

2020年9月14日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
慶應義塾大学医学部

悪性リンパ腫が免疫に対する抵抗性を獲得する仕組みを解明

研究成果のポイント

1. 悪性リンパ腫である「バーキットリンパ腫」や「びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫」の発症と進行において、リンパ腫細胞が免疫システムに対する抵抗性を獲得する仕組みを明らかにしました。
2. 高分化型 B 細胞リンパ腫のマウスモデルを新たに開発し、アポトーシス（細胞死）誘導分子 Fas の発現低下とアポトーシス阻害分子 Livin の高発現が、がんに対する免疫抵抗性に重要な役割を担っていることが分かりました。
3. Fas 誘導アポトーシスの再活性化と、Livin 分子の阻害による免疫抵抗性の打破が、予後不良の悪性リンパ腫の有望な治療法となると考えられます。

国立大学法人筑波大学 プレシジョン・メディスン開発研究センターの杉原英志准教授は、慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所の佐谷秀行教授らとの共同研究により、悪性リンパ腫ががん免疫に対する抵抗性を獲得する仕組みを明らかにしました。

本研究グループはこれまでに、生体外でマウス体細胞を培養し、がん関連遺伝子を導入後、マウスへ移植することで、白血病や骨肉腫をはじめとする様々な発がんマウスモデルを開発してきました。本研究では、同様の方法では樹立が難しかった、高分化型B細胞由来のリンパ腫の新たなマウスモデルの開発に成功し、発症の過程を分子レベルで解析しました。その結果、アポトーシスによる細胞死を誘導する細胞膜分子Fasの発現低下が、リンパ腫の発症と維持にきわめて重要であることを明らかにしました。また、B細胞の分化に関わる分子CD40をリンパ腫細胞で活性化すると、Fasの発現が回復することを見出しました。一方、ヒトリンパ腫の一部の細胞株ではアポトーシス阻害分子Livinが高発現しており、Fasを再活性化してもアポトーシスに抵抗性を示すことが分かりました。さらに遺伝子発現プロファイル解析により、悪性リンパ腫のバーキットリンパ腫、および、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の患者において、Fas低発現とLivinの高発現が予後不良と強い相関性を示すことを見出しました。そこでLivinを標的とした阻害剤を用いてLivin高発現リンパ腫細胞に投与し、Fas誘導アポトーシスが有意に増加することを、ヒト細胞株及びマウスモデルを用いて確認しました。

以上の結果から、Livinを標的とした治療法は、Fas誘導アポトーシスによるがん免疫の効果を高める、非常に有望な治療法となり得ることが明らかになりました。また、Fasリガンドを介したFas誘導アポトーシスは、現在、がん免疫療法で中心的な役割を担う、細胞傷害性T細胞の攻撃手段の一つであり、今回の発見は、リンパ腫に限らず広範ながん種に対するがん免疫抵抗性の仕組みの解明につながると期待されます。

本研究の成果は2020年9月14日付「Cancer Research」誌で公開されました。

- * 本研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金：基盤C（#15K06840・杉原）、挑戦的萌芽（#15K14384・佐谷、杉原）によって実施されました。

研究の背景

近年、がんに対する新しい治療法として開発された免疫チェックポイント阻害剤^{注1)}による免疫療法は、悪性黒色腫や肺がんをはじめ多くのがんで有効で、手術療法、放射線療法、化学療法に続く「第4の治療法」として大きな期待を受けています。一方、最近、この免疫療法に対して抵抗性を持つがんが存在することも報告されています。免疫療法では、がんの抗原を認識する活性化した T 細胞が、様々な方法でがん細胞を攻撃し、最終的に細胞を溶解したり、アポトーシス^{注2)}を誘導します。この攻撃方法の一つが、細胞傷害性 T 細胞の Fas リガンドを介した Fas 誘導アポトーシスです (図 1)。がん細胞に発現した細胞膜分子の Fas は、Fas リガンドと結合すると 3 量体を形成して DISC と呼ばれる複合体をつくり、その後、システインプロテアーゼ Caspase-3、Caspase-8 と活性化することで、アポトーシスを誘導します。しかし、Fas を発現したがん細胞が生体内でがん免疫の攻撃に対してどのように抵抗性を示すのか、その詳細な仕組みはほとんど分かっていませんでした。

