

## ミニレビュー

## 免疫学ハイライト

## No. 1

## 免疫チェックポイント分子

## Immune Checkpoint Molecules

東京医科大学免疫学分野：横須賀 忠

Department of Immunology,

Tokyo Medical University : Tadashi YOKOSUKA

2011年のノーベル医学生理学賞受賞以来、「自然免疫」という言葉も広く知られるようになった。これまで「免疫」といえば抗体やHLAに代表される「獲得免疫」であり、では“自然免疫と獲得免疫とどちらが大切か？”と学生に質問した場合どう説明するか。自然免疫はハエなどの原始的な生き物にもあり、基本的な生命の維持に不可欠であるが故に異常が起こると生まれてこない。一方、獲得免疫は魚類（無顎類）くらいから発達した免疫系で、ハエのように獲得免疫が無くても生きられるが、異常を呈するとアレルギーや自己免疫疾患、発がんとして現れる。だから君たちの勉強する多くの疾患は獲得免疫の異常であって、医学的には獲得免疫の方が大切である、と説明する。この獲得免疫を制御する司令塔がT細胞である。

T細胞の活性化は、T細胞受容体（T cell receptor : TCR）、補助刺激受容体、サイトカイン受容体などさまざまな受容体からの活性化シグナルとそれに相対する抑制性シグナルによって調節されている。また抗原提示細胞だけでなく、制御性T細胞（regulatory T cell : Treg）やがん細胞、血管内皮細胞や結合組織などT細胞を取り巻く環境全てがそれら受容体のリガンドを介して包括的にT細胞の活性化を制御している。その中でも、抑制性補助刺激受容体の一群はT細胞活性化のON/OFFを決める運命決定因子として、その重要性が注目され臨床応用されている。最初の抑制性補助刺激受容体の単離は既に30年前に遡る。一部のT細胞研究者にしか注目されていなかったが、「がん免疫療法の革命」とも評される劇的な抗腫瘍効果ゆえ、「免疫チェックポイント

ト」と名前を変えて現在のがん治療のホットトピックであるのには間違いなく、サイエンス誌の“Breakthrough of the year 2013”に挙げたことがそれを証明している。

T細胞の活性化は、[TCRからの抗原特異的な第1シグナル]+[補助刺激受容体からの非特異的な第2シグナル]+[サイトカイン受容体からの非特異的な第3シグナル]によって制御されている。補助刺激受容体シグナルは基本的に、TCRシグナルがないと機能せず、TCRシグナルを「量」的に変化させる増幅器であり、一方、サイトカインシグナルはTregや濾胞ヘルパーT細胞（follicular helper T cell : T<sub>FH</sub>）を含むいわゆるヘルパーT細胞の分化誘導、つまりT細胞活性化に「質」的变化を加えるシグナルである。T細胞の補助刺激受容体は、①免疫グロブリンスーパーファミリー（immunoglobulin superfamily : IgSF）と②腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor : TNF）SFに大別され、①にはCD28やICOS（inducible T cell costimulator, CD278）などの活性型補助刺激受容体と<sup>1)2)</sup>、CTLA-4（cytotoxic T cell antigen-4, CD152）やPD-1（programmed-cell death-1, CD279）、BTLA（B and T lymphoma attenuator, CD272）などの抑制性補助刺激受容体がある<sup>3)</sup>。免疫チェックポイント分子には①以外にも、クラスII分子に結合するLAG3（lymphocyte activation gene 3, CD223）や、フォスファチジルセリンやgalectin9に結合するTIM3（T-cell Ig mucin-containing domain-3）、古典的クラスI分子に結合するNK受容体KIR（killer cell immunoglobulin-like receptor）などがある（図1）。

ではなぜTCRシグナルの増幅器である活性型補助刺激受容体が免疫チェックポイント分子と言われないのか？一つに、TCRシグナルを増幅はできても減弱することはできないため、ON/OFFのスイッチにはなり得ないこと<sup>3)4)</sup>。二つめに活性型補助刺激受容体の刺激は制御不能になりかねない危険性があること、であろう。T細胞の活性化を加速さ

