

がん免疫におけるケモカイン CCL5 発現抑制機構の解明

－CCL5 の活性抑制による新たながん免疫療法の開発に貢献－

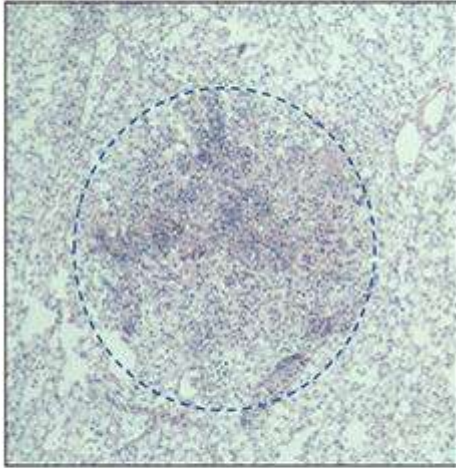
理化学研究所（理研）生命医科学研究センター免疫転写制御研究チームのセオ・ウセオク研究員、谷内一郎チームリーダーらの国際共同研究チームは、細胞の遊走を制御する分泌タンパク質「ケモカイン」の一種である「CCL5」の発現抑制機構を解明し、CCL5 の発現量が免疫細胞の機能を調整し、がん免疫応答に大きく影響することを発見しました。

本研究成果は、CCL5 の活性抑制による新たながんの免疫療法の開発に貢献すると期待できます。

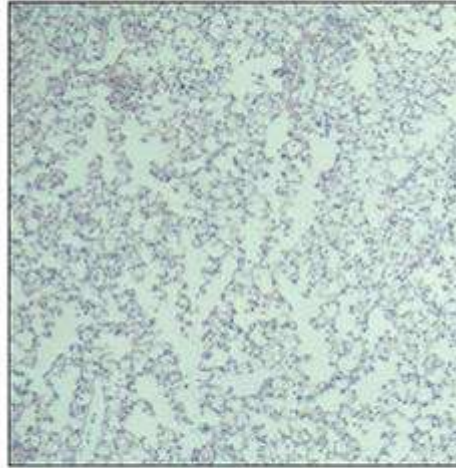
CCL5 は炎症部位へ免疫細胞が遊走する過程を制御することで、免疫反応を調整しています。近年、CCL5 ががん細胞に対する免疫反応にも関与することが報告されていますが、CCL5 の発現がどのように調節されているかは全く不明でした。

今回、国際共同研究チームは、RUNX 転写因子が CCL5 遺伝子の発現を抑制することを見いだしました。その分子機構を詳しく調べて、CCL5 遺伝子の発現を正に制御する二つのエンハンサーを同定しました。また、ゲノム編集技術により、この二つのエンハンサーを欠損するマウスを作製して解析した結果、エンハンサー欠損マウスでは、CCL5 の発現量の低下により、ナチュラルキラー細胞（NK 細胞）の機能が亢進し、がん細胞の排除が促進されることを発見しました。これらの結果は、CCL5 が免疫細胞の機能状態を制御することで、がん免疫応答を調整するという新たな知見を示しています。

野生型マウス



CCL5近位エンハンサー
欠損マウス



マウス肺のHE染色による組織像
(皮膚ガンの肺転移巣の顕微鏡写真)

CCL5 近位エンハンサー欠損マウスは野生型マウスと比較してがん転移巣の形成が抑制された

背景

「ケモカイン」は、細胞の遊走（細胞の走化性 [Chemotaxis; ケモタキシス[6]]）を促進させる分泌タンパク質であり、病原微生物の感染部位へ免疫細胞を呼び込み、免疫反応を促進させる作用を持ちます。ケモカインには多くの種類があり、「CCL5」はCCケモカインと呼ばれるケモカインファミリーの一つで、その受容体である CCR5 を発現している細胞に作用します。例えば、炎症が起こる際に CCL5 は、活性化されたキラーT細胞[7]やナチュラルキラー細胞（NK細胞）などの免疫細胞から産生され、受容体 CCR5 を発現している他の免疫細胞を炎症局所へ誘導します。

