

NRF2 活性化がん細胞における抗腫瘍免疫逸脱機構の解明
 東北大学加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野
 岡崎 慶斗

研究概要

転写因子NRF2が恒常的に活性化することで、極めて予後が不良であるNRF2活性化がんは、私達の研究室をはじめとする、多くの研究者がこれまで様々な分子機構について明らかにしてきた。さらに近年、シングルセルRNA-シーケンス解析の技術が飛躍的に進歩を遂げるにより、マウスにおけるNRF2活性化がんモデルなどを用いて、NRF2活性化がんにおける抑制性腫瘍微小環境(TME)のエビデンスが構築されつつある。そこで本研究では実際、シングルセルRNAシーケンス解析やNRF2活性化がんのマウスへの同種移植実験を通して、NRF2活性化がんにおける免疫抑制性TMEについて証明した。さらに、その分子機構として、超硫黄分子に着目して解析を進めた。本研究から、NRF2活性化がんでは、NRF2により超硫黄分子が著明に産生されていること、超硫黄分子によりCD8(+)T細胞の活性化が抑制されること、がん細胞から放出される何らかのケモカイン(ケモカインX)が超硫黄分子によって抑制制御を受けることでCD11(+)単球の遊走能を低下させること、また遊走後の末梢血単核球におけるCD4(+)T細胞とCD11b(+)単球のダブルット形成を阻害することなどを明らかにした。これらの機序が一体となり、NRF2活性化がんの免疫抑制性TMEが形成されていることが考えられる(図1)。

研究背景・目的

転写因子NRF2は、生体防御機構において中心的役割を果たしている。一方、非小細胞性肺がんのおよそ20%ではNRF2が恒常的に活性化し、治療抵抗性をもたらしている。私は、こうしたNRF2活性化肺がん恒常的に活性化したNRF2により生じる特徴的な転写制御機構の解明に挑み、エンハンサーのリモデリングとその分子機構などを明らかにしてきた¹⁻³⁾。一方、近年、シングルセルRNAシーケンス解析の発展やマウスにおけるNRF2活性化肺がんモデルを用いた検証により、NRF2活性化がんにおける抑制性の腫瘍微小環境(TME)について示唆されているものの、その詳細な分子機構については不明な点が多く残されている^{4,5)}。

超硫黄分子は硫黄原子が直鎖状に連結した分子を指し、近年の分析技術によって普遍的な生体分子であることが明らかになった⁶⁾。また、私の所属する研究室では昨年度、NRF2がその標的遺伝子であるGCLMやXCTの活性化を介して超硫黄分子の産生に大きく貢献していることを明らかにした⁷⁾。また、私の共同研究者らが、超硫黄分子はCD4(+) T細胞受容体内に存在するCXXCモチーフに結合することでその活性化を抑制することを見出している(未発表)。

以上の背景から私は、NRF2活性化がんにおいて、NRF2を介して著増する超硫黄分子が、NRF2活性化がんのTMEに存在する免疫細胞に抑制的に作用することで、NRF2活性化がんが免疫抑制性TMEを形成しているのでは、と考えるに至り、同仮説を検証することとした。

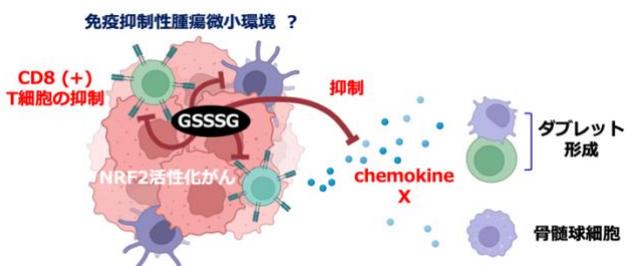


図1. 本研究により、NRF2 活性化がんは免疫抑制性 TME を生じさせていること、またその分子機構として NRF2 が産生する超硫黄分子によって CD8(+) T 細胞の活性化抑制が生じること、がん細胞が放出するケモカイン X が超硫黄分子によって抑制を受けることで CD11b(+) 単球の遊走抑制、CD4(+) T 細胞と CD11b(+) 単球のダブルット形成が抑えられることが明らかとなった。

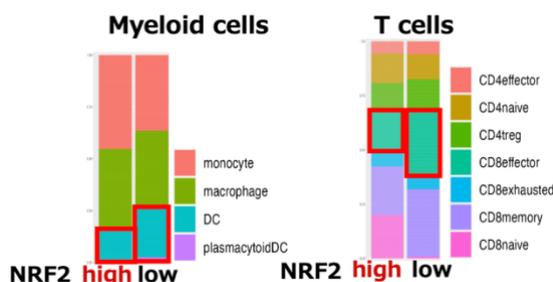


図2. 東北大学病院において、2020年に行われた肺腺がんの手術検体複数例を用いてシングルセル RNA シーケンス解析を行った。同時に施行した免疫染色にて NRF2 の活性が低い群(low)と高い群(high)に分類し、骨髓球(左)、T細胞(右)の各分画を調べた。

