

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15227

研究課題名(和文) 斬新な抗腫瘍免疫活性化法の開発

研究課題名(英文) Development of a new strategy for tumor immunity activation

研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI, Kazuhiko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織にはがん抗原を認識する細胞障害性T細胞が浸潤するものの、ほとんどは疲弊(exhaustion)し、有効な殺細胞機能を発現しない。さらに、抑制性T細胞や抑制性ミエロイド細胞が誘導され腫瘍組織に浸潤することで腫瘍免疫が無効化される。本研究では、細胞障害性T細胞機能をおさえ、抑制性T細胞分化を促進する転写因子Bach2に着目し、Bach2を阻害することで腫瘍免疫を活性化するという斬新な治療戦略を開発することを目指した。Bach2欠損T細胞では細胞傷害性T細胞の応答が増強していること、細胞傷害性に関わる多数の遺伝子の発現がより上昇、あるいは早期に上昇することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxic T cells play critical roles in eliminating tumor cells with tumor-specific antigens. Although this tumor surveillance is effective during initial phases of tumorigenesis, it eventually fails to restrict tumor progression due to exhaustion of cytotoxic T cells. In addition, regulatory T cells and suppressor myeloid cells also inhibit the cytotoxic T cell activities. Based on our previous findings that the transcription factor Bach2 is essential for the differentiation of regulatory T cells, restricting cytotoxic T cell differentiation, this study was carried out to understand potential roles of Bach2 in the process of the T cell exhaustion and to develop a new strategy to activate tumor immunity. We found that Bach2-deficient T cells showed enhanced cytotoxic T cell differentiation and activity in vitro. Furthermore, many of the genes involved in T cell activation and cytotoxic activity were more highly expressed in Bach2-deficient T cells than in wild-type cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍免疫 Tリンパ球 Bach2 疲弊

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍免疫制御に関わる分子の実体の一端が解明されたことを受け、腫瘍免疫活性化へ向けた取り組みや成果の実用化が進んでいる。特に、免疫系細胞表面に発現する抑制性受容体やそのリガンドに対する抗体を用いた治療は、着実に成果をあげつつある。例えば、本庶博士らが発見した膜貫通型抑制性受容体 PD-1 は、そのシグナルをおさえることで免疫を活性化することが可能であり、この事実は例えばそのリガンドである PD-L1 に対する抗体を用いた免疫活性化療法へと展開しつつある(1; 引用は次頁にまとめる)。また、抗 CTLA-4 抗体の有効性も臨床試験で示されている(1)。しかし、これら抗体医薬の実用化にあたっては、薬価が極めて高価となること、癌種によって効果に差があることなどが、大きな問題となっていくと予想される。さらに多様な腫瘍免疫活性化法を開発していく必要がある。

申請者らは、転写因子 Bach2 が抑制性 T 細胞分化に必須であることを国際共同研究により発見し(Nature 2013,)、さらに最近、Bach2 が細胞障害性 T 細胞の疲弊(exhaustion)を引き起こすことを見いだした。この異常を腫瘍免疫活性化戦略へと発展させることの妥当性を、メラノーマ細胞移植実験により検証した。その結果、Bach2 ノックアウトマウスでは、より多くの細胞障害性 T 細胞(CD8 陽性細胞)が浸潤し、その細胞では抑制性受容体発現が低下し、腫瘍増大が著しく抑制されることを見いだした。この事実より、Bach2 を不活性化する薬剤は、抗腫瘍免疫活性化へと展開できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

代表者らは、補欠分子ヘムが Bach2 のリガンドであり、ヘムは Bach2 の DNA 結合を阻害し、ユビキチン化と分解を促進することを報告してきた(Blood 2011, BBA 2014;)。また、Bach2 は PI3K-mTOR 経路の下流で 1 カ所のセリン残基がリン酸化され、細胞質へと局在を変えて不活性化することを見いだしている(申請時点で未発表)。これらの独自の発見に基づいて、本研究では腫瘍免疫活性化戦略の開発へとつなげるため、T リンパ球における Bach2 の機能の詳細、特に CD8 T リンパ球活性化におけるその機能と標的遺伝子を同定することを目指した。併せて、mTOR 経路の薬剤による操作が T リンパ球応答に及ぼす効果を調べた。

