

マルチオミクス解析を駆使したがん局所浸潤 CTLA-4 高発現制御性 T 細胞の新規制御メカニズムの解明に関する研究

名古屋市立大学大学院

医学研究科免疫学 講師 杉山 大介

1. 研究の背景・目的

がんに対する治療法として「がん免疫療法」が標準治療として確立され、がん患者体内の免疫応答を精査し、治療へつなげることが求められている。免疫応答は、活性と抑制のバランスを保つことで生体内恒常性を維持しており、とりわけがん環境は免疫抑制に傾くことでがんを排除する免疫応答（抗腫瘍免疫応答）が減弱されている。この免疫抑制を担う免疫細胞として制御性 T 細胞（Treg cell）が存在し、Treg cells の除去による免疫抑制の解除により、抗腫瘍免疫応答を増強させ、がんを治療する試みが世界中で進められている（文献 1）。Treg cells は細胞表面分子 CTLA-4 を発現することで活性化免疫細胞を抑制している。研究代表者の所属研究室では、頭頸部がん局所における Treg cells が細胞表面 CTLA-4 を高発現することを報告しており（文献 2）、我々はこの Treg cells が抗腫瘍免疫応答を抑制する強免疫抑制 Treg cells であると考えている。一方で、Treg cells の細胞表面 CTLA-4 の発現制御メカニズムは不明な点が多く、これを明らかにすることでがん局所の Treg cells を介する免疫抑制環境の理解につながると考えられる。本研究では、この Treg cells の細胞表面 CTLA-4 発現制御メカニズムの解明を目的とし、これを達成することで Treg cells を標的とした新しいがん免疫治療法の開発につなげたいと考えている。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 頭頸部がん患者由来 Treg cells における網羅的遺伝子発現解析

研究代表者が保有している頭頸部がん患者由来遺伝子解析データをもとに、細胞表面 CTLA-4 高発現 Treg cells において発現上昇がみられる遺伝子群および代謝活性群を選別し、CTLA-4 の細胞表面発現に寄与する因子を探索した。また、公開されているがん患者由来 single cell RNA sequence データを解析し、頭頸部がん患者の Treg cells の CTLA-4 発現と関連する遺伝子を探索した。

(2) CTLA-4 および CTLA-4 高発現因子の強制発現株の樹立

T 細胞白血病細胞株である Jurkat にレンチウイルスベクターを用いてヒト CTLA-4 遺伝子を強制発現させた。同様に、遺伝子発現解析の結果から見出した遺伝子 X と CTLA-4 を Jurkat へ同時に遺伝子導入した。これらの遺伝子導入細胞株についてピューロマイシンによる遺伝子導入細胞の選別をおこなった。選別後、これらの遺伝子が Jurkat に発現しているかを確認するため、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー解析を実施した。

(3) CTLA-4 高発現細胞株を用いた免疫抑制解析

遺伝子導入していない Jurkat (Responder) を B 細胞リンパ腫細胞株である Daudi と共培養し、抗 CD3 抗体による刺激をおこなった。共培養の際、樹立した CTLA-4 高発現 Jurkat および遺伝子 X-CTLA-4 共発現 Jurkat を加えた。共培養 48 時間後に、PMA/ionomycin および Monensin を添加し 5 時間追加培養した。培養後の細胞を回収し、BD Cytofix Fixation Buffer および抗 IL-2 抗体を用いた細胞内染色をおこない、Responder の IL-2 産生をフローサイトメーターにて解析した。

3. 研究成果

(1) Treg cells の細胞表面 CTLA-4 発現制御には多因子が関与する

細胞表面 CTLA-4 を高発現する Treg cells に関与する因子を探索するため、がん患者 4 症例分の細胞表面 CTLA-4 発現 Treg cells と低発現 Treg cells 由来 RNA を用いた RNA sequence 解析を実施し、これらについて比較発現解析を実施した。その結果、CTLA-4 高発現 Treg cells において複数の遺伝子が共に高発現することが分かった (図 1A)。さらに、本 RNA sequence データをもとに代謝関連遺伝子解析をおこなったところ、CTLA-4 高発現 Treg cells において複数の代謝産物が増加していた (図 1B)。さらに、複数のがん患者由来 single cell RNA sequence 解析データを統合し再解析したところ、頭頸部がん Treg cells において CTLA-4 の高発現に伴い数個の遺伝子が高発現することを見出した (図 1C)。これらの解析結果および既存の CTLA-4 遺伝子発現制御機構を考慮し、遺伝子 X に着目した解析を進めた。