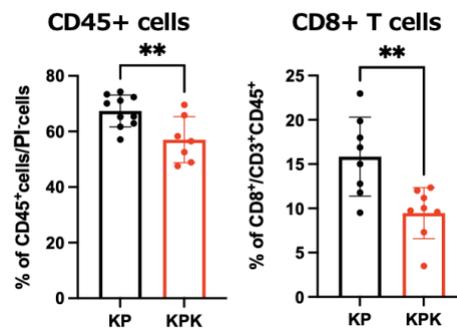


図3. マウス NRF2 正常肺がん細胞 (KP: Kras^{G12D/+}; p53^{-/-}; Keap1 WT)、マウス NRF2 活性化肺がん細胞 (KPK: Kras^{G12D/+}; p53^{-/-}; Keap1R470C)をB6マウスの側腹部へ同種移植を行い、腫瘍形成後、腫瘍を摘出し FACS にて腫瘍内の CD45(+) 細胞(左)と CD8(+) 細胞(右)の割合を算出した。

研究方法・研究結果

NRF2活性化がんにおけるTMEについて詳しく調べるため、東北大学病院における肺腺がんの手術検体を用いたシングルセルRNAシーケンス解析を行った(図2)。免疫染色を行い、NRF2の発現が高い群と低い群に分類し、各がんのTMEに浸潤してくる細胞を調べたところ、NRF2活性が高いがんでは樹状細胞の浸潤の割合が有意に低くなっていること、またCD8(+)T細胞の浸潤の割合が有意に低下していることが明らかになった。続いて、NRF2活性化がん細胞のマウスモデルを用いた検証を行った。共同研究者から譲渡されたマウスNRF2正常肺がん細胞(KP: Kras^{G12D/+};p53^{-/-} Keap1 WT)、マウスNRF2活性化肺がん細胞(KPK: Kras^{G12D/+};p53^{-/-}, Keap1R470C)を用いて同種移植を行い、形成された腫瘍に浸潤してくる細胞をフローサイトメトリー(FACS)にて解析した(図3)。興味深いことにマウスNRF2活性化マウス肺がんではマウスNRF2正常マウス肺がんモデルと比較して腫瘍に浸潤するCD45(+)T細胞、CD8(+)T細胞の割合が減少していることが明らかになった。以上の結果は、NRF2活性化がんにおける免疫抑制性TMEの存在を示している。

次に、NRF2活性化がんにおいて超硫黄分子産生の増加が生じているかを検証した。シングルセル解析と同様、東北大学病院における肺腺がん手術検体を用いて、超硫黄分子(CysSSH、GSSH)について解析したところ、NRF2活性が高いがんでは超硫黄分子量が高いことが明らかになった(図4)。また、NRF2活性化肺がん細胞計3種類を用いて、NRF2をノックダウン(KD)し、培養上清を調べた結果、NRF2活性化がんではがん細胞を入れていない培地と比較して超硫黄の増加を認め、NRF2 KDによりその産生が低下する傾向を認めた(図5)。以上から、NRF2活性化がんではNRF2依存的に超硫黄が産生されることが明らかになった。

そこで、実際CD8(+)細胞の活性化が超硫黄分子により低下するかについて、検証することとした。マウスから採取したCD8(+)細胞を用いたin vitroの検証にて、GSSSG添加によるCD8(+)細胞活性の抑制効果を認めた。すなわち、超硫黄による免疫抑制性TMEの分子機構の一端を示すことができた。

続いて、NRF2活性化がんによる超硫黄分子を介した免疫細胞の遊走能の抑制について検証することとした。トランスウェルを用いてNRF2活性化がんを下層に、ヒトの末梢血単核球(PBMC)を上層に配置し、単核球の遊走能を調べたところ、NRF2活性化がんではNRF2をKDすると、CD11b(+)単核球の遊走能が有意に増加することが明らかになった。さらに、この現象は下層に超硫黄を投与することによりキャンセルされた(図6)。以上の結果はNRF2活性化がんによる単核球の遊走能の低下は、NRF2が産生する超硫黄に依存することを示している。また、がん細胞が分泌する何らかのケモカインがNRF2活性化がんにより産生するGSSSGによる修飾を受けることで失活している可能性を示唆している。そこで、トランスウェルを用い、上層にPBMC、下層

