

マクロファージ免疫チェックポイント分子による Tリンパ腫増悪化メカニズムを解明

～悪性リンパ腫に対する新たな治療薬開発への応用に期待～

ポイント

- ・ CD47 欠損 T リンパ腫細胞のマウスへの接種時には腫瘍形成や腫瘍転移が減弱。
- ・ CD47 はグアニンヌクレオチド交換因子 AKAP13 と結合し低分子量 G タンパク質 RhoA 活性を促進。
- ・ CD47-AKAP13-RhoA 相互作用の解析は新しい T リンパ腫治療薬開発に繋がる。

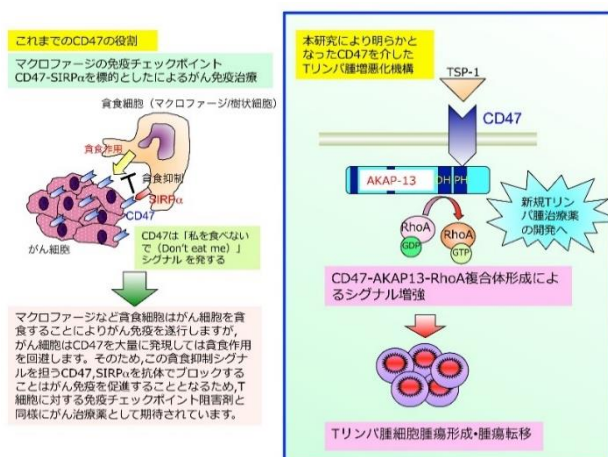
概要

北海道大学大学院薬学研究院の鍛代悠一助教・松田 正教授らの研究グループは、マクロファージ免疫チェックポイント分子 CD47 が、低分子量 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) RhoA の活性を調節するグアニンヌクレオチド交換因子 AKAP13 と結合して RhoA 活性を促進することにより、T リンパ腫の腫瘍形成や腫瘍転移に関与することを見出しました。

悪性リンパ腫は、免疫を司るリンパ球ががん化して増殖し、リンパ組織に塊 (腫瘍) を作る病気で年間 10 万人あたり 10 人程度の発症が報告されており、日本人の成人では最も頻度の高い血液のがんの一種です。この病気は、加齢、放射線、慢性炎症などの要因により、染色体や遺伝子に異常が起こることが発症の原因ではないかと考えられています。日本人の悪性リンパ腫の 90% 以上を非ホジキンリンパ腫が占め、中でも T 細胞リンパ腫には、末梢性 T 細胞リンパ腫・非特定型、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、節外性 NK・T 細胞リンパ腫などがあり、多剤併用化学療法や放射線療法が行われています。しかし、副作用が多く、また、再発難治例では治療が難航することもあります。そのため、T リンパ腫の発症や進展に関与する分子機序の解明により、副作用が少ない新しい分子標的治療薬の開発が望まれています。

今回、研究グループは、マクロファージ免疫チェックポイント分子である CD47 が T リンパ腫の増悪化に関与することを明らかにしました。本研究は、CD47 の T リンパ腫増悪化に対する新たな役割を発見したものであり、悪性リンパ腫の新規治療薬の開発に繋がることが期待されます。

なお、本研究成果は 2021 年 1 月 6 日 (水) 公開の *International Immunology* 誌に掲載されました。



がん免疫治療におけるこれまでの CD47 細胞戦略と本研究による新たな治療戦略への展望

【背景】

がんは我が国の死因の第一位であり、より有効な治療薬の開発が望まれています。近年ではがん細胞に多く存在する特定のタンパク質に作用する薬剤（分子標的薬）によるがん治療が行われ、その効果が注目されています。また、本庶 佑博士とジェームズ・アリソン博士が 2018 年にノーベル生理学・医学賞を受賞したことで、がん免疫療法も新たながん治療法として脚光を浴びています。

がん免疫療法には、がんに対して免疫による攻撃力を高める方法と、がんによってブレーキがかかった免疫の攻撃力を回復させる方法（免疫チェックポイント阻害療法など）が知られており、現在では免疫チェックポイントと呼ばれている T 細胞のブレーキ役（CTLA-4 や PD-1/PD-L1）を阻害する薬（免疫チェックポイント阻害薬）が実際の治療で使用されるようになってきました。一方、T 細胞に存在するブレーキ役とは異なり、がん細胞を食べる（貪食）能力を持つマクロファージにも免疫チェックポイント分子（SIRP α と CD47）が存在します。

近年の研究により、マクロファージ免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体を用いることで、マクロファージが活性化され、がん細胞を効率よく排除できることが明らかにされており、貪食作用を抑制することから「私を食べないで (Don't eat me)」シグナルと呼ばれています。非ホジキンリンパ腫や乳がんなどは CD47 を過剰発現しており、これら腫瘍細胞の CD47 が出すシグナルをマクロファージの SIRP α が感知すれば、マクロファージは腫瘍細胞を貪食しないため、腫瘍増殖や腫瘍転移が促進されますが、CD47 や SIRP α に対する阻害抗体は、その「食べないで」シグナルを発生させない役割を果たすことにより抗腫瘍効果を発揮し、がん治療薬となります (p.1 図)。

