

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15451

研究課題名（和文）PD-1のコアフコシル化阻害による腫瘍免疫の活性化

研究課題名（英文）Blocking core fucosylation of PD-1 reduces cell-surface expression and promotes anti-tumor immune responses of T Cells

研究代表者

岡田 匡央 (Okada, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：30749479

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞でのPD-1の発現は、がんに対する攻撃を阻害する。PD-1が発現するメカニズムを解明することで、抗PD-1抗体に代わる治療法の開発や、T細胞がPD-1発現を介して機能低下する原因を明らかにすることができる。本研究において、ゲノム編集技術を用いて、ゲノムワイドノックアウトスクリーニングを行い、PD-1の発現メカニズムの解明を目指した。その結果、糖鎖修飾の一つであるコアフコシル化が、PD-1の発現を促進・保持する可能性を見出した。フコシル化阻害剤の処置はT細胞の活性化を促進し、がん免疫応答の活性化を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1の発現メカニズムの一端を明らかとすることができた。PD-1はT細胞の疲弊を起こす分子の中でも、阻害抗体が多様ながん治療で奏功を示しており、医療においても、がん免疫学においても、重要な標的である。PD-1の発現が、コアフコシル化修飾によって制御されるという新しい機構を提案したことで、新しい治療法の開発や、がん免疫応答の更なる解明につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：PD-1 expression on T cells dampens T cell immune responses against tumors. Uncovering the mechanisms of PD-1 expression contributes to the development of new therapeutics. In this research, by performing the genome wide knockout screen for PD-1 expression, we identified the core fucosylation of PD-1 as one of the mechanism for sustained PD-1 expression. Blockade of core fucosylation reduced PD-1 expression and augmented anti tumor immune responses of T cells.

研究分野：がん免疫

キーワード：pd-1 fut8 core fucose tumor immunity

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞でのPD-1の発現は、T細胞の機能不全、疲弊状態を誘導する。PD-1は、リガンドであるPD-L1との相互作用により、T細胞の活性化シグナルを抑制する。その結果、T細胞の抗原に対する免疫応答が抑制される。特に、がんのように慢性的な抗原のある環境では、PD-1の発現は顕著であり、本来のがんに対する免疫応答は、強く抑制されている。PD-1/PD-L1相互作用を阻害する抗PD-1抗体は、T細胞のがん免疫応答を高く保つことで、臨床においても、高いがん治療効果を示している。一方で、T細胞におけるPD-1発現の誘導、またその持続に関するメカニズムについては、未解明な点が多く、特に、糖鎖修飾による制御に関しては、ほとんど明らかとなっていない。また、T細胞が疲弊を引き起こす過程に関して、説明が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、T細胞で、PD-1の発現や持続に関するメカニズムを探索し、特に、CRISPR-Cas9ノックアウトスクリーニングにより、PD-1の発現に強く関与が示唆されていたコアフコシル化に着目して、PD-1の発現メカニズムを解明することである。また、その知見を、がん免疫療法へと応用することである。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9を利用して、ゲノムワイドなノックアウトスクリーニングを行い、PD-1の発現に関する分子を、網羅的に探索した。gRNAが導入されたことでPD-1発現が低下した細胞より、ゲノムDNAを抽出し、そのgRNA配列を次世代シーケンサーにより調べた。その結果、コアフコシル化に関与する分子群を、PD-1の新しい制御因子として同定した。コアフコシル化によるPD-1の発現制御メカニズムを生化学的に詳細に解析した。コアフコシル化を阻害することで、PD-1の発現抑制、並びに、T細胞の活性化の維持ができるかどうかを、in vitroとin vivoで検証した。最終的に、担癌マウスモデルで、コアフコシル化阻害剤を処置したT細胞移入療法において、その治療応用性について検証した。

4. 研究成果

(1)PD-1発現制御因子の網羅的なスクリーニング

PD-1を恒常的に発現するT細胞株を用いて、CRISPR-Cas9によるゲノムワイドノックアウトスクリーニングを行った。PD-1発現の低下した細胞群に導入されたgRNA配列を、次世代シーケンスを用いて解析した。その結果、Gm3s、Tsta3、Slc35c1、Fut8が、PD-1発現を促進する因子として同定され、これらの遺伝子は、全て細胞内の糖鎖修飾の一つであるコアフコシル化に必須の遺伝子群であった(図1)。

