

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16522

研究課題名(和文)免疫抑制受容体PD-1による遺伝子発現制御システムの複合的オミクス解析

研究課題名(英文)Multimomics analyses of gene expression regulated by immunoinhibitory receptor PD-1

研究代表者

清水 謙次(Shimizu, Kenji)

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：60837061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現解析とATAC-seqの結果から、TCRシグナルで誘導される遺伝子を複数のグループに分類した。それらの中で、CpG頻度、ATACシグナル、刺激前の発現量が高いグループは弱いTCRシグナルでも発現上昇し、PD-1による抑制を受けにくい傾向を有していた。反対に、CpG頻度、ATACシグナル、刺激前の発現量が低いグループは発現上昇に強いTCRシグナルを必要とし、PD-1による抑制を受けやすい傾向を有していた。また、TCR刺激による遺伝子発現上昇と同様に、開放に強いTCRシグナルを必要とするATACピークほど、PD-1による抑制を受けやすいことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗PD-1抗体によるがんの治療が注目を集めている。しかし、PD-1がTCRシグナルで誘導される遺伝子発現に及ぼす影響の詳細は分かっていなかった。これまでの研究により、PD-1によって発現が抑制されやすい遺伝子とされにくい遺伝子が存在することを明らかにしてきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究により、PD-1による抑制を受けやすい遺伝子はクロマチンの状態に特徴があることが分かった。すなわち、T細胞の状態によってPD-1の影響が異なることが示唆された。PD-1を標的とした治療を行う際にクロマチンの状態を変化させることで、治療効果の増強や副作用の軽減が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed cap analysis of gene expression (CAGE) and assay for trasposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq) of TCR-inducible genes and found that TCR-inducible genes can be categorized into several groups based on their expression and epigenetic profiles. TCR-inducible genes in the group with high CpG frequency, high ATAC signal, and high mRNA expression before TCR-stimulation required weak TCR signal for upregulation and were resistant to PD-1-mediated inhibition. On the other hand, TCR-inducible genes in the group with low CpG frequency, low ATAC signal, and low mRNA expression before TCR-stimulation required strong TCR signal for upregulation and were sensitive to PD-1-mediated inhibition. We also found that ATAC peaks which required strong TCR signal to be opened were sensitive to PD-1-mediated inhibition.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 PD-1 CAGE ATAC-seq

### 1. 研究開始当初の背景

約30年前より、日本での死因の第1位はがんとなっている。従来のがん治療法は外科療法、化学療法、放射線療法が中心であった。近年はこれらに加えて免疫療法の開発が進んでおり、特に抗 PD-1 抗体によるがん治療はメラノーマなどのがんに対して、化学療法よりも優れた治療成績を示している (Robert et al, N Engl J Med, 2015)。

免疫系は病原体を排除するために存在するが、過度の免疫応答は自己組織にも損傷を与えてしまう。このような過度の免疫応答を抑制する機能をもった分子が免疫抑制受容体 PD-1 である (Okazaki et al, Nat Immunol, 2013)。一部のがん細胞は PD-1 のリガンドである PD-L1 を発現することで、免疫系からの攻撃を免れている。よって、抗 PD-1 抗体を用いて PD-1 の機能を阻害すると、がん細胞を免疫系が攻撃できるようになり、がんの治療が可能となる。

PD-1 は主に T 細胞に発現している。T 細胞が T 細胞受容体 (TCR) を介して病原体やがんの抗原を認識すると、TCR シグナルが活性化する。TCR シグナルの下流では様々な遺伝子発現が誘導され、免疫応答が促進される。PD-1 は SHP-2 ホスファターゼをリクルートし、TCR シグナルによってリン酸化されるシグナル分子を脱リン酸化することが知られていたため (Sheppard et al, FEBS Lett, 2004) PD-1 は TCR シグナルによって誘導される遺伝子発現を一様に抑制すると考えられたが、それを証明した報告はなかった。

