

# 代謝改善を介し抗原認識能を増強する 新規細胞輸注療法の開発

愛知県がんセンター研究所  
腫瘍免疫制御 TR 分野 ユニット長 村岡大輔

## 1. 研究の背景・目的

近年、抗PD-1抗体を初めとする免疫チェックポイント阻害剤や、キメラ抗原受容体導入T細胞療法を初めとする養子免疫療法等の、がん免疫療法の研究開発が進められている。がん免疫療法は、T細胞が腫瘍上の抗原を認識し殺傷することで治療効果が導かれる。しかし、腫瘍の中には、「Cold tumor」と呼ばれる、免疫系に認識され難い腫瘍が存在し、それらの腫瘍に対してはがん免疫療法の有効性が減弱することが明らかになっている。腫瘍がCold tumorとなる理由は様々であるが、我々は、腫瘍自体が発現する抗原の低免疫原性がその原因の一つであることを明らかにしてきた (Ref. 1)。腫瘍の免疫原性が低い場合、たとえT細胞が腫瘍内に浸潤し抗原を認識してもT細胞受容体 (TCR) シグナルが十分に活性化せず、腫瘍殺傷は導かれない。我々は当該課題の解決策として、T細胞の抗原認識能 (=TCRシグナルへの感受性) を増強させることで、低免疫原性腫瘍でさえも効率的に駆逐する治療法が開発できると着想し、T細胞の抗原認識能を増強する新規化合物PQDNを同定した (Ref. 2)。PQDNは、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iを介して作用し、電子伝達系を活性化しT細胞の抗原認識能を増強させ、また、低免疫原性のマウス腫瘍移植モデルでさえも、腫瘍排除を導くことが明らかになっている。しかしながら、未だ当化合物が直接的に作用する分子やそれにより活性化するシグナル分子の同定は成されていない。本研究では、T細胞の抗原認識能を増強する低分子化合物であるPQDNの標的分子を明らかにすると共に、T細胞の抗原認識能向上の鍵となる分子の特定を試みた。

## 2. 研究の対象ならびに方法

### 標的分子の探索

ERK1/2由来新生抗原である9mを認識するTCRを発現させた遺伝子操作マウスのDUC18より脾

臓を採材しリンパ球を回収した。リンパ球を 10 cm培養ディッシュに播種した後、9m ペプチドで刺激した。刺激後に、細胞を回収して低温化で細胞破碎液を調整した。磁性ビーズを PQDN の様々な部位に結合させた磁性ビーズ結合 PQDN を作製した。磁性ビーズ結合 PQDN を細胞破碎液に加え反応後、マグネットを用いビーズを回収した。回収したビーズと結合する蛋白質を抽出した後、SDS-PAGE および銀染色を行った。その後、PQDN 処理群のみで観察されたバンドを切り出して質量分析にて分子の同定を試みた。

### RNA-seq 解析

DUC18 マウスの脾臓より採材しリンパ球を回収した。リンパ球を 10 cm培養ディッシュに播種した後、9m ペプチドで刺激すると共に PQDN 処理を行った。その後、RNA を回収し、RNA-seq 用のライブラリーを調整した後、HiSeq2000 を用いて配列解析を行った。

### 3. 研究結果

PQDN と結合する標的タンパク質の同定を試みた。磁性ビーズ結合 PQDN および対象として PQDN が結合していない磁性ビーズを細胞破碎液と反応させ、その後銀染色にて磁性ビーズ結合 PQDN にのみに観察されるバンドを同定した (Fig. 1)。さらに、当バンドを切り出し質量分析を行った。しかしながら、回収量が少なかった為か、当タンパク質の同定には至らなかった。



Fig. 1 銀染色による PQDN 結合蛋白質の同定

次に、PQDN と直接結合する標的タンパク質の同定は難しいと考え、PQDN 処理後の遺伝子発現変化を検討した。脾臓より回収したリンパ球を抗原にて刺激し、そこに PQDN 処理することでどのような遺伝子の発現が変化するかを確認した。まず、PCA 解析を行い、PQDN 処理がリンパ

球における遺伝子発現変化を導くことを確認した (Fig. 2)。さらに、PQDN 処理により発現が変化する遺伝子の検討を進めた。PQDN 処理により優位に発現が減少する遺伝子が 70 遺伝子、発現が上昇する遺伝子が 43 遺伝子あることが分かった (Fig. 3)。