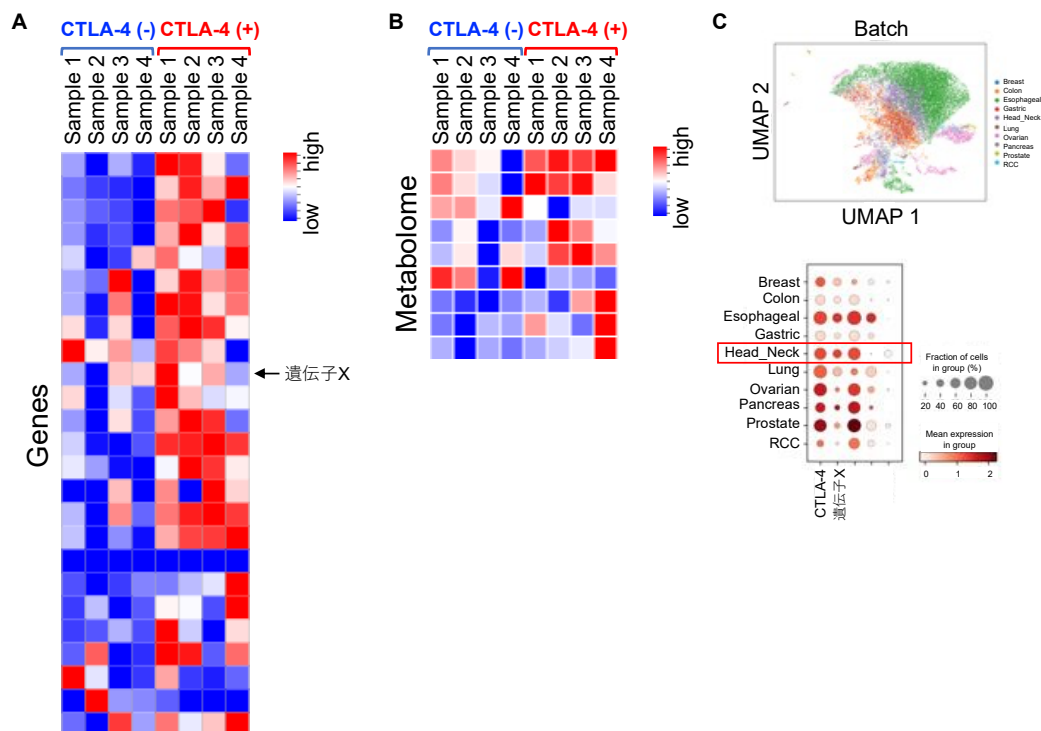


図1.頭頸部がん患者由来Treg cellsにおける網羅的遺伝子発現解析

頭頸部がん患者由来サンプルを用いた細胞表面CTLA-4高発現Treg cellsおよび低発現Treg cellsの比較遺伝子発現解析 (A)、比較代謝産物解析 (B) のヒートマップ表示。発現レベルを高い (赤)、低い (青) で表示している。(C) 公共データベースを用いた、各種がん患者由来single-cell RNA sequence解析データの再解析。上図は各種がん患者サンプルのTreg cellsをUmapにて表示している。下図はCTLA-4発現およびCTLA-4遺伝子制御関連因子の発現レベルを表記している。

