

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K09925
研究課題名(和文) 成人T細胞白血病におけるFOXP3発現機序の解明

研究課題名(英文) Foxp3 expression in adult T-cell leukemia

研究代表者

菱澤 方勝 (Hishizawa, Masakatsu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90444455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：FOXP3は、成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia: ATL)の多くで発現するが、その発現する機序は未解明である。ATLの一部では、TSDR脱メチル化がFOXP3の発現と関連していた。TSLC-1の発現に基づく表面抗原の解析により、CD3+CD4+TSLC-1+CD7-の細胞の多くがHTLV-1感染細胞であり、かつFOXP3やCCR4などTregに一致する表現型を有していた。一方、免疫逃避に関わる治療標的としてCD58に着目し解析をした。CD58発現は、EZH2阻害薬で発現が回復しTやNK細胞のIFN- γ 産生が促進されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FOXP3やCD58といった免疫逃避機構に関わる分子の発現や抑制が、epigeneticな機序でされており、ATLにおける免疫不全や発症に関わる可能性があり、さらに、今後治療標的としても候補となりうる。

研究成果の概要(英文)：ATL cells usually express forkhead box P3 (FOXP3). However, the mechanisms of FOXP3 expression remain unclear. Analysis of DNA methylation in ATL showed a part of patients hypomethylated the TSDR. Flowcytometric analysis showed CD3+CD4+TSLC-1+CD7- cells were mainly HTLV-1-infected cells and possess the regulatory T cell (Treg) phenotype, such as FOXP3, CCR4. Loss of CD58 is a common mechanism for tumor immune evasion in lymphoid malignancies. Epigenetic library screening demonstrated that EZH2 inhibitors enhanced CD58 expression. EZH2 inhibitor enhanced interferon- γ production of T and NK cells against lymphoma cells. These results indicated that downregulation of CD58 could be a mechanism for tumor immune escape and provide a molecular basis for immunotherapy.

研究分野：血液内科学

キーワード：成人T細胞白血病 FOXP3 制御性T細胞 CD58

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) は、レトロウイルスである Human T-cell leukemia virus type1 (HTLV-1) の感染により引き起こされる末梢性 T 細胞腫瘍である。急性型やリンパ腫型などの予後は極めて不良であり、新規治療の開発が切望されている。ATL は、免疫不全を高頻度に伴うが、これは日和見感染症の合併など臨床上的の問題となるばかりでなく、本疾患の発症にも深くかかわっている。制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の master regulator である forkhead box P3 (FOXP3) は、多くの ATL で発現していることが知られ、抑制性の機能を持つことで免疫不全の一因となっている。

2. 研究の目的

ATL に FOXP3 が発現する機序は未解明であり、本研究では、ATL における FOXP3 の発現機序や Treg との関連について解析し、ATL の免疫不全や ATL の細胞起源について新たな知見を得て、本疾患の病態の理解を深めるような研究を目指した。

FOXP3 は Treg の分化および抑制機能を制御するが、その発現は主に epigenetic に制御されている。とりわけ FOXP3 遺伝子に存在する Treg-specific demethylated region (TSDR) と呼ばれる部位の CpG residues の DNA 脱メチル化は、FOXP3 の安定した発現に重要な役割を果たす。さらに、Treg は胸腺の段階で CD4 陽性細胞から分化する natural Treg においては TSDR が脱メチル化されており、この脱メチル化が安定した FOXP3 の発現および抑制能の維持に貢献している。このような FOXP3 の epigenetic な発現制御に注目し、ATL 患者の腫瘍細胞から抽出した DNA の TSDR 領域のメチル化の状態について解析し検討をおこなった。

実際の ATL 細胞での Treg の形質を、多数の患者検体で解析し、臨床像との関連について解明し、ATL の免疫不全や疾患の進行の指標となるものはないかを検討した。

一方で、ATL の免疫不全について FOXP3 や Treg との関連が注目されているが、この他に免疫不全と関連し、治療の標的となりうる分子の候補がないかの検討をおこなった。

3. 研究の方法

FOXP3 遺伝子 TSDR の脱メチル化の解析

ATL 細胞株と ATL 患者検体から抽出した DNA を用いて Bisulfite sequencing による DNA メチル化の解析をおこなった。TSDR のほかに、natural Treg で脱メチル化の生じる CTLA-4、HELIOS の遺伝子領域の CpG でも DNA メチル化の状態を確認した。

ATL 細胞の表面抗原解析

ATL(急性型、リンパ腫型、慢性くすぶり型)と無症候性キャリアで、flowcytometry による表面抗原解析をおこなった。TSLC-1 は、HTLV-1 感染細胞で特異的に発現することが知られているが、これを組み込んだ HAS-Flow と呼ばれる解析を用いた。

CD58 抗原の発現低下についての検討

リンパ系腫瘍では CD58 の発現低下が免疫逃避の機序として報告があり、ATL での CD58 発現の検討およびリンパ腫細胞株を用いてその機序の解明と発現回復による免疫応答の解析をおこなった。

4. 研究成果

TSDR の bisulfite sequencing によるメチル化解析は、脱メチル化されていた症例とメチル化された症例両方をもとめた (図 1)。脱メチル化されていた症例では、CTLA-4 exon2, HELIOSintron5 の遺伝子領域の CpG でも DNA は低メチル化であり、natural Treg と同じメチル化のパターンであった。