あわせて、Bach2 阻害が液性免疫に及ぼす影響も詳細に調べた。

ヘム代謝そのものは生化学の領域でも古い研究テーマであり、律速酵素である アミノレプリン酸合成酵素を中心としたヘム合成量の調節機構や電子伝達系における生理的機能など、膨大な研究成果が蓄積されてきた。しかし、ヘム代謝の変化が免疫も含めた

細胞機能の変化へつなげる可能性については、ほとんど取りあげられてこなかった。申請者らの Bach2、そしてその類似因子 Bach1 がヘム受容体でもあるという発見から、ヘムによる遺伝子発現の制御という全く新しい研究領域が開拓されてきた。この研究パラダイムでは、ヘムの増減が Bach2 や Bach1 の作用を変化させ、その結果遺伝子発現が変化し、細胞機能の恒常性が調節され、また場合によってはヘムがトリガーとなって細胞状態の変化など、動的な応答が生じることを想定している。最近では、ヘム合成が形質細胞分化を制御することも報告した。このヘムによる遺伝子発現調節系を腫瘍免疫活性化戦略へと発展させることを目指す点に、本研究の萌芽研究としての意義があると考えた。このような観点から、当初予定した T リンパ球活性化へのヘムの関与に加え、B リンパ球分化・活性化の過程への関与の可能性についても検討を進めた。

3. 研究の方法

研究成果にまとめて記述する。

4. 研究成果

本研究では、細胞障害性 T 細胞機能をおさえ、抑制性 T 細胞分化を促進する転写因子 Bach2 に着目し、Bach2 を阻害することで腫瘍免疫を活性化する、という斬新な治療戦略を開発することを目指した。

まず、野生型あるいは Bach2 ノックアウトマウスに同系メラノーマ細胞を移植し、形成される腫瘍に浸潤する細胞種や数を比較した。なお、研究提案時に得ていた予備の結果の通り、Bach2 ノックアウトマウスではメラノーマ腫瘍の増大が顕著に遅いことを確認できた。腫瘍に浸潤する細胞は、ノックアウトマウスにおいて CD4 および CD8 陽性 T 細胞の数がより増加していることを見いだした。B リンパ球については逆に低下傾向を認めた。一方、NK 細胞やマクロファージなど自然免疫系細胞の数には大きな差を見いださなかった。骨髄においては著明な好酸球の増加とミエロイド由来抑制細胞(MDSC)の割合の増加を認めたが、樹状細胞の数などに違いは認められなかった。このような結果から、Bach2 ノックアウトマウスにメラノーマを移植した際には獲得免疫の中でも細胞性免疫の活性亢進がおき、これによりがん細胞の増殖が阻害されることが考えられた。すなわち、腫瘍免疫を活性化する上で、Bach2 が重要な標的となる可能性が考えられた。また、MDSC 分化への Bach2 の関与も考えられた。

まず、MDSC との関係性を調べるため、非担がん Bach2 のノックアウトマウスにおける MDSC の詳細を検討した。しかし、MDSC 自体の分化や試験管内の活性化や殺細胞活性には大きな変化は認められず、上記の実験で観察された MDSC 割合の増加は獲得免疫系の応答に由来する二次的なものと考えられた。

次に、野生型および Bach2 ノックアウト T 細胞を単離し試験管内で活性化し、その系に野生型 MDSC を添加・共培養することで、これら T 細胞の MDSC 感受性を比較した。この実験では、Bach2 が MDSC 感受性を大きく左右する可能性が示唆された。

