

抗トキソプラズマ免疫と抗ガン免疫の両方に重要な制御分子を発見

— PLC β 4 はキラーT細胞特異的に T細胞受容体シグナルを制御する —

キーワード：トキソプラズマ、ガン免疫、キラーT細胞、PLC β 4

【研究成果のポイント】

- ◆ トキソプラズマ感染時の免疫応答にシグナル伝達分子 PLC β 4（ピー エル シー ベータ 4）が重要な制御分子であることを明らかに。
- ◆ PLC β 4 が免疫細胞の一つであるキラーT細胞（※1）の活性化に参与することを解明
- ◆ 抗トキソプラズマ免疫だけではなく、抗ガン免疫にも PLC β 4 は重要であることを発見

❖ 概要

山本雅裕教授 (IFReC 免疫寄生虫学/微生物病研究所兼任) らの研究グループは、病原性寄生虫トキソプラズマやガン細胞の排除を担う宿主免疫系のキラーT細胞の活性化に PLC β 4 が必須であることを明らかにしました。

ホスホリパーゼ C (PLC) は、細胞内にある代謝酵素で、真核生物で広く保存された重要なシグナル伝達分子です。PLC β 4 は哺乳類で 13 種類ある PLC ファミリー分子の一つで、古くから中枢神経系での発現が知られていましたが、免疫系での役割は全く不明でした。

今回、山本教授らの研究グループは、

- ① トキソプラズマ感染に対し、PLC β 4 欠損マウス、特に T細胞のみ PLC β 4 を欠損しているマウスが非常に弱いこと
- ② 免疫細胞の中でも、特にキラーT細胞の活性化に PLC β 4 が関与すること
- ③ キラーT細胞依存的免疫である抗ガン免疫にも PLC β 4 が関与すること

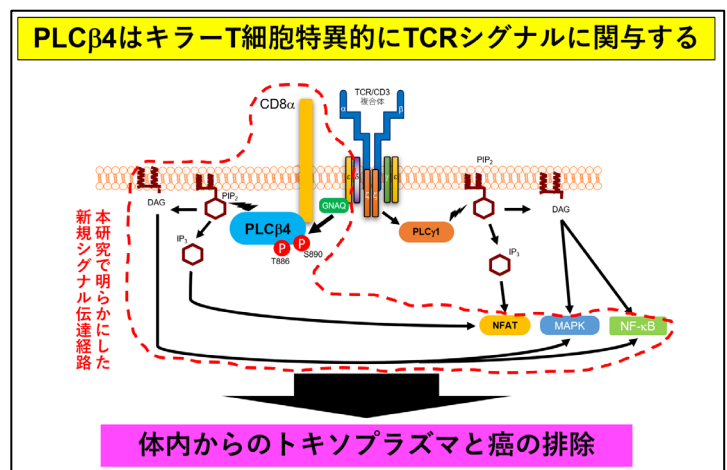
を明らかにしました。

これらの結果より、PLC β 4 を人為的に制御すれば、抗トキソプラズマ宿主免疫応答および抗ガン免疫双方を担うキラーT細胞の反応を同時に高めることのできる薬剤開発につながる事が大いに期待されます。

❖ 研究の背景

病原性原虫であるトキソプラズマは日和見病原体の一つで、健康人が感染しても問題ありませんが、抗ガン剤や臓器移植患者などの免疫不全者や妊婦が初感染した場合に致死的なトキソプラズマ症を引き起こします。トキソプラズマに対する免疫系は、マクロファージなどの自然免疫系と T細胞などによる獲得免疫系が応答し、それらが相互に協調して働くことが重要であることが分かってきました。

ホスホリパーゼ C (PLC) はリン酸エステル基の直前でリン脂質を切断する酵素群の総称で、真核生物で広く保存され、特に細胞内シグナル伝達経路で重要な役割を果たしています。13 種類存在する哺乳類の PLC は構造に従って β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ に分類されます。PLC β 4 は 4 つある PLC β ファミリー分子の一



