

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15196

研究課題名（和文）エピジェネティクス修飾による抗腫瘍免疫増強法の探索

研究課題名（英文）Enhancement of the anticancer immune response by epigenetic modification

研究代表者

古澤 之裕（Furusawa, Yukihiro）

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：80632306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍に対する薬剤療法は、従来の細胞毒性薬から分子標的薬の使用へと転換が進み、抗体医薬品を使用したがん免疫療法が優秀な成績を収めている。一方、抗体医薬品を用いたがん免疫療法は、極めて高コストであることから、医療費の圧迫が問題視されている。本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）を標的とした低分子化合物に着目し、HDAC阻害薬によるがん免疫療法への可能性を模索した。今回検討したHDACアイソザイムの選択的阻害薬の中に、腫瘍に対する免疫抑制を担う制御性T細胞の分化を抑制するだけでなく、腫瘍が免疫抑制を示すための細胞膜表面分子であるPD-L1の発現を抑制するものがあることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍に対する治療法として、近年抗体医薬品を用いたがん免疫療法が開発され、臨床で良好な成績を収めている。一方、抗体医薬品は従来の低分子化合物をベースとした薬剤と比較して薬価が著しく高く、患者のQOLの低下や医療費の圧迫が懸念されている。本研究ではエピジェネティクス機構を標的とした低分子化合物が、がん免疫療法の標的となる分子の発現を阻害することや、がん免疫の抑制を担うヘルパーT細胞サブセットの分化を抑制することを見出した。この知見を発展させ、低分子化合物をベースとした新たながん免疫療法の薬を開発することができれば、近年の抗体医薬品の薬価の問題をカバーできると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Antibody-based drug is widely used for cancer immunotherapy; however, the high cost of this type of drug is problem to be solved. In this study, We focused on small molecule inhibitor against histone deacetylase (HDAC) that regulates epigenetic modification and evaluated the effect of HDAC inhibitors on cancer immunotherapy. Among several HDAC isozyme specific inhibitors, we found HDAC inhibitor B suppressed the differentiation of naive T cells into regulatory T cells. The reduction of regulatory cells and anti-tumor effect of this inhibitor were also observed even in *in vivo* HDAC knockout tumor model, indicating that the HDAC inhibitor might show anti-tumor effect through the modification of immune function. In addition, this inhibitor suppressed PD-L1 expression in cancer cells. Collectively, HDAC inhibitor B may be potent immune regulator that enhance anti-tumor immunity.

研究分野：免疫学

キーワード：エピジェネティクス がん免疫 Treg PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する薬剤療法は、従来の細胞毒性薬から分子標的薬の使用へと転換が進み、特に近年では抗 PD-1 抗体ニボルマブ (オプジーボ) が悪性黒色腫患者の治療で優秀な成績を収めている。この治療法は、がんに対する免疫 (抗腫瘍免疫) の抑制を解除し、エフェクター T 細胞 (キラー T 細胞や 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1)) を活性化するがん免疫療法と呼ばれる手法である。一方、がん細胞はエフェクター T 細胞上の PD-1 との相互作用を介する他に、自身の周囲に制御性 T 細胞 (Treg) を誘導する事で抗腫瘍免疫を抑制することが知られている。Treg はヘルパー T 細胞サブセットの 1 つであり、エフェクター T 細胞の機能を抑制することで生体内での過剰な免疫応答を抑制するが、がん組織は自身の周囲にこの Treg を誘導する環境を作り出すことで、免疫系からの攻撃を回避している。すなわち、PD-1/PD-L1 といった免疫チェックポイントの阻害に加え、Treg を抑制する薬剤は抗腫瘍免疫を増強することが期待される。

2. 研究の目的

これまで我々は、エピゲノム修飾による Treg の分化や増殖制御に関する研究を行ってきた。その過程で、ある種のヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase, 以下 HDAC と略) や DNA メチル化酵素の阻害が、*in vitro* および *in vivo* で Treg 分化や増殖を抑制することを発見した (一部未発表)。さらに、HDAC や DNA メチル化酵素の阻害は、抗腫瘍免疫に関わる 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) への転換を進めることがわかった (未発表)。ヒストンアセチル化や DNA メチル化は、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節機構として知られ、エピジェネティクスと総称されている。HDAC や DNA メチル化酵素の阻害薬 (以下、エピゲノム薬) は、これまで、腫瘍単独に対する毒性に着目して、抗腫瘍効果が検討されてきた背景があるが、本知見からエピゲノム薬の中には、腫瘍自体に対して抗がん作用を示すだけでなく、Treg 抑制を介して抗腫瘍免疫応答を増強するものがあると考えられる (図 1)。

本研究では、エピゲノム薬の 1 つである HDAC 阻害薬による Treg 抑制の効果をマウス担がんモデルにおいて評価することで、エピゲノム薬の免疫修飾による腫瘍抑制効果を検証することを目的とした。また同時に、HDAC 阻害による PD-L1 発現への影響についても評価した。

