

自己免疫を起こさないがん免疫活性化法を開発

—腫瘍随伴マクロファージの PF4 は、がん免疫を抑制する Th1-Treg を誘導する—

キーワード: Th1-Treg、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)、腫瘍微小環境(TME)、PF4

【研究成果のポイント】

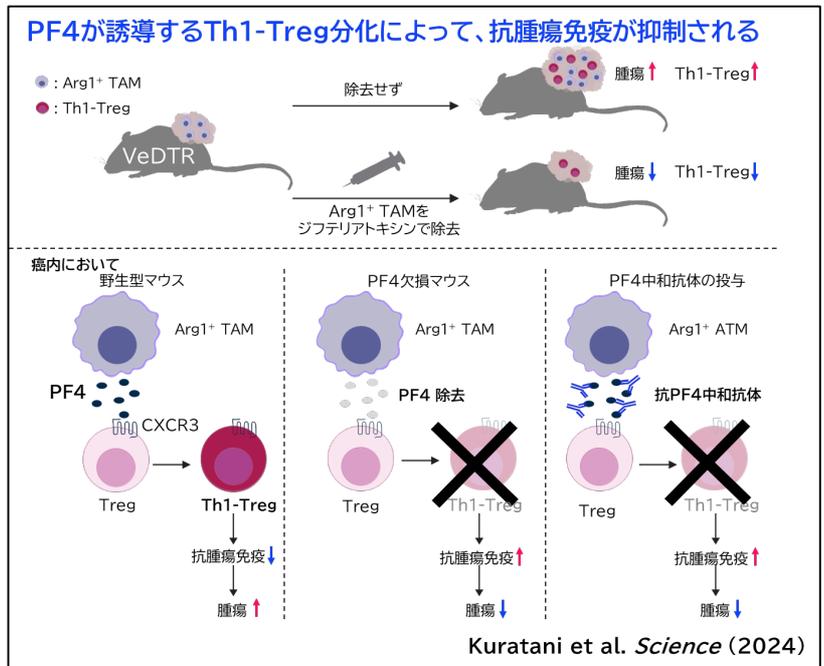
- ◆ Arg1⁺ 産生腫瘍随伴マクロファージ^{※2} (Arg1⁺ TAM)が産生するケモカイン PF4 ががん免疫を抑制する Th1-Treg^{※3} の分化を誘導し、腫瘍の増殖につながっていることが判明
- ◆ PF4 を中和することで、Th1-Treg の分化が阻害され、がん免疫を活性化し、かつ自己免疫を起こさずに、腫瘍の増殖を抑制できることを発見
- ◆ PF4 を標的とする安全性の高い抗腫瘍免疫治療につながる可能性

❖ 概要

大阪大学大学院生命機能研究科大学院生の倉谷歩見さん、微生物病研究所の山本雅裕教授(免疫学フロンティア研究センター WPI-IFReC、感染症総合教育研究拠点兼任)らの研究グループは、腫瘍内のアルギナーゼ 1 (Arg1)を産生するマクロファージ (Arg1⁺ TAM)が産生するケモカイン PF4 が Th1-Treg を誘導し、がん免疫を抑制することを明らかにしました。

これまで腫瘍内において強力にがん免疫を抑制する Treg のサブセットの一つである Th1-Treg が腫瘍内に高度に蓄積することが分かっていますが、なぜそのようなのか、その分子メカニズムは全く不明でした。

今回、山本教授らのグループは Arg1⁺ TAM を特異的に標識・除去可能な遺伝子改変マウスを VeDTR マウス^{※4} システムにより作製し、腫瘍随伴マクロファージの役割を検討しました。担癌マウスで Arg1⁺ TAM を除去したところ、腫瘍内 Th1-Treg の割合の減少とがん免疫の強い活性化が確認されました。さらに、Arg1⁺ TAM が産生する液性因子 PF4(別名 CXCL4)が Treg の Th1-Treg への分化に関与することを明らかにしました。PF4 欠損マウスや抗 PF4 中和抗体の投与による PF4 の機能の阻害によって、がん組織内 Th1-Treg の割合の減少に伴うがん免疫の強い活性化が確認され、その結果、腫瘍増殖の抑制が確認されました(上図)。さらに PF4 中和抗体の投与は、全 Treg 除去で起きる自己免疫になりませんでした。以上のことから、PF4 が安全性の高い抗腫瘍免疫治療の新規標的となる可能性が大いに期待されます。