つで、主に中枢神経系に主に存在していることが報告されていましたが、免疫系における役割については全く分かっていませんでした。

❖ 研究内容の詳細

山本教授らの研究グループでは、まず PLCβ4 欠損マウスにトキソプラズマを感染させ生存率測定を行いました。その結果、PLCβ4 欠損マウスが野生型マウスに比べてトキソプラズマ感染に高感受性を示すことを発見しました (図1A と 1B)。次に、自然免疫系と獲得免疫系のどちらが重要かを検討する目的で、ミエロイド系細胞 (※2) 特異的な PLCβ4 欠損マウスと T細胞特異的な PLCβ4 欠損マウスにトキソプラズマを感染させる実験を行いました。その結果、ミエロイド系細胞特異的な PLCβ4 欠損マウスは野生型マウスと同様に耐性ですが、T細胞特異的な PLCβ4 欠損マウスがトキソプラズマ感染に弱いことが分かりました (図1C)。

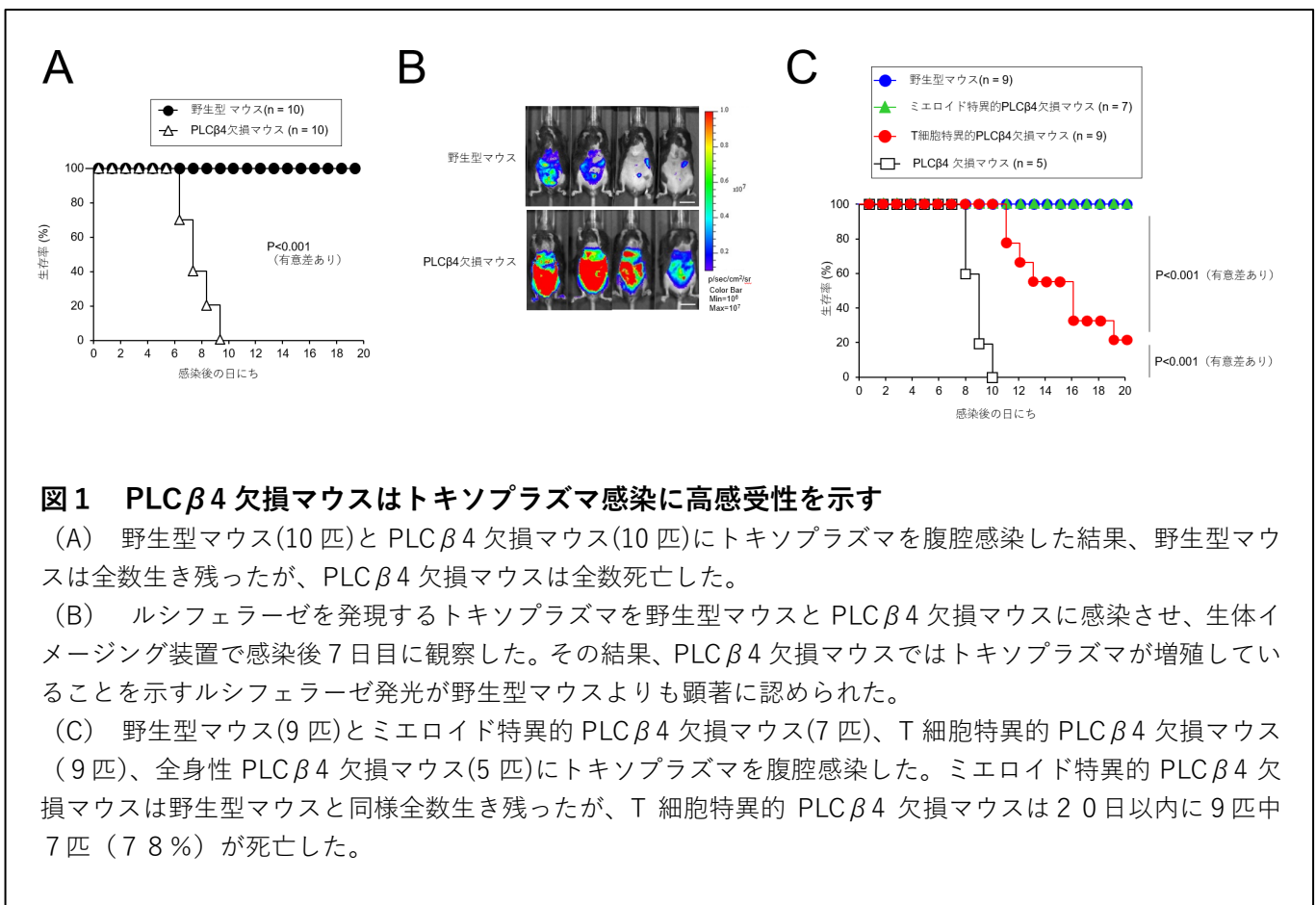
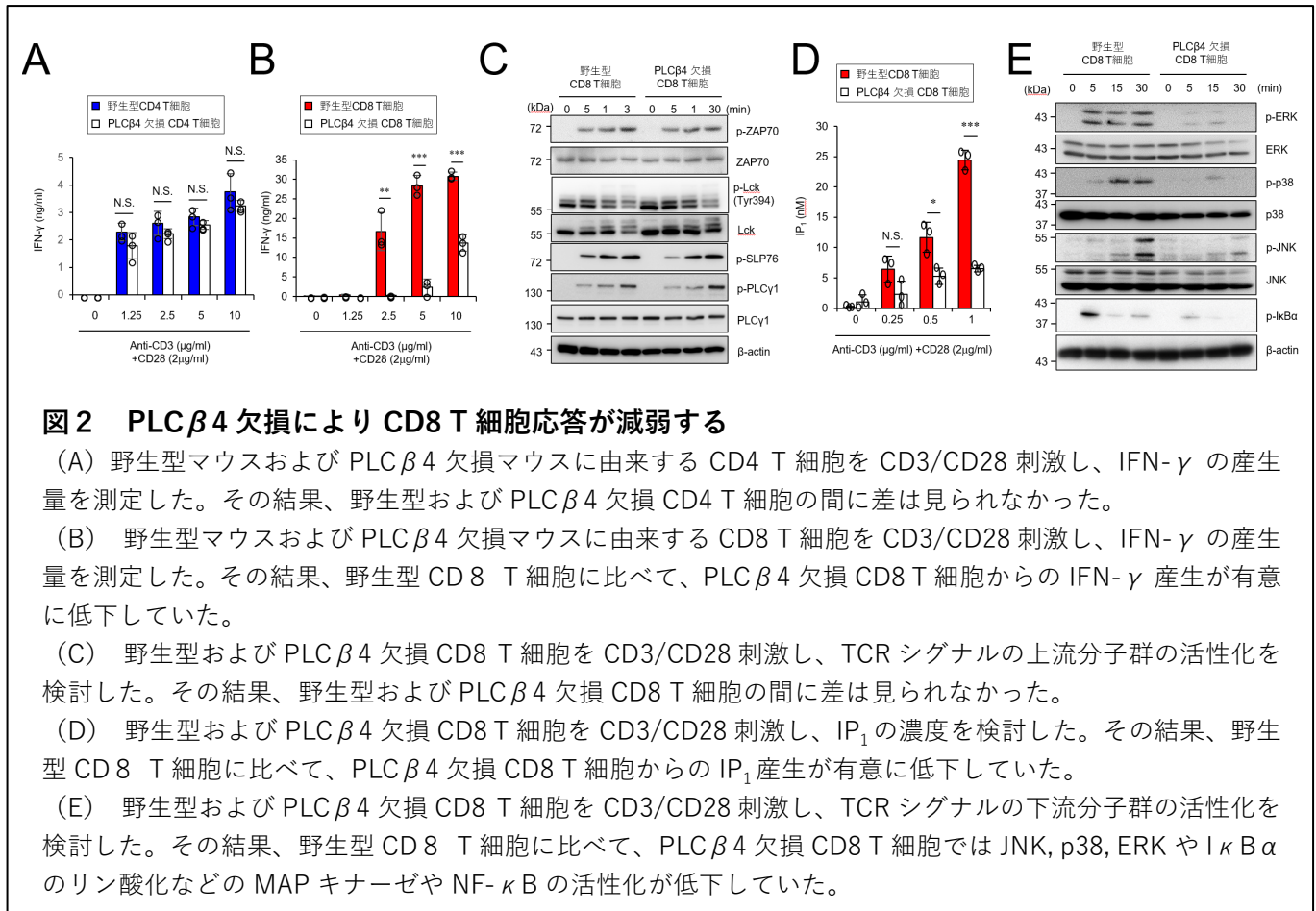


