

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07257

研究課題名(和文) CD69-MyI9/12システムを標的とした新規がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of new cancer immunotherapy that targets the CD69-MyI9/12 system

研究代表者

那須 亮 (Nasu, Ryo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30466859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CD69-MyI9/12システムを標的とした新規がん免疫療法の開発を目指した。MyI12欠損大腸がん細胞の腫瘍形成能が低下していたことから、がん細胞由来MyI9/12による免疫逃避機構の存在が示唆された。その一方で、CD69欠損マウスでは腫瘍組織における細胞傷害活性を有する分化型CD8T細胞の割合が増えていた。従ってCD69-MyI9/12システムは、腫瘍内CD8T細胞の分化制御を介して腫瘍細胞の免疫逃避を促進する、全く新しいタイプの治療標的であることが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに抗腫瘍免疫応答への関与が着目されていなかったCD69-MyI9/12システムに焦点を当てている。MyI9/12は我々が独自に見出したCD69の機能的リガンドであり、国内外を通じて類似の研究はなく、独自の独創的な研究である。さらに、MyI9/12の放出はがん細胞自体に依存していると考えられるため、抗MyI9/12抗体投与は腫瘍組織を選択的に標的とする、副作用の少ない治療法になる可能性がある。今後、我々の知見からCD69-MyI9/12システムを標的とした新規がん免疫療法が開発され、がん治療に新しい局面が拓かれることを期待している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new cancer immunotherapy that targets the CD69-MyI9/12 system. MyI12-deficient cancer cells showed reduced tumorigenicity, suggesting an immune evasion by cancer cell-derived MyI9/12. On the other hand, CD69-deficient mice showed increased frequency of cytotoxic differentiated CD8T cells in the tumor microenvironment. Thus, the CD69-MyI9/12 system promotes cancer immune evasion by controlling differentiation of intratumoral CD8T cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん免疫 CD69 細胞傷害性T細胞 免疫チェックポイント阻害剤 免疫逃避機構

## 1. 研究開始当初の背景

がん/悪性腫瘍は本邦における死亡原因の第一位を占める疾患である。進行がんに対しては外科療法、放射線療法および化学療法を複数組合せた集学的治療が施行されるが、その効果は限定的である。

近年、第4のがん治療である免疫療法が有望視されている。なかでもT細胞の機能抑制にかかわる免疫チェックポイントであるB7/CTLA-4およびPD-1/PD-L1経路に対する阻害剤の有効性に注目が集まっている。特に抗PD-1抗体製剤は、2014年に認可されてから種々のがんへの適応が広がっている。しかし、劇的な効果を示す患者が認められる一方で、その奏効率は半数を割り込むため、抗PD-1抗体投与の効果を高める併用療法の開発が急務である。PD-1、PD-L1およびCTLA-4以外の免疫チェックポイント分子を標的とした治療法の実用化も進展しているが、本研究ではこれまでに抗腫瘍免疫応答への関与が着目されていなかったCD69-My19/12システムの解析を行った。既存および開発中の治療標的と異なりMy19/12の局在は腫瘍組織特異的と考えられるため、My19/12を標的とするがん免疫療法は副作用が少ないことが期待される。

## 2. 研究の目的

CD69はC型レクチンファミリーに属するII型の膜貫通型タンパク質である。T細胞およびB細胞を刺激すると数時間以内にCD69の発現レベル上昇が認められるため、リンパ球の活性化の指標として広く用いられている。我々はCD69欠損マウスが様々な免疫応答の異常を示すことを報告してきたが、その一方でMHCクラスI陽性がん細胞に対する抗腫瘍免疫応答が増強されていることを見出した。抗腫瘍免疫応答の中心的な役割を担う細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)は、MHCクラスIによって提示されたがん抗原を認識してがん細胞死を誘導する。しかし、腫瘍組織に集積しているCTLの多くは、慢性的な抗原の暴露により不活性化された疲弊状態に陥っていることが知られている。従って、腫瘍組織にはCTLの疲弊を促すCD69のリガンドが存在し、がん細胞の免疫回避に関与している可能性が考えられた。

我々はCD69の細胞外領域に結合するタンパク質を生化学的に解析し、Myosin light chain 9, 12Aおよび12B(My19/12)を新規機能リガンドとして同定した。さらにマウス大腸がんモデルを用いて、CD69とMy19/12との相互作用を阻害する抗My19/12抗体投与の影響を試した結果、抗PD-1抗体投与の効果を高める抗腫瘍効果を示した。

My19/12は通常細胞内に局在することから、CD69のリガンドとして機能するためには、細胞外に放出される必要がある。アレルギー性気道炎症モデルでは、My19/12が炎症に伴って血小板から放出されることを見出している。興味深いことに、腫瘍組織においてはがん細胞自体にMy19/12の発現が認められる。従って、CTLによって誘導された細胞死に伴い、がん細胞から放出されたMy19/12が近傍のCD69陽性CTLに結合し、その疲弊を促進するネガティブフィードバック機構の存在が考えられた。抗My19/12抗体投与は、このネガティブフィードバックループを遮断することにより、抗腫瘍免疫応答を促進している可能性がある。以上の知見を考慮すると、CD69-My19/12システムを標的とすることにより、腫瘍組織におけるCTLの疲弊を抑制する、新規がん免疫療法の実用化が期待された。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種がんに対する抗My19/12抗体と各種免疫チェックポイント阻害剤との併用の検討:

