核内受容体間の競合を介した免疫記憶形成機構の解明とワクチン療法への応用

所属：　北海道大学大学院獣医学研究院

助成対象者：髙田　健介

概要

免疫応答において急激に増殖した T リンパ球の一部はその後も生存し、記憶 T リンパ球として免疫記憶を担う。最近、記憶 T リンパ球の分化における脂質代謝の重要性が示唆されている。そこで本研究では、様々な組織で脂質代謝を競合的に制御することが知られている核内受容体 RORαと REV-ERB に着目した。T リンパ球応答において、REV-ERB の発現は記憶形成に伴い上昇していた。また、REV-ERB リガンドは *in vitro* での活性化 T リンパ球の生存を大きく向上させるのに対し、ROR リガンドは逆に生存を低下させた。さらに、REV-ERB リガンドはエフェクター T リンパ球の抗腫瘍効果を顕著に向上させることが明らかとなり、免疫療法に応用できる可能性が示唆された。

abstract

T lymphocytes drastically proliferate during immune responses, but most of those T lymphocytes die, leaving behind a small number of long-lived memory T lymphocytes. Accumulating evidence from recent studies suggests that memory T lymphocyte differentiation is dependent on intracellular lipid metabolism. In this study, we examined the role of nuclear receptors RORα and REV-ERB, which are known to competitively regulate lipid metabolism, in memory T

lymphocyte differentiation. In T lymphocyte immune response, REV-ERB are significantly upregulated in memory phase. Survival of activated T lymphocyte *in vitro* was significantly improved in the presence of REV-ERB ligand, whereas RORα ligand impaired T lymphocyte survival. In addition, treatment of effector T lymphocytes with REV-ERB ligand enhanced the anti-tumor effect, suggesting a possibility of clinical application to immunotherapies.

研究内容

【背景】

過去に感染したことのある病原体が再び体内に侵入すると、免疫系はより迅速で強力に応答し、病原体は速やかに排除される。この現象は免疫記憶と呼ばれ、ワクチンの基本原理として予防医学に多大な貢献を果たしてきた。免疫記憶の本体は、抗原特異的に活性化した後、長期にわたり体内で維持される記憶リンパ球である。最近の研究から、記憶T細胞の分化は脂質分解による緩やかで持続的なエネルギー代謝に依存することが分かってきたが、詳細な分子メカニズムは解明されていない[1)]。

【目的】

Tリンパ球は活性化に伴って増殖しエフェクター細胞となるが、95%以上は死滅し、一部の細胞だけが記憶Tリンパ球へと分化する。本研究は、全身の様々な組織で脂質代謝を競合的に制御することが知られている核内受容体RORαとREV-ERBに着目し[2-4)]、Tリンパ球の記憶形成における役割を解明する。さらに、これらの核内受容体に対する特異的リガンドを用いて、ワクチン・免疫療法への応用を目指す。

【結果】

1) Tリンパ球免疫応答における核内受容体の発現変動

生体内でのT細胞応答に伴うRORα（遺伝子名 *Rora*）およびREV-ERB（遺伝子名 *Nr1d1* および *Nr1d2*）の発現の変化を検討した。卵白アルブミンを特異的に認識するOT-I抗原受容体発現Tリンパ球をOT-Iトランスジェニックマウスの二次リンパ組織から単離し、レシピ

エントマウスに養子移入した。さらに、卵白アルブミン由来ペプチド（SIINFEKL）でパルした樹状細胞を追加移入することで、ドナーT リンパ球に対し抗原刺激を加えた。その後、経時的にレシピエントマウスの二次リンパ組織からドナーT リンパ球を単離し、各種転写因子のmRNA発現を定量的PCRで解析した。その結果、*Rora*はエフェクター細胞の分化成熟に重要な転写因子である *Tbx21* や *Prdm1*、*Id2* と同様に、活性化後に急激な発現上昇を示し、その後、記憶形成に伴って減少する傾向を示した（図 1)。一方、*Nr1d1* および *Nr1d2* は、記憶細胞の分化に重要とされる *Eomes* や *Bcl6*、*Id3* と同様、ナイーブ T リンパ球で一定の発現が見られ、活性化直後に急激に低下するが、その後回復して記憶期に特に高い発現を示した（図 1)。

