

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02756

研究課題名（和文）エンハンサーによる多次元制御能を標的としたCTL賦活化リプログラミング

研究課題名（英文）Reprogramming of exhausted CTL by targeting enhancers with multi-dimensional regulatory activities

研究代表者

関谷 高史（Sekiya, Takashi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・免疫応答修飾研究室長

研究者番号：80519207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、エピジェネティック変化による、疲弊化CTL賦活化リプログラミング法の開発を目指し、まず、疲弊化CTLと活性化CTLの転写制御領域gRNAライブラリの作製を行った。さらに、疲弊化CTLレポーター細胞株を作製し、これらgRNAライブラリとレポーター細胞株を用い、疲弊化CTLを賦活化する遺伝子領域、エピジェネティック操作のスクリーニングを行った。その結果、疲弊化CTLでPD-1の発現低下を導く遺伝子領域、エピジェネティック操作を明らかとした。遺伝子発現解析の結果、当該エピジェネティック操作は疲弊化CTLを活性化CD8T細胞に近い性質を持つ細胞にリプログラミングす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

抗腫瘍免疫の賦活化は、様々な進行癌の治療を可能としたが、細胞傷害性T細胞(CTL)の疲弊化が引き起こされるメカニズムの理解や、疲弊化CTLの賦活化を誘導する手法の開発は、重要な研究課題であった。本研究で開発した「転写制御領域gRNAライブラリ」によるスクリーニングでは、既知の領域ではあったが、疲弊化CTLの賦活化を導く遺伝子領域、エピジェネティック操作法を見出すことに成功した。このことは、さらなるライブラリのスケールアップ及びスクリーニングの継続で、新規遺伝子領域およびエピジェネティック操作法を見出せる可能性を示しており、また、様々な細胞リプログラミングの試みに手掛かりを与えると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a reprogramming method for activating exhausted CTLs by epigenetic modification, and first created a gRNA library for the transcriptional control region of exhausted CTLs and activated CTLs. Furthermore, we created exhausted CTL reporter cell lines and used these gRNA libraries and reporter cell lines to screen for gene regions and epigenetic manipulations that activate exhausted CTL. As a result, we identified the genetic region and epigenetic manipulation that lead to decreased expression of PD-1 in exhausted CTLs. Gene expression analysis confirmed that the epigenetic manipulation reprograms exhausted CTLs into cells with properties similar to activated CD8T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 抗腫瘍免疫 細胞リプログラミング エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1/PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体に代表される「免疫チェックポイント阻害剤(immune checkpoint blockade; ICB)」による抗腫瘍免疫の賦活化は、様々な進行癌の治療を可能としたが、一方で奏効率や、対象となる癌種は依然限られていた。従って、腫瘍組織で細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の疲弊化が誘導されるメカニズムのさらなる理解や、疲弊化 CTL の賦活化を高効率かつ持続的に誘導する新規手法の開発は重要な課題であった。一方、CTL に疲弊化が誘導されるメカニズムの一つとして、エピジェネティックレベルでの様々な違いが活性化 CTL と疲弊化 CTL の間で確認されていた。さらに、このエピジェネティックレベルでの障壁が、ICB の効果を低減させている重要な原因の一つであることが示されていたうえ、ICB により賦活化を受けた CTL においてすら、エピジェネティックレベルでの変化は乏しいことも確認されていた。以上、CTL の疲弊化において、エピジェネティック変化は最も重要なファクターの一つであることが示されていた。一方、抗腫瘍免疫の賦活化を目指した、疲弊化 CTL リプログラミングの試みは盛んに行われており、その重要さが示されていた。

2. 研究の目的

CTL の疲弊化が引き起こされるメカニズムのさらなる理解や、疲弊化 CTL の賦活化リプログラミングを高効率かつ持続的に誘導する新規手法の開発は重要な課題である。本研究は、疲弊化 CTL の賦活化リプログラミングの原動力としてエピジェネティック変化に活路を求め、エピジェネティック変化による、疲弊化 CTL 賦活化リプログラミング法の開発 賦活化リプログラミングの分子メカニズムの解明 を目指し、さらに エピジェネティック変化による疲弊化 CTL 賦活化リプログラミングの、新たな抗腫瘍免疫賦活化法としての可能性の追求を行う。