❖ 研究の背景

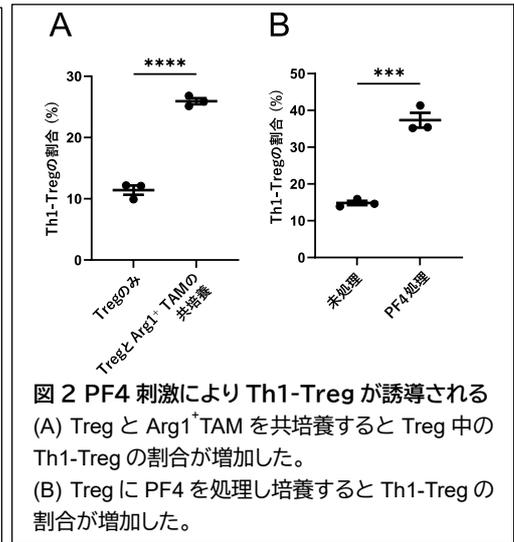
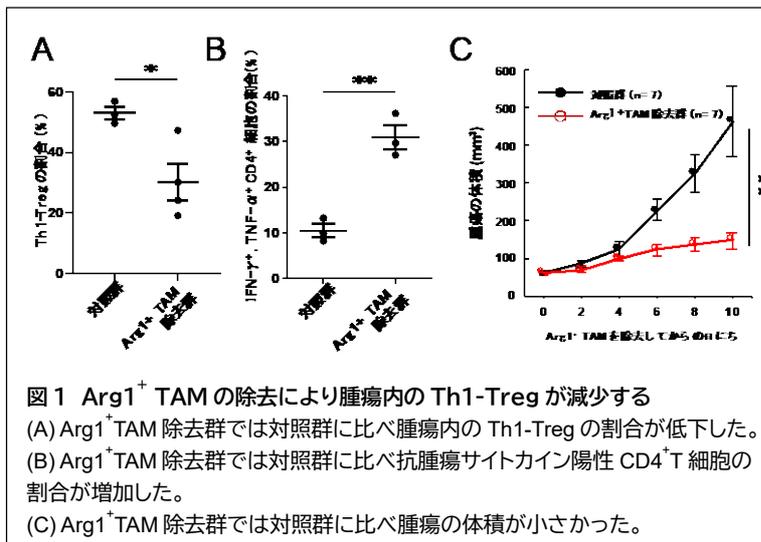
腫瘍組織では腫瘍細胞のほかに、免疫細胞、線維芽細胞、血管上皮細胞などが含まれており、腫瘍微小環境(TME)を形成しています。その構成細胞の一つである制御性 T 細胞 (Treg) はヘルパー T 細胞

(CD4⁺ T 細胞) の亜集団(サブセット)であり、免疫恒常性の維持と自己免疫の抑制に重要な役割を果たします。Treg の中でも、Th1 型 Treg (Th1-Treg) と呼ばれるサブセットは腫瘍組織に多く蓄積し、がん免疫を抑制します。Th1-Treg だけ除去する方法は、現在がんの免疫治療で用いられている全 Treg の除去(あるいは機能不全)でみられる自己免疫による副作用(免疫関連副作用※⁵)を引き起こしにくく安全であると考えられているため、有望ながん免疫療法のアプローチとして期待されています(参考: [2023.7.14 プレスリリース「Th1 型制御性 T 細胞の除去は安全にがん免疫を誘導する」](#))。しかし、Th1-Treg が TME に大量に集積する分子メカニズムについてはほとんど解明されておらず、また Th1-Treg だけを除く方法も今のところ開発されていません。一方、マクロファージは自然免疫細胞の一種で病原体に対する宿主免疫応答に重要ですが、腫瘍内にも高度に蓄積することが分かっており、特に腫瘍内のマクロファージは TAM(腫瘍随伴マクロファージ)と呼ばれています。先行研究において、体内の全マクロファージの枯渇により TME の Treg が減少することが示されており、TME における Th1-Treg の高度な集積にマクロファージが関与している可能性が考えられます。そこで本研究ではマクロファージ全体ではなく、腫瘍内のマクロファージ、すなわち、TAM が腫瘍内の Th1-Treg の蓄積に関与するのかを正確に評価できる実験系を構築し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的としました。

❖ 研究の内容

TAM は他の組織のマクロファージと比べて Arg1 という遺伝子の発現が高いことに着目し、2 種類の遺伝子の発現で特徴づけられた任意の細胞集団を標識し除去できる新型マウスシステム(VeDTR マウス)を用いて、TAM を標的化した新規マウスを作製しました。具体的にはマクロファージ標識遺伝子である Cx3cr1 と TAM 標識遺伝子 Arg1 を組み合わせ、Cx3cr1-Cre/Arg1-Flp/VeDTR マウスを作製しました。このマウスを用いて、腫瘍を移植し、ジフテリア毒素によって Arg1⁺TAM だけを選択的に除去した結果、腫瘍内の Th1-Treg の割合が低下し、さらになん免疫が強くなり活性化しており、腫瘍の増殖が抑制されていました(図1)。