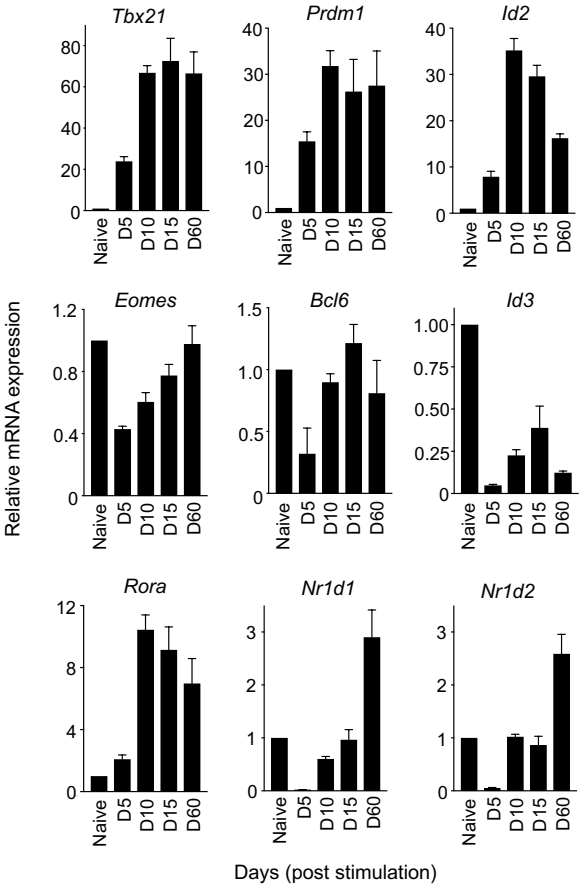


図 1. T 細胞免疫応答における核内受容体遺伝子の発現変動

2) 核内受容体リガンドが T リンパ球の生存に及ぼす影響

OT-I トランスジェニックマウスの脾細胞を卵白アルブミン由来ペプチドおよび IL-2 の存在下で 3 日間培養し、 *in vitro* で活性化させた。その後、核内受容体リガンドとサイトカイン（IL-2 あるいは IL-15）の存在下で培養した。トリパンブルー染色および PI 染色により生存 CD8T リンパ球の数と頻度を計測し、核内受容体を介したシグナルが活性化後の T リンパ球の生存に与える影響を検討した。また、活性化後に細胞を CFSE 染色し培養に供することで、核内受容体リガンド存在化におけるサイトカイン依存的細胞分裂を評価した。その結果、REV-ERB リガンドにより細胞の生存が大きく向上したのに対し、ROR リガンドでは逆に生存が低下した（図 2A,B)。一方で、細胞の増殖（図 2C）や表現型（図 2D）には大きな影響は見られなかった。