以上の結果は、Bach2 が T リンパ球系の活性化や抑制系に対する応答を大きく左右する転写因子であることが考えられる。この仕組みをさらに理解するために、Bach2 標的遺伝子を特定することを目指した。そのために、詳細な遺伝子発現解析と Bach2 のクロマチン結合部位解析の統合解析を実施した。遺伝子発現解析では、野生型および Bach2 ノックアウトマウスより CD8 陽性ナイーブ T リンパ球を単離し、試験管内で T 細胞受容体およびコリセプターに対する抗体を添加し、活性化を行った。そして経時的に RNA サンプルを回収し、蛍光標識後に DNA マイクロアレイとハイブリダイゼーションを行った。実験は各群マウス 3 匹を用いて実施した。CV 値と平均変動値でカットオフを設け、補正検定法により発現量が有意に変動した遺伝子群を道程した。そうしたところ、例えば刺激前の時点で Bach2 ノックアウト T リンパ球では 500 を超える遺伝子群の発現が上昇していることを見いだした。刺激後 24 時間の時点では 1200 以上の遺伝子群の発現が上昇していた。この二つの遺伝子群のオーバーラップをしらべてみると重複するのは 300 遺伝子程度であった。すなわち、Bach2 は刺激有無にかかわらず多くの遺伝子群の発現を抑制すること、しかし、抑制の標的は刺激前後で大きく変化することが理解された。これら遺伝子群のジーンオントロジー (GO) 解析を行ったところ、リンパ球活性化、細胞障害性、細胞移動、白血球活性化、サイトカイン、炎症などに関わる遺伝子群が統計学的に有意な高頻度で含まれていた。次に、比較的培養のしやすい共通リンパ球前駆細胞株を用いて Bach2 クロマチン免疫沈降シークエンス実験を行った。そうすると、遺伝子発現解析で Bach2 の下流に存在する (Bach2 ノックアウトで発現が変動する) 遺伝子の多くが、そのプロモーターやエンハンサー候補領域に Bach2 が直接結合することを見いだした。さらに確認するために、組み換え Bach2 タンパク質を調整し、Bach2 結合を今回新たに見いだした DNA 領域との結合をゲルシフト法を用いて検討した。候補 DNA 配列の多くは、Bach2 が効率的に直接結合することを確認できた。したがって、Bach2 は T リンパ球においてリンパ球活性化、細胞障害性、細胞移動、白血球活性化、サイトカイン、炎症などに関わる遺伝子群を直接抑制することで、CD8 陽性エフェクター T リンパ球の分化を抑制することが考えられた。ここまでのところをまとめると、Bach2 欠損 T 細胞では細胞傷害性 T 細胞の応答が増強していること、細胞傷害性に関わる多数の遺伝子の発現がより上昇、あるいは早期に上昇するこ

とを見いだした。

液性免疫に関しても新たな発見を成すことができた。まず、Bach2 が B リンパ球の増殖停止にも必要であることを見いだした。B リンパ球の活発な増殖は pre-B 細胞および抗原刺激を受けた成熟 B 細胞で観察される。Pre-B 細胞では重鎖遺伝子組み換えに成功したクローンが活発に増殖しながら軽鎖遺伝子組み換えが行われ、この組み換えに成功したクローンは増殖を停止する。この段階の細胞増殖をマウス個体の BrdU 標識などにより調べたところ、Bach2 ノックアウトマウスでは増殖停止が起きずに増殖が持続していることを見いだされた。また、Bach2 発現リポーターマウスを用いて Bach2 発現を調べたところ、pre-B 細胞には Bach2 発現の高い集団と低い集団が存在し、Bach2 発現の高い集団はほとんど増殖していないことを見いだされた。このような実験結果を合わせて考えれば、軽鎖組み換えに成功した細胞では Bach2 の発現が何らかの機序により誘導され、これにより細胞増殖が抑えられるという応答経路の存在が示唆された。次に成熟 B 細胞の増殖についても検討を行った。成熟 B 細胞は抗原刺激を受けない限り、G0 期にあり増殖はしない。ところが驚いたことに、Bach2 ノックアウトマウスの成熟 B 細胞は、DNA 合成期に存在するものが 10% 近く存在していた。すなわち、Bach2 を欠損することで、pre-B 細胞や成熟 B 細胞など、増殖停止すべきところで停止できないことが考えられた。

