

エピジェネティクス修飾による抗腫瘍免疫の増強

古澤之裕

富山県立大学 教養教育生物学

【研究の背景】

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への転換が進み、特に免疫チェックポイントを標的としたがん免疫療法が注目を集めている。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）を活性化する手法である。免疫チェックポイント分子を標的とした抗体医薬品の代表的なものに、抗PD-1抗体が知られており、がん治療法として臨床応用に至っているものもある。

がん細胞は、細胞膜表面のPD-L1と、受容体であるエフェクター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、平時は生体内での過剰な免疫応答を抑制することで、生体の恒常性の維持に寄与しているが、生体にとって必要な免疫応答を抑制してしまい、疾患の増悪に至るケースがある。その典型的な例が「がん」であり、がん組織は自身の周囲にTregを誘導する環境を作りだし、エフェクターT細胞の機能を抑制することで、自身に対する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以外に、Tregを抑制することで抗腫瘍免疫を増強することが期待される。

【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。

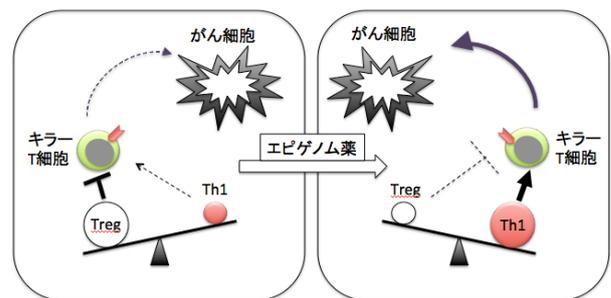


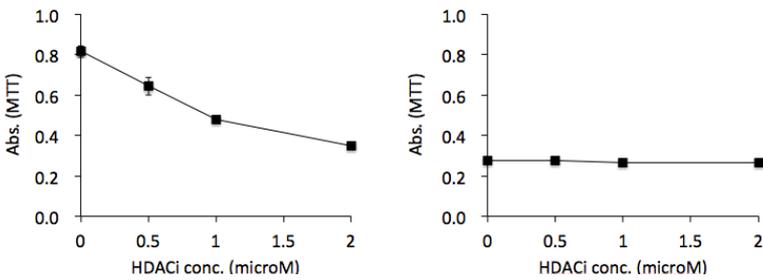
図1. エピゲノム薬によるがん免疫増強のモデル図。エピゲノム薬には、Th1/TregバランスをTh1側に傾け、抗腫瘍免疫を増強する可能性がある。

【方 法】

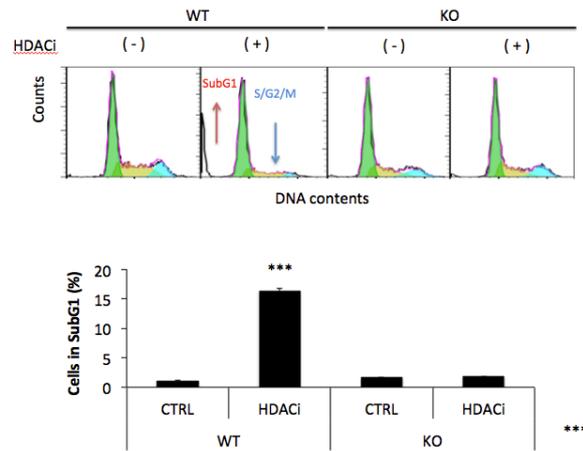
腫瘍に対する直接的な HDAC 阻害剤の効果を消失させるため、まず HDAC 阻害剤の主要な標的となる HDAC1 および HDAC2 を欠損する細胞の作成を試みた。細胞には B16F10 細胞を用い、*Hdac1* および *Hdac2* 遺伝子欠損株作成には CRISPR-Cas9 を用いた。作成した細胞の *in vitro* における細胞増殖は MTT 法にて評価し、細胞死は SubG1 期の細胞の割合を元に評価した。細胞は C57BL6/J に移植後、HDAC 阻害剤を投与し腫瘍径の評価および Treg の割合を解析した。

【結 果】

HDAC1 および HDAC2 を同時欠損しようとした場合、両分子を欠損した細胞のクローンが全く得られなかった。そこで、まず HDAC1 欠損クローンを樹立し、そこから HDAC2 に対する gRNA と Cas9 を発現するベクターを導入することで、HDAC1/2 を同時欠損する B16F10 クローン (dKO) を樹立した。野性型 B16F10 細胞では HDAC 阻害剤に高感受性であり、2 microM 処理により生細胞数の著しい減少と SubG1 期細胞の割合の増加を認めたが、dKO クローンでは全く認められなかったことから、機能的な HDAC1/2 は dKO クローンで欠失していることが確認できた。



↑ 図 2. HDAC 阻害薬処理が生細胞数に与える影響。左は野性型、右は dKO を表す



→ 図 3. HDAC 阻害薬処理による細胞死への影響。

dKO クローンをマウスに移植し 200 mm³ 程度の腫瘍を形成後、HDAC 阻害剤を投与することにより T 細胞における Treg の割合が減少し、投与 4 日目から有意な腫瘍の成長抑制効果が認められた (図 4)。

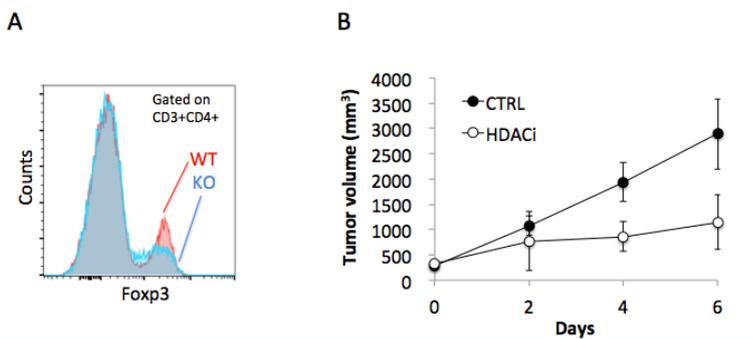


図 4. (A) HDAC 阻害薬投与による Treg の割合の減少。(B) HDAC 阻害薬投与による腫瘍の成長抑制。

【考 察】

本研究結果から、今回使用した HDAC 阻害剤には Treg 抑制を介することで腫瘍を抑制する効果がある可能性が示された。一方、がん細胞ではなく宿主側の HDAC コンディショナルノックアウトマウスでの解析にまだ着手できていないことに加え、T 細胞欠損マウスにおける HDAC 阻害作用の検討も進める必要がある。HDAC アイソザイムによる遺伝子発現制御機構の解明も含め課題は山積みではあるが、今後も継続してエピジェネティクス修飾による抗腫瘍免疫作用の増強について研究を継続していく。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

HDAC1 や HDAC2 は正常細胞に比べ腫瘍での発現が高いことから、これまで HDAC を標的とする低分子阻害剤は抗がん剤として臨床で開発されてきた経緯がある。一方で、腫瘍単独に対する HDAC 阻害の影響は多数報告があるものの、HDAC 阻害剤が腫瘍免疫に与える影響についての報告は限定的であった。本研究結果より、ある種の HDAC 阻害剤には抗腫瘍免疫を増強する作用があることがわかり、現在臨床で良好な成績をあげている免疫チェックポイント阻害療法との併用による腫瘍抑制効果の増強が期待できるかもしれない。本研究は、臨床における HDAC 阻害剤の新たな応用についての可能性を示すものであると考えられる。