最新の研究で、ケモカインはがん細胞に対する免疫応答にも重要な役割を果たしていることが明らかになり、がん免疫応答における CCL5 の機能も注目されています。CCL5 の発現量は、CCL5 遺伝子の発現調節により制御されていますが、CCL5 遺伝子の発現がどのように制御されているかについては分かっておらず、特に、CCL5 遺伝子の発現を抑える機構があるかどうかは不明でした。

長年にわたり「RUNX」と呼ばれる転写因子の機能解明を行ってきた谷内一郎チームリーダーらは、これまでに RUNX が免疫細胞からのインターロイキン-4 (IL-4) [8]の産生を抑制

し、アレルギー応答を抑制していることを報告しています注 1)。今回、国際共同研究チームは、RUNX により産生が抑制される分泌タンパク質の探索を試みました。

研究手法と成果

RUNX 転写因子は、標的となる遺伝子の周辺に存在する制御ゲノム領域[3]にある特異的な DNA 配列を認識し、ゲノム DNA に結合することで、標的遺伝子の発現を誘導または抑制する機能を持っています。国際共同研究チームはまず、遺伝子改変により RUNX 転写因子の機能を欠損させたマウスを作製しました。このマウスからキラーT 細胞を取り出して培養し、刺激した後に培養液中の分泌タンパク質の量を調べたところ、野生型のマウスのキラーT 細胞に比べて RUNX 欠損キラーT 細胞は、CC ケモカインファミリー、特に CCL5 を過剰に発現していることを発見しました (図 1)。この結果は、CCL5 の発現が RUNX によって抑制されていることを示しています。

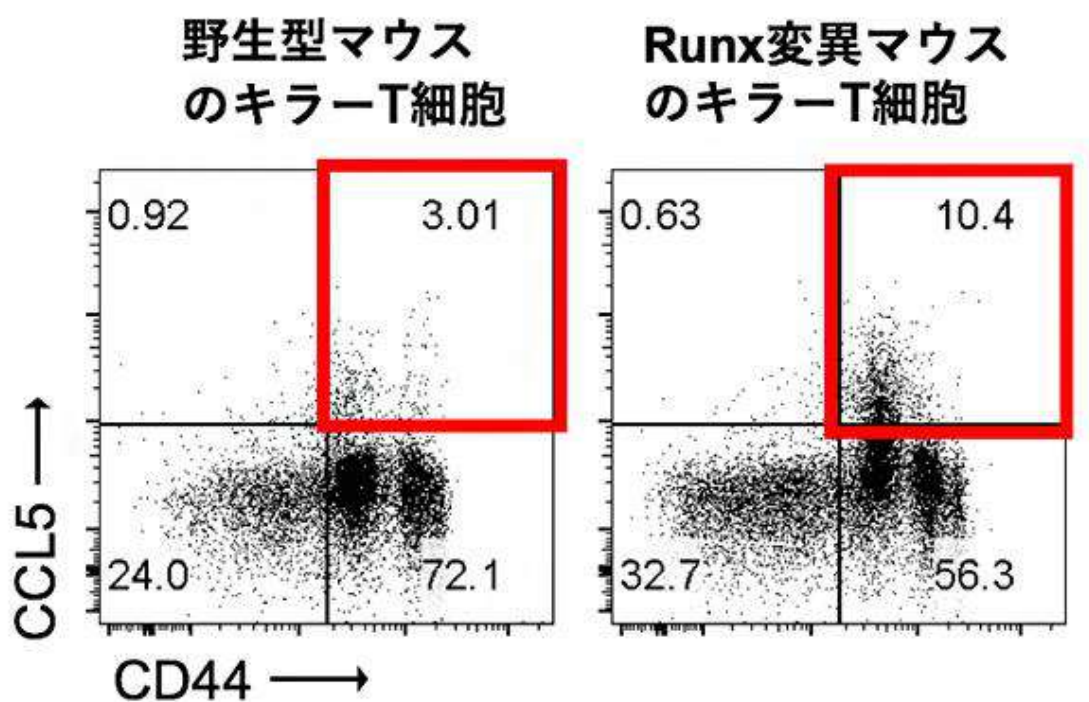


図 1 キラーT 細胞の培養後の CCL5 の発現解析

野生型マウスのキラーT 細胞に比べて、RUNX 欠損キラーT 細胞では CCL5 の発現が亢進している。これにより、CCL5 の発現が RUNX によって抑制されていることが分かった。