(2) 遺伝子 X は CTLA-4 の細胞表面発現の維持に関与する

遺伝子 X の機能を解析するため、Jurkat に CTLA-4 遺伝子および遺伝子 X を強制発現させた。それぞれの遺伝子発現レベルをフローサイトメーターにて解析したところ、CTLA-4 遺伝子導入 Jurkat において細胞表面 CTLA-4 発現が見られ、かつ遺伝子 X と共発現させることにより CTLA-4 発現が高レベルに維持されていた (図 2A)。これらの遺伝子発現 Jurkat を用い、CTLA-4 発現による T 細胞抑制効果を検証した。T 細胞として遺伝子導入をしていない Jurkat (Responder) を、抗原提示細胞として Daudi を用い、CTLA-4 あるいは遺伝子 X を共発現させた Jurkat を加えて共培養した。T 細胞を活性化させるため、抗 CD3 抗体を添加し、サイトカイン産生を促すため PMA/Ionomycin 刺激を行い、IL-2 の産生量をフローサイトメーターにて評価した。その結果、CTLA-4 あるいは遺伝子 X/CTLA-4 共発現 Jurkat を共培養することで、Responder の IL-2 産生が低下した (図 2B)。これらの結果が

ら、遺伝子 X は CTLA-4 の細胞表面発現に関与し、CTLA-4 の T 細胞活性化を抑える機能をサポートしていることが示唆された。

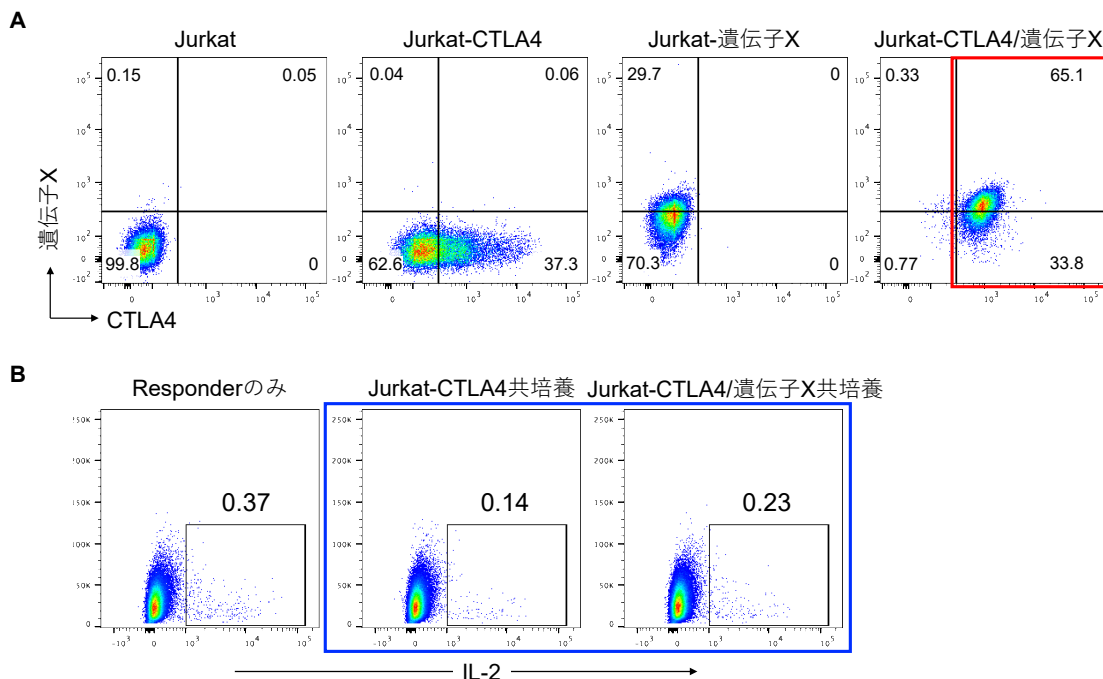


図2.遺伝子XによるCTLA-4発現制御への作用

(A) JurkatにCTLA-4遺伝子および遺伝子Xを強制発現させ、それぞれの遺伝子発現レベルをフローサイトメーターにて解析した。
 (B) JurkatおよびDaudiの共培養時に、各種遺伝子発現Jurkatを共培養させた。培養後、遺伝子導入していないJurkatのIL-2産生をフローサイトメーターにて評価した。