図1 PLCβ4 欠損マウスはトキソプラズマ感染に高感受性を示す

- (A) 野生型マウス(10匹)と PLCβ4 欠損マウス(10匹)にトキソプラズマを腹腔感染した結果、野生型マウスは全数生き残ったが、PLCβ4 欠損マウスは全数死亡した。
- (B) ルシフェラーゼを発現するトキソプラズマを野生型マウスと PLCβ4 欠損マウスに感染させ、生体イメージング装置で感染後7日目に観察した。その結果、PLCβ4 欠損マウスではトキソプラズマが増殖していることを示すルシフェラーゼ発光が野生型マウスよりも顕著に認められた。
- (C) 野生型マウス(9匹)とミエロイド特異的 PLCβ4 欠損マウス(7匹)、T細胞特異的 PLCβ4 欠損マウス(9匹)、全身性 PLCβ4 欠損マウス(5匹)にトキソプラズマを腹腔感染した。ミエロイド特異的 PLCβ4 欠損マウスは野生型マウスと同様全数生き残ったが、T細胞特異的 PLCβ4 欠損マウスは20日以内に9匹中7匹(78%)が死亡した。

次に PLCβ4 の T細胞における機能を調べました。主要な抗トキソプラズマ応答を担う T細胞にはヘルパー T細胞 (CD4 T細胞) (※1) とキラー T細胞 (CD8 T細胞) があります。どちらの T細胞も自然免疫細胞から T細胞受容体 (TCR) (※3) を刺激されるとインターフェロンγを産生します。人為的に TCR を刺激し T細胞を活性化させると、野生型 CD4 T細胞も PLCβ4 欠損 CD4 T細胞も同程度にインターフェロンγを産生しました (図2A)。一方、野生型 CD8 T細胞に比べて、PLCβ4 欠損 CD8 T細胞ではインターフェロンγの産生が著しく低下していることが分かりました (図2B)。TCR 刺激によって細胞内シグナル伝達経路が活性化されることから、PLCβ4 が CD8 T細胞の細胞内シグナル伝達経路のどこで機能しているかを解析しました。TCR による細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質である ZAP-70、SLP-76、Lck、PLCγ1 の活性化は野生型 CD8 T細胞と PLCβ4 欠損 CD8 T細胞の間で差はありませんでした (図2C)。

次に、PLC β 4 が PIP₂ (※4) を分解し IP₃ と DAG を生じることに着目して、IP₃ (※5) の代謝産物である IP₁ の量を TCR 刺激した野生型 CD8 T 細胞と PLC β 4 欠損 CD8 T 細胞で比較しました。その結果、IP₁ の量が PLC β 4 欠損 CD8 T 細胞では野生型細胞に比べて有意に低下していることが分かりました (図 2D)。さらに DAG (※5) の下流では MAPK や NF- κ B が活性化しますが、PLC β 4 欠損 CD8 T 細胞では野生型細胞に比べて MAPK や NF- κ B の活性化が低下していることが分かりました (図 2E)。以上のことから、PLC β 4 は CD8 T 細胞の細胞内シグナル伝達経路で重要であることが分かりました。



