

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22533

研究課題名（和文）RNA結合分子HuRを基盤とした新たな免疫チェックポイント分子の探索

研究課題名（英文）Searching for immune checkpoint molecules regulated by an RNA-binding protein HuR

研究代表者

河合 太郎（KAWAI, TARO）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：50456935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞の持つ免疫逃避機構に着目し、免疫抑制的に働く新たな遺伝子の探索とその作用機序の解明を目的に解析を行った。mRNA安定化に寄与するHuRを欠損させたLLC細胞（マウス肺がん細胞）を移植したマウスでは、対照LLC細胞と比べキラーT細胞の腫瘍組織内浸潤が有意に増加するとともに腫瘍体積が減少することを見出した。そこで、HuR標的遺伝子を探索したところケモカインCCL2を得た。CCL2欠損によりがん組織の成長抑制が見られるとともに、がん組織内でのマクロファージの減少とキラーT細胞増加が認められたことから、LLC細胞はHuRを介してCCL2発現を増加させ免疫監視を逃避してい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

今回、がんによる免疫逃避機構の一つとしてHuRを介したCCL2発現誘導が存在することが示唆された。本研究は抗腫瘍免疫応答の分子機構の一つを明らかにしたという学術的意義にとどまらず、HuRやCCL2が新たな免疫チェックポイント阻害剤の標的となり得ることを示唆している点で大きな社会的意義もある。

研究成果の概要（英文）：We focused on the immune evasion mechanism of cancer cells to search for new genes and to elucidate their mechanisms of action. We found that the infiltration of killer T cells into the tumor tissue was significantly increased and the tumor volume was decreased in mice transplanted with LLC cells lacking HuR, a mRNA-binding protein that meditates its stability. By searching for HuR-target genes, we identified a chemokine CCL2. The lack of CCL2 suppressed the growth of tumor volume, and decreased macrophages and increased killer T cells in the tumor tissues, suggesting that LLC cells evade immune surveillance by increasing CCL2 expression via HuR.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 腫瘍 樹状細胞 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は免疫系で認識され排除される一方、免疫細胞の腫瘍内浸潤や活性化を抑制する免疫抑制機構を複数備え免疫系からの攻撃を回避している。主なものとして、PD-1 や CTLA4 といった「免疫チェックポイント分子」や「制御(抑制)性細胞のリクルート」が挙げられ、いずれも免疫細胞との相互作用によって免疫抑制的な効果を付与している。この免疫細胞による「監視・攻撃」とがん細胞の「免疫逃避」の均衡がどちらに傾くかによって腫瘍が排除に進むか悪性化に進むかが決まると考えられているが、その仕組みについては明らかになっていない点も多く、抗 PD-1 抗体に続く新たな抗腫瘍薬の開発も必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の持つ免疫逃避機構に着目し、免疫抑制的に働く新たな遺伝子の探索とその作用機序の解明を目的とする。我々は、Hu antigen R (HuR; 別名 ELAV1) と呼ばれる RNA 結合タンパク質を欠損させた LLC 細胞(マウス肺がん細胞)を移植したマウスでは、対照 LLC 細胞と比べ、腫瘍排除に中心的役割を果たすキラーT細胞や樹状細胞の腫瘍組織内浸潤が有意に増加するとともに腫瘍体積が減少する知見を独自に得ている。したがって、HuR は LLC 腫瘍における免疫抑制制御に関連する分子であると考えられる。HuR は mRNA の 3' 末端非翻訳領域に結合するタンパク質であり、mRNA に結合することでエキソヌクレアーゼによる分解から保護し、mRNA の安定化に寄与すると報告されている。また、肺がん、胃がんおよび大腸がんなどの様々ながん腫で、HuR の発現量が顕著に増加しており、HuR の発現量の増加はがんの悪性度やがん患者の生存率に相関している。したがって、HuR により発現が制御される遺伝子の中には、免疫抑制に関与する分子が含まれていると考えられる。そこで、本研究では、HuR 欠損細胞で発現が減少している遺伝子群の中から免疫抑制に関わると予想される細胞表面分子やサイトカイン類を抽出し、それらを個々にノックアウトした LLC 細胞を樹立し、マウスへと移植することで、その後の腫瘍免疫誘導を検討する。腫瘍免疫活性化が認められた場合、該当分子に対する中和抗体の作成も視野に入れ、これが新たなチェックポイント阻害剤として機能するか検討を行い、腫瘍に対する新たな治療アプローチへと繋げることを目指す。