免疫チェックポイント阻害剤の適応が種々のがんへと広がっているため、各種臓器由来のがん細胞株(大腸がんCT26, 悪性黒色腫B16, 乳がん4T-1, B細胞リンパ腫A20, 神経膠腫GL261, その他)を移植した担がんマウスに対して、抗My19/12抗体および抗PD-1抗体の、単独および併用投与の効果を調べる。さらに、抗PD-1抗体と同じく免疫チェックポイント阻害剤である抗CTLA-4抗体および抗PD-L1抗体に対する、抗My19/12抗体の上乗せ効果も確認する。

### (2) My112遺伝子欠損CT26細胞の作製:

CRISPR/Cas9システムを用いてMy112遺伝子欠損をゲノム編集したCT26細胞を作製する(CT26ΔMy112)。CT26細胞とCT26ΔMy112細胞の*in vitro*における増殖速度を比較する。さらにCT26細胞およびCT26ΔMy112細胞を、野生型マウスおよび免疫不全マウスに移植した場合の腫瘍形成能を比較する。以上のデータを統合して、がん細胞由来My19/12の免疫原性に与える影響を評価する。

(3) 腫瘍組織における My19/12 の局在解析:

抗 My19/12 抗体の腫瘍組織における標的を調べるために、CT26 担がんマウスに対して蛍光標識した抗 My19/12 抗体を腹腔投与後に、組織切片を作製して My19/12 の局在を解析する。抗 PD-1 抗体投与の影響も確認する。CT26  $\Delta$  My112 細胞に対しても同様の実験を行い対照とする。

(4) CD69-My19/12 相互作用による CTL 疲弊促進の分子機構の解析:

CT26 担がんマウスに抗 My19/12 抗体および抗 PD-1 抗体の、単独および併用投与を行い、腫瘍浸潤 CTL の疲弊状態の解析を行う。CT26  $\Delta$  My112 細胞に対しても同様の実験を行い対照とする。

#### 4. 研究成果

マウス大腸がんモデルにおいて、抗 PD-1 抗体投与に対して上乗せ効果を示す治療標的を探索した結果、我々が同定した CD69 の新規機能リガンドである My19/12 に対する抗体の抗腫瘍効果を見出した。さらに、マウス扁平上皮がんモデルにおいては、抗 My19/12 抗体投与が抗 CTLA-4 抗体投与に対する上乗せ効果を示すことを明らかにした。がん細胞由来 My19/12 の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いて

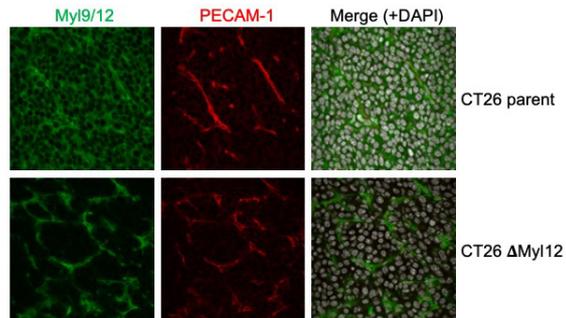


図1: CT26腫瘍の免疫組織化学 (PECAM-1染色は血管を示す)

My112 遺伝子欠損をゲノム編集したマウス大腸がん細胞株を作製した (図 1)。この細胞の *in vitro* における増殖能は維持されていたが、*in vivo* における増殖能が顕著に低下していたことから、CD69-My19/12 システムによる免疫逃避機構の存在が示唆された。My19/12 の放出はがん細胞自体に依存していると考えられるため、抗 My19/12 抗体投与は腫瘍組織を選択的に標的とする、副作用の少ない治療法になる可能性がある。

さらに、CD69-My19/12 システムによる細胞傷害性 T 細胞の制御機構を明らかにするために、腫瘍内 CD8T 細胞に着目した解析を行った結果、CD69 欠損 CD8T 細胞におけるエフェクター機能の亢進を見出した。さらに RNA-seq 解析を行った結果、エフェクター機能の亢進は転写レベルで制御されていることを明らかにした。CD69 欠損 CD8T 細胞では Granzyme B 発現細胞の割合が増加していたことから、CD8T 細胞の分化が促進されている可能性が考えられた (図 2)。従って、CD69-My19/12 システムは、腫瘍内 CD8T 細胞の分化抑制を介して腫瘍細胞の免疫逃避を促進する、全く新しいタイプの治療標的であることを明らかにした。

