

制御性 T 細胞のがん組織における 活性化プログラムのキーとなる分子を発見 制御性 T 細胞を標的とした新規免疫療法の開発へ

2022 年 10 月 6 日

国立研究開発法人国立がん研究センター
東海国立大学機構名古屋大学

発表のポイント

- 制御性 T 細胞(注 1)は、がんの進展や PD-1/PD-L1 阻害薬の治療抵抗性に関与していることが分かっていますが、がん組織内で活性化する詳細なメカニズムはこれまで分かっていませんでした。
- 本研究では、生検組織などの微量ながん組織を用いて 1 細胞レベルで遺伝子発現とその制御機構を解析する新規手法を開発して、ヒトの血液、正常肺組織、肺がん組織に存在する免疫抑制性の制御性 T 細胞を詳細に解析することに成功しました。
- 転写因子(注 2)の BATF が、肺がん組織内の制御性 T 細胞の遺伝子発現制御機構を再構築することにより、制御性 T 細胞のがん組織に適合して活性化するためのプログラムの中核として働いていることを発見しました。
- 本研究成果により、開発が難しいとされてきた制御性 T 細胞を標的とした新規免疫治療開発につながる事が期待されます。

概要

国立研究開発法人国立がん研究センター(理事長:中釜 斉、東京都中央区、以下国立がん研究センター)と名古屋大学の研究チームは、がんの進展や PD-1/PD-L1 阻害薬の治療抵抗性に関与しているものの、がん組織内での活性化のメカニズム等の詳細が解明されていない制御性 T 細胞について、微量な組織で解析できる新たな手法を開発し、肺がん組織内の制御性 T 細胞を 1 細胞レベルで詳細に解析した結果、がんの組織内の制御性 T 細胞の多様性と、がん組織内で制御性 T 細胞が活性化していくプログラムを解明しました。今後、制御性 T 細胞を標的とした、新規のがん免疫治療の開発につながる事が期待されます。

PD-1/PD-L1(注 3)阻害薬を始めとした免疫チェックポイント阻害薬は、2014 年に悪性黒色腫で保険適用されて以降、肺がんや胃がんなどの多様ながん種の治療に用いられています。一方で、PD-1/PD-L1 阻害薬の治療効果の認められる患者さんは全体の 2 割程度と少なく、治療が奏効しないメカニズムの探求と、そのメカニズムに基づく新たな治療法の開発が求められています。

本研究では、解析が難しいとされてきた生検組織などの微量ながん組織を用いた 1 細胞レベルの解析手法を開発しました。本手法を用いて、血液や正常肺組織、非小細胞肺がんの組織に存在する制御性 T 細胞の網羅的解析を行い、がんの組織に存在する制御性 T 細胞が特徴的なクロマチン(注 4)構造と遺伝子発現制御機構を持っていることを見出しました。さらに、転写因子の BATF が、クロマチン構造をリモデリング(注 5)する機能を介して、がん組織における制御性 T 細胞の活性化プログラムの中核を担っていることを発見しました。

本研究は、国立がん研究センター 研究所 腫瘍免疫研究分野 板橋 耕太 研究員、西川博嘉 分野長(名古屋大学大学院医学系研究科 微生物・免疫学講座 分子細胞免疫学 教授併任)の研究チームで実施しました。研究の一部は小野薬品工業株式会社との共同研究として実施され、研究の一部は MSD 株式会社の支援により実施されました。

本研究成果は、米国科学雑誌「*Science Immunology*」に、2022 年 10 月 7 日に掲載されます。

背景

免疫系は生体内に生じた異常細胞(がん細胞)を異物として認識して、免疫応答を誘導して、攻撃・排除することが知られています。とりわけ CD8 陽性 T 細胞は、がんに対する抗腫瘍免疫応答で主要な役割を担っており、がん細胞に提示されるがん抗原を認識して、がん細胞を攻撃・排除します。しかしながら、免疫抑制的ながん組織では、CD8 陽性 T 細胞は、「疲弊」と呼ばれる状態に陥っており、十分に機能を発揮することができません。CD8 陽性 T 細胞が疲弊するメカニズムに関しては詳しく研究されてきており、PD-1 などの免疫チェックポイント分子と呼ばれる免疫抑制分子が中心的役割を担っていることが明らかになってきています。現在、CD8 陽性 T 細胞の疲弊の解除を目的とした PD-1/PD-L1 阻害薬を始めとした免疫チェックポイント阻害薬の開発が多く進められています。

