

エピゲノム異常による炎症性亢進を利用した免疫療法

千葉大学 国際高等研究基幹 災害治療学研究所

小野寺 淳

1. 研究開始当初の背景

(背景1: エピジェネティック関連分子TET酵素と炎症) 研究代表者は、これまでの研究で様々なエピジェネティック分子による免疫細胞の制御機構について明らかにしてきた。特に、ヒストン修飾を介して遺伝子発現を抑制するPolycomb群、逆に活性化状態を維持するTrithorax群を主な研究対象としてきた。また、Dr. Anjana Raoの研究室に海外留学した際に、TET酵素による免疫細胞の機能調節をテーマとして研究を行った。TET酵素はDNAの脱メチル化を介して遺伝子発現をONにする。研究代表者らの研究により、T細胞サブセットに特徴的な遺伝子、例えばTh2細胞におけるIL-4やTregにおけるFoxp3の発現にTET酵素が重要であることが明らかになった。しかし不思議なことに、遺伝子発現をONにするはずのTETを欠損したマクロファージでは、炎症性サイトカインの高産生が観察された。この事実と合致して、TET2遺伝子の変異による炎症性亢進と冠動脈疾患との関連がヒトにおいて報告されていた(Jaiswal et al., NEJM. 2017)。そこで、エピジェネティックの異常によって生じる炎症性の免疫細胞を逆に利用して、抗腫瘍免疫の効果を増強できないか、との着想を得た。

(背景2: TET欠損によるNKT細胞の増殖) 抗腫瘍効果を研究するにあたってNKT細胞に着目することにした。理由は以下の二つである。(1) Rao研究室のデータから、CD4+T細胞特異的にTET2/3の遺伝子を欠損させると、マウス体内でNKT細胞が増加することが分かっていた(Tsagaratou et al., Nat Immunol. 2017)。実際に自らの手で調べてみると、増加の程度はマウス個体によってバリエーションがあるものの、確かにNKT細胞が増加することが確かめられた。このTET2/3欠損マウスは出生後数週間で全例死亡するが、マウスが死亡する前に脾臓を取り出して、NKT細胞特異的なTCR刺激(α GalCerを用いる)を加えてIL-2存在下で培養すると、NKT細胞の増殖が見られた。(2) NKT細胞は抗腫瘍効果があり、研究代表者が所属する千葉大学はNKT細胞による免疫療法のフロンティアランナーである。しかしながら、NKT細胞の増殖能は患者毎に違いがあり、効率の良い増殖方法の確立が課題として残っている。そこで、(1)のNKT細胞の増殖がヒトでも再現できれば治療に応用できるのでないかとのアイデアが浮かび、(2)の臨床実績を生かせる新たなプロジェクトを発案するに至った。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究ではエピジェネティック分子欠損で見られる炎症性の亢進を逆手に取って、疾患治療に用いることを目標とした。具体的には、TET欠損のNKT細胞をin vitroで増殖させて、抗腫瘍効果の高い細胞を作成することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞増殖の分子基盤の解明 (マウス)

TET2/3欠損マウス由来の脾臓からwhole splenocyteを取り出し、NKT細胞特異的なTCR刺激を加えてIL-2の存在下で培養すると、NKT細胞が選択的に増殖する(CD4-Creを使った場合)。野生型NKT細胞の増殖には限界があることが知られており、これはヒトでもマウスでも共通の課題である。NKT細胞の効率の良い増殖方法が確立できれば、免疫療法の成績が大幅に改善する可能性がある。本項目ではTET2/3遺伝子を欠損させて増殖するNKT細胞の分子基盤の解明を目的として、以下の項目について実験を行った。

- ① CD4-ERT2-Creにより、CD4+T細胞特異的にTET2/3を欠損させるinducible DKOのNKT細胞においても、CD4-Creを使った既報と同様の現象が見られるか。
- ② TET2/3欠損のNKT細胞は野生型と比較してどのような特徴があるか。
- ③ TET2/3欠損のNKT細胞のグローバルな遺伝子発現は野生型と比べてどう変化するのか。

(2) TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞を使った抗腫瘍活性の評価 (in vitro)

TET欠損NKT細胞を培養後、標的がん細胞と共培養することで抗腫瘍活性を評価した。抗腫瘍活性は、アポトーシスアッセイにより評価した。

- ① マウスのTET2/3欠損NKT細胞を腫瘍細胞(α GalCerをロードしたJurkat細胞)と共培養して、抗腫瘍活性を評価。
- ② Repeat killing assay (Ngai et al., Cancer Immunol Res. 2023) を用いて、TET2/3欠損NKT細胞と腫瘍細胞の

