

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07164

研究課題名(和文) PD-1を介した腫瘍免疫制御機構におけるrRNAメチル化修飾機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of rRNA methylation in tumor immune system through PD-1

研究代表者

和久 由佳(仲島由佳)(Waku, Yuka)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：40399499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、CD8陽性T細胞の活性化に關与する塩基メチル化の同定を特異的な抗体を用いたFACS解析により行った。その結果、N1-メチルアデノシン(m1A)陽性細胞は、分化度の高いCD8陽性のサブポピュレーションにおいて活性化により増加し、m1AのメチルターゼであるNMLの発現と相関していた。さらに、m1A陽性のCD8陽性細胞の割合は腫瘍形成を強く抑制する若いマウスではPD-1阻害治療により増加したが、腫瘍形成を抑制することの出来ない加齢マウスでは増加しなかった。このように、m1Aメチル化がCD8陽性T細胞の活性化に關与しPD-1阻害治療効果の予測マーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにタンパク質合成制御を調節するための修飾として考えられてきたrRNAのメチル化が、腫瘍免疫機能を制御するという全く新しい機能の解明を推し進め普遍性を追求する本研究は、RNA修飾分野のみならず免疫の分野において、パラダイムシフトを引き起こすものと考えられる。また、本研究により得られたPD-1経路阻害に対する不応答性がんの問題の克服に繋がる成果は、新しいがん免疫療法の開発に繋がるのみならず、PD-1阻害治療の有効性を判断するためのバイオマーカー開発にも繋がると思われる。治療前に不応答患者かどうかを判定出来れば、抗体治療という高額医療費の削減にも繋がり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I performed FACS analysis using specific antibodies and found that the positive cells of N1-methyladenosine (m1A) was increased in highly differentiated CD8+ T-cell subsets which expressed m1A methyltransferase NML. Moreover, the percentage of m1A positive CD8+ T-cells in young mice was increased by PD-1 blockade therapy. On the other hand, the induction in aged mice, that could not reject tumors, was not induced by PD-1 blockade. These results suggest that m1A RNA modification is involved in the activation of CD8+ T-cells through PD-1 blockade.

研究分野：分子生物学

キーワード：rRNA 塩基メチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因のトップであり、人類にとって最も治療の難しい病気の一つと考えられている。その原因として、効果を示す抗がん剤であっても、その後の再発や転移が起きることが挙げられる。さらにがん細胞は、遺伝子に変異を蓄積し変化し続けるため、1つのタンパク質を狙った療法では、新しいタンパク質へと変化した場合に無力になってしまう。PD-1は、がん細胞ではなく免疫細胞に発現し、その活性を負に制御している。このPD-1経路を抑制する抗体治療により、免疫細胞、中でもCD8陽性T細胞が活性化し、がん細胞を駆逐することが明らかになってきている。そのため、がん細胞が変異したとしても、免疫細胞は変異した細胞をも標的として排除すると考えられる。このように、全く新しいがん治療に役立つ因子であるPD-1とそのリガンドであるPD-L1が発見され、その新しい免疫治療法への応用が成されている (Ishida Y, *et al.*, *EMBO J* 11, 1992; Iwai Y *et al.*, *PNAS* 99, 2002; Okazaki T *et al.*, *Nat Immunol* 14, 2013; Hamanishi *et al.* *J Clin Oncol* 33, 2015)。しかしながら、臨床応用が盛んに行われている一方で、基礎研究が遅れているため、CD8陽性T細胞の活性化の機序を含め、PD-1経路を介した腫瘍免疫制御機構には不明な点が多い。これまでの臨床研究から、PD-1抗体が薬事承認されたがん種における治療奏効率は30~60%程度であり、十分な治療効果が認められない患者 (PD-1抗体治療耐性) が存在することが明らかになってきている。PD-1経路を介した腫瘍免疫制御機構を解明することで、併用治療のための新たな標的分子を特定することが出来れば、このようなPD-1抗体治療耐性の問題の解決に繋がるものと期待出来る。申請者は、長年にわたり癌の進展における転写制御の基礎研究を遂行するとともに、転写後修飾制御の研究を進めてきた (*Nature Cell Biol.*, *Oncogene* 2009; *Science Signal.* 2011; *J Clin. Invest.* 2013; *Sci. Rep.*, *Hepatology* 2014; *Oncogene*, *MCB* 2015)。その過程の中で、リボソームRNA (rRNA) の塩基メチル化修飾が、グローバルな翻訳制御を介さずにがん細胞の増殖に影響することを見出した (*J Cell Sci.* 2016)。rRNAは唯一のタンパク質合成の場であるリボソームの構成要素の1つである。rRNAはrDNAから転写された後に、メチル化修飾を受け成熟する。そのメチル化には2種類あり、1つはリボースの2'-Oに(2'-Oメチル化)、もう一つは、塩基の窒素又は炭素原子にメチル基が付加される(塩基メチル化)。近年、ヒト細胞においてDIMP1LやWBSCR22-TRMT112などの因子は、塩基メチル化の付加には関与しているが、リボソーム形成には関与しないことが報告されている (Zorbas *et al.*, *Mol. Biol. Cell.* 2015; Sharma and Lafontaine, *Trends Biochem. Sci.*, 2015)。このように、我々と他グループの研究結果から、rRNA塩基メチル化には翻訳以外の役割があると予想されるが、その役割はほとんど明らかになっていない。

