

軟骨魚類と古代魚において獲得免疫の鍵となる CD4 および LAG-3 遺伝子を発見 (海洋生物資源学部 先端増養殖科学科 瀧澤准教授、末武教授)

1. 研究のポイント

- 軟骨魚類のサメにおける CD4 と LAG-3 遺伝子の存在およびそれぞれの分子の活性化と抑制化のモチーフを特定しました。
- LAG-3 の機能は不明な点が多いですが、進化的に保存されている細胞質内の ITIM 様モチーフが最も重要なモチーフだと考えられます。
- 条鰭類の古代魚において真骨魚類に存在する 2 種類の CD4 (CD4-1、CD4-2) と LAG-3 遺伝子を存在することを同定しました。
- ヘルパーT 細胞の機能に関わる CD4 と LAG-3 遺伝子の進化を明らかにし、これら遺伝子の脊椎動物間で保存された特徴や各種動物に固有の特徴を見出しました。
- 研究が進んでいる CD4 に対して、その近縁分子である LAG-3 の研究は限られていましたが、進化の過程で両分子およびその特徴が保存されていることは、有顎脊椎動物の免疫系において両分子が同様に重要であることを指し示しています。

2. 研究内容

【概要】

福井県立大学の瀧澤准教授と末武弘章教授および藤田医科大学ヨハネス M. ダイクストラ准教授は、アクアワールド茨城県大洗水族館、ペンシルベニア大学、メリーランド大学との日米共同研究において、軟骨魚類のサメにおける CD4 および LAG-3 遺伝子を同定しました。CD4 および LAG-3 分子は獲得免疫の指令役であるヘルパーT 細胞の機能に関わっており、この発見により脊椎動物全般において CD4 の細胞質内に Cx(C/H) 活性化モチーフが存在し、LAG-3 の細胞質内には (F/Y)_xL(D/E) からなる ITIM 様の抑制化モチーフが保存されていることを明らかにしました。また、条鰭類の真骨魚類(現生魚類の中の多数を占めるグループ) では LAG-3 に加えて 2 種類の CD4 遺伝子 (CD4-1、CD4-2) が存在することが知られていましたが、本研究では原始的な条鰭類であり古代魚と呼ばれるポリプテルス類、チョウザメ類、ガー類においても CD4-1 と CD4-2 が存在することを見出しました。これらの発見は、獲得免疫の指令役であるヘルパーT 細胞の機能に関わる CD4 と LAG-3 遺伝子の起源とその進化を明らかにし、脊椎動物の進化の過程で保存されている CD4 と LAG-3 分子の特徴や各種動物に固有の特徴の解明に繋がりました (図 1)。本成果はオンライン科学雑誌の「Frontiers in Immunology」に 2023 年 12 月 21 日に掲載されました。

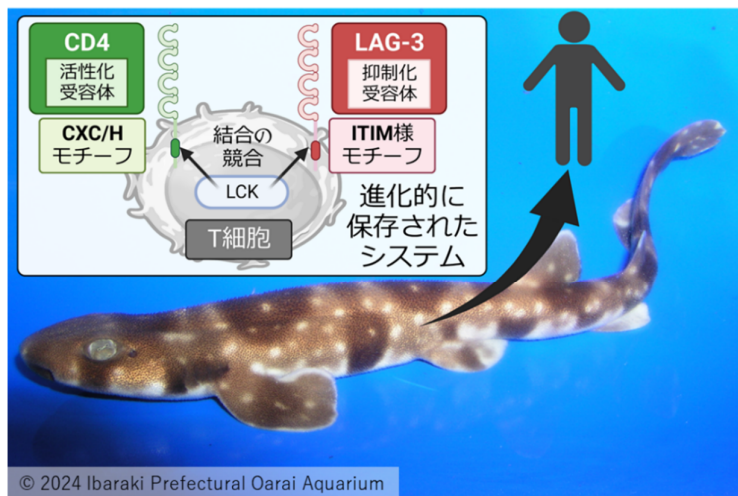


図 1. 実験に用いたトラザメおよび本研究の概要

【背景】

CD4 (Cluster of Differentiation 4) と LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3) は遺伝子重複により出現した関連分子と考えられており、両分子とも樹状細胞や B 細胞などの抗原提示細胞がペプチド抗原を提示するための MHC クラス II 分子に結合できます。CD4 は、ヘルパー T (Th) 細胞や制御性 T 細胞の細胞表面に T 細胞受容体複合体として発現するとともに、その細胞質内領域の CXC モチーフ介して LCK と結合し、Th 細胞の活性化に関与します。一方、LAG-3 は制御性 T 細胞に恒常的に発現しており、細胞質内の抑制モチーフを介して T 細胞の分裂を制限する役目を持っています。そのため、LAG-3 分子は T 細胞の免疫応答を抑制する免疫チェックポイント分子であり、がん免疫療法の免疫チェックポイント阻害薬として注目されています。