一方で、がん組織には、抑制性の免疫細胞である制御性 T 細胞が豊富に存在しており、CD8 陽性 T 細胞の働きを妨害することも知られています。本研究チームは、がん組織内で制御性 T 細胞が活性化して増殖し、がんの進展や PD-1/PD-L1 阻害薬の治療抵抗性に関与していることを解明して報告してきました(Saito T, et al. *Nat Med* 2016; Kumagai S, et al. *Nat Immunol* 2020, Sugiyama E, et al. *Sci Immunol* 2020, Kumagai S, et al. *Cancer Cell* 2022)。しかしながら、がん組織における制御性 T 細胞の活性化メカニズム、特に詳細なクロマチンの状態に関しては、多くの点が未解明のままでした。

研究方法

がん組織内の制御性 T 細胞の特徴を明らかにするために、肺がん組織から制御性 T 細胞と制御性 T 細胞以外の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を採取し、ATAC シーケンス(注 6)と RNA シーケンス法を用いて、各々の T 細胞のクロマチンの状態(クロマチンアクセシビリティ:注 7)と遺伝子発現の詳細な解析を実施しました。その結果、肺がん組織内の制御性 T 細胞は、がん組織内の他の T 細胞や肺がん患者の血液中の制御性 T 細胞のいずれとも全く異なるクロマチン構造と遺伝子発現のプロファイル

を有していることが明らかになりました(図 1)。この結果から、がんの微小環境下に適応するために、制御性 T 細胞のクロマチンは特徴的な構造にリモデリングされていることが示唆されました。

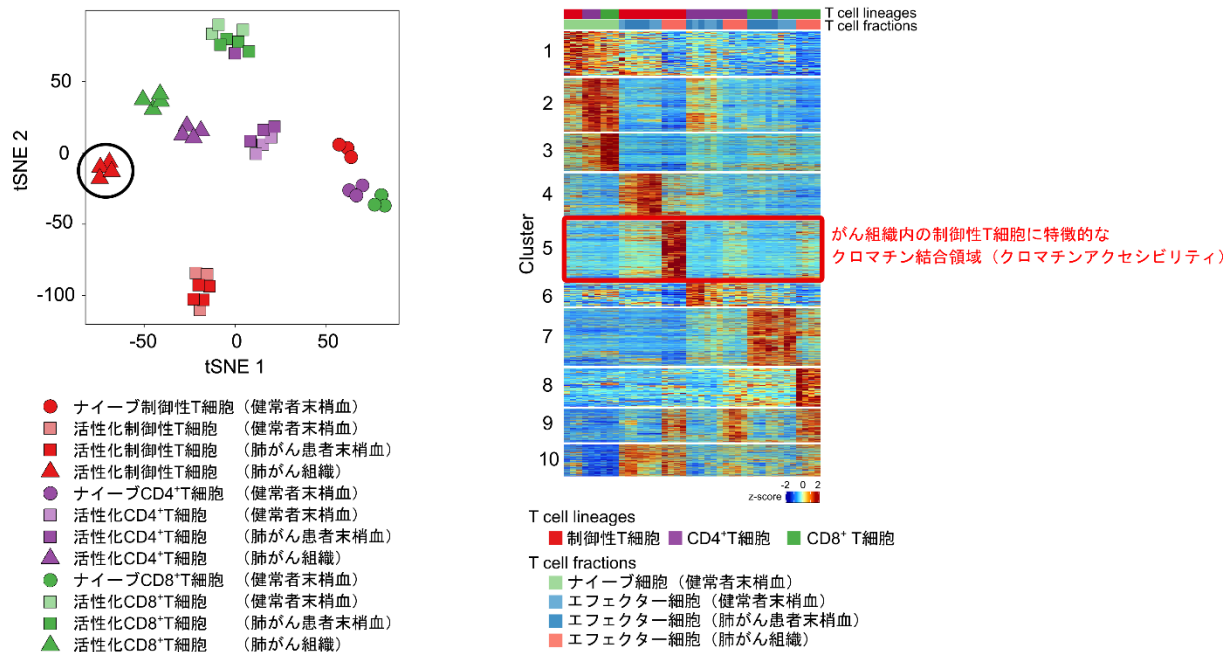


図 1. 各 T 細胞のクロマチンアクセシビリティの評価

血液中やがん組織内の制御性 T 細胞と制御性 T 細胞以外の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を採取し、ATAC シーケンスの解析を行いました。がん組織内の制御性 T 細胞は、他の T 細胞や血液中の制御性 T 細胞と異なるクロマチン(クロマチンアクセシビリティ)の構造を有することが分かりました。