図4. 東北大学病院において、2020年に行われた肺腺がんの手術検体複数例を用いて、質量分析装置(LC-MS/MS)にて超硫黄代謝物(CysSSH、GSSH)を測定した。同時に施行した免疫染色にてNRF2の活性が低い群(low)と高い群(high)に分類し、グラフ(下)に示した。

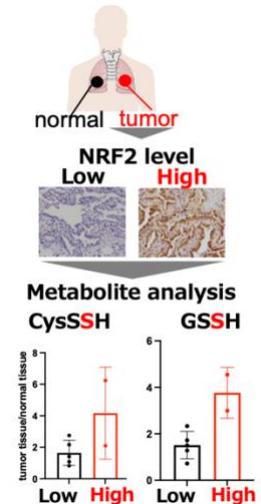


図5. NRF2活性化肺腺がんの細胞株3種類で、Control siRNA、もしくはNRF2 siRNAを導入した後、細胞培養液上清に含有される超硫黄分子(GSSG)をLC-MS/MSにて分析した。

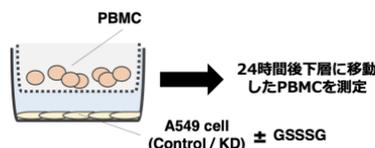
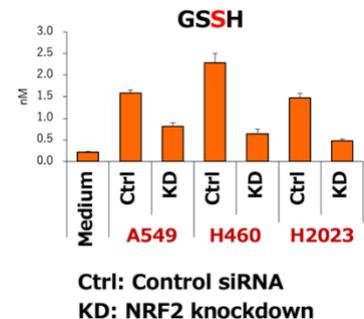


図6. NRF2活性化がんであるA549細胞とPBMCを用いたトランスウェル実験。実験手順(上)と24時間後に下層に遊走したCD11b(+)単核球の割合を測定した実験結果(右)。NRF2 KDは2種類のsiRNA(#28、#30)を用いた。

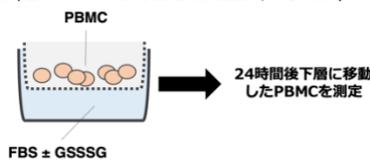
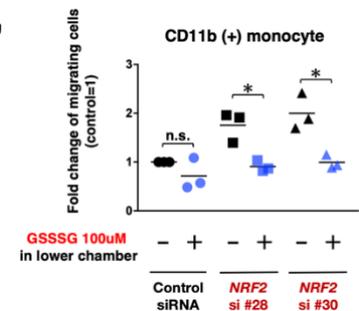
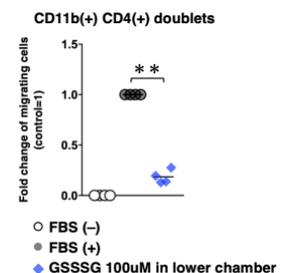
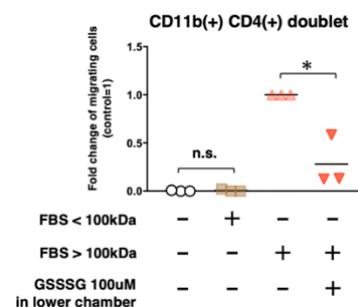


図7. FBSとPBMCを用いたトランスウェル実験。実験手順(上)と24時間後に下層で形成されたCD11b(+) CD4(+)ダブルットの割合を測定した実験結果(右)。



に多数のケモカインを含有するFBSを置き、続いて下層にGSSSGを投与したところ、FBSによる単球の遊走能はGSSSG投与によりキャンセルされた。さらに解析結果を詳しく検証したところ、FBSを投与した場合、下層に遊走するCD4(+)T細胞とCD11b(+)単球は遊走後にダブレットを形成しているが、GSSSG投与はダブレット形成能を低下させることが判明した(図7)。ちなみに、T細胞と単球のダブレットは、潜在性結核などの免疫活性化維持状態を示していることが報告されており⁶⁾、がんという局面においても、同様に免疫活性化維持状態を示していることが推察される。次に、FBS中に含有されるケモカインなどのタンパク質が遊走を生じさせているかを検証するため、FBSを95°Cで15分間熱変性を加えた後に同様のトランスウェルアッセイを行ったところ、熱変性後のFBSではCD11b(+)単球の遊走やCD4(+)T細胞とCD11b(+)単球のダブレット形成は低下した。そこで、GSSSGにより修飾を受けるタンパク質のおおよその分子量を特定するため、FBSをカラム精製後に投与する実験を行うことで、FBS中の100kDaを超える分子量を持つタンパク質がGSSSGの修飾を受けることで単球の遊走能の低下、ダブレット形成の減少が生じることが明らかになった(図8)。一般的に遊走を促すタンパク質としてケモカインが想定されるが、100kDaを超えるケモカインは100kDa未満のケモカインと比較して圧倒的に数が少なく、今後以下の方法を用いてその同定を目指している。