T 細胞や MHC 分子を用いる獲得免疫は、軟骨魚類から哺乳類までの有顎脊椎動物に存在しています。条鰭類の真骨魚類では、2004 年と 2006 年に LAG-3 遺伝子に加えて 2 種類の CD4 遺伝子 (CD4-1, CD4-2) が発見され、CD4-1, CD4-2 および LAG-3 遺伝子が存在することが明らかになりました (1-3)。また、我々はニジマスの CD4-1 と CD4-2 に対するモノクローナル抗体の作製に成功し、CD4-1⁺/CD4-2⁺ Th 細胞と CD4-2⁺ Th 細胞および CD4-1⁺ マクロファージを特定しています (4)。しかしながら、2 種類の CD4 遺伝子が真骨魚類に特有なものなのか、古代魚にも存在するのか分かっていませんでした。

軟骨魚類も哺乳類と同様に T 細胞、B 細胞、そして MHC 分子による抗原提示が存在し、獲得免疫の進化に関するモデル動物として用いられています。2014 年に Venkatesh らの研究グループは、ゾウキンザメやコモリザメの全ゲノムの配列決定を行い、軟骨魚類において 1) 哺乳類や新骨魚類に存在する Th 細胞の機能に関わるサイトカインや転写因子が存在せず、2) CD4/LAG-3 様遺伝子は存在するものの他の動物種で存在する典型的な CD4 遺伝子 (CXC モチーフ) とは異なる、ということが報告されました (5)。したがって、軟骨魚類の獲得免疫系は Th 細胞による補助機能が原始的な独自のシステムが存在することが提唱されました (4)。しかしその後、軟骨魚類においてもほとんどの Th 細胞の機能に関わるサイトカインや転写因子の遺伝子が存在することが明らかになり、Th 細胞の機能が軟骨魚類から十分に備わっていることが分かってきましたが (6)、未だ CD4 および LAG-3 遺伝子の存在は不明確なままでした。そこで我々は、脊椎動物における CD4 および LAG-3 遺伝子の進化を調べるため、軟骨魚類や条鰭類の古代魚における CD4 および LAG-3 遺伝子を探索しました。

【研究手法・研究成果】

本研究では、軟骨魚類の CD4 および LAG-3 遺伝子が同定するために、軟骨魚類のゲノムデータベースや Transcriptome Shotgun Assembly データベースを用いてシマザメ、シマネコザメ、ハナカケトラザメ、トラザメ、コモリザメという 5 種類の軟骨魚類における CD4 および LAG-3 遺伝子の塩基配列を取得できました。ハナカケトラザメのゲノムでは、CD4 と LAG-3 遺伝子は同一染色体上に局在し、その周囲の遺伝子構成も他の動物のものと同様に保存されていました。軟骨魚類の CD4 遺伝子の演繹アミノ酸配列のうち細胞質内領域に着目すると、LCK 結合領域として魚類の CD8 に見られる CXH モチーフが確認されました。一方、LAG-3 分子の細胞質内領域には FXXLD 抑制モチーフが保存されていました (図 1)。また、トラザメの各種組織を用いてリアルタイム PCR による遺伝子発現解析

を行ったところ、CD4 遺伝子は胸腺において高い発現が認められたのに対して、LAG-3 遺伝子はリンパ組織全般に発現していました。さらに、データベースに登録されているコモリザメのシングルセルトランスクリプトーム解析を利用して単一細胞レベルの CD4 および LAG-3 遺伝子の発現を調べたところ、CD4 あるいは LAG-3 発現細胞の大部分が T 細胞系列のマーカー遺伝子を共発現していることが分かりました。以上から軟骨魚類においても CD4 と LAG-3 分子が T 細胞の機能に関与することが強く示唆されました (図 2)。