次に、Arg1⁺TAM が Treg の Th1-Treg への分化誘導に関与するか検討しました。その結果、Arg1⁺TAM との間接共培養群において、Treg から Th1-Treg への分化が誘導されました(図2)。



Th1-Treg 分化を誘導する Arg1⁺TAM 由来の液性因子を解析したところ、Th1-Treg 分極を誘導する液性因子としてケモカインである PF4 と呼ばれる分子を同定しました。

さらに生体内での PF4 の機能を調べるために、PF4 欠損マウスを作製し、解析を行った結果、PF4 欠損マウスの腫瘍組織では野生型に比べ腫瘍の増殖が抑制され、腫瘍内の Th1-Treg の割合が減少していました(図3)。

最後に、PF4 の機能を阻害する PF4 中和抗体(#6-1-5)を作製し、担癌マウスに投与した結果、腫瘍内の Th1-Treg の割合の低下とがん免疫の強い活性化が起き、腫瘍の増殖が抑制されました(図4)。

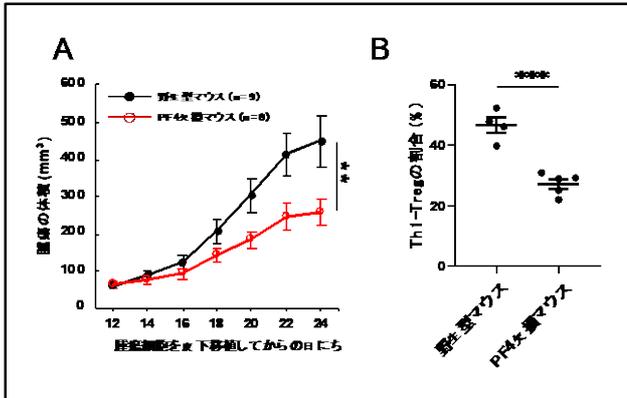


図3 PF4 欠損マウスでは腫瘍内 Th1-Treg の割合と腫瘍増大速度が減少する

(A) PF4 欠損マウスでは野生型マウスに比べ腫瘍の体積が小さかった。

(B) PF4 欠損マウスでは野生型マウスに比べ腫瘍内の Th1-Treg の割合が低下した。

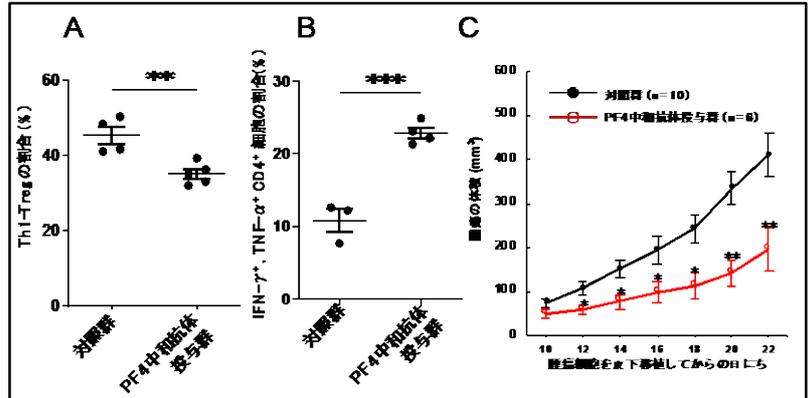


図4 PF4 中和抗体の投与により腫瘍内 Th1-Treg の割合が減り、抗腫瘍免疫が活性化する

(A) PF4 中和抗体投与群では対照群に比べ腫瘍内の Th1-Treg の割合が低下した。

(B) PF4 中和抗体投与群では対照群に比べ抗腫瘍サイトカイン陽性 CD4T 細胞の割合が増加した。

(C) PF4 中和抗体投与群では対照群に比べ腫瘍の体積が小さかった。

さらに PF4 中和抗体の投与によって自己免疫が起きるかを検討した結果、全 Treg の除去によって起きるような免疫細胞の活性化やそれに伴う体重減少なども全く起きず、高い安全性が示唆されました。さらに PF4 中和抗体の薬効は全 Treg の除去(または機能不全)を起こす抗 CTLA4 抗体投与と同等でした(図5)。