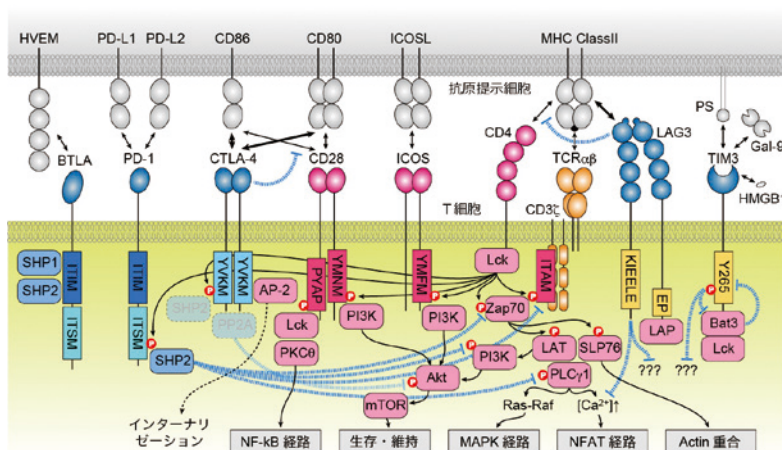


図 1 TCR シグナルと補助刺激受容体シグナルのネットワーク

T 細胞（下）と抗原提示細胞（上）の間で行われる TCR、補助刺激受容体とそのリガンドとの結合および受容体下流のシグナル経路を図示した。

せると危険であることは、マウスモデルで免疫抑制を示すはずの抗ヒト CD28 スーパーアゴニストモノクローナル抗体 TGN1412 が、メモリー T 細胞の著しい活性化とサイトカインストームを誘発し、被検者 6 名全員が ICU 送りとなった TGN1412 の第 1 相臨床試験が示す通りである<sup>5)</sup>。抗 PD-1 抗体療法が普及するにつれ自己免疫性腸炎など重篤な副作用のあることが明らかとなつてはきたが、抑制性補助刺激受容体を標的とした免疫チェックポイント療法は安全性において優れている。抑制化を解除し本来生理的にあるべき活性化レベルまでしか引き上げられないからである。「がんの免疫原性」という観点からも非常に頭の良いやり方である。これまで、がんワクチンやがん抗体療法など、腫瘍を直接のターゲットとした治療法開発がなされてきたが、WT1 ペプチドのように汎用性の高い腫瘍抗原は少ない。がん抗原として、① 胎児抗原のような異所性タンパク質の発現、② ゲノム不安定性から生じるドライバー変異の他に、③ パッセンジャー変異の高い抗原性が注目されているが、いずれにせよ抗原や腫瘍の固形差、抗原性の変化と耐性獲得のたびに対応する必要がある。免疫チェックポイント療法では、このがん抗原の特異性は全て宿主任せであり、補助刺激受容体、つまりがん抗原に対しては非特異的なインバリエントな部分を少しいじるだけである。このことから、腫瘍特異性は 10 兆通りともいわれる TCR レパートリーの中に最初から存在し、抗原性が変化したときはまた次の T 細胞がクローン増殖し殺腫瘍効果を発揮できる可能性のあることが想

像される。

### CTLA-4

CTLA-4 は最初に同定された免疫チェックポイント分子である。遺伝子欠損マウスが全身性 T 細胞浸潤によって生後 2～3 ヶ月で死亡することから<sup>6)7)</sup>、絶対的な免疫抑制分子と考えられている (図 2)。ヘテロ変異でも、Treg の機能異常、末梢組織での T 細胞の活性化と浸潤、自己抗体産生 B 細胞の浸潤など全身性自己免疫疾患を発症することが、

図 2 免疫チェックポイント分子 PD-1 と CTLA-4 との比較

	PD-1	CTLA-4
構造	IgSF 単量体	IgSF ホモ二量体
発現細胞	活性化 T・B 細胞	活性化 T 細胞
細胞内局在	細胞膜	細胞質 (分泌型リソソーム)
リガンド	PD-L1/PD-L2	CD80/CD86
細胞内モチーフ	ITIM/ITSM	ITIM 様モチーフ
下流の機能分子	SHP2 (SHP1)	(SHP1 SHP2 PP2A)
遺伝子欠損マウスの表現型	遅発型の自己免疫疾患 拡張型心筋症 (BALB/c) 糸球体腎炎 (C57BL/c)	早期発症の自己免疫疾患 T 細胞の多臓器浸潤
T 細胞サブセットの分化と機能	制御性 T 細胞の分化誘導 疲弊 (消耗) T 細胞や老化 T 細胞のアナジー (不応答) の誘導	制御性 T 細胞の免疫抑制機能