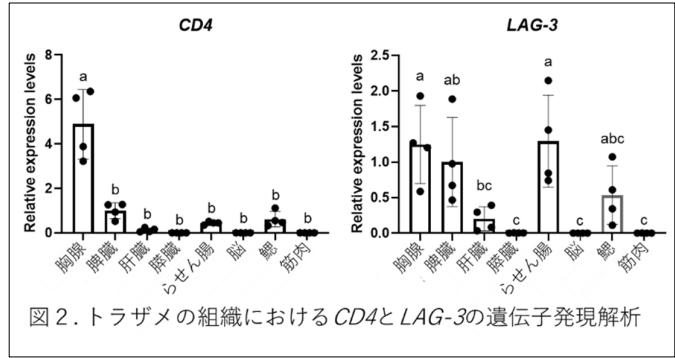


図 2. トラザメの組織における CD4 と LAG-3 の遺伝子発現解析

条鰭類の真骨魚類 (現生魚類の中の多数を占めるグループ) では、2 種類の CD4 遺伝子 (CD4-1、CD4-2) と LAG-3 が存在することが知られていました。本研究では、原始的な条鰭類であり古代魚と呼ばれるポリプテルス類、チョウザメ類、ガー類においても CD4-1、CD4-2 および LAG-3 が存在することを見出しました (図 2)。つまり、条鰭類の魚類では、新骨魚類で起きた全ゲノム重複ではなく条鰭類の初期から CD4-1 と CD4-2 が存在することが明らかになりました (図 3)。また、条鰭類のすべての魚種で CD4-1 と LAG-3 分子は細胞外に 4 つの免疫グロブリン様 (Ig) ドメインが存在するのに対して、CD4-2 は魚種により 3 と 4 番目の Ig ドメインもしくは 4 番目の Ig ドメインを欠くために 2~4 つの Ig ドメインから構成されることが分かりました。細胞内領域に着目すると、条鰭類の多くの魚種の LAG-3 は FXXLE もしくは YXXLE からなる抑制モチーフを持っており、一方で CD4-1 と CD4-2 のどちらも全ての魚種において LCK が結合するための CXC モチーフが存在していました。また、CD4-1 の細胞内領域には魚種間で比較的保存された P(K/Q)P(K/R) (A/G)FY (H/K/R) というモチーフが存在していました。このモチーフは CD4-1 に独自のもので、他生物種の CD4 や条鰭類の CD4-2 には認められません。そのため、このモチーフの機能を今後調べることで CD4-1 と CD4-2 の機能の違いを明らかにすることが期待できます。