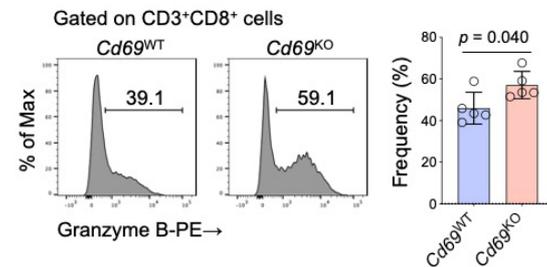


図2: CT26腫瘍内CD8T細胞のFACS解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hara A, Koyama-Nasu R, Takami M, Toyoda T, Aoki T, Ihara F, Kobayashi M, Hirono S, Matsutani T, Nakayama T, Iwadate Y, Motohashi S.	4. 巻 70
2. 論文標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell-based cancer immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02742-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki AS, Yagi R, Kimura MY, Iwamura C, Shinoda K, Onodera A, Hirahara K, Tumes DJ, Koyama-Nasu R, Iismaa SE, Graham RM, Motohashi S, Nakayama T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential Role for CD30-Transglutaminase 2 Axis in Memory Th1 and Th17 Cell Generation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kotaki R, Kawashima M, Yamaguchi A, Suzuki N, Koyama-Nasu R, Ogiya D, Okuyama K, Yamamoto Y, Takamatsu M, Kurosaki N, Ando K, Murata A, Ohtsuka M, Nakagawa S, Katagiri K, Kotani A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Overexpression of miR-669m inhibits erythroblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70442-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Aoki T, Takami M, Takatani T, Motoyoshi K, Ishii A, Hara A, Toyoda T, Okada R, Hino M, Koyama-Nasu R, Kiuchi M, Hirahara K, Kimura MY, Nakayama T, Shimojo N, Motohashi S.	4. 巻 111
2. 論文標題 Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2223 ~ 2233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura MY, Koyama-Nasu R, Yagi R, Nakayama T.	4. 巻 41(3)
2. 論文標題 A new therapeutic target: the CD69-Myl9 system in immune responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seminars in Immunopathology	6. 最初と最後の頁 349-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00281-019-00734-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Endo Y, Onodera A, Obata-Ninomiya K, Koyama-Nasu R, Asou HK, Ito T, Yamamoto T, Kanno T, Nakajima T, Ishiwata T, Kanuka H, Tumes DJ & Nakayama T	4. 巻 1
2. 論文標題 ACC1 determines memory potential of individual CD4+ T cells by regulating de novo fatty acid biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 261-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-018-0025-4	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 該当する

1. 著者名 Funato K, Hayashi T, Echizen K, Negishi L, Shimizu N, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Morishita Y, Tabar V, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N & Akiyama T.	4. 巻 19
2. 論文標題 SIRT2-mediated inactivation of p73 is required for glioblastoma tumorigenicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e45587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201745587	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 -

1. 著者名 Mita Y, Kimura MY, Hayashizaki K, Koyama-Nasu R, Ito T, Motohashi S, Okamoto Y & Nakayama T	4. 巻 30
2. 論文標題 Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 559-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy050	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hara, A., Nasu, R., Takami, M., Hirono, S., Matsutani, T., Nakayama, T., Iwadate, Y., Motohashi, S.
2. 発表標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell- based cancer immunotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, A., Nasu, R., Takami, M., Hirono, S., Matsutani, T., Nakayama, T., Iwadate, Y., Motohashi, S.
2. 発表標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell- based cancer immunotherapy
3. 学会等名 EMBO workshop CD1-MR1
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村元子、那須亮、三田恭義、中山俊憲
2. 発表標題 がん免疫療法の新たなターゲットとしてのCD69の可能性
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須亮、遠藤祐介、伊藤俊広、木村元子、中山俊憲
2. 発表標題 Inhibition of acetyl-CoA carboxylase enhances memory Th2 cell generation and Th2 mediated anti-tumor immunity
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 彩佳、那須 亮、高見 真理子、廣野 誠一郎、松谷 智郎、中山 俊憲、岩立 康男、本橋 新一郎
2. 発表標題 膠芽腫に発現するCD1d分子はNKT細胞を用いた免疫療法における有望な標的となる
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mita Y, Kimura M, Nasu R, Motohashi S, Okamoto Y & Nakayama T
2. 発表標題 Crucial role for CD69 in anti-tumor immunity
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ito T, Hirahara K, Nasu R, Yano I, Motohashi S & Nakayama T
2. 発表標題 Anti-tumor immunity via the superoxide-eosinophil axis induced by lipophilic component of Mycobacterium lipomannan
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三田 恭義, 木村 元子, 那須 亮, 本橋新一郎, 岡本 美孝, 中山 俊憲
2. 発表標題 CD69による抗腫瘍免疫制御
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 俊広, 平原 潔, 那須 亮, 小野寺 淳, 矢野 郁也, 本橋新一郎, 中山 俊憲
2. 発表標題 好酸球およびエフェクター記憶 Th2 細胞の活性化によるMycobacterium lipomannanの抗腫瘍免疫
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学HP <a href="https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/jisseki/index.html">https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/jisseki/index.html</a> 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 <a href="https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/">https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/</a>
---

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
研究分担者	岩立 康男  (Iwadate Yasuo)  (70272309)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	
研究分担者	本橋 新一郎  (Motohashi Shinichiro)  (60345022)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------