申請者は、PD-1経路を介したCD8陽性T細胞の活性制御機構を解析する過程において、rRNAにおける塩基メチル化レベルがT細胞の活性化に伴い変化することを見出した。このrRNAメチル化変動は、メチル化修飾を受けている全てのRNAヌクレオシドではなく、限られたヌクレオシドにおいてのみ観察された。さらに、このT細胞の活性化に伴うrRNAのメチル化変動は、PD-1経路を介してT細胞の活性を抑制することにより変動した。これらの結果から、rRNAメチル化はCD8陽性T細胞の活性を制御し、PD-1はそのメチル化レベルを変動させることで腫瘍形成を亢進させている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

申請者の研究室では、世界で初めて免疫チェックポイント分子PD-1を同定し、この分子を標的とした抗体治療が、多くの難治性のがんに対して効果的なことを明らかにしている。さらに、このPD-1経路を介した癌抑制作用にCD8陽性T細胞の活性化が関与することが明らかになって来ているが、その作用機序の詳細は未だわかっていない。一方、古くからrRNAはメチル化修飾を受けることは知られているが、その役割や制御機構はほとんど明らかになっていない。これまでに本申請者は、CD8陽性T細胞におけるrRNAのメチル化が、PD-1の活性化により変動することを見出した。そこで本研究では、PD-1経路を介した腫瘍免疫制御におけるrRNAメチル化の役割を検討し、その制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

・CD8陽性T細胞の活性化に伴い変化するrRNAの塩基メチル化の種類と関係因子の同定

1-メチルアデノシン (m1A) と5-メチルシチジン (m5C) に対する抗体 (MBL, D345-3, MFC-9) を用いて担がんマウスのリンパ節と脾臓由来のCD8陽性T細胞におけるそれぞれの修飾のレベルをFACS解析により検討した。m1Aメチル化因子の解析には、NMLに対するポリクローナル抗体を使用した。さらに、増殖との関係の検討には、Ki-67の抗体を用いた核内染色を行った。

・CD8陽性T細胞の活性化に伴い変化するrRNAのメチル化領域の解析

細胞からNcleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を用いてRNAの抽出と精製を行い、低濃度 (20 μ M) と高濃度 (2 mM) のdNTP存在下でメチル化候補領域周辺のプライマーを用いて逆転写し、cDNAを合成した。低濃度と高濃度dNTP存在下で合成したcDNAを鋳型にし、候補領域を特異的に増幅することが出来るプライマーを用いてReal time PCRを行い、2つの値からメチル化レベルを算出した (Methylation level = $2^{(CT_{low} - CT_{high})}$)。