本研究グループはこれまで、マウスの様々な臓器由来の幹細胞や前駆細胞を一時的に生体外で培養し、がん関連遺伝子を導入後に同種マウスへ移植することで、骨肉腫、脳腫瘍、急性白血病など様々な発がんマウスモデルを構築し、解析してきました^{参考文献1-3}。これらのマウスモデルは、正常な免疫システムをもつマウスを用いているため、がんが発症・進展する過程でどのように免疫細胞が働くのか、さらにがん細胞がいかに免疫システムに対して抵抗性を獲得するのか、詳細な分子メカニズムの解析が可能であるという特徴があります。

近年の薬剤開発によって、悪性リンパ腫の治療成績に改善がみられるものの、一部の患者では治療抵抗性が報告されています。そこで本研究では、この治療抵抗性が、がん免疫抵抗性に起因する可能性があると考え、血液腫瘍の中で最も頻度が高いリンパ腫のうち、バーキットリンパ腫やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫といった、進行の速い悪性リンパ腫について、がん免疫抵抗性を調べました。

研究内容と成果

本研究グループは、これまで開発してきた発がんマウスモデルのシステムを応用し、高分化型 B 細胞リンパ腫モデルの開発を行いました。まず、生体外で脾臓由来のリンパ腫の起源となる B 細胞を培養し、発がん遺伝子 MYC を導入後、マウスの腹腔内への移植を行いました (図 2A)。その結果、がん抑制遺伝子 Cdkn2a が欠損したマウス由来の B 細胞から、およそ 60%の割合で、2 か月間でリンパ腫が形成することが分かりました。また組織学的には、ヒトバーキットリンパ腫に類似した進行の速い高分化型 B 細胞リンパ腫であることが分かりました (図 2B)。さらにリンパ腫の細胞表面分子を解析したところ、移植前の B 細胞で高発現していたアポトーシス誘導分子である Fas が、リンパ腫では全く発現していないことを見出しました (図 2C)。そこで、移植前の B 細胞の Fas を shRNA^{注3)}にて発現抑制し、移植後にリンパ腫形成における影響を観察しました。その結果、100%の割合で、2 か月よりも早期にリンパ腫が形成することが分かりました。形成したリンパ腫に Fas を遺伝子導入し、発現を戻すと、Fas リガンド処理によりアポトーシスが誘導され、これを再び移植すると生存期間の延長が見られました。これらの結果から、Fas の発現低下はリンパ腫の発症と維持にきわめて重要であることが示されました。

次に、リンパ腫の発症過程で Fas の発現が低下する仕組みを調べたところ、膜タンパク分子 CD40 の機能低下によるものであることが分かりました。リンパ腫細胞に対して CD40 抗体または CD40 リガンド処理により CD40 シグナルを活性化させると、Fas 発現が再度回復しました。また、ヒトバーキットリンパ腫とびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の細胞株における Fas 発現について調べると、マウスリンパ腫と同様に、多くの細胞株で Fas が低発現であることが分かりました。興味深いことに、CD40 リガンドにより CD40 シグナルを活性化させたところ、全ての細胞株で Fas 発現の回復がみられたものの、半数