CD47 は元々、細胞接着分子として知られるインテグリンタンパク質に会合するタンパク質として同定され、細胞接着や細胞遊走に関与します。また、細胞外マトリックスタンパク質トロンボスポンジン-1 (TSP-1) は CD47 のリガンド（特定の受容体に結合する物質）として知られており、CD47 に結合し、RhoA や Rac1 といった Rho ファミリー低分子量 G タンパク質を活性化します。Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は、細胞の形態形成や運動性を制御する種々のシグナル伝達の中心的な役割を担うとともに、細胞の生存・増殖にも強く関与しています。このような Rho ファミリー G タンパク質による機能発現には、グアニンヌクレオチド GDP/GTP 交換因子 (GDP/GTP exchange factor: GEF) が必要です。低分子量 G タンパク質 Ras 変異の活性化が約 30% のヒト癌への関連が知られるように、Rho ファミリーもがんでの腫瘍増殖や腫瘍転移への関与が強く示唆されています。

また、最近、Rho GEF である LARG (leukemia-associated Rho GEF) の低分子阻害剤 Y16 は LARG と RhoA の相互作用を抑制し、MCF-7 乳がん細胞において増殖や転移、浸潤を阻害することも報告されています。

【研究手法】

本研究では、CD47 欠損/遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞及びコントロール T リンパ腫細胞株をマウスに接種し、腫瘍形成や腫瘍転移がどのように変化するかを解析しました。また、これら CD47 欠損/遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞株での細胞接着への影響やマクロファージなどの貪食細胞による食作用への影響を、コントロール T リンパ腫細胞株と比較検討しました。さらに、これら T リンパ腫細胞株を CD47 のリガンドとして知られる細胞外マトリックスタンパク質トロンボスポンジン-1 (TSP-1) 処理することにより、細胞内シグナル伝達を担う低分子量 G タンパク質 RhoA や Rac1 などの活性化を比較検討しました。CD47 細胞内ドメインが RhoA 特異的な GEF タンパク質 AKAP13 やその欠損体と結合するかどうかについては、免疫沈降法などを用いて解析し、腫瘍形成がどのように変化するかについては、AKAP13 遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞株及びコントロール T リンパ腫細胞株をマウスに接種し解析しました。

【研究成果】

初めに、CD47 欠損マウス T リンパ腫細胞 EG7 や CD47 遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞株 L5178Y 及びコントロール T リンパ腫細胞をマウスに皮下接種し、腫瘍形成や腫瘍転移がどのように変化するかを観察しました。その結果、コントロール T リンパ腫細胞接種群では、腫瘍形成の亢進や移植後 40 日で肝臓などへの転移が観察されるとともに死亡しました (図 1A, B)。一方、CD47 欠損/遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞移植群では腫瘍形成が抑制されました。CD47 は、細胞増殖や遊走に関係するインテグリンファミリーによる細胞接着やマクロファージや樹状細胞による貪食作用において働くことが知られているため、まず、インテグリンファミリーを介する細胞外マトリックスタンパク質フィブロネクチンへの細胞接着活性を測定したところ、CD47 欠損によりフィブロネクチンへの細胞接着活性への影響は認められませんでした。次いで、貪食作用への影響を検討するため、CD47 欠損/遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞及びコントロール細胞の生細胞または死細胞をマウス骨髄由来のマクロファージ及び樹状細胞と共培養することによる貪食作用を検討しましたが、T リンパ腫細胞上の CD47 の貪食効果への影響は観察されませんでした。これらの結果から、CD47 が貪食細胞への細胞接着や Don't eat me シグナルを介したがん細胞への応答とは異なる機序で機能している可能性が考えられました。

そこで、CD47 細胞内ドメインを介した細胞内シグナル伝達への影響を検討しました。CD47 欠損マウス T リンパ腫細胞及びコントロール細胞を TSP-1 で処理した後、RhoA 及び Rac1 活性を解析したところ、コントロール細胞では両分子の活性化が TSP-1 により誘導されたものの、CD47 欠損では RhoA の活性化が観察されませんでした。この CD47 欠損での RhoA の活性化低下が腫瘍形成・腫瘍転移の軽減効果を引き起こすのかどうかについて、RhoA の恒常的活性化型である RhoA G14V を CD47 欠損マウス T リンパ腫細胞に発現させてマウスに移植したところ、腫瘍形成の回復が観察されました。また、CD47 細胞内ドメインが RhoA 特異的な GEF タンパク質 AKAP13 とその PH ドメインを介して結合することを示しました。CD47 は RhoA と直接結合しませんが、AKAP13 はその DH ドメインを介して RhoA と結合することから、CD47 は AKAP13 を介して RhoA と複合体を形成し、AKAP13 が効率的な RhoA の活性化を行うための足場タンパク質としての新規機能を有していることが明らかとなりました。実際に、CD47 欠損で AKAP13 による RhoA 活性化は誘導されず、AKAP13 遺伝子ノックダウンマウス T リンパ腫細胞接種群でも、CD47 欠損やノックダウンの場合と同様の腫瘍形成抑制効果が観察されました (図 1C)。