・マイクロアレイを用いた CD8 陽性 T 細胞の活性化に伴い変動する塩基メチル化因子の網羅的解析

マウスの脾臓由来の CD8 陽性 T 細胞を CD44 と CD62L の発現を指標にサブポピュレーション毎にセルソーターを用いて単離した。単離した細胞から NcleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を用いて、RNA の抽出と精製を行った。次に、精製した RNA と Mouse 8x60k v2 チップ (Agilent Technologies) を用いてマイクロアレイ解析を行った。

・ OT-1 マウスを用いた m1A 修飾と抗原刺激による CD8 陽性 T 細胞の活性化との関係解析

卵白アルブミン (OVA) を発現させた MC38 細胞を OVA 特異的な T 細胞受容体を持つ OT-1 マウスに静脈注射により移植した。5 日後、OVA により活性化した CD8 陽性 T 細胞における m1A 修飾を特異的な抗体を用いた FACS 解析により検討した。

・ m1A メチル化と PD-1/PD-L1 経路依存的な CD8 陽性 T 細胞の腫瘍増殖抑制能との関係解析

PD-1 経路との関係の解析を、PD-1KO (C57BL/6) マウスと野生型マウスとの比較又は、抗 PD-L1 抗体の投与とコントロールとの比較により行った。腫瘍抑制能との関係解析のために、マウスの皮内に腫瘍細胞 ($0.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/1 箇所) を移植し、腫瘍増殖の測定とリンパ節や脾臓、又は末梢血から細胞を調整し、FACS 解析に用いた。

・ PD-1 阻害治療耐性マウスにおける m1A メチル化の検討

加齢に伴い PD-1 経路阻害治療は効果を示さなくなる。そこで、加齢マウス (16 ヶ月齢以上) に腫瘍細胞を皮内移植し、腫瘍を形成させた。若い (3 ヶ月齢以下) 又は加齢担がんマウスにおける m1A メチル化の検討をリンパ節や脾臓、又は末梢血から細胞を調整し、FACS 解析により行った。

・ PD-1 阻害治療耐性の改善と m1A メチル化の関係の検討

加齢マウスにアジュバント投与を行い、その 10 日後に腫瘍細胞の皮内移植を行った。さらに 5 日後にこれらのマウスの所属リンパ節から細胞を調整し、FACS 解析により m1A 修飾や CD8 陽性 T 細胞の活性化状態 ($\text{IFN}\gamma$ や Granzyme B など) を検討した。

・ m1A 修飾とミトコンドリア代謝との関係解析

若い又は老化マウスの皮内に MC38 細胞を移植した。移植から 6 日後に CD8 陽性細胞をリンパ節から単離し、酸素消費速度 (OCR) の測定を Seahorse XFe96 Extracellular Flux assay kit and Seahorse XF Cell Mito Stress test kit (Agilent Technologies) を用いて XFe96 Extracellular Flux analyzer (Agilent Technologies) により測定した。

4. 研究成果

これまでに、rRNA 塩基メチル化されるヌクレオシドにおけるメチル化レベルが CD8 陽性 T 細胞の活性化に伴い変化することを見出した。この CD8 陽性 T 細胞の活性化に伴い変動する rRNA のメチル化の種類を特定するために、塩基メチル化特異的な抗体を用いた細胞染色を行い、フローサイトメトリーにより陽性細胞の割合を調べた。リンパ節、脾臓や末梢血中における CD8 陽性 T 細胞において m1A 陽性細胞が検出された。一方、m5C 陽性細胞の割合はどの組織由来の CD8 陽性 T 細胞においても低かった。さらに、この m1A 修飾の割合の高いサブポピュレーションを検討した結果、活性化に伴い増加する分化度の高いサブポピュレーションにおいて、発現していることが明らかになった (図 1)。

CD8 陽性 T 細胞の増殖は、腫瘍形成を抑制するために

不可欠である。そこで、m1A 修飾と細胞増殖の関係を検討するために、増殖マーカーである Ki-67 の発現を検討した。その結果、m1A 陽性率の高い高分化細胞で Ki-67 の発現が高いことが明らかになった。