次に、PLC β 4 が CD8 T 細胞の活性化では重要であるが、CD4 T 細胞では重要ではないメカニズムを解析しました。その結果、PLC β 4 は CD8 α とは結合するが CD4 とは結合しないことを見出しました (図 3A)。また、PLC β 4 の上流のシグナル伝達分子を探索した結果、GNAQ と呼ばれるヘテロ 3 量体 G タンパク質 (※6) を野生型 CD8 T 細胞で過剰発現すると IFN- γ 産生が増大するのに対し、PLC β 4 欠損 CD8 T 細胞では増大しなかったことから、CD8 T 細胞の TCR シグナル伝達経路では GNAQ が PLC β 4 の上流にあることが分かりました (図 3B)。また、質量分析によって GNAQ による PLC β 4 の翻訳後修飾を検索した結果、PLC β 4 の 886 番目のスレオニン (T886) と 890 番目のセリン (S890) がリン酸化することを見出し、そのリン酸化が CD8 T 細胞の活性化に重要であることを示しました (図 3C)。

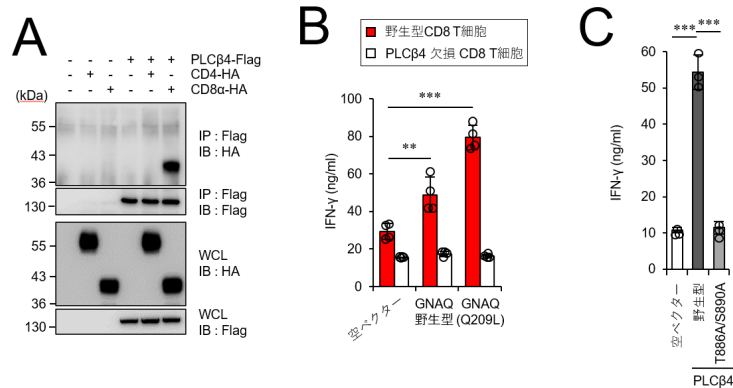


図3 PLCβ4はCD8αと結合するが、CD4とは結合しない

(A) PLCβ4とCD4およびCD8αの結合試験を免疫沈降法で検討した。その結果、PLCβ4はCD4とは結合しないが、CD8αと結合することが分かった。

(B) PLCβ4の上流の候補分子であるGNAQの野生型および恒常活性化型(Q209L変異体)を野生型およびPLCβ4欠損CD8T細胞に過剰発現した。野生型細胞では両方のGNAQの過剰発現により対照群(空ベクター)よりもIFN-γの産生が有意に増加した。一方、PLCβ4欠損CD8T細胞ではそのような増加は認められなかった。このことから、CD8T細胞ではGNAQがPLCβ4の上流に存在するが示された。

(C) PLCβ4のT886A/S890A変異体および野生型をPLCβ4欠損CD8T細胞に戻してIFN-γの産生量を検討した。その結果、野生型PLCβ4導入細胞ではIFN-γ産生が回復したが、T886A/S890A変異体導入細胞では全く回復しなかった。このことからPLCβ4のT886とS890がCD8T細胞の活性化に重要であることが分かった。

最後に、CD8T細胞はガン免疫にも重要であることから、マウスの悪性黒色腫モデル(B16メラノーマの肺転移モデル)においてPLCβ4の役割を検討しました。その結果、B16メラノーマを移入された野生型マウスに比べて、PLCβ4欠損マウスは生存期間が有意に短くなり(図4A)、さらに肺へのガン細胞の転移が増加することを見出しました(図4B)。また腫瘍を持つ肺臓中のCD8T細胞の活性化について、PLCβ4欠損マウスでは有意に低下していることが分かりました(図4C)。