網羅的な解析データから、がん組織内での制御性 T 細胞の分化と活性化のキーとなる分子を探索したところ、転写因子の BATF が候補として同定されました。BATF は、免疫細胞においては Th17 細胞(注 8)で、その結合領域のクロマチンを緩め、他の転写因子などをその結合領域にリクルートする機能を持っていることが知られていました。BATF 発現は、がん組織内の制御性 T 細胞で非常に高いことが示されました(図 2)。さらに BATF の結合するクロマチン領域を検討したところ、がん組織内の制御性 T 細胞では BATF 結合クロマチン領域が緩んでいることが分かりました(図 3)。これらの解析結果から、がん組織内の制御性 T 細胞のクロマチン構造のリモデリングに BATF が関与している可能性が示唆されました。特に BATF がプロモーター/エンハンサー(注 9)に結合してクロマチンアクセシビリティを変化させ、転写が促進される遺伝子には、制御性 T 細胞の抑制活性に重要な CTLA-4 や、がん組織内の制御性 T 細胞に特徴的な分子である CCR8 などが含まれていました。

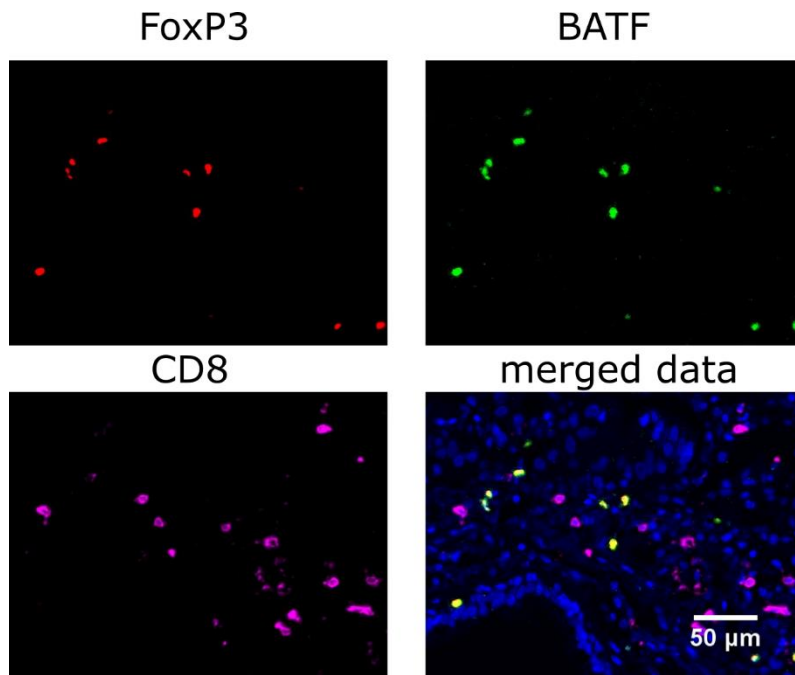


図 2. 多重免疫染色による、がん微小環境の BATF の発現の評価

肺がんの組織の多重免疫染色を実施しました。FoxP3 陽性の制御性 T 細胞で、BATF のタンパク発現が非常に高いことが明らかになりました。