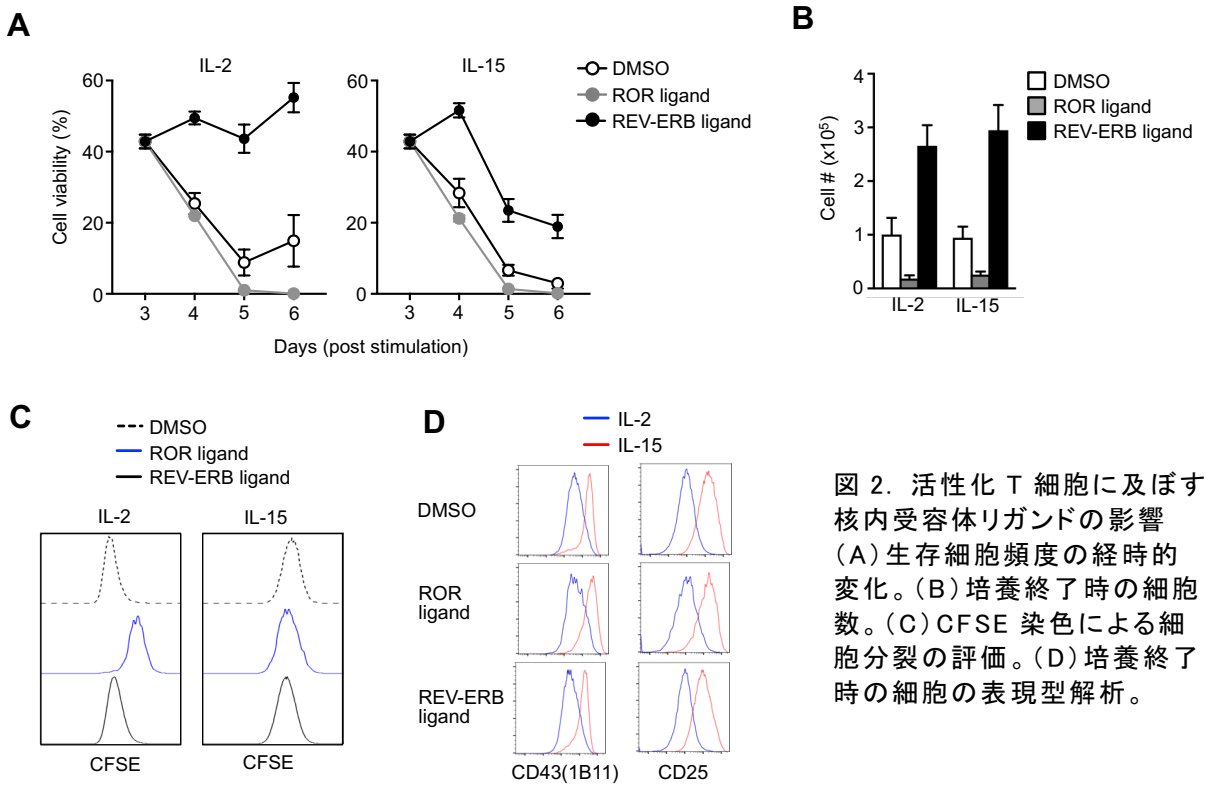
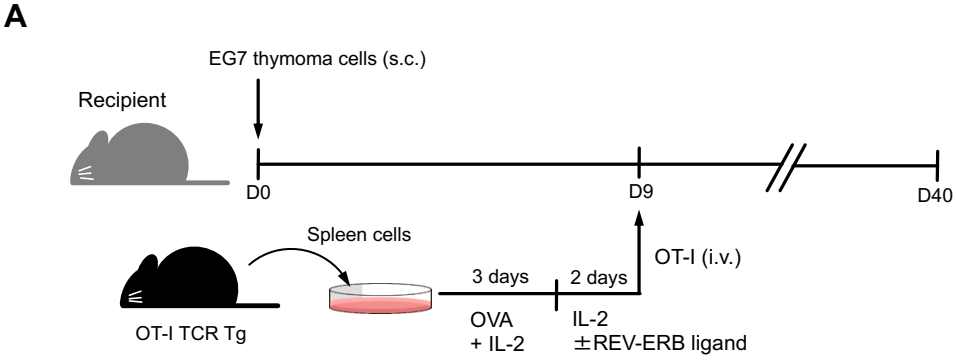


図 2. 活性化 T 細胞に及ぼす核内受容体リガンドの影響
(A) 生存細胞頻度の経時的変化。(B) 培養終了時の細胞数。(C) CFSE 染色による細胞分裂の評価。(D) 培養終了時の細胞の表現型解析。

3) 核内受容体リガンドを用いた腫瘍免疫療法の検討

卵白アルブミン由来ペプチドの刺激により *in vitro* で活性化させた OT-I T リンパ球を IL-2 と REV-ERB リガンドの存在下で 2 日間培養し、エフェクターT リンパ球を得た。あらかじめ卵白アルブミン発現組換え胸腺腫細胞 (EG7) を皮下投与して腫瘤を形成させたレシピエントマウスに対し、作成したエフェクターT リンパ球を静脈内投与した。経時的に腫瘍サイズを測定した。腫瘍の直径が 20 mm を超えた段階でマウスを安楽死させた。溶媒である DMSO 処理後の T リンパ球を投与された対照群にくらべ、REV-ERB リガンド処理後の T リンパ球を投与された実験群では、腫瘍の成長が顕著に阻害されるとともに (図 3B)、マウスの生存期間が延長した (図 3C)。



