

【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、すでにかん治療薬として 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 (pMHC II) 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 pMHC II 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