の細胞株は Fas 誘導アポトーシスに抵抗性を示すことが分かりました。そこで、アポトーシスに抵抗性を持つ分子群のタンパク質発現を解析した結果、IAP (inhibitor of apoptosis protein)ファミリー^{注4)}の一つである Livin 分子が、Fas 誘導アポトーシスに抵抗性を持つ細胞株に唯一共通して高発現していることを見出しました (図3)。さらに NCBI (アメリカ国立生物工学情報センター) に登録されている公共データを使用して、遺伝子発現プロファイル解析を実施しました。その結果、ヒトバーキットリンパ腫とびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫患者において Livin 高発現は予後不良の患者と有意に相関していました (図4A)。また Fas と Livin 発現での相関についても解析し、Livin 高発現と Fas 低発現のリンパ腫患者は、最も生存期間が短く、予後不良を示すことが分かりました (図4B)。

Livin の発現がどのように制御されているのかを調べるため、がんで重要なシグナル伝達経路の阻害剤などを用いて上流分子の検討を実施しました。その結果、転写を促進する機能をもつ BET ファミリータンパク質を阻害すると、Livin 発現が低下しました。BET ファミリータンパク質は、ゲノム上のエンハンサーやプロモーター領域のアセチル化ヒストンと結合するエピジェネティクス^{注5)}に関わっています。このファミリータンパク質は BRD4, BRD3, BRD2 などが知られており、どの分子が Livin 発現に重要か明らかにするため、shRNA によって各々の発現抑制実験を実施したところ、BRD4 と BRD2 の発現抑制によって Livin の発現が低下することが分かりました。さらにクロマチン免疫沈降法^{注6)}により、実際に両分子が Livin のプロモーター・エンハンサー領域と結合していることも確認しました。これらの結果から、Livin は BET ファミリータンパク質によって発現が制御されており、悪性化の過程でエピジェネティクスの変化により発現することが示唆されました。

さらに、Livin の発現を抑制することで Fas 誘導アポトーシスがリンパ腫細胞で起こるのかどうか、shRNA 及び Livin 阻害剤 BV6 を用いて検討しました。その結果、Livin の抑制により CD40 シグナル活性化による Fas 誘導アポトーシスが有意に生じることが分かりました。また、Livin を発現したマウスリンパ腫細胞を移植し、BV6 を投与したところ、BV6 の隔日投与によりマウスの生存時間が延長しました。つまり、生体内でも Livin の抑制は Fas 誘導アポトーシスの抵抗性を打破し、リンパ腫を細胞死に導くことが示されました。

以上のことから、MYC の過剰発現などの発がんイベントに加え、Fas の発現が低下した B 細胞が CD8 陽性 T 細胞など細胞障害性細胞による Fas 誘導アポトーシスから逃れることで、リンパ腫が発症することが分かりました (図5)。また、エピジェネティクスの変化により BRD4 及び BRD2 が Livin 発現を増加させることで、リンパ腫細胞はさらに Fas 誘導アポトーシスの抵抗性を獲得し、悪性リンパ腫の難治性を高めていることが分かりました。

今後の展開

本研究により、予後不良の悪性リンパ腫における免疫システムに対する抵抗性獲得の仕組みが明らかになりました。Fas リガンドを介した Fas 誘導アポトーシスは、がん免疫療法において、細胞障害性 T 細胞によるがん免疫の攻撃手段の一つであり、本成果は、免疫チェックポイント阻害剤への抵抗性をもつ他臓器のがんにおいても重要な知見となる可能性があります。Livin の阻害剤や BET ファミリータンパク質の阻害剤は、現在臨床試験が行われており、本研究の結果を踏まえ、悪性リンパ腫の免疫抵抗性への新たな治療手段としての応用・展開が期待されます。