CTLA-4 変異の 4 家系で報告されている<sup>8)</sup>。しばしば「CTLA-4 は免疫受容体抑制性チロシンモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif: ITIM) を持った細胞表面分子で、ITIM にリクルートしたフォスファターゼを介して T 細胞のプライミングフェーズに抑制的に働いている」という記述を目にするが 4 箇所間違いがある。CTLA-4 はプライミングフェーズのナイーブ T 細胞には発現しておらず、TCR 刺激後 12 ~ 24 時間後にタンパク質として出てくる。また CTLA-4 の ITIM 様モチーフである細胞内チロシンモチーフ (YMVM) にはクラスリン依存的エンドサイトーシスアダプター AP-2 が結合しているため、通常はその殆どが細胞表面から取り込まれて分泌性ライソゾームに蓄えられ、次の TCR 刺激 (細胞内カルシウムの上昇) と共に細胞膜表面に現れる。リガンドは活性型補助刺激受容体 CD28 と共通する CD80 (B7-1) と CD86 (B7-2) との二つである。CD28 よりも 50 ~ 100 倍も親和性 (affinity) が高いだけでなく、CD28 二量体が CD80 二量体と 1:1 で結合するのに対して、CTLA-4 二量体は 1:2 で結合するためアビティティー (avidity) も高い。CD80/CD86 は樹状細胞やマクロファージ、特にプロフェッショナル抗原提示細胞 (antigen-presenting cell: APC) に発現しているが、CD80 はホモ二量体であり、一方 CD86 は単量体で APC の活性化により発現誘導されるという違いを持つ。CTLA-4 の ITIM 様チロシンモチーフへのフォスファターゼ SH2 domain-containing phosphatase-2 (SHP-2)/SHP-1 の会合はほぼなく、同じ T 細胞上で CD28 が CD80/86 へ結合するのを拮抗阻害し、CD28 からの NF $\kappa$ B シグナルを低下させたり<sup>9)10)</sup>、APC 上の CD80/86 をトロゴサイトーシスによってもぎ取り抗原提示能を低下させたりすることが主なメカニズムと考えられている。

### PD-1

PD-1 は当初アポトーシス関連分子として同定された IgSF 分子であり<sup>11)</sup>、抗 PD-1/PD-L1 抗体が歴史的な抗腫瘍効果を発揮したことから<sup>12-14)</sup>、現在最も注目されている免疫チェックポイント分子である (図 2)。PD-1 欠損マウスは、生後 6 ヶ月で、糸球体腎炎、関節炎、脾腫、自己抗体産生を呈し (C57BL/6 マウス)<sup>15)</sup>、抗 I 型心筋トロポニン抗体による拡張性心筋症と胃壁細胞に対する自己抗体による胃炎を

発症する (BALB/c マウス)<sup>16)</sup>。PD-1 は、活性化した T/B 細胞、疲弊 T 細胞、濾胞 T 細胞、Treg、NKT 細胞、活性化した骨髄系 DC (myeloid DC: mDC) や単球に発現しており、TCR 下流の転写因子 NFATc1、I 型インターフェロン (interferon: IFN) 受容体下流の転写因子 IRF9、共通  $\gamma$  鎖 (common  $\gamma$ : c $\gamma$ )、自然免疫受容体 (Toll 様受容体 2/3/4 や NLR ファミリー分子 NOD1/2)、エストロゲン受容体シグナルなどによって発現制御される。リガンドには PD-L1 (PD-1 ligand-1, H7-H1, CD274) と PD-L2 (B7-DC, CD273) とがある。PD-L1 は T/B 細胞、マクロファージ、mDC、リンパ球系 DC (plasmacytoid DC: pDC)、骨髄肥満細胞などのリンパ球系細胞の他に、血管内皮や腸管上皮など広範囲かつ恒常的に発現している<sup>17)</sup>。一方 PD-L2 は GM-CSF、IFN $\gamma$ 、IL-4、c $\gamma$  サイトカイン、TNF $\alpha$  などの刺激を受け、mDC、pDC、マクロファージ、B-1 B 細胞、骨髄マスト細胞など主にプロフェッショナル APC に発現誘導される<sup>18)19)</sup>。PD-L1 も、IRF1、STAT3 を介する I 型 IFN、IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、c $\gamma$  サイトカイン、GM-CSF、IL-4、低酸素誘導因子 HIF1 $\alpha$  などによりさらに発現誘導がかかる。これらを簡単にまとめると、炎症が慢性的に起こるに従い、さまざまな免疫細胞が自ら PD-1 を出し、抗原提示細胞や結合組織細胞など周囲の細胞もリガンド PD-L1/2 を出すことによって環境全体が炎症をおさえこむ方向へと進む、ということである。このような免疫寛容の姿勢は、炎症性サイトカインが増加する感染や炎症、またがんなどの局所環境において誘導される過度な組織破壊を回避し炎症を合目的に終息させるのに有効であるが、がんはそれを逆手にとっている訳である (図 3)。