この仕組みを理解するために、野生型および Bach2 ノックアウトマウスより pre-B 細胞および成熟 B 細胞を単離し、詳細な遺伝子発現解析を上記の手法を用いて実施した。さらに Bach2 クロマチン結合領域のデータと統合解析することで、サイクリン D3 遺伝子を Bach2 が直接抑制することを見いだした。すなわち、野生型 B リンパ球では、例えば pre-B 細胞にて抗体軽鎖遺伝子組み換えが成功すると Bach2 の発現が誘導され、Bach2 がサイクリン D3 遺伝子などに結合してそれらの発現を抑制する。これにより細胞周期の停止が生じると考えられる。同様の仕組みは T リンパ球でも行われ、液性免疫および細胞性免疫のブレーキが踏まれることが予想される。

以上の結果から、Bach2 を不活性化することは T リンパ球と B リンパ球の活性化につながるという概念をほぼ確立することができた。今後、Bach2 を不活性化する薬剤を同定することで腫瘍免疫活性化の新しい戦略が可能になるであろう。

その方策の一つとして、Bach2 を不活性化することを既に報告している mTOR 経路の操作が有望と考えた。そこで、実際に T リンパ球で mTOR 経路を阻害することで Bach2 の状態が変化するか否かを調べ、有望な結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Igarashi, K., Kurosaki, T. and Roychoudhuri, R. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. Nature Rev. Immunol. 17, 437-450 (2017)、査読有

DOI: 10.1038/nri.2017.26.

Jang, E., Lee, H. R., Oh, A. R., Cha, J. Y., Igarashi, K. and Youn J. Bach2 represses the AP-1-driven induction of interleukin-2 gene transcription in CD4 + T cells. BMB Rep. 50, 472-477 (2017)、査読有

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5625695/>

Tamahara, T., Ochiai, K., Muto, A., Kato, Y., Sax, N., Matsumoto, M., Koseki, T. and Igarashi, K. The mTOR-Bach2 cascade controls cell cycle arrest and class switch recombination during B cell differentiation. Mol. Cell. Biol. 37, e00418-17 (2017)、査読有

DOI: 10.1128/MCB.00418-17.

Sato, Y., Kato, H., Ebina-Shibuya, R., Itoh-Nakadai, A., Okuyama, R. and Igarashi, K. Bach2 Controls Homeostasis of Eosinophils by Restricting the Type-2 Helper Function of T Cells. Tohoku J. Exp. Med. 241, 175-182 (2017)、査読有

DOI: 10.1620/tjem.241.175.

Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., Spolski, R., Palmer, D.C., Pan, J.H., Patel, S.J., Macallan, D.C., Fabozzi, G., Shih, H.Y., Kanno, Y., Muto, A., Zhu, J., Gattinoni, L., O'Shea, J.J., Okkenhaug, K., Igarashi, K., Leonard, W.J., and Restifo, N.P. BACH2 regulates CD8+ T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. Nature Immunol. 17, 851-860 (2016)、査読有

DOI: 10.1038/ni.3441.

[学会発表](計 2件)

Yuki Sato, Miki Matsui-Watanabe, Daniel R. Sharda, Kazuhiko Igarashi, Ryuhei Okuyama. Deficiency of Bach2 results in improved tumor immunity by enhancing effector function in CD8+ T cells. 76th Annual Meeting of Society For Investigative Dermatology, Portland, USA, Apr 26-29, 2017 (poster presentation)

Yuki Sato, Miki Matsui-Watanabe, Daniel R. Sharda, Kazuhiko Igarashi, Ryuhei

Okuyama. Deficiency of Bach2 results in improved tumor immunity by enhancing effector function in CD8+ T cells. 41st Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, Sendai, Japan, Dec 9-11, 2016 (oral and poster presentation)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI, Kazuhiko)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 00250738

(2)研究分担者

張替 秀郎 (HARIGAE, Hideo)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50302146

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()