【今後への期待】

本研究により、CD47 が AKAP13-RhoA と複合体を形成し、T リンパ腫の増殖や転移といったがんの増悪化に寄与する新規機能を明らかにしました。これまでの CD47 阻害抗体のみならず、CD47-AKAP13-RhoA シグナルを標的とした低分子阻害剤などの治療薬が悪性リンパ腫に有効である可能性が示唆されました。今後、CD47-AKAP13-RhoA シグナルを標的とした新規治療薬の開発が進むことが期待されます。

論文情報

論文名 CD47 promotes T-cell lymphoma metastasis by upregulating AKAP13-mediated RhoA activation (CD47 は AKAP13/RhoA シグナルを介して T リンパ種の転移を促進する)

著者名 鍛代悠一¹, 石浦まりえ¹, 齋藤浩大¹, 松本尚樹¹, 大鷲公也¹, 山田駿介¹, 室本竜太¹, 柏倉淳一¹, 織谷健司², 松田 正¹ (¹ 北海道大学大学院薬学研究院, ² 国際医療福祉大学医学部)

雑誌名 *International Immunology* (免疫学の専門誌)

D O I 10.1093/intimm/dxab002

公表日 2021年1月6日(水)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 助教 鍛代悠一 (きたいゆういち)

T E L 011-706-3244 F A X 011-706-4990 メール yu-kitaii@pharm.hokudai.ac.jp

北海道大学大学院薬学研究院 教授 松田 正 (まつただだし)

T E L 011-706-3243 F A X 011-706-4990 メール tmatsuda@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール kouhou@jimu.hokudai.ac.jp

【参考図】

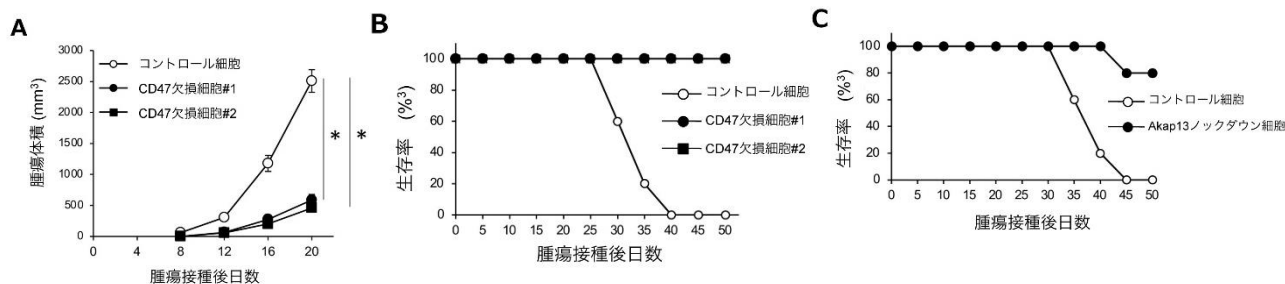


図 1. リンパ腫モデルマウスにおける腫瘍体積の変化と生存率。

(A・B) CD47 欠損マウス T リンパ腫 EG7 及びコントロール T リンパ腫細胞株 EF7 をマウスに接種した後の腫瘍形成と生存率の推移。

(C) AKAP13 ノックダウンマウス T リンパ腫細胞株 EG7 及びコントロール T リンパ腫細胞株 EF7 をマウスに接種した後の生存率の推移。

【用語解説】

- *1 リンパ球 … 免疫細胞群の一つ。免疫反応の司令塔である T 細胞や抗体を産生する B 細胞などが含まれる。
- *2 ノックダウン … 特定の遺伝子の発現だけを抑制する操作のこと。遺伝子そのものを破壊する遺伝子ノックアウト(遺伝子欠損)とは異なり、遺伝子の発現量を大きく減弱させ、それに伴い当該タンパク質の発現も低下するが、完全には失わせない。本研究では、shRNA と呼ばれる RNA を用いて遺伝子をノックダウンしている。
- *3 低分子量 G タンパク質 … 分子量 20~30kDa のグアノシン三リン酸 (GTP) に結合するタンパク質で、GDP が結合している不活性型(スイッチのオフ)と GTP が結合した活性型(スイッチのオン)の間を切り替えることにより、細胞内シグナルを伝達する分子スイッチとして働く。