申請者はこれまでの研究で、Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) を用いたトランスクリプトーム解析を行い、PD-1 によって発現が抑制される遺伝子とされない遺伝子があることを明らかにした。また、T 細胞を刺激する強度を変化させた場合の遺伝子発現量を比較することにより、それぞれの遺伝子は発現上昇するために異なる刺激強度が必要であることを見出した。最大の発現量の半分の発現量を誘導するために必要な刺激強度を  $EC_{50}$  として算出すると、 $EC_{50}$  が高い遺伝子ほど PD-1 による抑制を受けやすいことが明らかになった (Shimizu et al, Mol Cell, 2020)。

CAGE は mRNA の 5'末端の配列を次世代シーケンサにて決定するため、mRNA の転写開始点を決定することができる。PD-1 によって発現が抑制されにくい遺伝子の転写開始点付近には高頻度で CpG アイランドが存在していることがわかった。CpG アイランドが存在するプロモーターはクロマチンがオープンになっていることが多いことが知られている (Zhou et al, Nat Rev Genet, 2011)。したがって、刺激前からクロマチンがオープンになっている遺伝子は PD-1 によって抑制を受けにくいと考えられる。CpG アイランドの有無によるクロマチンの状態の予測には曖昧さがあるので、より直接的な方法でクロマチンの状態を調べる必要があった。

### 2. 研究の目的

PD-1 によって発現が抑制される遺伝子とされない遺伝子がどのように決まっているのかという問いに答えるために、ATAC-seq を実施し、クロマチンの状態と PD-1 の抑制効果の関係性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

PD-1 刺激あり、またはなしの条件で、T 細胞を様々な強度で刺激し、ATAC-seq のサンプルとした。刺激によって上昇する ATAC ピークを同定し、その ATAC ピークの  $\pm 500$ bp における ATAC シグナルを算出した。また、CAGE により同定した転写開始点の  $\pm 500$ bp における ATAC シグナルを算出した。

### 4. 研究成果

T 細胞を刺激することによって上昇する ATAC ピークを約 5000 個同定した。図 1 に例を示すように、各 ATAC ピークは刺激強度依存的に上昇していた。また、PD-1 の抑制効果は各 ATAC ピークによって異なっていた。そこで、各 ATAC ピークの  $EC_{50}$  と PD-1 感受性を算出すると、転写制御と同様に、 $EC_{50}$  が高い ATAC ピークほど PD-1 による抑制を受けやすいことがわかった (図 2)。