次に、RUNX 転写因子がどのようにして CCL5 の発現を抑制するかを調べるため、抗 RUNX 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法[9]を用いて、CCL5 遺伝子の周りで RUNX 転写因子が結合しているゲノム領域を探索しました。その結果、CCL5 遺伝子上流 5kb (キロベース

=1,000 塩基対) の位置に RUNX 結合領域が同定され、この領域を「CCL5 近位エンハンサー」と名付けました。

CCL5 近位エンハンサーの機能を調べるため、ゲノム編集技術を用いて CCL5 近位エンハンサーを欠損するマウスを作製しました。CCL5 は感染や炎症時に活性化された免疫細胞から分泌されますが、感染・炎症が生じていない定常状態でも、粘膜などの末梢組織に定住している組織定住型メモリーT 細胞[10]から少量産生されます。この定常状態での CCL5 の発現は、末梢組織に滞在している免疫細胞の維持に重要な働きをすることが知られています。驚いたことに、CCL5 近位エンハンサー欠損マウスでは、定常状態での CCL5 の発現が消失しましたが、活性化したキラーT 細胞からの CCL5 の発現に変化は見られませんでした。この結果は、活性化したキラーT 細胞での CCL5 遺伝子の発現を誘導する役割を持つエンハンサーが、他にも存在する可能性を示しています。

そこで、enChIP と呼ばれる CRISPR/Cas9[4]技術を使用した最新の研究手法を活用し、CCL5 遺伝子と相互作用するゲノム領域を網羅的に探索しました。その結果、CCL5 遺伝子から 1.35Mb (メガベース=100 万塩基対) という極めて離れた位置に存在するもう一つのエンハンサー領域を同定することに成功し、その領域を「CCL5 遠位エンハンサー」と名付けました。RUNX 転写因子は CCL5 遠位エンハンサーにも結合しており、CCL5 遠位エンハンサーを欠損したマウスでは、活性化したキラーT 細胞で CCL5 遺伝子の発現が消失しました。

これらの結果から、CCL5 遺伝子の発現は少なくとも近位エンハンサー、遠位エンハンサーという二つのエンハンサーによって制御され、RUNX 転写因子は両方のエンハンサーに拮抗的に働き、CCL5 遺伝子の発現を抑制していることが明らかになりました (図 2)。この成果は、CCL5 遺伝子のエンハンサーを初めて同定したものであり、さらに CCL5 遺伝子の発現を能動的に抑制する仕組みがあることを初めて明らかにした画期的なものといえます。