共培養を繰り返した際の疲弊マーカーの発現を評価。

(3) TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞を使った抗腫瘍活性の評価 (in vivo)

NKT細胞を培養後、 α GalCerをロードした樹状細胞 (DC) と共に担がんマウスに移入し、マウスの生存や転移腫瘍の結節数を評価した。担がんマウスとして、メラノーマの肺転移モデルを用いた。

4. 研究成果

(1) TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞増殖の分子基盤の解明 (マウス)

- ① タモキシフェン投与とCD4-Ert2-CreによりTET2/3遺伝子を欠損させて、4-8週間後に脾臓細胞を取り出し、NKT細胞特異的なTCR刺激 (α GalCerを用いる) を加えてIL-2存在下で培養すると、TET2/3欠損型 (DKO) NKT細胞の増殖が見られた (図1A)。このことから、CD4-Ert2-Creにより、CD4+T細胞特異的にTET2/3を欠損させた場合も、NKT細胞の増殖が見られることが分かった。
- ② 腫瘍効果持続のためには、CD62L+のセントラルメモリータイプの細胞の重要性が指摘されている。CD62Lはリンパ球ホーミングに関係し、組織persistenceに重要である。NSGマウスを用いた研究では、CD62L+のヒトNKT細胞を投与した群で、生存期間の有意な延長が報告されている (Gengwen et al, JCI, 2016)。そこで我々は、TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞でCD62Lの発現を調べた。その結果、WTと比較して、DKOのNKT細胞でCD62Lの発現が上昇することを見出した (図1B)。
- ③ TET2/3欠損のNKT細胞のグローバルな遺伝子発現を詳しく調べるためバルクのRNA-seqを行った。DKOで発現が上昇した遺伝子群のGO解析を行うと、自然免疫やウイルス感染に関係する経路がエンリッチしていた。興味深いことに、DKOではinterferon-regulated genes (IRGs) の高発現が特徴的であった。なぜIRGsの発現が上昇するか、抗腫瘍活性とどう関係するかについては現在解析中である。

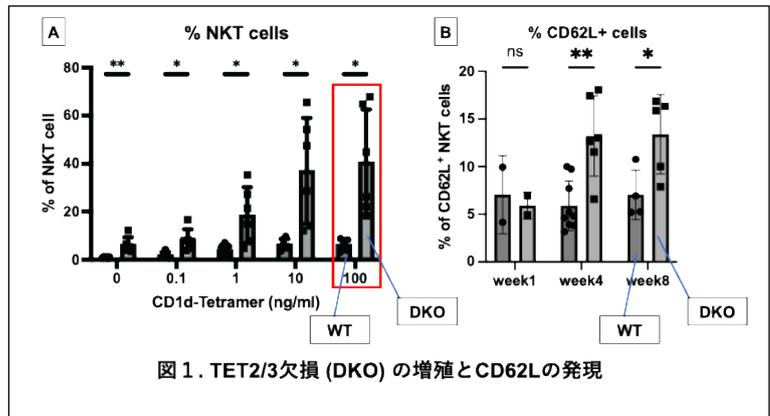


図1. TET2/3欠損 (DKO) の増殖とCD62Lの発現

(2) TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞を使った抗腫瘍活性の評価 (in vitro)

- ① マウスのTET2/3欠損NKT細胞を腫瘍細胞と共培養して抗腫瘍活性を評価するための実験を行った。まずは、 α GalCerをロードしたJurkat細胞と、野生型もしくはTET2/3欠損NKT細胞を共培養し、抗腫瘍活性を調べたところ、TET2/3欠損型NKT細胞において抗腫瘍活性が高い傾向が見られた (図2左)。
- ② 次に、次に我々は、repeat killing assayにより反復刺激を加え、疲弊マーカーPD-1の発現を調べた。Repeat killing assayでは、NKT細胞と腫瘍細胞Jurkatを1:1の比でmixし、PD-1の発現を3日毎にFACSで調べた。その結果、WTではPD-1発現が徐々に上昇するのに対して、DKOではそれが抑制されることが分かった (図2右)。

(3) TET2/3欠損 NKT細胞を使った抗腫瘍活性の評価 (in vivo)