3. 研究の方法

野生型 LLC 細胞と自ら樹立した HuR 欠損 LLC 細胞の間で発現遺伝子の網羅的解析を行い HuR 欠損細胞で発現が有意に減少あるいは増加している遺伝子群の抽出を行った結果、単球の遊走に関与するケモカインである CCL2 や CXCL1、細胞外マトリックスの分解酵素である MMP3 や EFEMP1、細胞接着に関与する CDH2 (カドヘリン)、サイトカインである TGF- β 1 の発現が HuR KO LLC で有意に低下していることを見出した。そこで本研究では、これら因子を欠損した LLC 細胞を樹立を行った。樹立した遺伝子欠損 LLC 細胞をマウスに移植し、その後がん組織体積の計測や組織内に浸潤する免疫細胞の FACS 解析を行い、抗腫瘍免疫応答への寄与を検討した。また、得られた分子が実際に HuR により発現制御を受けるかについて HuR 結合モチーフの探索を行った。

4. 研究成果

樹立した HuR KO LLC 細胞を C57/BL6 マウスに移植後のがん組織の体積を計測したところ、HuR KO LLC 細胞ではがん組織の増殖が野生型細胞と比べ抑制されていた(図1)。そこで、両細胞間で発現量に差のある遺伝子を網羅的に解析したところ、EFEMP1、MMP3、CCL2、CSCL1、TGF- β 1 といった免疫抑制に関連する遺伝子群が KO 細胞で有意に低下していることを見出した(図2)。また、これら遺伝子の 3' -UTR には HuR の結合が予想される配列が含まれており、ここに HuR が結合することで標的遺伝子の mRNA 安定性を上げている可能性が考えられた(図3)。

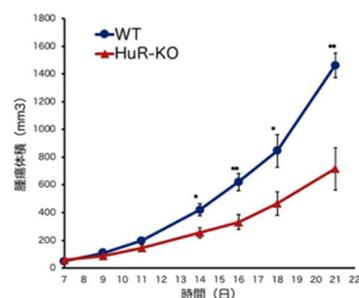


図1

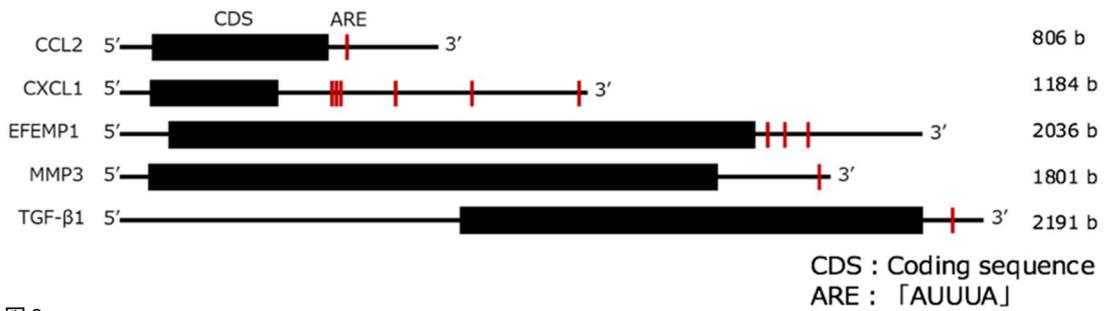
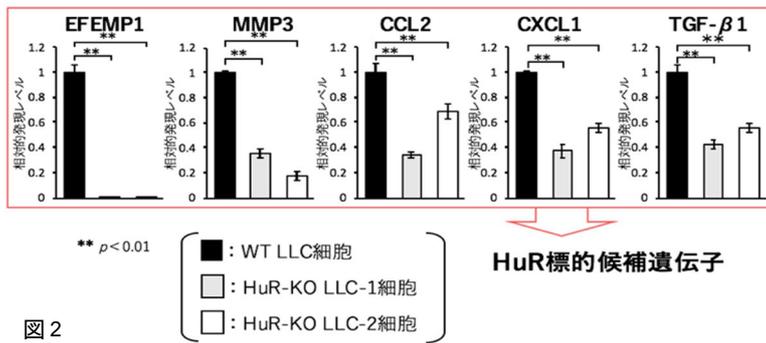


図3

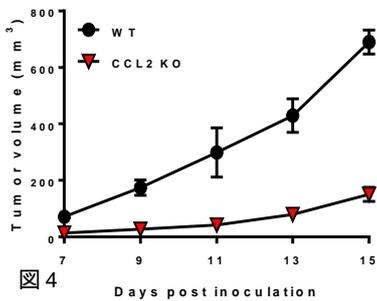


図4

次に、MMP3 及び CCL2 に着目し、それぞれの KO LLC 細胞の樹立を行った。これら細胞をマウスに移植しがん組織の大きさを計測したところ、MMP3 KO 細胞では、野生型と有意な差は認められなかった一方、CCL2 KO 細胞では有意に減少していた (図 4)。CCL2 は単球やマクロファージの遊走に関するケモカインとして知られている。また、がんにおいては腫瘍随伴マクロファージと呼ばれるがん進展に寄与するマクロファージの遊走に関わることも示唆されている。そこで、がん組織内に存在する免疫細胞の FACS 解析を行った結果、CCL2 KO によりマク