3. 研究の方法

疲弊化 CTL と活性化 CTL の転写制御領域 guide RNA (gRNA) ライブラリの作製

申請者は、転写制御領域をエンハンサーも含めて網羅し、かつ任意の細胞種に応用が可能な、gRNA ライブラリの安価かつ簡便な構築法を確立した。このライブラリ構築法は、プロモーターやエンハンサー領域がヌクレアーゼに高感受性を示すことが着眼点となっており、ゲノムの DNaseI 高感受性部位を抽出し、アダプターを付加したセミランダムプライマーを用いた PCR により、PAM 配列を含む部位を選択的に増幅した後、EcoP15I と MlyI による制限酵素処理を行った断片を、U6 プロモーターと gRNA scaffold の間にクローニングするものである。この手法で、疲弊化 CTL および活性化 CTL の転写制御領域 gRNA ライブラリを作製し、本研究に供する。

疲弊化 CTL に賦活化リプログラミングを導くエピジェネティック操作法の開発

上記の通り作製した gRNA ライブラリと、ヌクレアーゼ活性欠失変異体 Cas9(dCas9) と転写不活性化ドメイン KRAB の融合分子(CRISPRi), dCas9 と転写活性化ドメイン VPR との融合分子(CRISPRa)を用い、疲弊化 CTL に賦活化リプログラミングを導く gRNA のスクリーニングを、申請者が先行研究で作製した 2 種類のレポーター細胞株を用いて行う。片方のレポーター細胞株は、マウス T リンパ腫細胞株・EL4 の *IL2* 遺伝子座に GFP をノックインしたものであり、もう一方は、*Ifng*-GFP レポーターマウスから取得したプライマリ疲弊化 CTL と、BW5147 マウス T リンパ腫細胞株のハイブリドーマである。これらのレポーター細胞株に CRISPRi もしくは CRISPRa と gRNA ライブラリを導入し、in vitro で培養後、PD-1 発現の減少と *IL2*-GFP や *Ifng*-GFP レポーター発現を誘導する gRNA を探索する。CRISPRa 導入細胞には活性化 CTL 由来ライブラリ、

CRISPRi 導入細胞には疲弊化 CTL 由来ライブラリを導入することで、それぞれ、疲弊化 CTL で抑制されているクロマチン部位の活性化と、活性亢進しているクロマチン部位の抑制を試みる。スクリーニング陽性の gRNA に関しては、プライマリ疲弊化 CTL を用いて検証実験を行う。

エピジェネティック操作による賦活化リプログラミングの分子メカニズムの検討

上記の研究で賦活化を導いたエピジェネティック操作が、疲弊化 CTL に引き起こした分子イベントの解明を試みる。エピジェネティック操作前後の細胞で、RNA-seq による遺伝子発現解析と、ChIP-seq によるヒストン修飾の解析を経時的に行う。これらの結果を統合的に解析することで、gRNA 標的部位のエピジェネティック操作が、一次的、二次的にどのようなクロマチン変化や遺伝子発現変化を誘導し、賦活化リプログラミングを導いたのか検討する。

エピジェネティック改変の、新たな抗腫瘍免疫賦活化法としての可能性の追求

まず、担癌マウスの腫瘍組織から単離した疲弊化 CTL に対し、上記の研究で賦活化を導いたエピジェネティック操作を施す。この細胞を別の担癌マウスに移入し、腫瘍サイズの増加や転移に及ぼす影響を検討する。抗腫瘍免疫の強さや持続性に関し、既存の ICB との比較を行い、また、ICB との相乗効果も検討する。次に、上記の研究で見出された標的クロマチン部位に対し、ヒトゲノム上で対応する部位をサーチする。対応部位が存在した場合は、ヒト活性化 CTL と疲弊化 CTL におけるエピジェネティック状態を、パブリックデータのマイニングにより解析する。この検討で著明な差を示したクロマチン部位に対しては、ヒト疲弊化 CTL を用いた実験を行い、遺伝子発現レベルおよび機能レベルで賦活化リプログラミングを検討する。

