている。PD-L1 KO マウスでは Th1 細胞応答の亢進や実験的自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性肝炎の増悪を認め、PD-L1 も PD-1 と同様に免疫恒常性維持において重要な分子である。

PD-L1 は T 細胞活性化により発現が誘導されるが、定常状態において PD-L1 を発現する細胞として CD4<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) が知られている。Treg は胸腺で誘導されるものと末梢 (胸腺外) で誘導されるものに大別される。胸腺において誘導される CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg (CD25<sup>+</sup> Treg) はマスター制御遺伝子として forkhead protein 3 (Foxp3) を発現し、抑制性サイトカインの interleukin-10 (IL-10) や transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を産生するとともに細胞表面の PD-L1 を介してエフェクター細胞の増殖やサイトカイン産生を抑制している。フレームシフトによる *Foxp3* 遺伝子の機能的欠損マウスである Scurfy マウスは肝障害、皮膚障害などの全身性炎症により生後約 20 日程度で死亡するが、中枢神経・関節・小腸・内分泌腺など多くの臓器は障害されないままであり、免疫学的恒常性は末梢で誘導される Foxp3 非依存性 Treg と協調して維持されると考えられている。

当研究室では末梢で誘導される Treg として、細胞表面に LAG3 を特異的に発現し、IL-10 を高産生する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAG3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (LAG3<sup>+</sup> Treg) を同定し、報告している。LAG3<sup>+</sup> Treg は末梢で分化し、その抑制能は Foxp3 に依存しない。近年当研究室では、LAG3<sup>+</sup> Treg が TGF- $\beta$ 3 を大量に産生し、B 細胞の抗体産生抑制を介してループモデルマウスである MRL/Fas<sup>lpr/lpr</sup> マウスの病態を著明に改善することを報告している。興味深いことに、TGF- $\beta$ 3 を介した B 細胞抑制は B 細胞上の PD-1 発現依存性であり、LAG3<sup>+</sup> Treg も PD-L1 を高発現している。

本研究では LAG3<sup>+</sup> Treg の PD-L1 発現に着目し、その発現機構について詳細に検討した。まず、LAG3<sup>+</sup> Treg に特異的に発現する転写因子 early growth response 2 (Egr2) と PD-L1 発現について検討した。Egr2 は神経系の発達に重要な役割を果たす転写因子として同定され、T 細胞では活性化抑制を通じたアナジー維持を担っているとされていた。当研究室では LAG3<sup>+</sup> Treg において Egr2 は LAG3 のみならず IL-10 や転写因子 Blimp-1 の発現を誘導しており、Egr2 が LAG3<sup>+</sup> Treg に特異的な形質を与えることを報告している。レトロウイルスベクター pMIG-Egr2 を T 細胞に導入したところ、Egr2 導入細胞で PD-L1 の発現増加が認められた。しかしながら、T 細胞特異的 Egr2 欠損

(*Egr2<sup>fl/fl</sup>CD4Cre<sup>+</sup>*; *Egr2* CKO) マウスの LAG3<sup>+</sup> Treg も PD-L1 を高発現しており、*Egr2* CKO マウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞に TCR 刺激として抗 CD3 $\epsilon$  抗体、抗 CD28 抗体刺激を加えると PD-L1 の発現は増強され、PD-L1 発現には *Egr2* 非依存性の発現誘導機構が働いていることが示唆された。

*Egr2* 以外に PD-L1 発現誘導に関わる転写因子を探索するため、LAG3<sup>+</sup> Treg に特異的な転写因子をマイクロアレイデータから抽出し、JASPAR database から推測された PD-L1 プロモーター領域に結合可能な転写因子のデータと照合したところ、転写因子 Krüppel-like factor 1 (*Klf1*) が候補として挙げられた。*Klf1* は赤血球前駆細胞においてヘモグロビン構成分子である  $\beta$  グロビンの転写を制御する転写因子として知られていたが、*Klf1* 欠損マウスが造血障害で胎生致死となるため、免疫における *Klf1* の役割はこれまで不明であった。レトロウイルスベクター-pMIG-*Klf1* を用いて遺伝子導入すると、*Klf1* 導入細胞で PD-L1 の発現増強が見られた。*Egr2* CKO マウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞においても同等の結果が得られ、*Klf1* は *Egr2* 非依存性に PD-L1 発現を制御していることが示唆された。

次に、*Klf1* による PD-L1 制御機構を調べるため、細胞内シグナル伝達経路に着目した。PD-L1 発現を誘導するメカニズムに関しては生物種、細胞種を問わず主に免疫細胞、腫瘍細胞で検討されており、Toll 様受容体刺激や Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 刺激によってその発現が増強される。PD-L1 発現は細胞種によってそれぞれ異なる細胞内シグナル伝達経路を利用しており、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の MEK/ERK・p38・JNK、Janus activated kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路の STAT1、STAT3、nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) 経路、phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) 経路、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路による発現誘導が報告されているため、本研究でもこれらの細胞内シグナル伝達経路について検討した。T 細胞特異的 STAT3 KO マウス、STAT4 KO マウス、STAT5a KO マウス、STAT6 KO マウス、および野生型 (wild type: WT) マウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞に *Klf1* を導入するといずれのマウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞も WT マウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞と同様に PD-L1 を発現した。さらに、B6 マウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞に *Klf1* を導入する際に JNK 阻害剤、p38 阻害剤、MEK 阻害剤、PI3K 阻害剤、mTOR 阻害剤を添加し細胞内シグナル伝達を阻害すると、PI3K 阻害剤、mTOR 阻害剤を加えた群において PD-L1 発現の減弱を認めた。これらの結果から、*Klf1* による PD-L1 発現には PI3K-mTOR シグナル伝達経路が関与していることが示唆された。

PD-1/PD-L1 を利用した治療は腫瘍免疫の分野では臨床応用されているが、自己免疫疾患の治療においては実現していない。T 細胞における PD-L1 発現誘導

機構を解明することは自己免疫疾患制御の理解にとって重要であると考えられる。TGF- $\beta$  と PD-L1 発現細胞の存在下で Treg が効率的に誘導される機構もこれまでに報告されており、PD-L1 とサイトカインの協調によって相乗的に自己免疫疾患の制御が可能になることが想定される。本研究では、LAG3<sup>+</sup> Treg に特異的に高発現する転写因子である Klf1 が、PI3K-mTOR 経路と協働して PD-L1 発現を誘導している可能性が示された。これらの因子の制御によって自己免疫疾患や腫瘍への治療法がさらなる発展を遂げることが期待される。