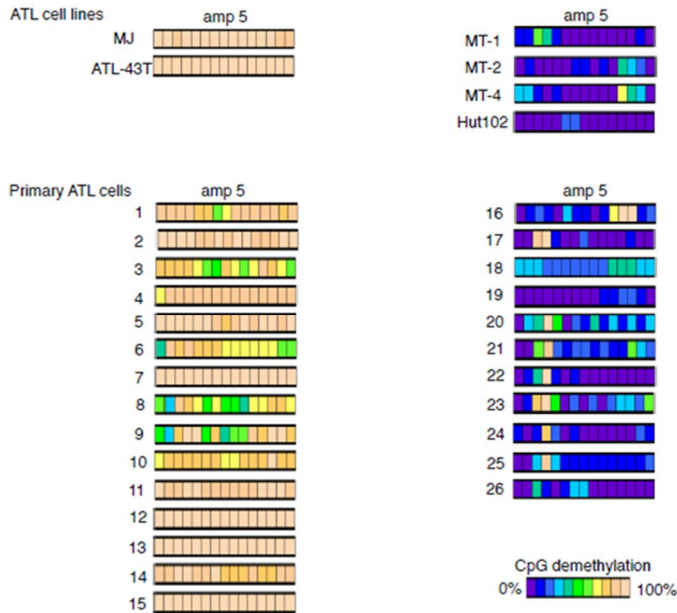


図 1 ATL 症例での TSDR の DNA メチル化を解析したところ 26 例中 15 例 (58%)で脱メチル化されていた

TSDR 脱メチル化の ATL では、FOXP3 の発現も強発現する傾向にあった。しかし、TSDR のメチル化の状態と、日和見感染の発症や予後との間には明確な相関は確認できなかった。

ATL 11例、HTLV-1 キャリア 11 例で HAS-Flow による表面抗原解析をした。CD3+CD4+CD7-TSLC-1+の細胞に HTLV-1 感染細胞が多く含まれ、特に急性型やリンパ腫型の ATL 細胞がこの分画であった (図 2)。末梢血中の proviral load (PVL)は、HAS-flow によ CD3+CD4+CD7-TSLC-1+の細胞割合と相関した。また、CD3+CD4+CD7-TSLC-1+の分画に、FOXP3 や CCR4 などの Treg の表面抗原に一致する細胞も有していた。

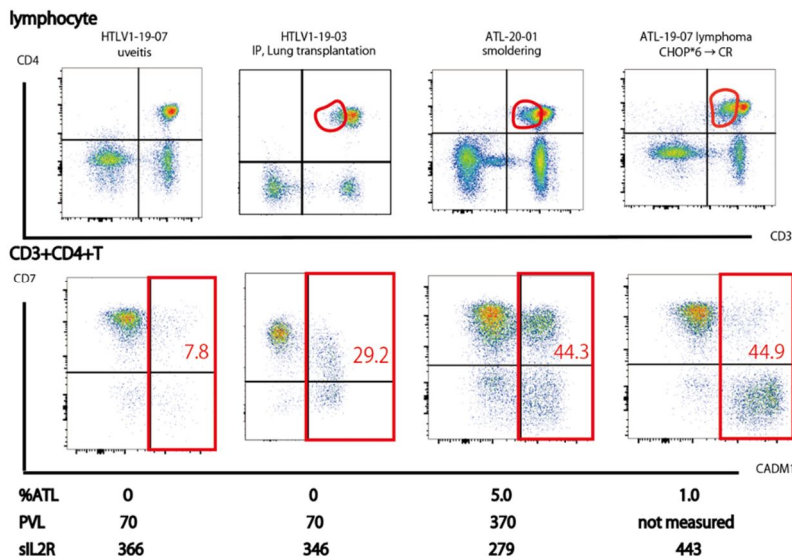


図 2 CD3, CD4, CD7, TSLC-1 により ATL 細胞が検出され、末梢血中の proviral load (PVL)との相関が確認された

ATL における免疫逃避に関わる新たな治療標的候補を見出すことを目的として、CD58 に着目し解析をおこなった。ATL 患者においては、CD58 の発現が低下しており、免疫不全との関連が推測された。細胞株でのスクリーニングの結果、CD58 発現が確認された細胞株を用いて、解析をおこなったこと、B 細胞リンパ腫細胞株においては、CD58 は epigenetic な機序で抑制されていた。EZH2 阻害薬で発現が回復した。さらには、EZH2 阻害薬による CD58 発現の回復の結果、リンパ腫細胞に対する T 細胞や NK 細胞での IFN- γ 産生が促進された (Mol Immunol. 2020 Mar;119:35)。

これらの結果は、CD58 の発現低下は免疫逃避に関わる可能性があり、この回復が免疫応答を回復させることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Otsuka Y, Nishikori M, Arima H, Izumi K, Kitawaki T, Hishizawa M, Takaori-Kondo A.	4. 巻 119
2. 論文標題 EZH2 inhibitors restore epigenetically silenced CD58 expression in B-cell lymphomas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 35-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molimm.2020.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----