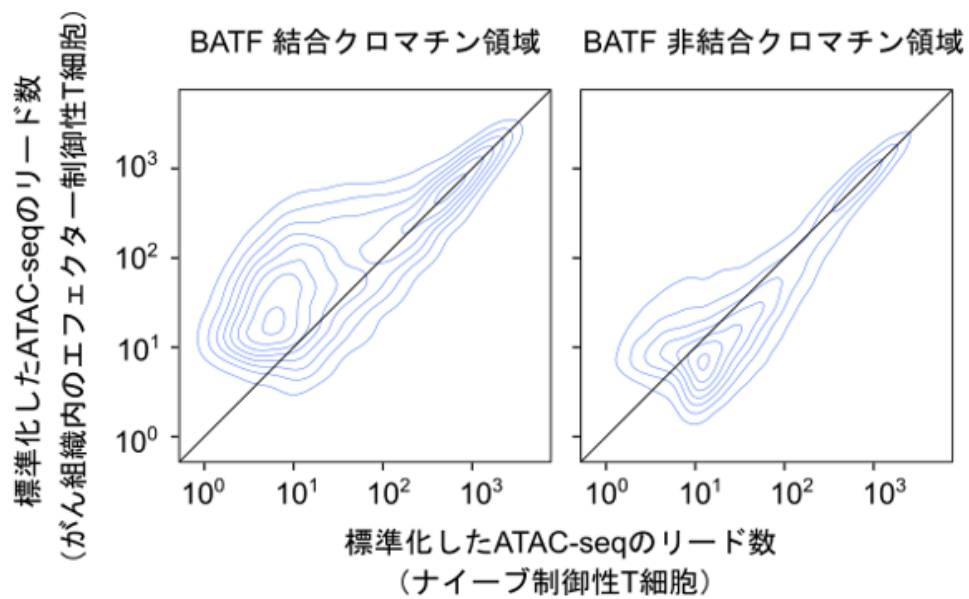


図 3. 制御性 T 細胞における、BATF の結合とクロマチンアクセシビリティの関連

BATF の結合によって、がん組織内の制御性 T 細胞のクロマチンアクセシビリティが上昇することが示唆されました。

次に、シングル RNA シーケンスとシングルセル ATAC シーケンス手法を用いて、血液、正常肺組織、がん組織内の制御性 T 細胞の 1 細胞解析(注 10)を実施しました。シングルセルシーケンスで得られたデータを用いて制御性 T 細胞のクラスタリング(注 11)を行い、その結果を次元圧縮法[Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)]を用いて、二次元上に描出しました(図 4)。その結果、がん組織内の制御性 T 細胞は、複数の特徴的な制御性 T 細胞集団に分類することができ、多様な細胞集団の集合であることが明らかになりました。擬似時間解析(注 12)を用いて、ナイーブ制御性 T 細胞からがん組織内で最も活性化している制御性 T 細胞への擬似的な時間軸を作成し、制御性 T 細胞の分化における転写因子の発現変動を解析しました。すると、制御性 T 細胞の活性化に寄与することが報告されている他の転写因子と比較して、制御性 T 細胞の活性化の早期から転写因子 BATF の発現上昇が認められました。以上より、がん組織内の制御性 T 細胞の分化で BATF が早期相から働いていると考えられました。