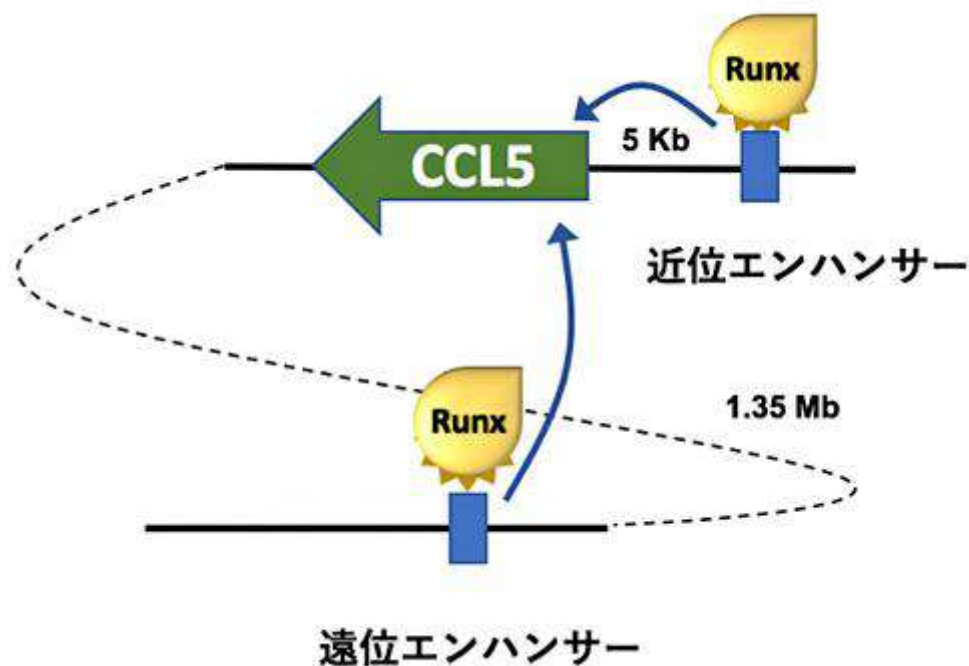


図2 CCL5 遺伝子の発現を調節する二つのエンハンサー

CCL5 遺伝子の 5kb 上流に近位エンハンサーが、1.35Mb 離れた位置に遠位エンハンサーが存在し、ともに RUNX 転写因子によりその機能が抑制されている。

近年の研究成果から、がん免疫応答において組織定住型の免疫細胞の重要性が明らかになってきています。また、CCL5 は組織定住型の免疫細胞を維持するために重要であることが分かっています。そこで、今回作製した CCL5 の二つのエンハンサーを欠損するマウスと皮膚がん細胞の肺への転移モデルマウスを用いて、がん免疫応答を調べました。その結果、CCL5 近位エンハンサー欠損マウスでは、がん細胞の肺転移で見られるがん転移巣の形成が抑制されること、つまりがん細胞が効率良く排除されていることが分かりました (図3)。

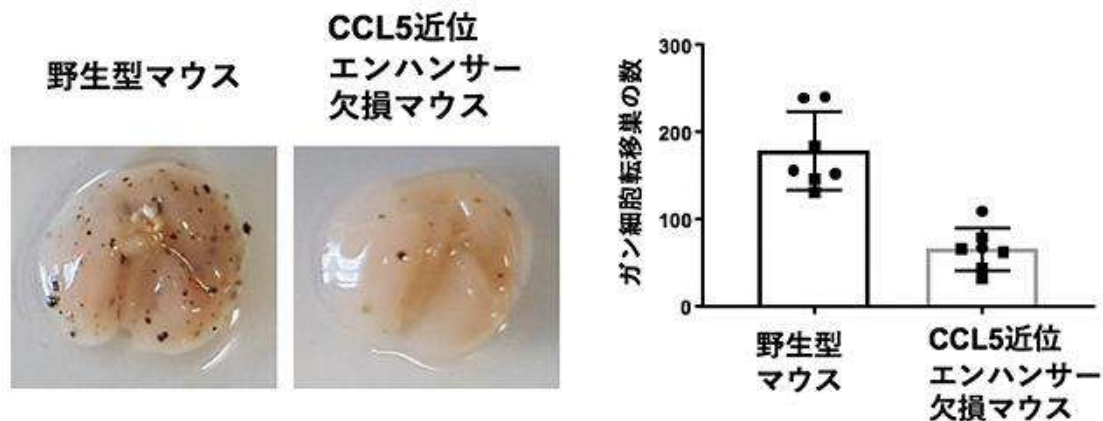


図3 皮膚がん細胞の肺への転移モデルマウスを用いたがん免疫の解析結果

右はマウスの肺の写真、黒い点は皮膚がん細胞の肺転移巣を示している。CCL5 近位エンハンサー欠損マウスでは、野生型マウスと比較してがん転移によるがん転移巣の形成が抑制されており、がん細胞を排除するがん免疫応答が増強されていることが分かる。