4. 考察

Treg cells の免疫細胞抑制作用は多岐に渡り、その中でも T 細胞の CD28 分子と抗原提示細胞の B7 分子との相互作用による T 細胞活性化に CTLA-4 は関与する (文献 3)。Treg cells は T 細胞サブセットの中でも CTLA-4 を高発現する免疫細胞として知られている。CTLA-4 は CD28 よりも B7 分子との親和性が高いため、CD28 と競合して B7 分子に結合することで、T 細胞の活性化を抑えられていると考えられている。そのため、CTLA-4 が B7 分子と結合するためには細胞表面に発現する必要があるが、CTLA-4 は細胞内外を常に行き来する特殊な分子である (文献 4)。本研究では、先行研究において頭頸部がん組織に浸潤する Treg cells が CTLA-4 を細胞表面に高発現することを見出した経緯から、この Treg cells は CTLA-4 細胞表面発現に寄与する因子を保有しているとの仮説を立て、それを実証するための実験をおこなった。

頭頸部がん組織の Treg cells を回収し、細胞表面 CTLA-4 発現が高い分画と低い分画をセ

ルソーターにて分取し、それぞれの遺伝子発現を RNA sequence にて解析した既存データを再解析した。なお、本研究成果は未発表データであるため具体的な遺伝子名や代謝産物名を伏せている。その結果、細胞表面 CTLA-4 高発現 Treg cells において複数の免疫関連遺伝子の発現レベルが上昇しており、一部の代謝産物においても同じ傾向を示した。また、複数のがん種患者にて実施された腫瘍浸潤リンパ球の single-cell RNA sequence データを統合し、頭頸部がん組織 Treg cells の CTLA-4 発現レベルを評価した。その結果、CTLA-4 高発現細胞に伴い高発現を示す数種の遺伝子を選別できた。これらの結果から、頭頸部がん環境の代謝産物が Treg cells の遺伝子発現を変化させ、CTLA-4 の細胞表面高発現を示す可能性が示唆された。

網羅的遺伝子発現解析データから、CTLA-4 遺伝子と関連性のある遺伝子に着目し、当教室が保有している頭頸部がん患者由来 RNA sequence データと公共の single-cell RNA sequence データの両方で高発現を示した遺伝子 X の作用に注目した。CTLA-4 と遺伝子 X を Jurkat へ共発現させたところ、細胞表面の CTLA-4 発現が高いレベルに維持されていた。また、これらの遺伝子発現 Jurkat が T 細胞の活性化に伴う IL-2 産生を抑制させたことから、遺伝子 X による CTLA-4 の細胞表面高発現作用により CTLA-4 を介する免疫抑制作用が維持される可能性がある。図 2B の結果から、CTLA-4 発現のみと遺伝子 X 共発現 Jurkat を比較した場合、CTLA-4 発現 Jurkat のほうが IL-2 産生をより低下させていた。フローサイトメーター解析による遺伝子 X の CTLA-4 細胞表面高発現作用を加味すると、Jurkat と Daudi の共培養時間を延長させることで遺伝子 X の共発現による免疫抑制作用が高まる可能性がある。

本研究成果から、今後は遺伝子 X による CTLA-4 細胞表面発現作用を分子レベルで解明することを目指している。また、遺伝子 X の発現を制御することで、CTLA-4 の細胞表面発現が変化するか否かを検証していく。将来的には、本研究課題を達成することで、Treg cells を標的とした新しい CTLA-4 制御免疫療法の開発に繋がたいと考えている。

5. 文献

文献 1: Nishikawa H, Koyama S. Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: implications for innovative immune precision therapies. *J Immunother Cancer*, 9(7):e002591, 2021.

文献 2: Matoba T, Imai M, Ohkura N, Kawakita D, Ijichi K, Toyama T, Morita A, Murakami S, Sakaguchi S, Yamazaki S. Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a

proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer*, 144(11):2811-2822, 2019.

文献 3: Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*, 38:541-566, 2020.

文献 4: Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol*, 11(12):852-63 , 2011.