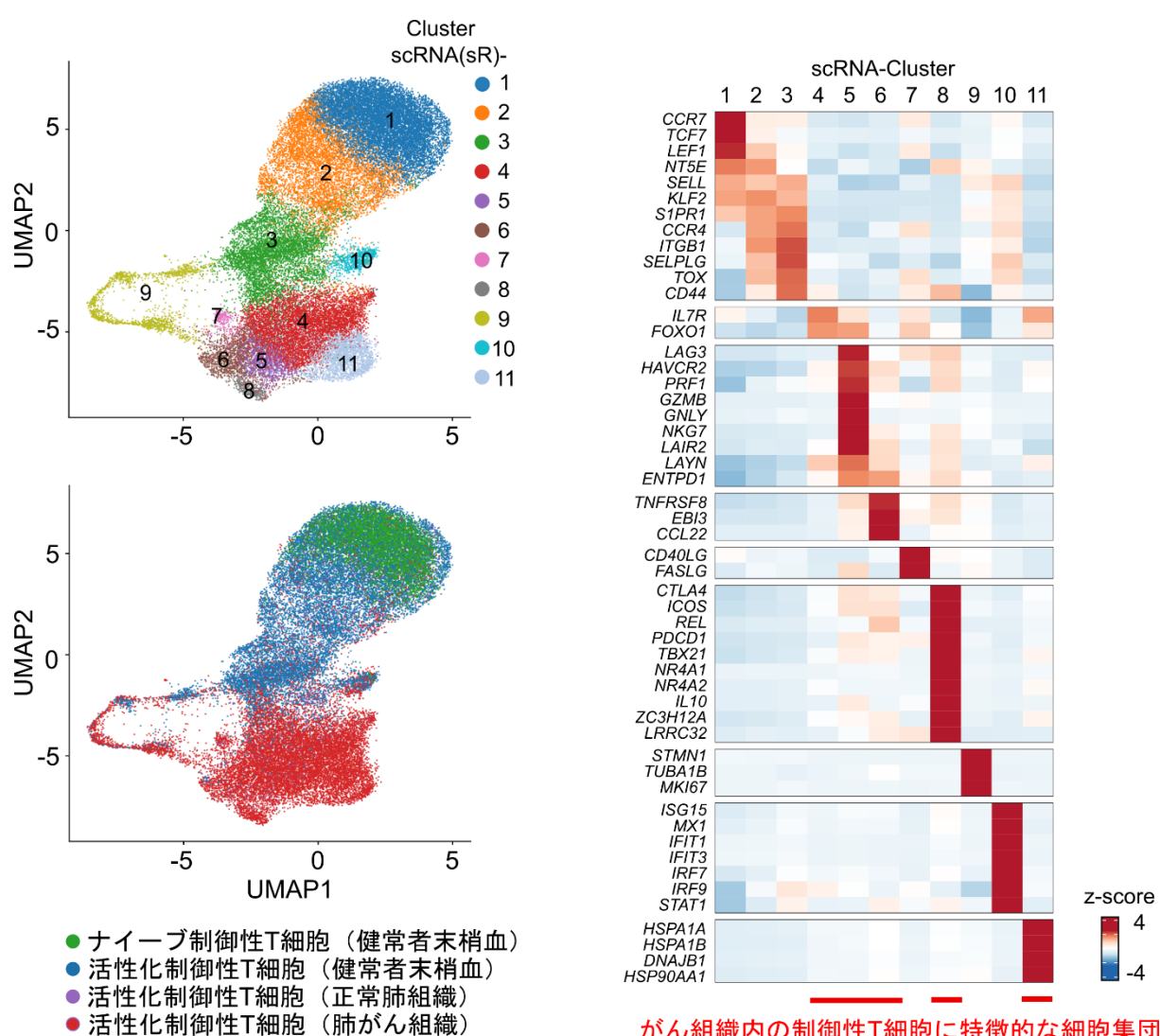


図 4. 制御性 T 細胞のシングルセル RNA シーケンス

血液、正常肺組織、肺がん組織内の制御性 T 細胞のシングルセル RNA シーケンスを実施し、その遺伝子発現のプロファイルから、がん組織内の制御性 T 細胞がさらに細分化できることを見出しました

BATF の制御性 T 細胞活性化における重要性が示されたことから、BATF 遺伝子をノックアウト(注 13)したマウスを用いて、がん組織内の制御性 T 細胞における BATF の機能をさらに検討しました。BATF 遺伝子のノックアウトによって、マウスのがん組織中の制御性 T 細胞の数や、制御性 T 細胞 /CD8 陽性 T 細胞の比は著減し(図 5)、その抑制活性も有意に低下しました。さらに、*Ctla4*、*Icos*、*Ii10*、*Ccr8*、*Tnfrsf8* を始めとして、がん組織内の制御性 T 細胞で特に発現が上昇している遺伝子の特徴的なオープンクロマチン領域が、BATF のノックアウトによって失われることが明らかになりました。以上より、BATF は、がん組織内で制御性 T 細胞がその特徴的なクロマチン構造を構築し、増殖、活性化するために必須であることが解明されました。最後に、制御性 T 細胞のみで BATF の発現がノックアウトされるコンディショナルノックアウトマウス(注 14)の *Batf^{fl/fl} Foxp3^{EGFP-cre-ERT2}* マウスを作成して、がん細胞の増殖への影響を検討しました。制御性 T 細胞特異的に BATF がノックアウトされたマウスでは、がんの増殖が著明に低下し(図 6)、がん組織内で制御性 T 細胞が十分に活性化して抗腫瘍免疫応答を抑制するためには、BATF が必須であることが証明され、制御性 T 細胞を標的としたがん免疫療法の新たな可能性が示されました。