参考図

図1. Fasリガンドを介したFas誘導アポトーシス模式図

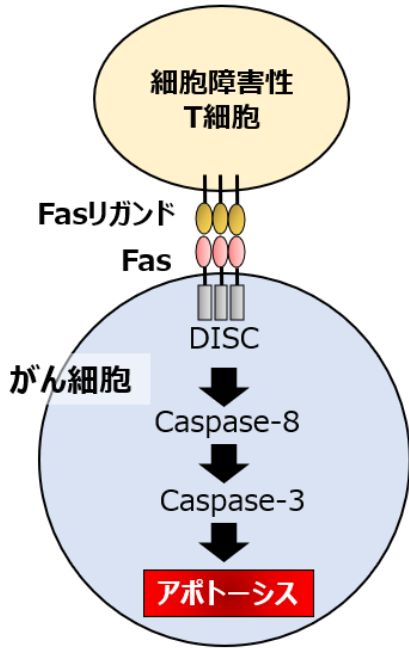


図2. 新規B細胞リンパ腫モデルとFas発現

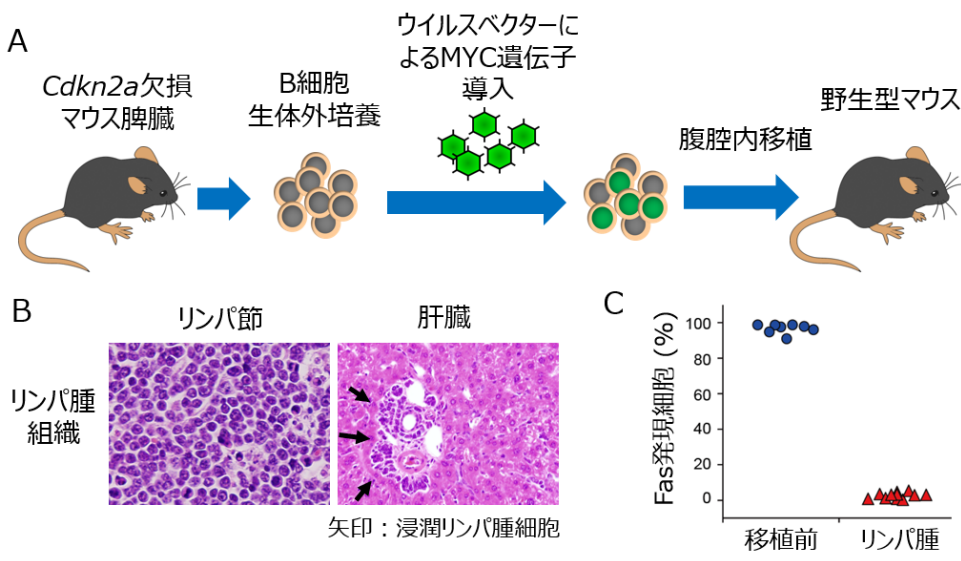