これらの結果から、rRNA 塩基修飾の中でも m1A 修飾が CD8 陽性 T 細胞の活性化や増殖に関与する可能性が示された。

次に、CD8 陽性 T 細胞における m1A メチル化因子を特定するために、メチル化の領域を検討した。その結果、28S rRNA m1A1136 周辺のメチル化は活性化に伴い変動し、m1A3301 や m5C3438 周辺のメチル化はほとんど変動しなかった。この m1A1136 の塩基メチル化は NML により制御されることをこれまでに明らかにしている。そこで、CD8 陽性 T 細胞の NML に対する siRNA を用いたノックダウンを試みた。しかしながら、ノックダウン効率が悪かったため、その効果を検討することが出来なかった。そのため次に、特異的な抗体を用いた NML の発現解析により m1A メチル化との関係を検討した。その結果、m1A 陽性細胞の割合と同様に、

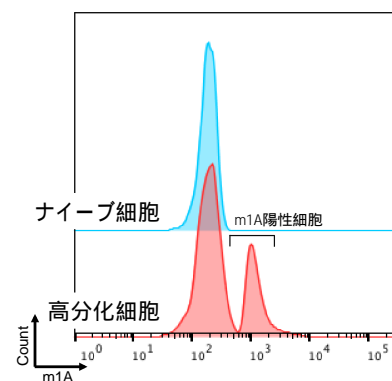


図1 CD8 T細胞のサブポピュレーションにおけるm1A陽性細胞の検出

分化度の高い CD8 陽性 T 細胞のポピュレーションにおいて NML の発現が高かった。この結果から、NML が CD8 陽性 T 細胞における m1A 修飾に關与する可能性が明らかになった。

CD8 陽性 T 細胞における rRNA のメチル化因子の網羅的な解析をマイクロアレイを用いて行った。その結果、エフェクター細胞において高発現している rRNA 塩基メチル化関連因子を 3 つ、メモリー細胞において発現の高い因子を 1 つ、ナイーブ細胞において発現の高い因子を 4 つ同定した。5mC に關与する因子の発現がメモリー細胞において高かったことから、5mC 修飾は CD8 陽性 T 細胞の活性化後期のメモリー細胞形成に關与する可能性が示唆された。さらに、これらの因子の中にはミトコンドリア rRNA のメチル化に關与する因子が含まれていることから、ミトコンドリア代謝を介した CD8 陽性 T 細胞の活性化への關与が示唆された。

CD8 陽性 T 細胞における m1A 修飾が、活性化に伴い増加することを見出したが、この増加が抗原刺激によるものかどうかを卵白アルブミン (OVA) 特異的な受容体を持つ OT-1 マウスを用いて検討した。OVA を発現させた MC38 (MC38-OVA) 細胞を OT-1 マウスに移植し、3、5、7 日後の m1A 陽性細胞の割合を調べた。その結果、コントロールに比べて、3 日後までに MC38-OVA 細胞移植により m1A 陽性細胞の割合が増加し、その割合は次第に減少した (図 2)。さらに、この傾向は Ki-67 陽性細胞の割合と相関していた。これらの結果から、CD8 陽性 T 細胞における m1A 塩基メチル化は抗原刺激による細胞増殖に關与することが示唆された。

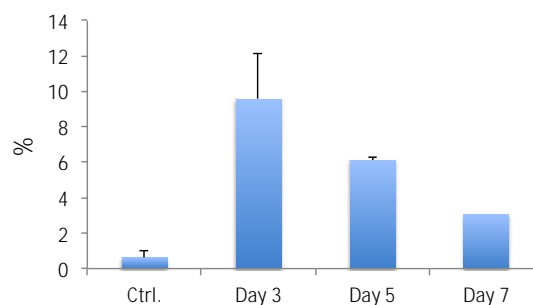


図 2 OT-1マウス由来のCD8 T細胞におけるm1A陽性細胞の割合

PD-1/PD-L1 経路阻害治療による腫瘍形成の抑制は、CD8 陽性 T 細胞を介して効果を示すことが知られている。

m1A メチル化を野生型マウスと PD-1KO マウス由来の CD8 陽性 T 細胞を用いて比較した結果、m1A 陽性細胞の割合が PD-1KO マウス由来の CD8 陽性 T 細胞において高かった。さらに、担がんマウス由来の CD8 陽性 T 細胞における m1A 陽性細胞の割合は、抗 PD-L1 抗体治療により増加した。この m1A 陽性細胞の多いポピュレーションでは、IFN γ や Granzyme B などのエフェクターマーカーの発現が高かった。これらの結果から、PD-1/PD-L1 経路阻害を介した CD8 陽性細胞の活性化による腫瘍抑制作用に m1A メチル化の促進が關与する可能性が示された。