PD-1 の細胞内領域には、二つのチロシン残基モチーフ ITSM (immunoreceptor-tyrosine-switch motif, TxYxxL/I) と ITIM があり、PD-L1/2 との結合を機に Src ファミリー分子 Lck もしくは Lyn によってリン酸化され、フォスファターゼ SHP2 が会合する。SHP2 はエフェクター分子として T 細胞では CD3 $\zeta$  鎖以下の<sup>20)21)</sup>、B 細胞では Ig $\beta$  鎖以下のシグナル伝達分子を脱リン酸化する<sup>22)</sup>。T 細胞上の PD-L1 は APC 上の CD80 とも結合し、双方向に抑制性シグナルを伝え、免疫寛容 DC を分化誘導すると考えられている<sup>23)</sup>。原発性マクログロブリン血症由来の抗 PD-L2 IgM 抗体でも DC を刺激できることや<sup>24)</sup>、PD-L2 が Repulsive guidance molecule b (RGMb)—



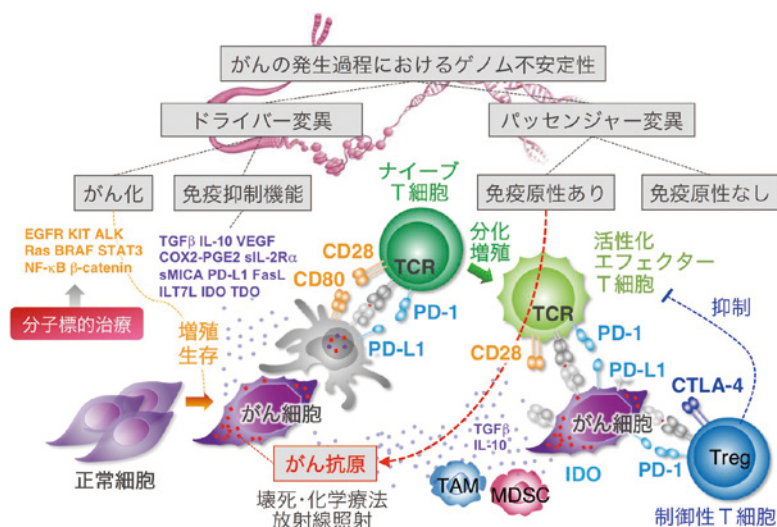


図3 がん免疫状態の抗腫瘍免疫ネットワークとPD-1を介したがんの逃避メカニズム  
ゲノム不安定性によって遺伝子変異が起こると、それがドライバー変異の場合、正常細胞が増殖過多・長期生存し、がん細胞となる。分子標的治療の多くは、このドライバー変異分子をターゲットにしている。一方、がん細胞は自然に壊死、また化学療法や放射線療法によって壊死し、それを抗原提示細胞が貪食し、「がん抗原」としてナイーブT細胞に提示する。最近では、パッセンジャー変異の方ががん抗原として強力的に認識されると示唆されている。ナイーブT細胞はTCRとCD28を介して分化・増殖し、活性化エフェクター細胞となり、エフェクター細胞は細胞傷害性サイトカインを分泌したり、直接がん細胞を殺傷したりする。しかし、がん原性炎症が長期間続くようになると、エフェクター細胞は自らがPD-1を発現して過剰な免疫応答を回避するだけでなく、骨髄由来免疫抑制細胞（myeloid-derived suppressor cell：MDSC）や腫瘍随伴マクロファージ（Tumor-associated macrophage：TAM）といった免疫抑制状態を誘導する細胞群が遊走・分化し、IL-10やTGFβといった抑制性サイトカインの分泌を介して、がんの局所環境を免疫抑制状態へと誘導する。このような環境はTregの分化も誘導し、ますます免疫抑制状態は促進される。また、パッセンジャー変異の中には抑制性サイトカインの分泌を促進するような遺伝子変異も含まれる。このような免疫抑制状態においてPD-1は中心的役割を果たしていると考えられ、チェックポイント療法はこれら免疫抑制状態をブレイクすることにある。