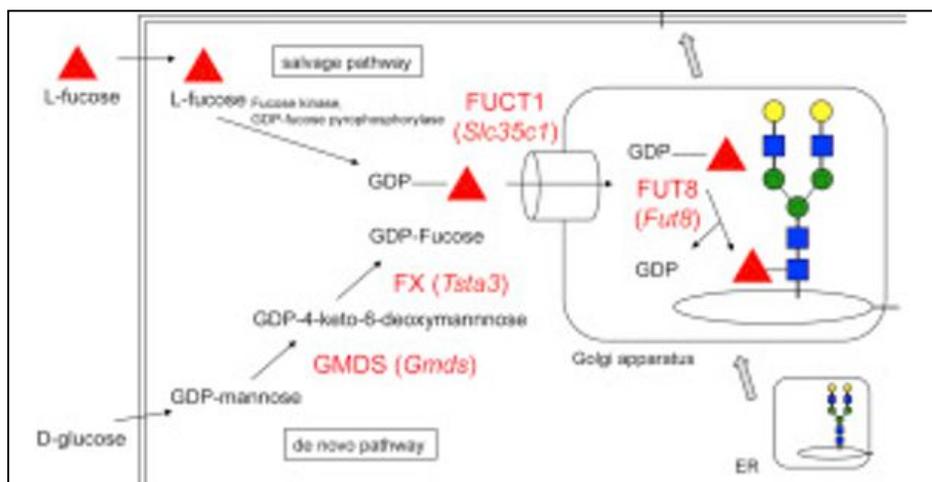
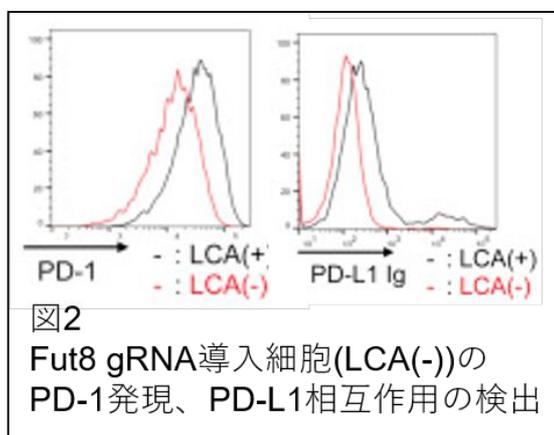


図1

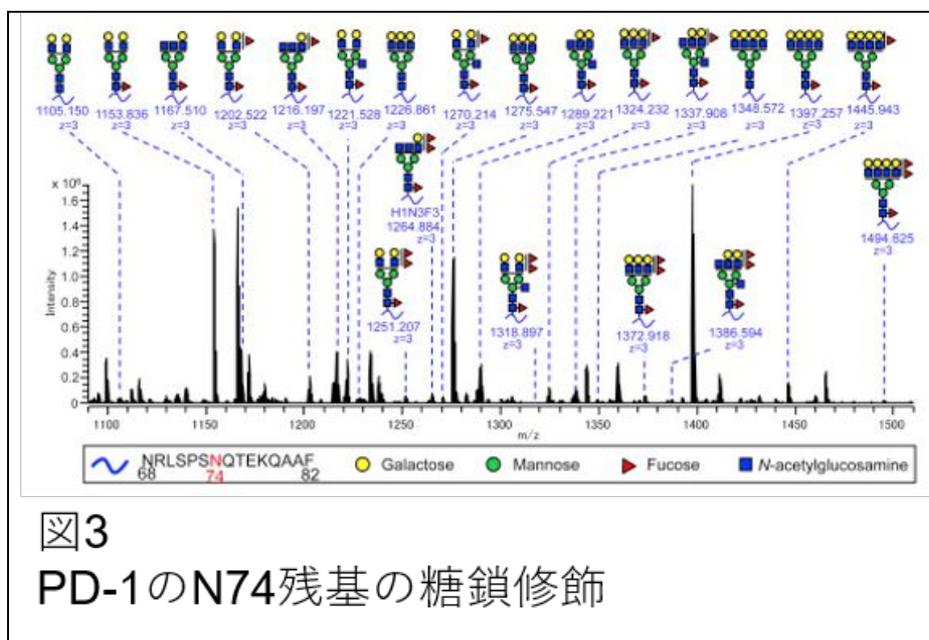
コアフコシル化に関与する遺伝子

(2) コアフコシル化による PD-1 の発現制御

PD-1 は細胞膜発現タンパク質であり、N 糖鎖修飾を受ける配列-N-x-S/T-配列を 4 か所含んでいた。このことから、PD-1 が糖鎖修飾を受け、更にその中でも、コアフコシル化修飾を受けることで、細胞膜発現に関わっていると推測された。コアフコシル化の程度は、特異的なレクチン(LCA)により検出でき、LCA(-)の細胞はコアフコシル化修飾を受けない細胞である。上記 4 遺伝子のノックアウト細胞での PD-1 の発現、PD-L1 との相互作用を検出したところ、ノックアウト細胞において、その低下が認められた(図 2)。