PD-1/PD-L1 阻害治療耐性が加齢に伴う CD8 陽性 T 細胞の機能不全と関係することが考えられる。実際に、若い PD-1KO マウスにおける腫瘍増殖は完全に抑制されたが、加齢 PD-1KO マウスにおいては、ほとんど抑制されなかった。これらの加齢マウス由来の CD8 陽性 T 細胞における m1A 陽性細胞率は若い PD-1KO マウスに比べて低かった。さらに、アジュバントの投与により CD8 陽性 T 細胞の機能を回復させると、m1A 陽性細胞の割合が増加した。このように、m1A メチル化の回復が CD8 陽性 T 細胞の機能回復に繋がる可能性が明らかになった。

代謝の変動と T 細胞の活性化は密接に結びついており、中でもミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の促進が PD-1/PD-L1 阻害治療の効果に關与していることが明らかになって来ている。また、初年度に行った網羅的な rRNA メチル化因子の解析の結果の中に複数のミトコンドリア rRNA メチル化因子が含まれていた。そこで、m1A メチル化とミトコンドリア代謝との関係を検討するために、OCR の測定を行った。CD8 陽性細胞における m1A メチル化は、腫瘍細胞の移植により増加するが、この条件下において OCR の値も増加した。さらに、m1A メチル化レベルの低い加齢マウス由来の CD8 陽性細胞では、低い値を示すことが明らかになった。

以上の結果から、CD8 陽性細胞のポピュレーション毎に異なる rRNA のメチル化が変動することが明らかになった。腫瘍免疫反応の初期と後期では異なる rRNA のメチル化因子が働くことが明らかになったため、メモリー細胞中で高発現していた因子や関連修飾の解析を行うことで、免疫反応の後期における rRNA メチル化の機構と意義が明らかになると考えられる。本研究で重点的に解析を行った m1A メチル化は、CD8 陽性 T 細胞の活性化に伴い免疫反応の初期に増加し、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の亢進を介して腫瘍形成を抑制させる可能性が示された。さらに、加齢により m1A メチル化の阻害が引き起こされることが明らかになり、PD-1/PD-L1 阻害治療耐性に繋がることを示唆された。そのため、m1A 陽性細胞の割合が PD-1/PD-L1 阻害治療効果の予測バイオマーカーになり得ると考えられる。また、全ての rRNA の塩基メチル化が促進するわけではなく、一部の塩基メチル化が活性化により増加したことから、リボソーム合成の制御を介さずにエネルギー代謝を制御すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Murakami Shohei, Suzuki Takuma, Yokoyama Wataru, Yagi Satoko, Matsumura Keita, Nakajima Yuka, Harigae Hideo, Fukamizu Akiyoshi, Motohashi Hozumi | 4. 巻 163 |
| 2. 論文標題 Nucleomethylin deficiency impairs embryonic erythropoiesis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 413-423 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvx086 | 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuka Nakajima, Kenji Chamoto, Tasuku Honjo |
| 2. 発表標題 Age-related resistance to PD-1 blockade therapy through reduction of a specific CD8+ T-cell subpopulation |
| 3. 学会等名 第78回 日本癌学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 仲島由佳、茶本健司、河上裕 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 メディカルレビュー社 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 Trends in Cancer Immunology | |

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 仲島由佳、茶本健司 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 メディカルレビュー社 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 がん分子標的治療 分子標的薬の新しいバイオマーカー | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 仲島由佳、波多江龍亮、茶本健司 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 メディカルビュー社 | 5. 総ページ数 5 |
| 3. 書名 THE LUNG perspectives 特集：免疫学の最新展開と呼吸器疾患 | |

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|