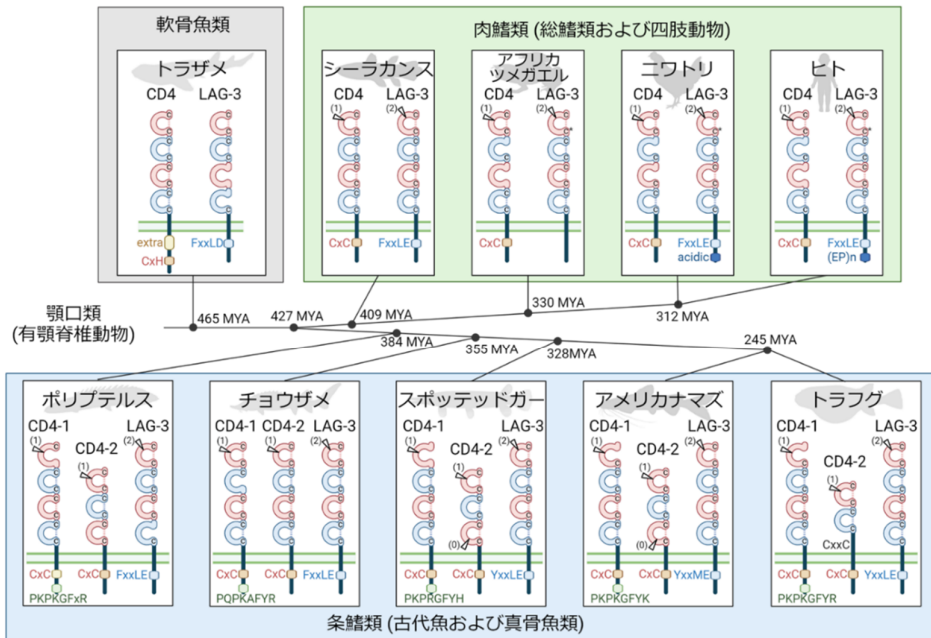


図 3. 本研究で明らかになった各脊椎動物における CD4 および LAG-3 の特徴

【今後の展開】

本研究では、軟骨魚類と条鰭類の古代魚における CD4 と LAG-3 の遺伝子配列を同定し、有顎脊椎動物におけるこれら遺伝子の進化の全体像を明らかにしました。近年、LAG-3 分子は FXXL モチーフによる抑制機能に加えて、酸性アミノ酸が CD4 から Lck を分離させて T 細胞の活性化を制限することが分かってきました(7, 8)。したがって、CD4 と LAG-3 分子はそれぞれ CX(C/H)活性化モチーフと (F/Y)_{xxL}(D/E) となる ITIM 様の抑制化モチーフを進化の過程で保存していますが、一部の動物種において特有の機能的モチーフを獲得したことが分かりました。軟骨魚類はヒトと同様な獲得免疫を有する最古の現生脊椎動物であり、CD4 と LAG-3 分子がこの原始的な動物種からヒトまで存在することは、免疫系において類似する分子が相反する機能(活性化と抑制化)を有することの必要性を示しています。また、本研究で特定された LAG-3 の進化の過程で保存されている特徴は、まだ不明な点が多い LAG-3 の機能の理解につながり、免疫系を抑制する LAG-3 を標的とする免疫チェックポイント阻害薬を用いたがん免疫療法の開発のために重要な知見となります。

参考文献

1. Suetake H, Araki K, Suzuki Y. Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics*. 2004 Aug;56:368-74.
2. Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Molecular immunology*. 2006 Feb 1;43(5):410-9.
3. Laing KJ, Zou JJ, Purcell MK, Phillips R, Secombes CJ, Hansen JD. Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *The Journal of Immunology*. 2006 Sep 15;177(6):3939-51.
4. Takizawa F, Magadan S, Parra D, Xu Z, Korytář T, Boudinot P, Sunyer JO. Novel teleost CD4-bearing cell populations provide insights into the evolutionary origins and primordial roles of CD4+ lymphocytes and CD4+ macrophages. *The Journal of Immunology*. 2016 Jun 1;196(11):4522-35.
5. Venkatesh B, Lee AP, Ravi V, Maurya AK, Lian MM, Swann JB, Ohta Y, Flajnik MF, Sutoh Y, Kasahara M, Hoon S. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature*. 2014 Jan 9;505(7482):174-9.
6. Dijkstra JM. TH2 and Treg candidate genes in elephant shark. *Nature*. 2014 Jul 10;511(7508):E7-9.
7. Maeda TK, Sugiura D, Okazaki IM, Maruhashi T, Okazaki T. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Apr 12;294(15):6017-26.
8. Guy C, Mitrea DM, Chou PC, Temirov J, Vignali KM, Liu X, Zhang H, Kriwacki R, Bruchez MP, Watkins SC, Workman CJ. LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nature Immunology*. 2022 May;23(5):757-67.

【用語解説】

- LCK : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase の略で、Src キナーゼ ファミリー (SFK) のメンバーです。CD4 や CD8 の細胞質内の CXC や CXH モチーフに結合してナイーブ T 細胞とエフェクター T 細胞の両方における T 細胞受容体シグナル伝達の活性化に重要です。
- ITIM モチーフ : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif の略で、多くの抑制型受容体の細胞質内領域に存在する保存されたアミノ酸配列であり、SH2 ドメイン含有タンパク質などと結合して、細胞の抑制化に関与します。
- 免疫チェックポイント分子 : 免疫恒常性を保つために自己に対する免疫応答や過剰な免疫反応を抑制する分子群のこと。免疫細胞の働きを抑制する「免疫チェックポイント」を阻害する免疫チェックポイント阻害薬はがん細胞に対する免疫を活性化・持続させる薬剤として注目されています。

3. 論文情報

- 【研究論文名】** CD4 and LAG-3 from sharks to humans: related molecules with motifs for opposing functions.
- 【論文著者】** 瀧澤 文雄 (福井県立大学 海洋生物資源学部 先端増養殖科学科)
橋本 敬一郎 (藤田医科大学名誉教授)
太田 裕子 (メリーランド大学)
Ana Verissimo (ポルト大学)
Martin F. Flajnik (メリーランド大学)
David Parra (イブラ)
徳永 幸太郎 (アクアワールド茨城県大洗水族館)
末武 弘章 (福井県立大学 海洋生物資源学部 先端増養殖科学科)
J. Oriol Sunyer (ペンシルベニア大学)
Johannes M. Dijkstra (藤田医科大学 総合医科学研究所)
- 【掲載雑誌】** Frontiers in Immunology
Volume 14 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1267743>
- 【公開日】** 2023年12月21日 (木)
- 【備考】** 当該研究は日本学術振興会科学研究費助成事業 研究課題 20KK0144、22H02437、23H02312 の支援のもと行われたものです。