この皮膚がん細胞の肺転移に対するがん免疫応答では、NK 細胞が重要な役割を果たすことが知られています。そこで、RNA-seq[11]という研究手法を使って、NK 細胞の機能を解析しました。その結果、近位エンハンサー欠損による肺での CCL5 の発現量の低下により、肺に定住している NK 細胞は、がん細胞を攻撃する機能に関わる遺伝子を多く発現していることが分かりました (図 4)。この結果から、CCL5 は細胞の遊走を誘導する古典的な機能以外に、定常時に組織に定住している免疫細胞の機能を調整し、がん細胞に対する免疫応答を調節するという新たな機能を持つことが明らかになりました。RUNX 転写因子は CCL5 のエンハンサーに拮抗的に作用し、CCL5 が過剰に発現しないように見張ることで、がん免疫応答を増強していると考えられます。

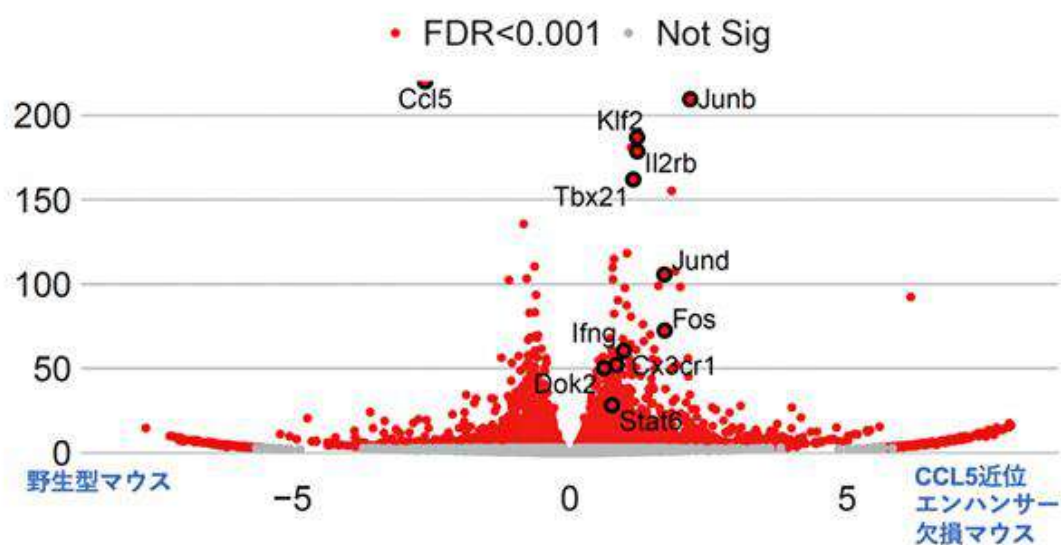


図4 マウス肺に定住するナチュラルキラー細胞の RNA-seq 結果

各点は遺伝子を示す。赤点を黒で囲んだ点は、野生型と CCL5 近位エンハンサー欠損細胞で、発現量が異なる遺伝子である。CCL5 近位エンハンサーを欠損するマウスでは、がん細胞を攻撃する機能に関わる遺伝子がより高く発現している。横軸は各遺伝子の発現量の差を表し、縦軸は発現量の差の有意差の程度を示す。

今後の期待

今回の研究により、CCL5 は免疫細胞の機能調節に重要な分子であることが明らかになりま

した。特に、CCL5 の発現低下によりがん免疫応答が増強されることから、CCL5 やその受容体である CCR5 を阻害することで、効果的ながん免疫療法が期待され、新たながん免疫療法の開発に応用される可能性が考えられます。

論文情報

タイトル：Runx-mediated regulation of CCL5 via antagonizing two enhancers influences immune cell function and anti-tumor immunity

雑誌 Nature Communications

DOI： [10.1038/s41467-020-15375-w](https://doi.org/10.1038/s41467-020-15375-w)

日本語発表原文

https://www.riken.jp/press/2020/20200326_3/index.html

文 JST 客観日本編集部