骨形成タンパク質—Neogeninと結合し、肺の免疫寛容に寄与することも報告されている<sup>25)</sup>。

#### 抗PD-1/PD-L1抗体療法が効果的な理由

遺伝子欠損マウスの表現型では明らかにCTLA-4欠損の方がPD-1欠損よりも重症な自己免疫応答を発症し早期に死亡することから、抗CTLA-4抗体療法よりも抗PD-1/PD-L1抗体療法の方がより高い抗腫瘍効果を持っていることが不思議に思われる。これらの2つの分子は広くT細胞の抑制を行っており、なぜこの違いが生じるか明確に解答できる研究者はいない。ただ、これまでの実験結果から、PD-1のT細胞抑制の優位性は恐らく前述した通り、①受容体もリガンドも発現している細胞や組織が広範で、日常的に抑制に働いていることと、②Tregや寛容性（tolerogenic）／制御性樹状細胞などを積極的に分化誘導できる点であろう。レビューなどで見かける「CTLA-4はプライミングフェーズに、PD-1はエフェクターフェーズに抑制活性を示

す」という記述も誤りであり、TCR刺激後2～6時間には発現した1週間以上も発現が持続するPD-1は、T細胞の1回目の細胞分裂より早い、つまり、ナイーブT細胞の初期の活性化からエフェクター細胞への分化、さらには記憶T細胞樹立の全ての段階で機能し得る作用期間の長い抑制性補助刺激受容体である<sup>26)</sup>。

Tregは免疫チェックポイント分子CTLA-4、PD-1、LAG3、TIM3を発現しており、PD-1はTregの抑制機能の増強だけでなく、Tregの分化誘導も促進することが示されている<sup>27)</sup>（図4）。これは、PD-1がリガンドPD-L1と結合することによって誘導されたPTENが、TCR下流のAkt-mTOR活性を抑えるからであり、mTOR阻害剤が誘導性制御性T細胞（inducible regulatory T cell：iTreg）を誘導できることと同じメカニズムを使っているようだ。またがん局所環境で分化した骨髄由来免疫抑制細胞（myeloid-derived suppressor cell：MDSC）や腫瘍随伴マクロファージ（tumor-associated macrophage：