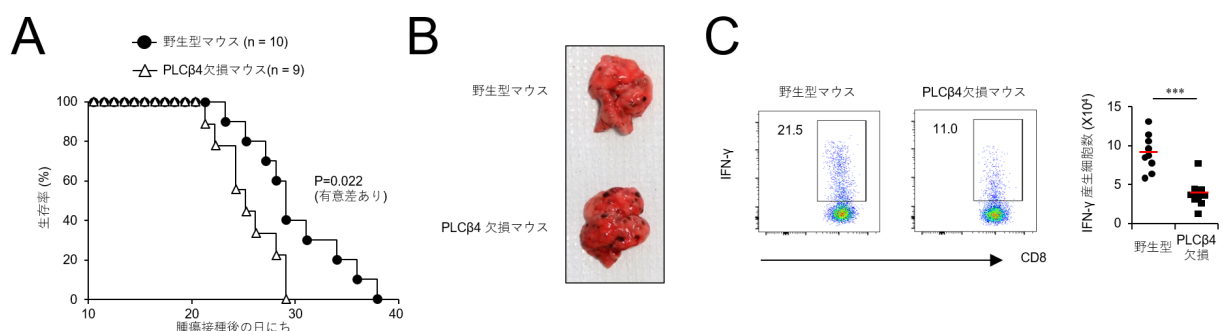


図4 マウスメラノーマ肺転移モデルにもPLCβ4欠損マウスは高感受性を示す

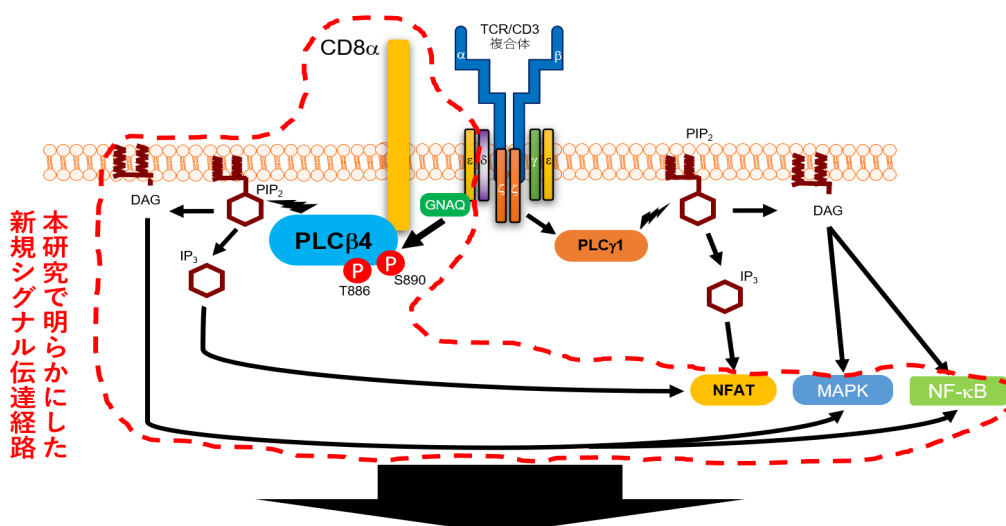
(A) 野生型マウス(10匹)とPLCβ4欠損マウス(9匹)にマウスのメラノーマ(B16)を移植した結果、野生型マウスに比べて、PLCβ4欠損マウスの生存期間が有意に短かった。

(B) マウスのメラノーマ(B16)が移植された野生型マウスとPLCβ4欠損マウスの肺への転移写真。PLCβ4欠損マウスの肺では野生型マウスよりも腫瘍が多く認められた。

(C) マウスのメラノーマ(B16)が移植された野生型マウスとPLCβ4欠損マウスの肺におけるCD8T細胞の活性化をIFN-γの産生を指標に検討した。その結果、野生型マウスよりもPLCβ4欠損マウスの肺ではIFN-γの産生が有意に低下していることが分かった。

以上のことから、PLC β 4 は CD8 T 細胞（キラーT 細胞） 特異的に TCR シグナル伝達経路に重要であり、その活性化が個体レベルでの抗トキソプラズマ免疫および抗ガン免疫に必須であることを本研究で明らかにしました（図5）。