図 8. FBS と PBMC を用いたトランスウェル実験。FBS はカラムを用いて >100kDa、<100kDa に分類した後に各々投与した。24 時間後に下層で形成された CD11b(+) CD4(+)ダブレットの割合を測定した実験結果(右)を示す。



免疫活性化維持状態を示していることが報告されており⁶⁾、がんという局面においても、同様に免疫活性化維持状態を示していることが推察される。次に、FBS中に含有されるケモカインなどのタンパク質が遊走を生じさせているかを検証するため、FBSを95°Cで15分間熱変性を加えた後に同様のトランスウェルアッセイを行ったところ、熱変性後のFBSではCD11b(+)単球の遊走やCD4(+)T細胞とCD11b(+)単球のダブレット形成は低下した。そこで、GSSSGにより修飾を受けるタンパク質のおおよその分子量を特定するため、FBSをカラム精製後に投与する実験を行うことで、FBS中の100kDaを超える分子量を持つタンパク質がGSSSGの修飾を受けることで単球の遊走能の低下、ダブレット形成の減少が生じることが明らかになった(図8)。一般的に遊走を促すタンパク質としてケモカインが想定されるが、100kDaを超えるケモカインは100kDa未満のケモカインと比較して圧倒的に数が少なく、今後以下の方法を用いてその同定を目指している。

今後の研究計画

今後、がん細胞が分泌し、超硫黄により修飾を受けることにより抑制されるケモカイン(ケモカインX)の同定を目指す。

具体的に、NRF2活性化がんNRF2 KDにより減少するケモカインをNRF2活性化がんの培養上清を用いたケモカインアッセイで同定する。さらに、候補となったケモカインを実際投与することで、単球の遊走能やCD4(+)T細胞とCD11b(+)単球のダブレット形成が生じるかを検証する。続いて、同手法で特定したケモカインを試験管内で超硫黄(GSSSG)を反応させ、分子内のS-S結合が乖離するかを検討する。

ケモカインアッセイでケモカインXの同定が困難な場合、共同研究者が現在その作成を試みているBiotin-GSSHを用いた解析を行って同定を目指す。具体的に、Biotin-GSSHとカラムを用いて分離した>100kDaのFBSを反応させ、Streptavidin-Beadsに結合したペプチド断片を質量分析装置により検出することで、GSSHに結合するケモカインの同定を試みる。

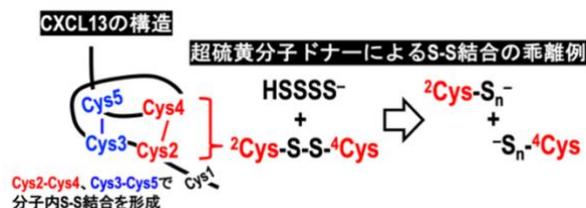


図 9. 超硫黄分子ドナーによる S-S 結合の乖離例。我々の予備実験から、CXCL13 と超硫黄ドナーである Na_2S_4 を反応させたところ、一部の CXCL13 分子中の S-S 結合は乖離し、R-S⁻や R-SS⁻となることがわかっている。

(文献)

- 1) Okazaki K., Anzawa, H., (他 17 名), Sekine, H., Motohashi, H. Enhancer remodeling promotes tumor-initiating activity in NRF2-activated non-small cell lung cancers. *Nat Commun* 11, 5911 (2020).
- 2) Okazaki K., Anzawa, H., Katsuoka, F., Kinoshita, K., Sekine, H., Motohashi, H. CEBPB is required for NRF2-mediated drug resistance in NRF2-activated non-small cell lung cancer cells. *J Biochem* 171, 567-578 (2022).
- 3) Okazaki, K., Papagiannakopoulos, T., Motohashi, H. Metabolic features of cancer cells in NRF2 addiction status. *Biophysical Reviews* 12, 435-441 (2020).
- 4) Salcher, S. et al. High-resolution single-cell atlas reveals diversity and plasticity of tissue-resident neutrophils in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* 40, 1503-1520.e1508 (2022).
- 5) Zavitsanou, A. M. et al. KEAP1 mutation in lung adenocarcinoma promotes immune evasion and immunotherapy resistance. *Cell Rep* 42, 113295 (2023).
- 6) Akaike, T. et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8, 1177 (2017).
- 7) Alam, M. M. et al. Contribution of NRF2 to sulfur metabolism and mitochondrial activity. *Redox Biol* 60, 102624 (2023).
- 8) Burel, J. G. et al. Circulating T cell-monocyte complexes are markers of immune perturbations. *Elife* 8 (2019).