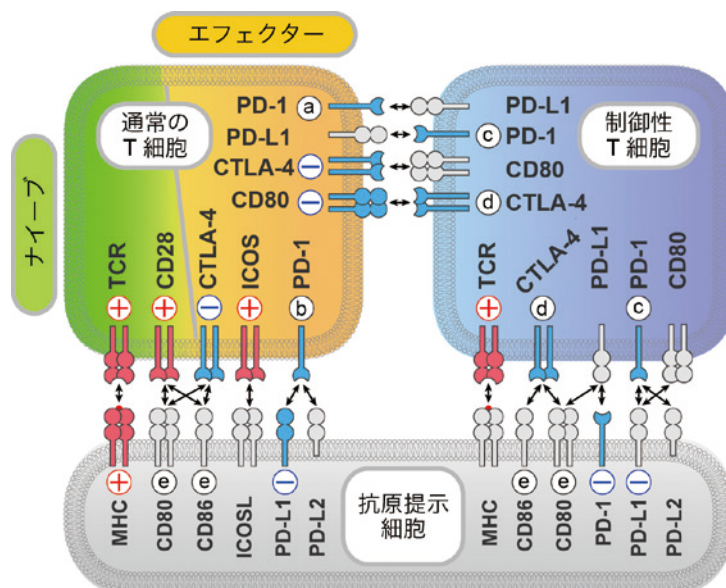


図 4 T 細胞と抗原提示細胞との間で起こる補助刺激受容体とリガンドとの結合とそのシグナル伝達  
 ナイーブ T 細胞（左上緑色）、一度 TCR 刺激を経たエフェクター T 細胞（左上橙色）、制御性 T 細胞（右上水色）、抗原提示細胞（下灰色）の間で行われている補助刺激受容体とそのリガンドとを介した細胞コミュニケーションを図示した。⊕：活性化シグナル。⊖：抑制性シグナル。Ⓐ：Treg 上の PD-L1 による通常のエフェクター細胞の機能抑制と iTreg への分化誘導。Ⓑ：抗原提示細胞上の PD-L1/PD-L2 による通常のエフェクター細胞の機能抑制と iTreg への分化誘導。Ⓒ：PD-1 を介した Treg の Foxp3 発現の維持と抑制機能の保持、生存シグナル。Ⓓ：CTLA-4 を介した Treg の抑制活性維持。Ⓔ：CD80/CD86 を介して、CD28 は活性化シグナルを、CTLA-4 は抑制シグナルを抗原提示細胞側へと伝達する。また、CTLA-4 は CD80/CD86 を T 細胞側に剥ぎ取ること（トロゴサイトーシス）によって抗原提示細胞の抗原提示能力を低下させる。

TAM) などからの IL-10 やトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor  $\beta$ : TGF $\beta$ ) といった抑制性サイトカインが増加すると、ナイーブ T 細胞から iTreg への *de novo* 分化、もしくはエフェクター T 細胞から iTreg への転換が起こり、末梢での免疫寛容が促進される。また、内在性制御性 T 細胞 (natural occurring regulatory T cell (nTreg)) も iTreg も PD-1 と PD-L1 の両方を発現し、他のエフェクター T 細胞上の PD-1 を介して iTreg へ分化・転換させたり、DC 上の PD-1 を介して免疫寛容 DC を誘導したりする。また、スプライシングによってできた可溶性 PD-1 は、DC や CD4<sup>+</sup> T 細胞からの抑制性サイトカイン IL-10 の産生を誘導することが報告されている。

#### 免疫チェックポイント分子と腫瘍

腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL) の多くが免疫チェックポイント分子を発現していることから、免疫チェックポイント療法は、直接的に抗腫瘍 CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞傷害活性をリカバーさせるフェーズと、TIL CD4<sup>+</sup> Treg の抑制機能をキャンセルするフェーズとの両方に寄与すると考

えられる。2000 年よりヒト型抗ヒト CTLA-4 抗体 (ipilimumab) の臨床治験が始まり、当初悪性黒色腫での奏効率は 10% 未満、大腸炎発症率が 25-30% と芳しくなかったが、抗体投与量と投与方法の改善、ステロイドや TNF 阻害剤の併用による副作用の軽減、メラノーマ抗原 gp100 などワクチン療法の併用などにより<sup>28)</sup>、2010 年 ipilimumab の悪性黒色腫への適応が米国食品医薬品局 FDA により認可された。前述の通り、PD-1 を標的とした抗腫瘍療法が CTLA-4 と大きく異なる点は、リガンドである PD-L1 が、腫瘍局所にいる CTL (CD8<sup>+</sup> TIL)、Treg、mDC などの免疫担当細胞、腫瘍細胞、がん原性炎症が波及している周囲の血管内皮や上皮細胞などにも発現しており、がん局所全体が免疫逃避環境を作っていることである。実際に、腎癌、肺癌、卵巣癌、消化器癌、悪性黒色腫など多くの腫瘍では PD-L1 の発現が高い<sup>29)</sup>。肥満細胞腫瘍株 P815 を用いた最初の抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果検討のマウス実験例<sup>12)</sup> から間もなく、ヒト型抗ヒト PD-1 抗体 (nivolumab) やヒト型抗ヒト PD-L1 抗体 (BMS-936559) を用いた米国での第 1 相試験は歴史的成功をおさめ<sup>13)14)</sup>、2014 年 7 月、日本でも悪性黒色腫

治療に対する認可が下りた。理論的には抗 PD-1 抗体では PD-L1—CD80 結合は阻害できず、抗 PD-L1 抗体では PD-1—PD-L2 結合が残るため、抗体のコンビネーションの検討も必要である。実際に抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体との併用は、単体使用の2倍の奏効率を示したという報告もあり、抗 PD-1 抗体と抗 TIM3 抗体もしくは抗 LAG3 抗体との併用を始め、抗 PD-1 抗体と他のがん治療とのコンビネーションをかかげた臨床実験は 500 件以上といわれている。