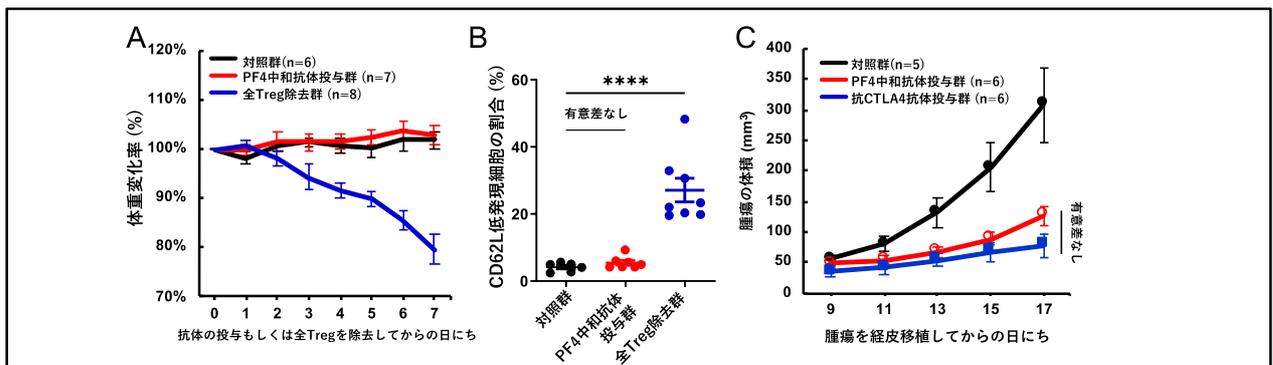


図5 PF4 中和抗体を投与しても、全 Treg 除去のような自己免疫にならない

(A) PF4 中和抗体投与群では対照群と比べ体重減少はみられなかった。一方、全 Treg を除去すると著しい体重減少が起きた。

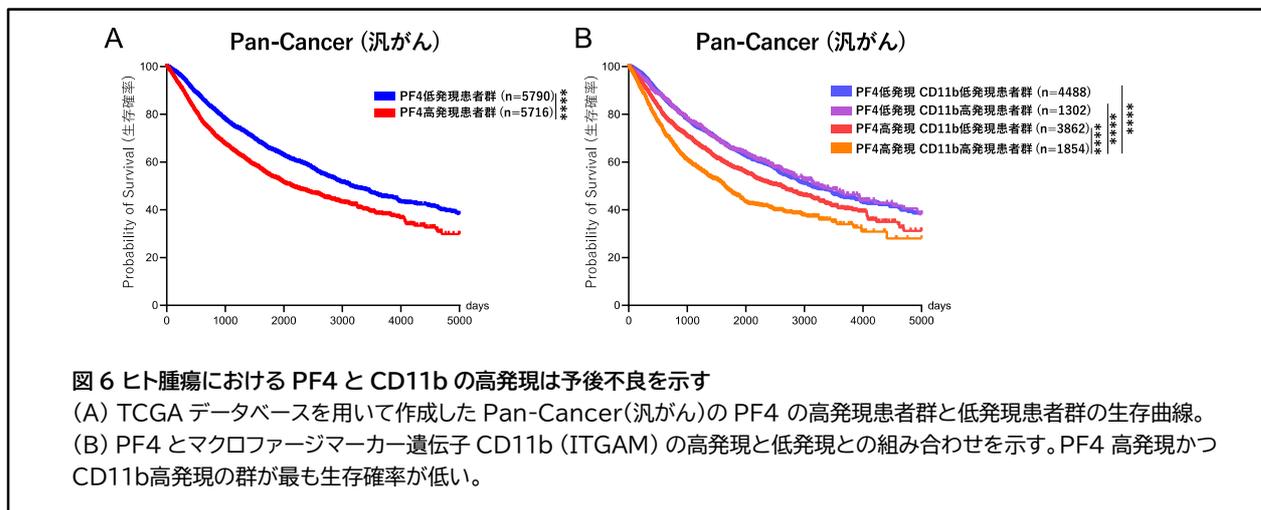
(B) 脾臓内において、全 Treg 除去群では活性化 T 細胞(CD62L 低発現 T 細胞)が CD8⁺T 細胞において大きく上昇(活性化)しており自己免疫状態になっていたが、PF4 中和抗体投与群では対照群と差がなかった。