4. 研究成果

複数種類の T 細胞に対し、ヌクレアーゼ高感受性ゲノム領域 gRNA ライブラリを作製した。まず、スクリーニングに用いる gRNA ライブラリを、疲弊化 CD8T 細胞、活性化 CD8T 細胞、ナイーブ CD8T 細胞、制御性 T 細胞 (Treg)、Th1 細胞から取得したヌクレアーゼ高感受性ゲノム領域 DNA に対して gRNA ライブラリの作製を行った。作製したライブラリを NGS 解析した結果、それぞれ数百万から数千万ヶ所を網羅していることが確認されたうえ、大部分のクローンは 19 nt であることが確認された。

疲弊化 CTL レポーター細胞株、Treg レポーター細胞株をそれぞれ新たに 6 種類ずつ作製した。

まず、疲弊化 CTL レポーター細胞株として、当初スクリーニングに用いる予定であった EL4-IL2-GFP 細胞株は、gRNA ライブラリを構成するレトロウイルスベクターの感染効率が非常に低いことが判明したため、レトロウイルス感染効率が高いことを確認している BW5147 細胞をベースにしたレポーター細胞株の構築を行った。BW5147 も EL-4 と同じく疲弊化マーカー分子の高発現を示す。レポーター細胞株の作製は CRISPR/Cas9 システムを用いて行い、相同組み換えにより IL2 遺伝子座に GFP 分子、Rosa26 遺伝子座にヌクレアーゼ活性欠損 Cas9(dCas9)とクロマチン活性化ドメイン VPR もしくはクロマチン不活性化ドメイン KRAB の融合分子を導入した BW5147 細胞株を作製した。また、Foxp3 遺伝子座にハイグロマイシン耐性遺伝子と GFP を挿入した Treg レポーター細胞株も同様の手法で作製した。一方、プライマリー細胞側のエピジェネティック状態の改変を試みるために、各種レポーターマウスと CRISPR-KI, CRISPRi, CRISPRa マウスを交配したマウスから取得した疲弊化 CTL および Th1 細胞と、BW5147 の融合

細胞を PEG 法により作製した。その結果、IFN γ -GFP-CRISPR-KI, -CRISPRi, -CRISPRa 疲弊化 CTL と BW5147 の融合細胞、Foxp3-KI-CRISPR-KI, -CRISPRi, -CRISPRa Th1 細胞と BW5147 の融合細胞が作製された。

上記作製したレポーター細胞株と gRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。上記で作製した gRNA ライブラリーとで作製したレポーター細胞株を用い、IL-2 と IFN α の発現誘導を指標とした疲弊化 CTL を賦活化するエピジェネティック操作と、Foxp3 の発現誘導を指標にした、Th1 細胞から Treg を誘導するエピジェネティック操作の探索を行った。スクリーニング操作は、疲弊化 CTL レポーター細胞、Th1 レポーター細胞からそれぞれ PD-1 発現低下細胞、Foxp3 発現亢進細胞をソーティングにより取得した後、細胞からライブラリーを回収し、2 次ライブラリーを構築するというステップを 3 回繰り返した。このステップを経たライブラリー（4 次ライブラリー）は、1 次ライブラリーと比較し、PD-1 発現や Foxp3 発現亢進に寄与する効率が著明に著明に亢進しており、目的のエピジェネティック変化を引き起こすクローンが著明に濃縮されている可能性を強く示唆する結果が得られた。さらに、ライブラリーの gRNA 遺伝子を NGS 解析した結果、疲弊化 CTL、Th1 細胞リプログラミング操作の両方で、インプットよりも有意に存在割合の高い gRNA 配列が複数確認された（表 1）。