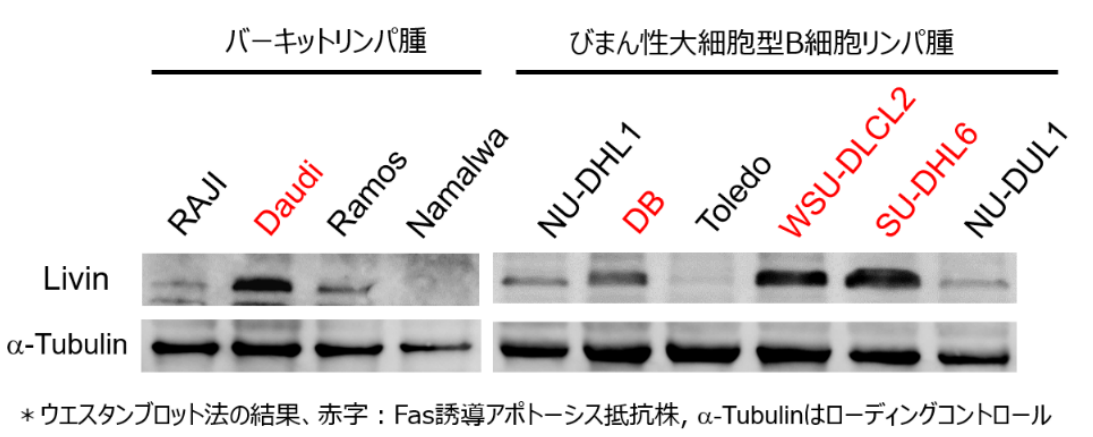
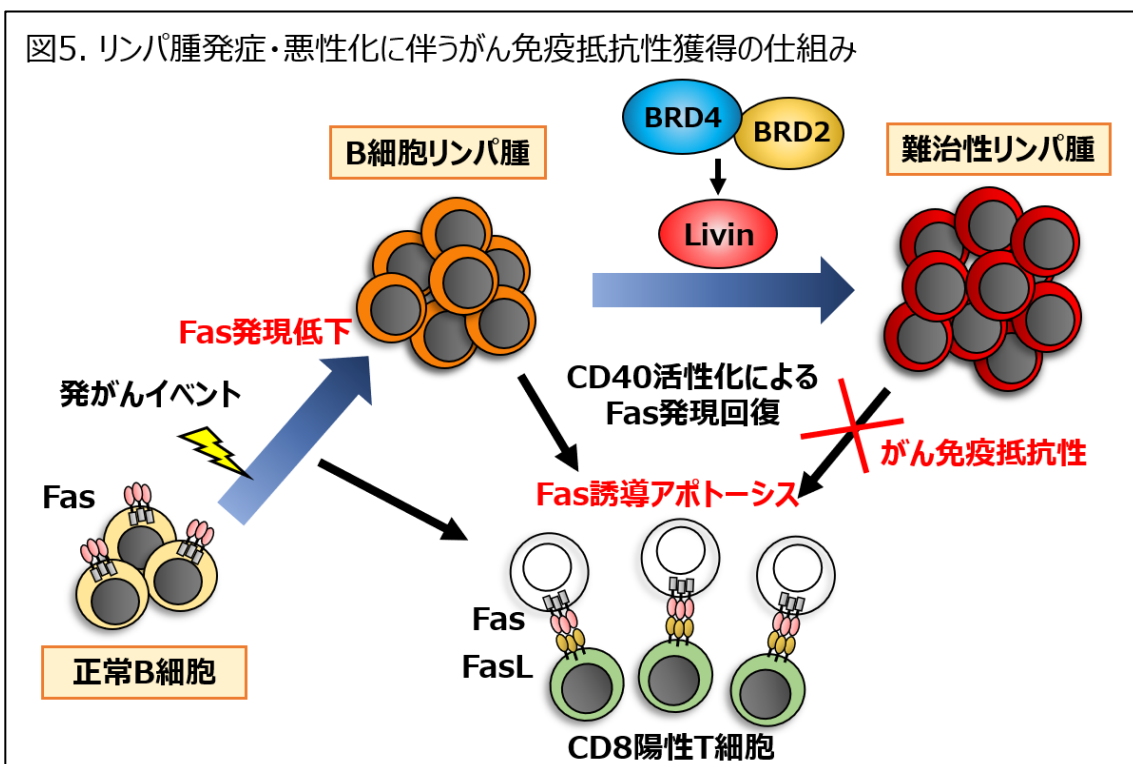
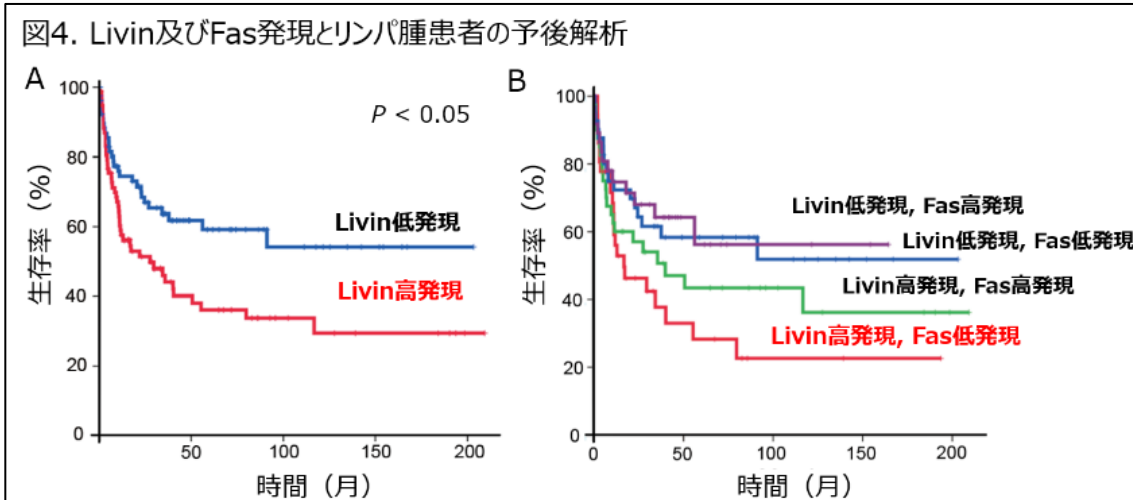


