

研究報告書
令和3年度：A課題

2023 年 5 月 10 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 東京大学先端科学技術研究センター

住所 〒153-0041 東京都目黒区駒場 4-6-1 T棟 505 号室

研究者氏名 日比野 沙奈

(研究課題)

新規がん免疫チェックポイント分子としての細胞外ポリアミンの意義の解明

令和4年 3 月 25 日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究の背景・目的】

スペルミジンに代表されるポリアミン類は、癌細胞の内部に蓄積する造腫瘍活性を有する低分子代謝物である‘Oncometabolite (オンコメタボライト)’としてよく知られている。興味深いことに、癌患者の血清や尿、唾液といった生体試料中にも、ポリアミン類が健常個体と比べて顕著に高濃度で検出されることが報告されているが (Casero *et al. Nat. Rev. Cancer.* 2018)、これらの“細胞外”ポリアミンが腫瘍進展において何らかの病態生理学的意義を持つかどうかは明らかになっていなかった。

我々のグループでは、固形癌の進展過程で生じる大規模な組織壊死 (ネクローシス) が、腫瘍促進性の免疫抑制性微小環境の形成に寄与している可能性を見出し、癌死細胞が放出する分子群による免疫制御メカニズムに着目して研究を行ってきた。その一環として、抗腫瘍免疫応答において要となるエフェクターCD8⁺ T細胞に対する機能抑制能を指標に、癌死細胞上清を用いて新規の死細胞由来の免疫調節因子のスクリーニングを実施した。その過程で、T細胞の抑制活性が非タンパク質性の水溶性低分子分画に存在することを見出し、網羅的メ

タボローム解析からスペルミジンを実験分子として同定することに成功した（未発表）。スペルミジンがマウス腫瘍組織の間質液中に高濃度で存在するというデータも得られており、その腫瘍局所における免疫応答への関与も示唆されている。以上を踏まえ、本研究では、癌免疫療法の新規治療標的としての細胞外スペルミジンの可能性を探るべく、その一環としてスペルミジンによる T 細胞抑制の分子機構の解明を試みた。

【方法】

In vitro の T 細胞アッセイにおいては、C57BL/6 マウスの脾臓及びリンパ節より単離した CD8⁺ T 細胞を、抗 CD3/CD28 モノクローナル抗体を表面に結合した磁気ビーズ及び IL-2 の存在下で培養した。スペルミジンは通常の細胞培養時に使用する FBS (Fetal Bovine Serum) 中に含まれる酸化酵素の作用を受け、アンモニアや過酸化水素、アクロレインといった細胞毒性を有する副産物を生成することから、スペルミジンの添加時は FBS を含有しない T 細胞用培地 (TexMACS Medium (Miltenyi Biotec)) を用いて培養を行なった。T 細胞機能については、エフェクターサイトカイン (IFN- γ , IL-2, TNF- α) の産生、及び TCR (T cell receptor) 下流のシグナル伝達分子のリン酸 (total tyrosine, CD3 ζ) を指標に、フローサイトメトリー (FACS) により評価した。T 細胞の網羅的遺伝子発現解析には、Mouse Clariom S Array を利用した。

【結果】

コントロールおよびスペルミジン処置を行った *in vitro* 培養 CD8⁺ T 細胞について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を実施した。発現変動遺伝子群について GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) により機能的アノテーションの付加を行ったところ、細胞内コレステロール合成系を制御する遺伝子群の発現がスペルミジンにより有意に低下することを見出した。コレステロールを認識するプローブである Filipin III で染色を行ったところ、スペルミジン投与により CD8⁺ T 細胞の細胞膜上のコレステロール量が顕著に減少することが確認できた。また、注目すべきことに、スペルミジンによる T 細胞の機能抑制は、培養系にコレステロールを添加するとほぼ完全に打ち消された。コレステロールはシグナル伝達の足場構造を構成する細胞膜脂質ラフトの主要な構成成分であり、TCR の正常なクラスターリングに必須であることが知られているが、スペルミジン処置はこのプロセスを阻害し、その結果、TCR 下流のシグナル伝達およびエフェクター化が妨げられることが明らかになった。

【考察】

本研究より、スペルミジンが細胞膜コレステロールのダウンレギュレーションを介して CD8⁺ T 細胞のエフェクター活性を負に制御することが示された。先行研究において、コレステロールのエステル化酵素である ACAT1 の阻害により CD8⁺ T 細胞膜上のコレステロールレベルを上昇させることで強力な抗腫瘍免疫応答を誘導できることが報告されており (Yang *et al. Nature*, 2016)、我々の見出した癌死細胞由来のスペルミジンを経た一連のメカニズムが、実際に腫瘍局所における T 細胞の機能抑制に関与している可能性が高い。既存のポリ

アミン合成阻害剤による癌細胞のスペルミジン合成系の阻害や、中和抗体などで細胞外スペルミジンを直接ターゲティングできる技術を確立することは、免疫チェックポイント阻害剤に代表される T 細胞を標的とした癌免疫療法の有効性を最大限に引き出すために有望な戦略であることが期待される。

【成果発表】

Sana Hibino, Shotaro Eto, Sho Hangai, Keiko Endo, Sanae Ashitani, Maki Sugaya, Tsuyoshi Osawa, Tomoyoshi Soga, Tadatsugu Taniguchi*, and Hideyuki Yanai* Tumor cell-derived spermidine is an oncometabolite that suppress TCR clustering for intratumoral CD8+ T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2023 in press.

【謝辞】

本研究に多大なご支援を賜りました、がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。