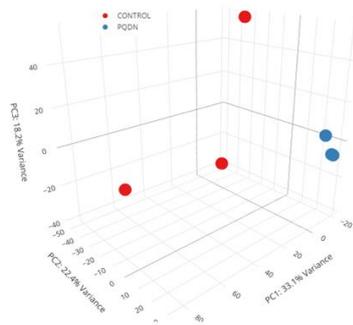


Fig. 2 PCA 解析

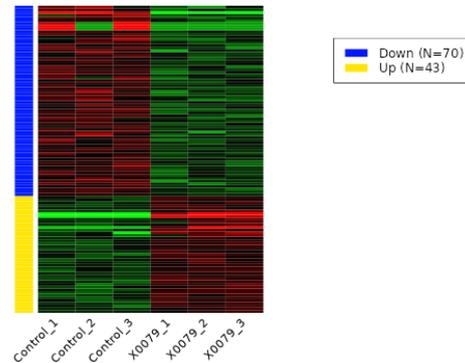


Fig. 3 発現変動遺伝子のヒートマップ

次にこれら発現変化があった遺伝子がどのような生物学的性質を有するかを Gene Ontology 解析にて検討した (Fig. 4)。その結果、細胞間相互作用や活性化経路に関連する遺伝子の発現が変化していることが分かった。さらに、PQDN 処理および未処理群の遺伝子発現を Volcano Plot にて比較し、PQDN 処理は、STK4 の発現を減少させ、Ndufv3 や Skap 1 そして CD83 などの遺伝子の発現を上昇させることが分かった (Fig. 5)。

Direction	adj.Pval	nGenes	Pathways
Up regulated	1.8e-03	10	Cell-cell adhesion
	3.0e-03	4	Positive regulation of B cell proliferation
	4.2e-03	11	Cell adhesion
	4.2e-03	11	Biological adhesion
	5.2e-03	9	Regulation of cell adhesion
	7.3e-03	7	Leukocyte cell-cell adhesion
	7.3e-03	7	Regulation of cell-cell adhesion
	7.3e-03	8	Regulation of cell activation
	9.9e-03	5	Regulation of B cell activation

Fig. 4 Gene ontology 解析

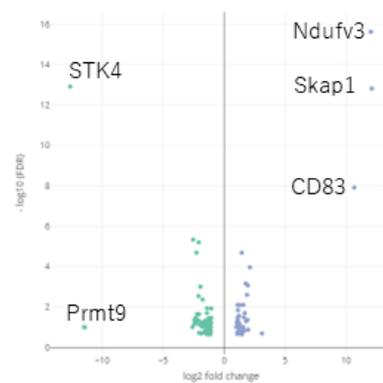


Fig. 5 Volcano plot 解析

#### 4. 考察

本研究では、PQDN と直接結合する標的タンパク質の同定には至らなかったが、PQDN 処理によりどのような遺伝子の発現が変化するかを明らかにすることに成功した。PQDN 処理は、T 細胞の抗原認識能を促し活性化を促進するが、GO 解析によりリンパ球の活性化に関連する分子の発現が向上しており、これは今までの知見と一致する。その一方、PQDN 処理が細胞間相互作用に関連する分子の発現を向上することは、新たな発見であった。PQDN 処理により発現が上昇する SKAP1 は LFA-1 のシグナルに関与するとの報告があり、また、LFA-1 は T 細胞の細胞間相互作用に重要なインテグリンの一つである。PQDN が SKAP1 を介し LFA-1 の機能を変化させることで、当化合物の作用を生み出す可能性があり、今後検討を進めていきたい。また、PQDN により発現が上昇する遺伝子として Ndufv3 が同定された。当遺伝子は、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I の構成分子であり、これは PQDN がミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を介して作用するとの現在までの知見と一致する。今後、これらの知見を基盤として、さらに検討をすすめる PQDN に結合する分子の同定を試みる。

#### 5. 文献

- 1) Muraoka et al., Journal of clinical investigation, 129(3):1278-1294, 2019
- 2) Dotsu Y, et al., Journal of Immunotherapy for Cancer, 10:e003958, 2022

#### 6. 論文発表

なし