図3. ヒトリンパ腫細胞株とLivinタンパク質発現





用語解説

注1) 免疫チェックポイント阻害剤

人体にはがん細胞を攻撃する免疫機能が備わっているが、がん細胞はこの免疫からの攻撃をブロックすることで自身を守っている。このブロックを解除し、免疫を活性化する薬剤が免疫チェックポイント阻害剤で、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体が知られている。

注2) アポトーシス

管理・調節された細胞の能動的な死。システインプロテアーゼ caspase によるタンパク質分解を介して起こる。

注3) shRNA (Short hairpin RNA)

RNA 干渉による遺伝子発現抑制に用いられる RNA 配列。細胞内で shRNA を発現させるとヘアピン構造を形成し、プロセッシングを受けて siRNA (short interference RNA) となる。この siRNA は RNA 干渉 (二本鎖 RNA と相補的な塩基配列をもつ mRNA が分解される現象) によって目的遺伝子の発現を抑制する。

注4) IAP (inhibitor of apoptosis protein) ファミリー

BIR (baculovirus IAP repeat) ドメインを共通して持ち、活性化型 caspase と結合し、不活性化することによりアポトーシスを抑制するタンパク質。cIAP1/2, XIAP, Survivin, Livin などが知られている。

注5) エピジェネティクス

DNA 塩基配列の変化を伴わない細胞分裂後も継承される遺伝子発現、あるいは細胞表現型の変化の仕組みのこと。DNA メチル化とヒストンのメチル化やアセチル化等の修飾による遺伝子発現調節などが知られている。

注6) クロマチン免疫沈降法

DNA と DNA 結合タンパク質の複合体 (クロマチン) をホルムアルデヒドにより架橋し、切断後に目的のタンパク質に対する抗体を使用して、どの DNA 領域に目的タンパク質が結合したのか、PCR 法やシーケンス解析にて調べる方法。

参考文献

1. Shimizu T, et al. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene*, 29:5687-5699, 2010.
2. Sampetean O, et al. Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia*, 13:784-791, 2011.
3. Sugihara E, et al. Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene*, 31:2849-2861, 2012.

掲載論文

- 【題名】 The inhibitor of apoptosis protein Livin confers resistance to Fas-mediated immune cytotoxicity in refractory lymphoma
(IAP タンパク質 Livin は難治性リンパ腫における Fas を介した免疫細胞障害に対する抵抗性をもたらす)
- 【著者名】 Sugihara E, Hashimoto N, Osuka S, Shimizu T, Ueno S, Okazaki S, Yaguchi T, Kawakami Y, Kosaki K, Sato TA, Okamoto S, Saya H.
- 【掲載誌】 *Cancer Research* (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3993)

問い合わせ先

杉原 英志 (すぎはら えいじ)

筑波大学 プレシジョン・メディスン開発研究センター 准教授

佐谷 秀行 (さや ひでゆき)

慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所遺伝子制御研究部門 教授