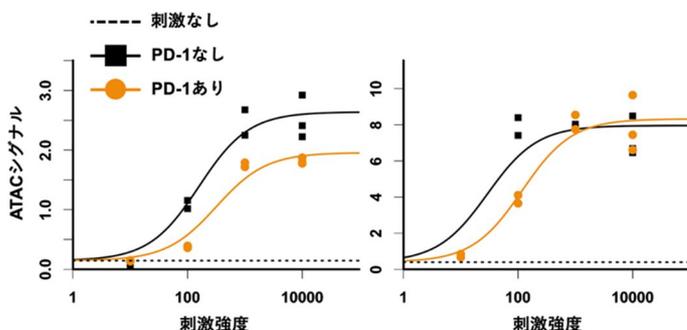


図1. 刺激強度依存的なATACシグナル上昇の例

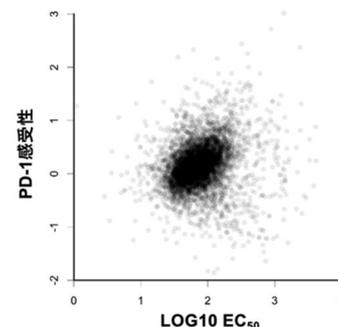


図2. 各ATACピークのEC50とPD-1感受性の関係

次に、刺激前のサンプルを用いて、転写開始点±500bpのCpG頻度とATACシグナル強度と発現量の関係を調べた(図3)。CpG頻度が高い転写開始点付近はATACシグナル強度が高く、予想された通り、クロマチンがオープンになっていることが確認された。一方で、CpG頻度が低い転写開始点付近はATACシグナル強度が高いグループと低いグループに二分されることが分かった。また、刺激前において、CpG頻度が低い転写開始点からはほとんど転写がないのに対して、CpG頻度が高い転写開始点の場合は、転写が低いグループと転写が高いグループに分かれていた。混合ガウスモデルによるクラスタリングを行った結果、T細胞で発現する遺伝子は、図3に示すグループA, B, C, Dおよび、グループA~Dに属さないグループEに分類された。それぞれのグループのEC<sub>50</sub>を比較すると、グループA, B, C, Dの順番に低いことが分かった(図4)。つまり、グループA, B, C, Dの順番にPD-1による抑制を受けにくいと言える。

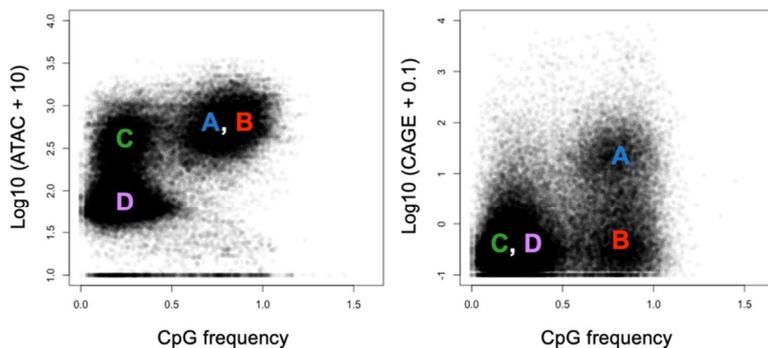


図3. 転写開始点±500bpのCpG頻度とATACシグナル強度と発現量の関係

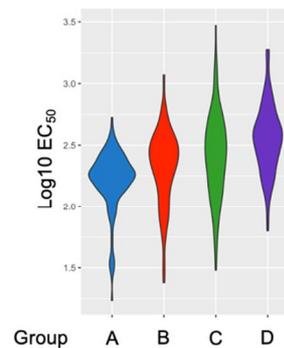


図4. クロマチンの状態によって分類された遺伝子群のEC<sub>50</sub>

先行研究において、発現誘導に強い抗原刺激を必要とする遺伝子ほどPD-1による抑制を受けやすいことを見出したが、その特性をもとに、ある遺伝子のPD-1による抑制への感受性を予測するには、T細胞を段階的な強度で刺激してEC<sub>50</sub>を測定する必要がある。そのため、がんや自己免疫疾患の患者のサンプルで行うのは困難であった。本研究成果により、患者から採取したT細胞をそのまま遺伝子発現解析およびATAC-seqすることによって、各遺伝子のPD-1感受性を予測することが可能となった。また本研究により、PD-1による抑制を受けやすい遺伝子はクロマチンの状態に特徴があることが分かった。すなわち、T細胞の状態によってPD-1の影響が異なることが示唆された。これを応用すれば、PD-1を標的とした治療を行う際にクロマチンの状態を変化させることで、治療効果の増強や副作用の軽減が可能になると期待される。

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 Shimizu Kenji, Sugiura Daisuke, Okazaki Hi-mi, Maruhashi Takumi, Takegami Yujiro, Cheng Chaoyang, Ozaki Soichi, Okazaki Taku	4. 巻 77
2. 論文標題 PD-1 Imposes Qualitative Control of Cellular Transcriptomes in Response to T Cell Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 937 ~ 950.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2019.12.012	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 清水謙次, 杉浦大祐, 岡崎一美, 丸橋拓海, 竹上雄治郎, 程朝陽, 尾崎崇一, 岡崎拓
2. 発表標題 PD-1はT細胞活性化時のトランスクリプトームを質的に調節する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

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

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