(C) PF4 中和抗体投与群と抗 CTLA4 抗体投与群で腫瘍の成長は同程度に抑制された。

以上より Arg1⁺ TAM より産生される液性因子 PF4 は腫瘍内において Th1-Treg を誘導し、がん免疫を抑制することにより腫瘍の増殖を促進することが明らかになりました。そして PF4 の阻害は Th1-Treg の分化を阻害し、自己免疫を起こすことなく安全かつ全 Treg 除去と同様に腫瘍の増殖を抑制できることが分かりました。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究によりPF4の阻害はがん免疫を活性化し、腫瘍の増殖が抑制されることが明らかとなりました。TCGA データベース^{※6}によると腫瘍内のPF4の高発現やマクロファージの高度な蓄積は予後不良と相関があることを示しています(図6)。そのためPF4は自己免疫になることなく抗腫瘍免疫治療ができる新規創薬標的となることが大いに期待されます。



❖ 特記事項

Journal: **Science** (Nov. 22, 2024 online)

Title: “Platelet factor 4-induced Th1-Treg polarization suppresses anti-tumor immunity”

Authors: Ayumi Kuratani, Masaaki Okamoto, Kazuki Kishida, Daisuke Okuzaki, Miwa Sasai, Shimon Sakaguchi, Hisashi Arase, Masahiro Yamamoto

DOI: 10.1126/science.adn8608

本研究は、JST創発的研究支援事業(FOREST)「次世代型免疫細胞サブセット解析手法の開発とその実装」(グラント番号:JPMJFR206D)の一環として行われました。

❖ 用語説明

※1 Arg1

アルギナーゼ 1。L-アルギニンをL-オルニチンと尿素に加水分解する酵素。増殖しているリンパ球やがん細胞において高い活性を示す。

※2 腫瘍随伴マクロファージ

腫瘍組織内に浸潤・集積しているマクロファージ(Tumor-associated macrophage, TAM)。大部分は腫瘍に対する免疫応答を抑制し、腫瘍の増殖の促進に関与することが報告されている。

※3 Th1-Treg

制御性T細胞(Treg細胞)はヘルパーT細胞の一種であり、免疫応答を抑える機能を持ち、免疫恒常性の維持と自己免疫の抑制に重要な役割を果たす細胞である。転写因子Foxp3を特異的に発現する。

腫瘍内に浸潤するTregはさらにT-betも発現することがあり、Th1型Treg(Th1-Treg)と呼ばれており、Th1依存的な免疫応答(腫瘍においては抗腫瘍免疫)を特異的に抑制することを、昨年、山本研究室は報告した。[\(参考:2023.7.14 プレスリリース「Th1型制御性T細胞の除去は安全にがん免疫を誘導する」\)](#)。

※4 VeDTR マウス

昨年、山本研究室が上記論文で開発を報告した新型マウス。VeDTR マウスの中では、Cre-loxP システムと Flp-FRT システムという2つの部位特異的リコンビナーゼを組合せ、2 種類の遺伝子の発現で特徴づけられた任意の細胞集団において蛍光タンパク質およびヒト型のジフテリアトキシン受容体(DTR)を発現できる。ジフテリアトキシンはヒトやサルには毒性が強いが、マウスでは毒性が低いという特徴を持つ。したがって、VeDTR マウス内でジフテリアトキシンがヒト型 DTR に作用すると、特定の細胞だけが除去される。

※5 免疫関連副作用

irAE(immune-related Adverse Effect)とも呼ばれる。免疫チェックポイント阻害剤として使われている抗 CTLA4 抗体(イピリムマブ)では、全 Treg に作用し、その結果起きる免疫系の過剰活性化によって、内分泌障害、間質性肺疾患、消化器系障害、神経系の障害、肝機能障害など、さまざまな種類の副作用が報告されている。

※6 TCGA データベース

TCGA (The Cancer Genome Atlas) は、米国がん研究所と米国ヒトゲノム研究所が共同で作ったデータベースである。33 種類のがん種で、11,000 人以上のがん患者に由来するがんサンプルを使って、ゲノム変異／遺伝子発現変動／メチル化異常など 7 種類のデータタイプを網羅的に解析しており、がん研究に幅広く活用されている。

【山本教授のコメント】

現在、免疫チェックポイント阻害剤を使ったがん免疫療法が実施されていますが、免疫関連副作用のため使用を継続できないケースも多々あります。本研究では、マウスの腫瘍モデルで抗 PF4 中和抗体が、免疫関連副作用なく抗 CTLA4 抗体（マウスでのイピリムマブに相当）と同等の薬効を示しました。本研究が安全性の高い新しいがん免疫療法の開発につながり、免疫関連の副作用に苦しむがん患者にとって福音になればいいなと思います。