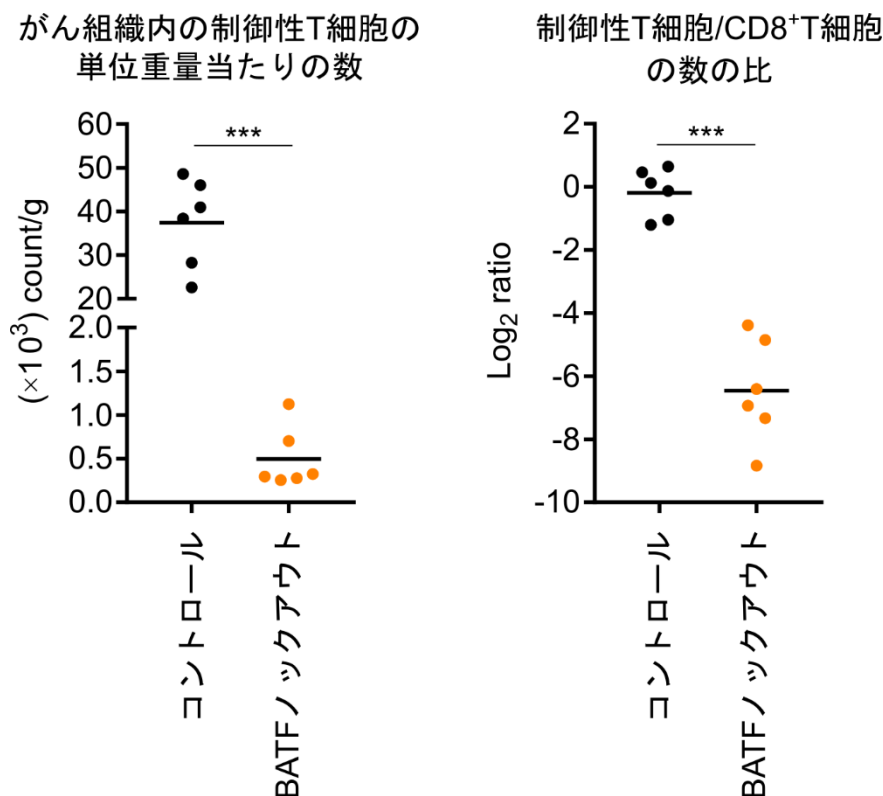


図 5. BATF ノックアウトの、がん組織内の制御性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞に与える影響の評価