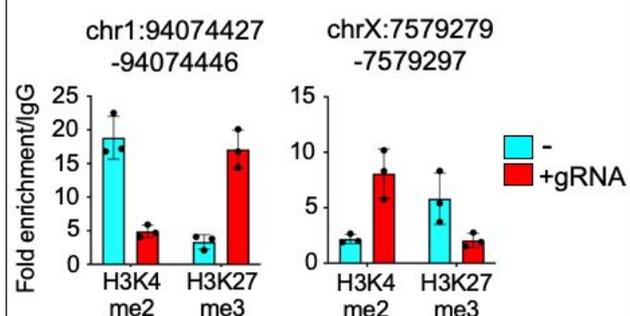
表1: スクリーニング陽性となったgRNAとエピジェネティック操作

	レポーター細胞	遺伝子座	gRNA配列	最近傍遺伝子
疲弊化CTLの賦活化	CRISPRi	chr1:94074427-94074446	CCAAAACCCAGGAGGACATC	<i>Pdcd1</i>
	CRISPRi	chr2:120027671-120027689	GCCGCTGTGCACGCCCTCG	<i>Arsb</i>
	CRISPRa	chr9:118489710-118489728	CTGCCTAAAATAAACAGCT	<i>Gm33460</i>
	CRISPRi	chr10:43901645-43901663	GGAGTCAGCCGGTAGCACC	<i>Qrsl1</i>
	CRISPRa	chr10:91082921-91082939	TCTACGCGCCTCTCCGCAA	<i>Ikbp</i>
	CRISPRa	chr13:31801330-31801348	CACCTCCGCGTTGCCTCTG	<i>Foxc1</i>
	CRISPRi	chr17:29490985-29491003	TCGTCCTCCGACTCGCCCT	<i>Pim1</i>
Th1→Treg リプログラミング	CRISPRi	chr2:120027671-120027689	CACAAAACCTGTGTGGCCAC	<i>Jmjd7</i>
	CRISPRa	chr4:136285888-136285906	CCTGCTCTGGCTGCTAAG	<i>Zfp46</i>
	CRISPRa	chr15:80219691-80219709	CAGGAGACCTCGATGCCTT	<i>Mgat3</i>
	CRISPRa	chrX:7579279-7579297	AAATCACAAAGGCATCCCG	<i>Foxp3</i>

疲弊化 CTL や Th1 細胞のフェノタイプに寄与しているクロマチン領域の制御により、プライマリーT 細胞の部分的なリプログラミングに成功した

上記のスクリーニングにより見出された、疲弊化 CTL における PD-1 発現誘導や Th1 細胞での Foxp3 発現抑制に寄与しているクロマチン候補領域（表 1）に対し、当該 gRNA に加え、周囲配列の gRNA をそれぞれ 3 種類ずつ作製し、レポーター細胞に導入し、その作用を検討した。その結果、chr1:94074427-94074446 gRNA および周囲配列の gRNA の CRISPRi レポーター・疲弊化 CTL 細胞への導入は PD-1 発現の抑制を導き、一方、chrX:7579279-7579297 gRNA および周囲配列の gRNA の