次に、共同研究により、HEK293 細胞で強制発現させた、リコンビナントマウス PD-1 を用いて、アミノ酸部位特異的な糖鎖構造の解析を行った。消化酵素処理後 PD-1 のアミノ酸部位特異的な糖鎖修飾を解析したところ、解析できた全ての N 残基で、コアフコシル化修飾された糖鎖が非常に多い割合で検出された(図 3)。N 残基に変異を入れた変異体を作成し、細胞膜発現とコアフコシル化の量の検出から、PD-1 発現に関与する残基を特定した。並びに、その残基が、蛍光顕微鏡を用いた共同研究の解析から PD-L1 との相互作用に重要な残基であることを明らかにすることができた。



次に、コアフコシル化阻害による PD-1 の発現低下は、マウス T 細胞でも、確認することができた。そして、この低下は、PD-1 がコアフコシル化を受けないことにより、細胞膜への移動性の低下、または、細胞膜での安定性の低下が原因となっていることが示唆された。

(3) コアフコシル化阻害による T 細胞の活性化

コアフコシル化を阻害することで、PD-1 の発現が低下することが明らかとなったことから、コアフコシル化の阻害は、PD-1/PD-L1 による抑制機構を回避することで、T 細胞の活性化を誘導できるかについて検証した。CRISPR-Cas9 を用いた Fut8 のノックアウト、またフコシル化阻害剤の処置した CD4 T 細胞において、アロジェネイックな抗原提示による in vitro での反応、また OVA 特異的 CD4 T 細胞を、OVA/CFA 免疫により in vivo で抗原刺激を行う反応のいずれにおいても、サイトカイン産生の増強が確認された。このことは、フコシル化の阻害は、PD-1 発現を低下するとともに、T 細胞の活性化を持続できることが明らかとなった。

(4)コアフコシル化阻害による腫瘍免疫応答の向上

腫瘍に浸潤したT細胞は、PD-1やTim-3を発現し、疲弊状態に陥る。この疲弊の遷移過程と、コアフコシル化の程度が相関することが明らかとなった。このことは、コアフコシル化が、PD-1発現とともに、T細胞の疲弊状態の制御に関わっている可能性を示唆している。

次に、フコシル化阻害剤を前処置したOVA抗原特異的CD8T細胞を用いて、B16-OVA移植マウスモデルの治療効果を検討した。その結果、フコシル化阻害剤を前処置した細胞移入群で、腫瘍増殖の抑制が認められた(図4)。また、腫瘍浸潤T細胞の解析から、フコシル化阻害剤を前処置することで、腫瘍中で、細胞が疲弊しない状態が続くことによると推測される、細胞数の増加と、炎症性サイトカイン産生の増強を認めることができた。

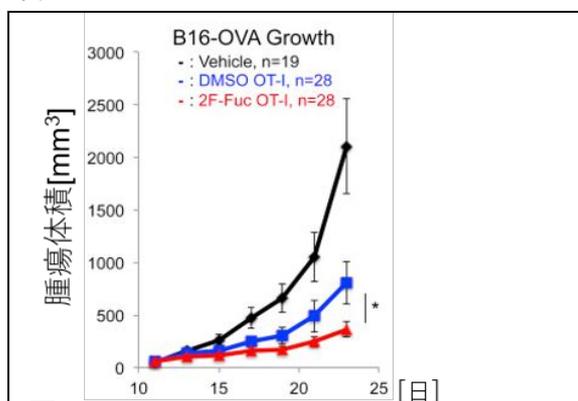


図4
フコシル化阻害剤処置したOVA抗原特異的なCD8T細胞移入による腫瘍増殖の抑制

以上より、PD-1は、コアフコシル化によって、細胞膜発現が亢進すること、またコアフコシル化を阻害することで、T細胞応答が増強し、T細胞移入療法といったがん免疫療法への応用が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Stabilization of Foxp3 expression by CRISPR-dCas9-based epigenome editing in mouse primary T cells.

Okada M, Kanamori M, Someya K, Nakatsukasa H, Yoshimura A.

Epigenetics Chromatin. 2017 May 8;10:24. doi: 10.1186/s13072-017-0129-1. eCollection 2017. 査読あり

2. Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells.

Okada M, Chikuma S, Kondo T, Hibino S, Machiyama H, Yokosuka T, Nakano M, Yoshimura A.

Cell Rep. 2017 Aug 1;20(5):1017-1028. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.027. 査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。