BATF ノックアウトマウスにがん細胞を皮下移植して、がん浸潤する免疫細胞を評価した所、制御性 T 細胞が著減することが確認されました。

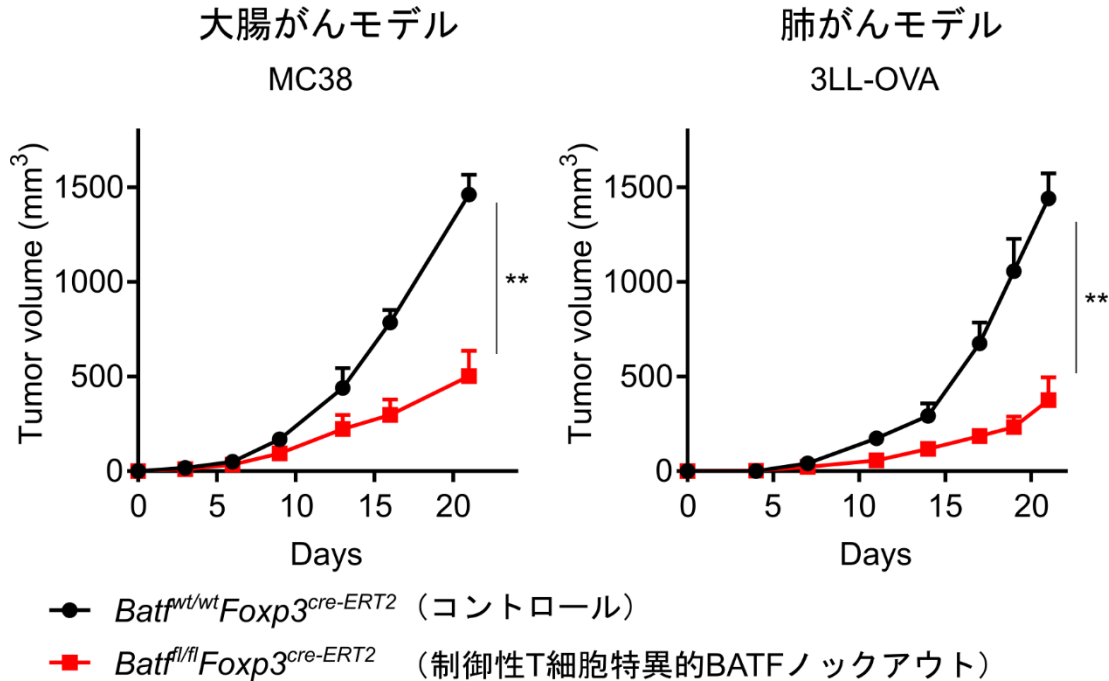


図 6. 制御性 T 細胞特異的な BATF のノックアウトの腫瘍増殖への影響

タモキシフェンという薬剤を投与すると、制御性 T 細胞で特異的に BATF をノックアウトできるコンディショナルノックアウトマウスを作成しました。制御性 T 細胞特異的に BATF をノックアウトすることにより、がん局所の抗腫瘍免疫応答が回復し、がんの増殖が抑制されました。

展望

本研究では、転写因子の BATF が、がん組織内の制御性 T 細胞のクロマチンのリモデリングに重要であり、制御性 T 細胞の活性化プログラムのコアを担っていることを発見しました。血液、正常組織、がん組織内の制御性 T 細胞を詳細に解析して得られた結果は、がん組織内の制御性 T 細胞を標的とする免疫治療開発のみならず、制御性 T 細胞が発症に関わる自己免疫性疾患の理解などを始めとして、様々な医学研究に応用されることが期待されます。

発表論文

雑誌名: *Science Immunology*

タイトル: BATF epigenetically and transcriptionally controls the activation program of regulatory T cells in human tumors

著者: Kota Itahashi¹, Takuma Irie¹, Junichiro Yuda^{1,2}, Shogo Kumagai^{1,3}, Tokiyoshi Tanegashima¹, Yi-Tzu Lin^{1,3}, Sho Watanabe¹, Yasushi Goto⁴, Jun Suzuki⁵, Keiju Aokage⁵, Masahiro Tsuboi⁵, Yosuke Minami², Genichiro Ishii⁶, Yuichiro Ohe⁴, Wataru Ise^{7,8}, Tomohiro Kurosaki^{8,9,10}, Yutaka Suzuki¹¹, Shohei Koyama¹, and Hiroyoshi Nishikawa^{1,3}

所属: ¹Division of Cancer Immunology, Research Institute/Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center (EPOC), National Cancer Center, Tokyo 104-0045/Chiba 277-8577, Japan, ²Department

of Hematology, National Cancer Center Hospital East, Chiba 277-8577, Japan, 3Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan, 4Department of Thoracic Oncology, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan, 5Department of Thoracic Surgery, National Cancer Center Hospital East, Chiba 277-8577, Japan, 6Division of Pathology, National Cancer Center Hospital East, Chiba 277-8577, Japan, 7Regulation of host defense team, Division of Microbiology and Immunology, Center for Infectious Disease Education and Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan, 8Laboratory of Lymphocyte Differentiation, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan, 9 Division of Microbiology and Immunology, Center for Infectious Disease Education and Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan, 10 Laboratory for Lymphocyte Differentiation, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS), Kanagawa 230-0045, Japan, 11Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Chiba 277-8562, Japan.

掲載日: 2022 年 10 月 7 日

DOI: 10.1126/sciimmunol.abk0957.