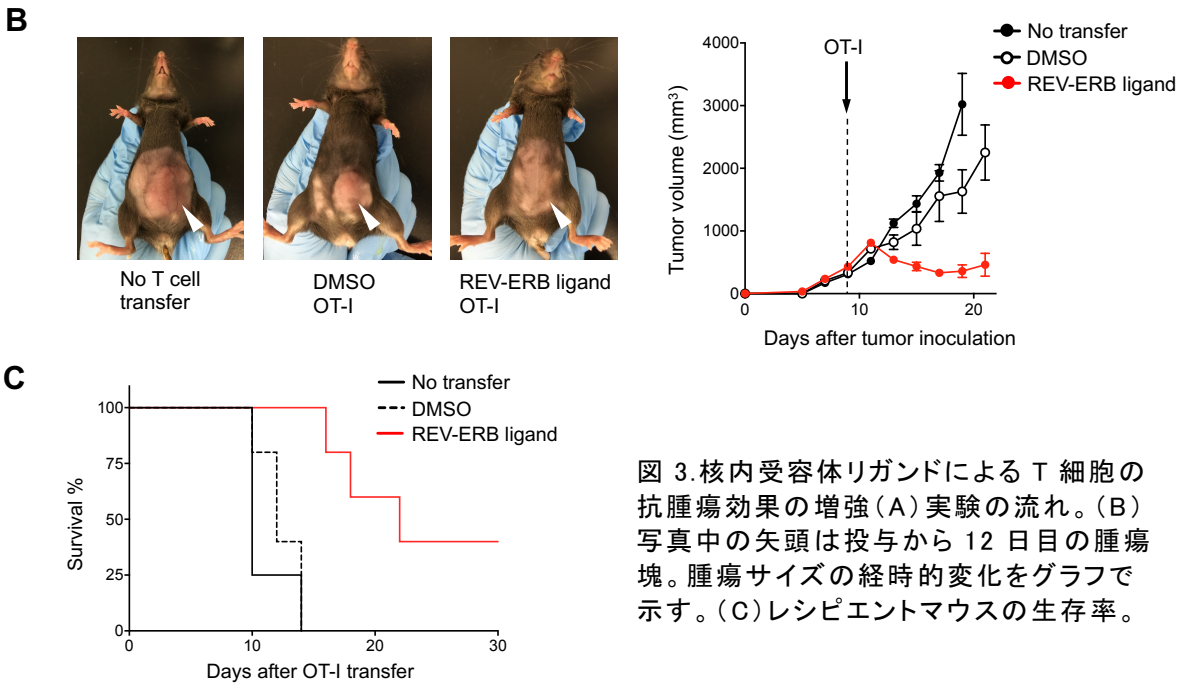


図 3.核内受容体リガンドによる T 細胞の抗腫瘍効果の増強（A）実験の流れ。（B）写真中の矢頭は投与から 12 日目の腫瘍塊。腫瘍サイズの経時的変化をグラフで示す。（C）レシピエントマウスの生存率。

【考察と今後】

RORαと REV-ERB は転写因子として、標的遺伝子プロモーター上の同じ配列に結合し、転写を競合的に制御することが知られている[3,4]。活性化 T リンパ球の *in vitro* での生存が核内受容体リガンドに大きく影響されるという本研究の知見は、記憶形成過程における T リンパ球の死滅と生存を当該核内受容体が決定する可能性を示唆する一方、生体内での役割を直接的に示すものではない。現在、RORα欠損マウス、REV-ERBα欠損マウスと OT-I 抗原受容体トランスジェニックマウスの交配を進めており、今後、生体内における記憶 T リンパ球分化に当該核内受容体の欠損が与える影響を検討する予定である。また、これまでに、核内受容体リガンド処理後の T リンパ球を対象としてマイクロアレイ解析を実施し、予備的知見ながら、当該核内受容体によって発現制御を受けると考えられる標的候補遺伝子群を見出した。今後、詳細な分子機構を検討し、免疫記憶機構の解明につなげていきたい。さらに本研究では、REV-ERB リガンドが *in vitro* で活性化 T リンパ球の生存を大きく改善させるという独自の知見に基づき、当該薬剤が腫瘍免疫療法の効果を大幅に増強することをマウスでの実験により見出した。今後、この知見を進展させ、臨床応用に向けた検討を進めていきたい。

引用文献

1. Man K et al., 2015 Nat Rev Immunol 15: 574-584.

2. Zhang Y et al., 2015 Science 348: 1488-1492.

3. Everett LJ et al., 2014 Trend Endocrinol Metab 25: 586-592.

4. Kojetin DJ et al., 2014 Nat Rev Drug Discov 13: 197-216.

本助成に関わる成果物

特許申請を予定しているため、現在のところ公表を控えている。

[論文発表]

[口頭発表]

[ポスター発表]

[その他]