PLC β 4はキラーT細胞特異的にTCRシグナルに関与する



体内からのトキソプラズマと癌の排除

図5 キラーT細胞での PLC β 4 の機能によって、トキソプラズマと癌が排除される

T 細胞は、抗トキソプラズマ宿主免疫反応と抗ガン免疫に重要である。ヘルパーT 細胞とキラーT 細胞の細胞内シグナル伝達の主な経路は共通であるが、それに加えてキラーT 細胞では T 細胞受容体の下流で GNAQ-PLC β 4 経路が活性化し、キラーT 細胞依存的な免疫応答を引き起こすことを明らかにした。

❖ 本研究成果が社会に与える影響（本研究成果の意義）

PLC β 4 の活性を人為的に制御することでキラーT 細胞による抗トキソプラズマ免疫や抗ガン免疫を賦活できるようになることから、今後 PLC β 4 が新規の創薬標的となることが大いに期待されます。

❖ 特記事項

Journal: *Journal of Experimental Medicine* (5月10日 オンライン掲載)

Title: “Uncovering a novel role of PLC β 4 in selectively mediating TCR signaling in CD8+ but not CD4+ T cells”

Authors: Miwa Sasai, Ji Su Ma, Masaaki Okamoto, Kohei Nishino, Hikaru Nagaoka, Eizo Takashima, Ariel Pradipta, Youngae Lee, Hidetaka Kosako, Pann-Ghill Suh, Masahiro Yamamoto

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED） 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「日本のトキソプラズマ症の感染実態把握とその制御に向けた協創的研究開発」の研究支援を受け、韓国・脳研究院 Pan-Ghill Suh 院長、徳島大学・小迫英尊教授と愛媛大学の高島英造准教授の協力を得て実施されました。

❖ 用語説明

※1 キラーT細胞とヘルパーT細胞

それぞれリンパ球である T 細胞の亜集団である。ヘルパーT細胞は B 細胞やキラーT細胞の役割を助けることから、「ヘルパー」T細胞と呼ばれる。キラーT細胞は、病原体感染細胞やがん細胞を直接殺傷することから、「キラー」T細胞と呼ばれる。CD4 と CD8 は、T細胞の表面に出ているタンパク質で、主に T細胞で発現し、CD4 を発現する T細胞はヘルパーT細胞、CD8 を発現する T細胞はキラーT細胞と呼ばれる。

※2 ミエロイド系細胞

免疫細胞（リンパ球（T細胞、B細胞）、好中球、単球（マクロファージ）、好塩基球、好酸球、樹状細胞）のうち、単球・好中球・好酸球・好塩基球・樹状細胞を指す。

※3 T細胞受容体（T Cell Receptor, TCR）

T細胞の表面に存在する受容体。これまでヘルパーT細胞とキラーT細胞の間で TCR のシグナル伝達経路には質的な違いはないと考えられてきた。

※4 PIP₂

ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸とも呼ばれ、細胞膜の微量構成成分の一つであり、特に細胞膜で濃縮されている。ホスホリパーゼ C により分解され、IP₃ と DAG となり、下流の様々な細胞内シグナル伝達経路が活性化する。

※5 IP₃ と DAG

IP₃（イノシトール 3 リン酸）と DAG（ジアシルグリセロール）は、PIP₂ のホスホジエステル結合がホスホリパーゼ C により分解されて生じる。

※6 ヘテロ 3 量体 G タンパク質

G タンパク質は GTP 分解酵素に属するグアニンヌクレオチド結合タンパク質の略称である。αサブユニット、βサブユニット、γサブユニットからなるヘテロ三量体のものを、「ヘテロ 3 量体 G タンパク質」と呼ぶ。αサブユニットに結合する GDP が GTP になることで、βとγサブユニットが遊離し、それぞれの標的タンパク質が活性化しシグナル伝達経路が活性化する。