研究費

文部科学省

科学研究費助成事業 基盤研究(S)

「発がんの人種差と免疫応答の関わり」の解明」

科学研究費助成事業 基盤研究(A)

「がん組織の空間的マルチスケール解析による免疫監視と免疫寛容制御機構の解明」

国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)

次世代がん医療創生研究事業

「がん細胞および免疫応答解析に基づくがん免疫療法効果予測診断法の確立」

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業

「患者層別化マーカー探索技術の開発/がん免疫モニタリングによる患者層別化を行う基盤技術の開発」

革新的先端研究開発支援事業

「腸内細菌叢のがん免疫応答への関わり」の解明によるがん治療への展開」

次世代がん医療加速化研究事業

「腫瘍浸潤細胞の時間的空間的変化に基づく免疫抑制機構の解明と治療への展開」

国立がん研究センターがん研究開発費

28-A-7「先端的がん免疫モニタリング法開発体制に関する研究」

31-A-7「がん免疫療法抵抗性を解除する新規治療法の臨床展開に向けた開発研究」

用語解説

注 1) 制御性 T 細胞:

制御性 T 細胞は、CD4 陽性 T 細胞の一種で、転写因子の FoxP3 がマスターレギュレーターとして知られています。本来は、自己に対する免疫応答を抑制(免疫寛容)し、自己免疫疾患などにならないように働いています。がんにおいては、がんを攻撃する免疫細胞の働きを阻害することで、がんに対する免疫応答を抑制しています。

注 2) 転写因子:

特定の DNA 配列に結合して、遺伝子の発現を制御するタンパク質。T 細胞の分化の運命決定にも寄与することがあります。

注 3) PD-1/PD-L1 阻害薬:

PD-1 は免疫細胞上に発現する免疫チェックポイント分子であり、樹状細胞やがん細胞に発現する PD-L1 や PD-L2 と結合することで、免疫細胞の働きを抑制します。PD-1/PD-L1 阻害薬治療により PD-1 が PD-L1 と結合しなくなることで、免疫細胞が本来の働きを取り戻し、がん細胞を攻撃するようになると考えられています。

注 4) クロマチン:

細胞核内の、ヒストンなどの様々なタンパク質と DNA の複合体。

注 5) (クロマチン)リモデリング

クロマチン構造が変化すること。

注 6) ATAC シーケンス:

高活性改変型 Tn5 transposase がアクセスできるゲノム領域を選択的に濃縮、シーケンスをすることで、ゲノムワイドにクロマチンアクセシビリティを評価する手法。

注 7) クロマチンアクセシビリティ:

クロマチンへの転写因子や DNA 結合タンパク質のアクセスしやすさ。クロマチンアクセシビリティが高い場合、転写因子などが DNA に結合しやすい。

注 8) Th17 細胞:

サイトカインの IL-17 を主に産生する CD4 陽性ヘルパーT 細胞。

注 9) プロモーター/エンハンサー

遺伝子の発現を制御するゲノム領域。プロモーターは遺伝子上流に位置し、転写開始複合体が結合して転写が開始されるゲノム領域。エンハンサーはプロモーターに働きかけて、遺伝子の発現を調節するゲノム領域。

注 10) 1 細胞解析:

個々の細胞レベルで解析をすること。1 細胞 RNA シーケンスと 1 細胞 ATAC シーケンスでは、メッセンジャーRNA の発現とクロマチンアクセシビリティを、個々の細胞で評価・解析することで、細胞の多様性の解明や分化追跡などが可能となります。

注 11) クラスタリング:

類似性の高いデータをグループ化する手法。

注 12) 擬似時間解析:

遺伝子発現やクロマチンアクセシビリティなどのパターンから、擬似的な時間軸を設定し、細胞分化の軌跡を推測する方法。

注 13) ノックアウトマウス:

遺伝子操作によって、特定の遺伝子を破壊し、その遺伝子の働きをなくした(ノックアウト)マウスのこと。

注 14) コンディショナルノックアウトマウス:

特定の遺伝子を発現する細胞でのみ標的遺伝子のノックアウトを起こすことができる。今回は、タモキシフェン投与時に FoxP3 発現細胞でのみ BATF 遺伝子がノックアウトされるマウスを作成しました。

問い合わせ先

- 研究に関する問い合わせ(広報窓口)
国立研究開発法人国立がん研究センター
企画戦略局 広報企画室
電話番号:03-3542-2511(代表)
Eメール:ncc-admin@ncc.go.jp
名古屋大学医学部・医学系研究科 総務課総務係
電話番号:052-744-2804
Eメール:iga-sous@adm.nagoya-u.ac.jp
- AMED 事業に関すること
日本医療研究開発機構(AMED)
次世代がん医療創生研究事業(P-PROMOTE)
創薬事業部 医薬品研究開発課
Eメール: jisedaigan@amed.go.jp