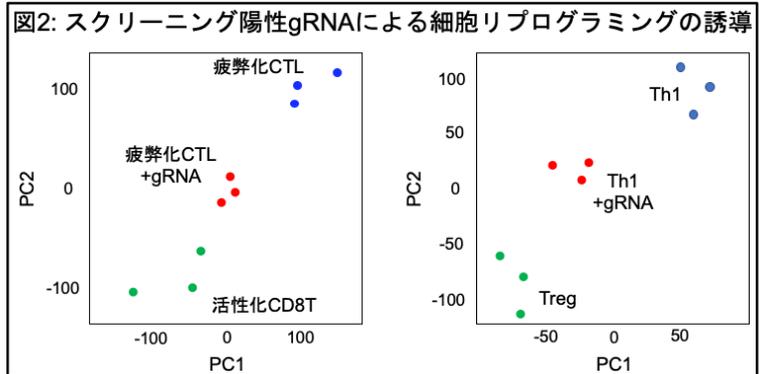
図1: スクリーニング陽性gRNAによるエピジェネティック変化の誘導



CRISPRa レポーターTh1 細胞への導入は Foxp3 発現の誘導を導いた。続いて、クロマチン免疫沈降法により、gRNA を導入したレポーター細胞の標的部位のヒストン修飾状態を解析した。その結果、chr1:94074427-94074446 および周辺配列の gRNA を導入した CRISPRi レポーター細胞では、標的部位周囲に特異的に、不活性化型ヒストン修飾 H3K27me3 の亢進および活性化型ヒストン修飾 H3K4me2 の減弱が確認された（図 1）。一方、chrX:7579279-7579297 gRNA および周辺配列を導入した CRISPRa レポーターTh1 細胞では、標的部位周囲に特異的に、活性化型ヒストン修飾 H3K4me2 の亢進および不活性化型ヒストン修飾 H3K27me3 の減弱が確認された（図 1）

さらに、疲弊化 CTL, 活性化 CD8T 細胞、chr1:94074427-94074446 gRNA を導入した CRISPRi レポーター・疲弊化 CTL, Th1, Treg, chrX:7579279-7579297 gRNA および周辺配列を導入した CRISPRa レポーターTh1 細胞

の、以上 6 種類の細胞に対し RNA-seq 解析を行ったところ、主成分分析により、chr1:94074427-94074446 gRNA を導入した CRISPRi レポーター・疲弊化 CTL は疲弊化 CTL よりも活性化 CD8T 細胞に近い遺



伝子発現パターンを示し、また、chrX:7579279-7579297 gRNA および周辺配列を導入した CRISPRa レポーターTh1 細胞は Th1 よりも Treg に近い遺伝子発現パターンを持つことが明らかとなった(図 2)。以上の結果から、疲弊化 CTL の賦活化、炎症性 Th1 細胞から Treg へのリプログラミングを部分的に誘導するエピジェネティック操作を、共に 1 種類ずつであるが明らかとした。chr1:94074427-94074446, chrX:7579279-7579297 は、それぞれ PD-1, Foxp3 遺伝子座に局在するため、予想し得る結果と言えるが、ライブラリーのスケールアップをすることで、新たな制御部位を同定することは可能であると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenta Iwasaki, Toshihide Tomosugi, Takashi Sekiya, Shintaro Sakamoto, Yuko Miwa, Manabu Okada, Takahisa Hiramitsu, Norihiko Goto, Shunji Narumi, Yoshihiko Watarai, Mai Okumura, Satoshi Ashimine, Kohei Ishiyama, Ezzelarab Mohamed B., Takaaki Kobayashi	4. 巻 107
2. 論文標題 Estimation of Sensitization Status in Renal Transplant Recipients by Assessing Indirect Pathway CD4+ T Cell Response to Donor Cell-pulsed Dendritic Cell	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000004491	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 Sekiya Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison Between Nr4a Transcription Factor Regulation and Function in Lymphoid and Tumor Treg Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.866339	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 Sekiya Takashi, Kasahara Hidenori, Takemura Ryo, Fujita Shinya, Kato Jun, Doki Noriko, Katayama Yuta, Ozawa Yukiyasu, Takada Satoru, Eto Tetsuya, Fukuda Takahiro, Ichinohe Tatsuo, Takanashi Minoko, Onizuka Makoto, Atsuta Yoshiko, Okamoto Shinichiro, Yoshimura Akihiko, Takaki Satoshi, Mori Takehiko	4. 巻 208
2. 論文標題 Essential Roles of the Transcription Factor NR4A1 in Regulatory T Cell Differentiation under the Influence of Immunosuppressants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2122 ~ 2130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100808	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 Sekiya Takashi, Hidano Shinya, Takaki Satoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Tonic TCR and IL-1 signaling mediate phenotypic alterations of naive CD4+ T cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113954 ~ 113954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.113954	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関谷 高史
2. 発表標題 Tonic TCR and IL-1b signaling mediate momentary and durable phenotypic alterations in naive CD4+ T cells
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関谷 高史
2. 発表標題 免疫抑制剤存在下でのTreg分化における転写因子NR4A1の役割
3. 学会等名 第20回 日本免疫治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関谷 高史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Nr4a1によるTh/Tregのバランス制御と炎症性疾患	

〔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
---------	---------