ロファージの浸潤が抑制された (図 5)。したがって、このマクロファージの減少により CCL2 KO 細胞ではがん組織の成長抑制が誘導されると示唆された。そこで、CCL2 KO 細胞と野生型細胞を移植後のがん組織内に浸潤する細胞障害性 T 細胞 (CD8⁺ T cell) の割合を計測したところ、CCL2 KO 細胞を移植後のがん組織内では野生型細胞移植時と比較して有意に増加していた (図 6)。

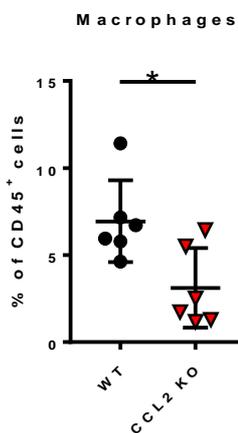


図5

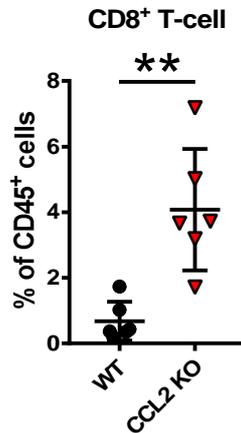


図6

以上の結果より、HuR は CCL2 mRNA の安定化を通して CCL2 発現を正に制御している可能性が示唆された。さらに、CCL2 欠損によりがん組織の成長抑制が見られるとともに、マクロファージのがん組織内への浸潤が減少していたことから、LLC 細胞は HuR を介して CCL2 産生を増加させ、その結果腫瘍随伴マクロファージの誘導促進することで細胞障害性 T 細胞からの排除を抑制していることが考えられた。今後は、CCL2 阻害抗体等を用いることで、抗腫瘍免疫応答を増加することができるか検討していく必要がある。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zainol MIB, Kawasaki T, Monwan W, Murase M, Sueyoshi T, Kawai T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Innate immune responses through Toll-like receptor 3 require human-antigen-R-mediated Atp6v0d2 mRNA stabilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20406-20406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56914-w	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 Monwan W, Kawasaki T, Hasan MZ, Ori D, Kawai T.	4. 巻 521
2. 論文標題 Identification of nucleoporin 93 (Nup93) that mediates antiviral innate immune responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1077-1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.035.	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 Soponpong S, Amparyup P, Kawai T, Tassanakajon A.	4. 巻 10
2. 論文標題 A Cytosolic Sensor, PmDDX41, Binds Double Stranded-DNA and Triggers the Activation of an Innate Antiviral Response in the Shrimp Penaeus monodon via the STING-Dependent Signaling Pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 2069-2069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.02069. eCollection 2019.	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 Jaree P, Kawai T, Lo CF, Tassanakajon A, Somboonwivat K.	4. 巻 93
2. 論文標題 Genome organization and definition of the Penaeus monodon viral responsive protein 15 (PmVRP15) promoter.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish Shellfish Immunol.	6. 最初と最後の頁 997-1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsi.2019.08.026.	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 Nnhhkorn Z, Amparyup P, Kawai T, Tassanakajon A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Penaeus monodon IKKs Participate in Regulation of Cytokine-Like System and Antiviral Responses of Innate Immune System.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1430-1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01430.	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 Dewi Pamungkas Putri D, Kawasaki T, Murase M, Sueyoshi T, Deguchi T, Ori D, Suetsugu S, Kawai T.	4. 巻 294
2. 論文標題 PtdIns3P phosphatases MTMR3 and MTMR4 negatively regulate innate immune responses to DNA through modulating STING trafficking.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 8412-8423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005731.	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 Momota M, Nagayama M, Okude H, Ishii KJ, Ori D, Kawasaki T, Kawai T.	4. 巻 530
2. 論文標題 The Ca ²⁺ -dependent pathway contributes to changes in the subcellular localization and extracellular release of interleukin-33	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 699-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.127.	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 Okude H, Ori D, Kawai T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 625833-625833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.625833.	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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kawai T, Kawasaki T
2. 発表標題 Local expansion of CD8+ T cells by tissue resident macrophages in the lung
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawai T
2. 発表標題 The role of innate immune signaling pathways in induction of anti-cancer immunity
3. 学会等名 The 6th ICPAPS-The 3rd ASEAN PharmNET 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合太郎
2. 発表標題 自然免疫による病原体や内在性因子の認識と炎症制御のメカニズムについて
3. 学会等名 免疫サマースクール2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加納規資、織大祐、河合太郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 252
3. 書名 免疫・炎症病態 × 治療Update	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------