最後にWTとDKOのin vivoでの抗腫瘍効果を調べるため、メラノーマの肺転移モデルを用いた。ここでは、無治療 (NT)、

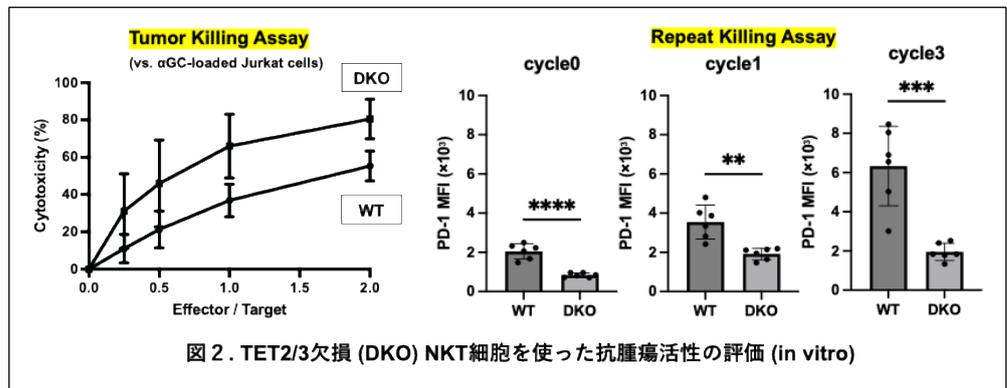


図2. TET2/3欠損 (DKO) NKT細胞を使った抗腫瘍活性の評価 (in vitro)

DCのみ、DC+WTのNKT、DC+DKOのNKTの4群を用意した。Day0に腫瘍細胞を静注して、day1に α GalCerをパルスしたDCとNKT細胞を投与、Day14に肺を摘出して、写真をとってから結節を数えた。

NT群では、肺転移の結節が数多く見られた。DC群とDC+WTのNKT群では、ある程度の結節数の減少が見られたが、まだ相当数の転移結節が残っていた。これに対して、DC+DKOのNKT群では、結節がほぼ消失していた。従って、DKOのNKT細胞はin vivoで強い抗腫瘍活性を示す、ことが分かった。

5. 考察と今後の展望

貴財団の研究助成金のご支援により当初の予想以上に研究成果を上げることができた。現在本研究の内容の論文化に取り組んでおり、今年中には投稿したいと考えている。この研究成果をさらに発展させるため、貴財団のステップアップ助成金やAMEDの事業に応募することを計画している。貴財団の研究支援に改めて感謝申し上げます。

6. 発表論文

1. Koyama-Nasu R, Kimura MY, Kiuchi M, Aoki A, Wang Y, Mita Y, Hasegawa I, Endo Y, **Onodera A**, Hirahara K, Motohashi S, Nakayama T.
CD69 Imposes Tumor-Specific CD8+ T-cell Fate in Tumor-Draining Lymph Nodes.
Cancer Immunol Res. 2023. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-22-0406.
2. **Onodera A**, Kokubo K, Okano M, Onoue M, Kiuchi M, Iwamura C, Iinuma T, Kimura MY, Ebihara N, Hanazawa T, Nakayama T, Hirahara K.
Pathogenic helper T cells as the novel therapeutic targets for immune-mediated intractable diseases.
Pharmacol Ther. 2023. doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108445.
3. Suzuki K, Rao A, **Onodera A**.
The TET-TDG axis in T cells and biological processes.
Int Immunol. 2025. doi: 10.1093/intimm/dxaf006.
4. Iinuma T, Kurokawa T, Aoki T, **Onodera A**, Fukazawa T, Yamada D, Kitahara G, Okoshi M, Yamaguchi M, Okura H, Sasaki S, Sasako Y, Kira S, Sharif J, Tsuchiyama Y, Kobayashi M, Kobayashi N, Horikoshi T, Inaba Y, Hanaoka H, Okamoto Y, Hanazawa T, Koseki H, Motohashi S.
Allogeneic iPSC-derived iNKT cells in recurrent head and neck cancer: a phase 1 trial.
Nat Commun. 2025. doi: 10.1038/s41467-025-66801-w.

7. 学会発表（招待講演のみ）

1. **Onodera A**.
Overview Talk: Epigenetic regulation in health and disease.
The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (JSI). 2024.
2. **Onodera A**.
In Memory of Toshi: Toshi's Research Achievement in Epigenetics & Gene Expression.
Dr. Toshinori Nakayama Memorial cMAV-cSIMVa Workshop. 2024.
3. **Onodera A**.
DNA demethylation in the immune system: do TET and TDG play roles?
Dr. Toshinori Nakayama Memorial cMAV-cSIMVa Workshop. 2024.
4. **Onodera A**.
Roles of TET and TDG in DNA demethylation in the hematopoietic and immune systems.
The 33rd International KOGO Annual Conference. 2024.
5. **Onodera A**.
TET-dependent epigenetic regulation in health and disease.
International Immunology meeting at Seoul National University. 2024.
6. **Onodera A**.
The double-edged sword of TET mutations in the immune system.
Anticancer Immune Cell Okinawa Symposium. 2024.