3. 研究の方法

本研究では、これまでの予備検討で Treg 誘導抑制効果が認められたエピゲノム薬に加え、新たに HDAC を標的としたエピゲノム薬を追加し、T 細胞の *in vitro* Treg 誘導系を用いて Treg 誘導抑制効果のスクリーニングを行った。腫瘍に対する直接的な HDAC 阻害剤の効果を消失させるため、まず HDAC 阻害剤の主要な標的となる HDAC アイソザイムを欠損する細胞の作成を試みた。細胞には B16F10 細胞を用い、*Hdac* 遺伝子欠損株作成には CRISPR-Cas9 を用いた。作成した細胞の *in vitro* における細胞増殖は MTT 法にて評価し、細胞死は SubG1 期の細胞の割合を元に評価した。細胞は C57BL6/J に移植後、HDAC 阻害剤を投与し腫瘍径の評価および Treg の割合を解析した。

4. 研究成果

これまで申請者が報告した酪酸と同様、HDAC 阻害作用をもつ多くのエピゲノム薬が Treg 誘導効果を示した一方、化合物 A および類似化合物 B については Treg 誘導抑制効果が認められた。そこで CRISPR-Cas9 システムにより、Treg 誘導抑制能を示した化合物 A および B が標的とする 2 種類の HDAC アイソザイムを欠損した B16F10 株 (以下 dKO 株) を作成し、培養系での薬剤の細胞毒性および移植モデルにおける薬剤の腫瘍抑性能を評価した。化合物 A は HDAC アイソザイム以外のオフターゲットが報告されているため、ここではよりオフターゲットが抑制された類似化合物である B を用いた。化合物 B は野生型 B16F10 細胞に対して、濃度依存性的および処理日数依存的に細胞増殖抑制効果を示し、培養 3 日目にはアポトーシスの指標とされる SubG1 期の細胞の割合を増加させた (図 1)。

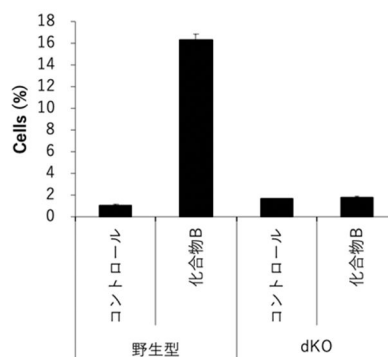


図 1. 化合物 B で処理した野生型 B16F10 および dKO における SubG1 期細胞の割合

dKO 株では野生型に比べ未処理条件での増殖能が低下したものの、培養 3 日目に高濃度の類似

化合物 B で処理した場合でも細胞増殖抑制効果は認められず、また SubG1 期の細胞の割合も増加しなかった。以上のことから、樹立した dKO 株は化合物 B の標的となる機能的な HDAC がいずれも欠損しており、そのため薬剤耐性を示したものと考えられる。

本細胞をマウスに移植することで、免疫系への薬剤の影響を評価できると考え、C57BL6/J マウスに野生型および dKO 株を移植し、腫瘍径が約 200mm³ に達した時点から化合物 B を 30 mg/kg で腹腔内投与した。薬剤を投与したマウスでは全身性の CD4+Foxp3+制御性 T 細胞の割合が低下し、また投与後 6 日目には腫瘍径の低下が認められた (図 2)。

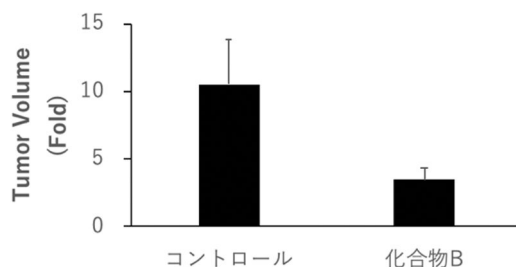


図 2. 化合物 B による腫瘍の成長抑制効果

以上のことから、化合物 B は腫瘍に直接的に作用するのみでなく、宿主側に作用することでも抗腫瘍効果を示す可能性があることがわかった。本研究ではさらに、腫瘍に対する免疫賦活化作用を調べる目的で、化合物 B による PD-L1 発現への影響を調べた。興味深いことに、化合物 B は B16F10 細胞の PD-L1 発現を抑制することがわかった。PD-L1 発現を抑制する濃度や処理日数は細胞毒性を示すポイントよりも手前であったことから、化合物 B が標的とする HDAC は細胞毒性非依存的に PD-L1 発現を抑制する可能性があると考えられた。いずれの HDAC が PD-L1 発現に関与するか調べるため、単独欠損細胞を作成し PD-L1 の発現をみたところ、一方の HDAC を欠損した場合に PD-L1 発現が減少することがわかった。本細胞は野生型に比べ細胞増殖能に差はみられなかったものの、マウスに移植した際には約 2 週間時点で野生型よりも腫瘍径が小さかったことから、PD-L1 発現と相関していることが伺えた (図 3)。

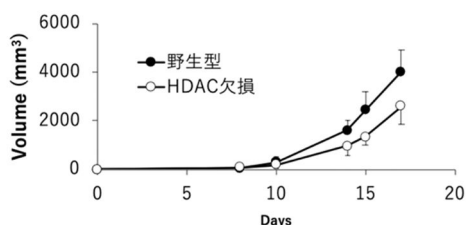


図 3. HDAC 単独欠損 B16F10 腫瘍移植モデルにおける腫瘍径の経時的変化

以上の結果より、2 種類の HDAC アイソザイムを阻害する化合物 B は、Treg 抑制に加え、PD-L1 発現を抑制することでも Treg 抗腫瘍効果を示す可能性が考えられた。今後は、マウス側で HDAC アイソザイムを欠損させて薬剤の効果を見るほか、2 種類の HDAC アイソザイムが Foxp3 や PD-L1 の発現を調節する分子メカニズムについて調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

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