細胞周期で使われる「チェックポイント」とは、サイクリンやサイクリンキナーゼなどのチェックポイント制御因子が明確に定義された上での、前の反応が終了するまでは次の反応を起こさないようにするフィードフォワード抑制機構である。一方、免疫チェックポイントは、TCR シグナルが惹起した結果、フィードバック抑制機構として誘導され機能する抑制性補助刺激のことであり、T 細胞応答の ON/OFF を制御する機構と考えられている。ゆえに、T 細胞抑制分子を「チェックポイント分子」と換言しただけではないかと否定的に考える人も多い。ただ、T 細胞抑制分子群の持つ抗腫瘍効果に対するポテンシャルは、外科的治療、化学療法、放射線療法に続く第4の治療としての免疫治療の可能性を大きく引き出し、それらを「チェックポイント」として再定義すべきだ、というのが近年の米国免疫学会をはじめとした動きなのだろう。1960 年のノーベル医学生理学賞受賞者 Franc M Burnet が提唱した「免疫監視（われわれの体内で 1 日 3,000 個といわれる自然発生したがん細胞を、免疫細胞が排除する現象）」が 50 年を経て実証されたということであり、実際にがんに対する T 細胞が体内に既に存在し、抑制分子という足かせを外してしまえばがんを駆逐できる、免疫系の多様性の大きさを示唆しているのだと思う。

## 文 献

- 1) Yokosuka T, Saito T: Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev* **229**(1): 27-40, 2009
- 2) Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T: Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity* **29**(4): 589-601, 2008
- 3) Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T: A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* **14**(12): 1212-1218, 2013
- 4) Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-264, 2012
- 5) Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N: Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* **355**(10): 1018-1028, 2006
- 6) Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* **270**(5238): 985-988, 1995
- 7) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**(5): 541-547, 1995
- 8) Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, Schickel JN, Tran DQ, Stoddard J, Zhang Y, Frucht DM, Dumitriu B, Scheinberg P, Folio LR, Frein CA, Price S, Koh C, Heller T, Seroogy CM, Huttenlocher A, Rao VK, Su HC, Kleiner D, Notarangelo LD, Rampertara Y, Olivier KN, McElwee J, Hughes J, Pittaluga S, Oliveira JB, Meffre E, Fleisher TA, Holland SM, Lenardo MJ, Tangye SG, Uzel G: Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* **345**(6204): 1623-1627, 2014
- 9) Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T: Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* **33**(3): 326-339, 2010
- 10) Kong KF, Yokosuka T, Canonigo-Balancio AJ, Isakov N, Saito T, Altman A: A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat Immunol* **12**(11): 1105-1112, 2011
- 11) Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T: Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* **11**(11): 3887-3895, 1992
- 12) Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N: Involvement of PD-L1 on tumor cells in



- the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19) : 12293-12297, 2002
- 13) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M : Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**(26) : 2443-2454, 2012
  - 14) Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM : Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366**(26) : 2455-2465, 2012
  - 15) Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T : Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**(2) : 141-151, 1999
  - 16) Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T : Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**(5502) : 319-322, 2001
  - 17) Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T : Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**(7) : 1027-1034, 2000
  - 18) Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ : PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**(3) : 261-268, 2001
  - 19) Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H : B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* **193**(7) : 839-846, 2001
  - 20) Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D : PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Lett* **574**(1-3) : 37-41, 2004
  - 21) Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T : Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* **209**(6) : 1201-1217, 2012
  - 22) Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T : PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24) : 13866-13871, 2001
  - 23) Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ : Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**(1) : 111-122, 2007
  - 24) Nguyen LT, Radhakrishnan S, Ciric B, Tamada K, Shin T, Pardoll DM, Chen L, Rodriguez M, Pease LR : Cross-linking the B7 family molecule B7-DC directly activates immune functions of dendritic cells. *J Exp Med* **196**(10) : 1393-1398, 2002
  - 25) Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM, Hua P, Duke-Cohan JS, Umetsu DT, Sharpe AH, DeKruyff RH, Freeman GJ : RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med* **211**(5) : 943-959, 2014
  - 26) Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, Okazaki T, Honjo T : PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8<sup>+</sup> T cell anergy in vivo. *J Immunol* **182**(11) : 6682-6689, 2009
  - 27) Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH : PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* **206**(13) : 3015-3029, 2009
  - 28) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urbaniak WJ : Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**(8) : 711-723, 2010
  - 29) Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, Krejci KG, Lobo JR, Sengupta S, Chen L, Zincke H, Blute ML, Strome SE, Leibovich BC, Kwon ED : Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients : Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49) : 17174-17179, 2004