

主論文の要旨

**An Oncogenic Alteration Creates a Microenvironment
that Promotes Tumor Progression by Conferring a
Metabolic Advantage to Regulatory T Cells**

腫瘍遺伝子変異が制御性T細胞を腫瘍微小環境に
誘導する機構に関する代謝的観点からの基礎的検討

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子細胞免疫学分野

(指導：西川 博嘉 教授)

熊谷 尚悟

【緒言】

PD-1 阻害剤治療が胃がんを始めとした様々ながん種に奏効することが報告されてきた。しかし、胃がんに対する抗 PD-1 抗体治療の奏効率は悪性黒色腫や肺がんに比べて低いことを考慮すると、胃がんではより強い免疫抑制性の腫瘍環境が形成されている可能性がある。従って、本研究では、抗腫瘍免疫応答の中心的役割を担う細胞傷害性 T 細胞と免疫応答を抑制する働きを持つ制御性 T 細胞とのバランスなどの解析から胃がん腫瘍微小環境の免疫状態を評価し、その免疫抑制環境が引き起こされるメカニズムを解明し、新規がん免疫併用治療の開発の可能性を明らかにすることを目的とした。

【結果】

胃がん手術検体の遺伝子発現のデータを免疫応答に関わる遺伝子セットを用いてクラスタリングした。また、腫瘍に浸潤するリンパ球のフローサイトメトリーによる解析結果と統合解析すると、制御性 T 細胞は通常は抗腫瘍免疫応答が強い腫瘍に浸潤するが、制御性 T 細胞が多く浸潤する一群の中に、エフェクター免疫細胞による抗腫瘍免疫応答が強い群と弱い群が存在することが明らかになった。抗腫瘍免疫応答が弱いにもかかわらず制御性 T 細胞が多く浸潤している一群の中で、半数の患者が Y42C 変異 *RHOA* を持つことが判明した (図 1)。

免疫応答関連遺伝子によるクラスタリングと腫瘍浸潤リンパ球の統合解析の結果から、*RHOA* 変異を持つ胃がんではエフェクター T 細胞による抗腫瘍免疫応答が十分に誘導されていないことに加えて、制御性 T 細胞が多く浸潤していることが示された。新たに進行胃がん症例の腫瘍浸潤リンパ球を解析したところ、Y42C 変異 *RHOA* 胃がんの腫瘍微小環境では CD8 陽性 T 細胞に比べて制御性 T 細胞が多く浸潤し、免疫抑制機能を司る CTLA-4 発現が高いことが示された (図 2)。

続いてなぜ *RHOA* Y42C 変異腫瘍では抗腫瘍免疫応答が起きにくくなっているのかを検討した。胃がん細胞株である MKN1 に野生型 *RHOA* と Y42C 変異 *RHOA* を強制発現させた。Y42C 変異 *RHOA* 強制発現株では活性化型 *RHOA* の発現が低下し、*RHOA* シグナルが低下していることが判明した。マイクロアレイにて遺伝子発現を網羅的に解析したところ、CD8 陽性 T 細胞を誘導することが知られている CXCL10/CXCL11 の発現が Y42C 変異 *RHOA* 強制発現株で低下していることが判明した。この結果は胃がん患者検体の解析でも検証された (図 3)。

Y42C 変異 *RHOA* でこれらのケモカイン発現が低下するメカニズムを検討した。野生型 *RHOA* と Y42C 変異 *RHOA* 強制発現株の網羅的遺伝子発現の結果を解析したところ、CXCL10/CXCL11 発現を制御することが知られている IRF1 発現が Y42C 変異 *RHOA* 強制発現株で低下していることが判明し、転写調節により CXCL10/CXCL11 発現が低下していることが明らかになった。この結果は胃がん患者の臨床検体でも検証された (図 3)。IRF1 発現低下についてより詳細に検討したところ、Y42C 変異 *RHOA* では PI3K/AKT 経路が活性化することで、IRF1 発現が低下することが判明した (図 4)。

続いて Y42C 変異 *RHOA* でなぜ制御性 T 細胞が多く浸潤するかを検討した。臨床検体の遺伝子発現の結果をエンリッチメント解析したところ、*RHOA* 変異胃がんで脂肪酸代謝に関わる遺伝子群が増加していた。それらの遺伝子群の中で、脂肪酸合成に深くかかわる *FASN* 遺伝子発現が Y42C 変異 *RHOA* 強制発現株で有意に高い結果となり、培養上清の脂肪酸濃度も有意に上昇していた。Y42C 変異 *RHOA* により PI3K/AKT/mTOR 経路を介し (図 4)、脂肪酸合成が有意に亢進することが明らかになった。

マウスの消化管由来のがん細胞株である MC-38 をマウスに皮下移植し、腫瘍浸潤リンパ球を解析し、各リンパ球サブセットと制御性 T 細胞の脂肪酸代謝にかかわる分子発現を比較したところ、制御性 T 細胞において脂肪酸取り込みが上昇し、脂肪酸代謝に関わる分子の発現が亢進していることが判明した (図 5)。以上より Y42C 変異 *RHOA* 胃がんでは、がん細胞が脂肪酸を多く生成することで、他のリンパ球に比較して制御性 T 細胞が生存・機能しやすい環境を作り、制御性 T 細胞優位の環境が形成されている可能性が示唆された。

Y42C 変異 *RHOA* により腫瘍浸潤制御性 T 細胞が増加するかをマウスモデルで検証した。MC-38 に野生型 *RHOA* と Y42C 変異 *RHOA* をそれぞれ強制発現させ、マウスに皮下接種し腫瘍浸潤リンパ球を解析した。Y42C 変異 *RHOA* 腫瘍の腫瘍微小環境では制御性 T 細胞が多く浸潤し抑制活性が高いことが判明した。Y42C 変異 *RHOA* 腫瘍が抗 PD-1 抗体治療に奏効するかを検討した。野生型 *RHOA* 細胞株と Y42C 変異 *RHOA* 細胞株をそれぞれマウスに皮下接種し、抗 PD-1 抗体治療を実施したところ、Y42C 変異 *RHOA* 腫瘍は抗 PD-1 抗体治療に耐性を示した (図 6)。抗 PD-1 抗体治療を実施した *RHOA* 変異胃がん症例を検討したところ、同様に全例が PD-1 阻害剤治療に抵抗性を示した。

RHOA 変異に特徴的なシグナルを阻害することで抗 PD-1 抗体治療抵抗性を解除できるかを検討した。*RHOA* 変異により PI3K/AKT 経路が活性化することがこれまでの検討で明らかになっていたので、PI3K 阻害剤を用いて検討した。Y42C 変異 *RHOA* 細胞株において PI3K 阻害剤を投与すると、IRF1 発現が亢進した結果、CXCL10/CXCL11 発現は増強する一方で脂肪酸合成能は低下した。Y42C 変異 *RHOA* 腫瘍に対する PI3K 阻害剤と抗 PD-1 抗体の併用治療の有効性をマウスモデルで検討したところ、PI3K 阻害剤を併用することで抗 PD-1 抗体治療抵抗性は解除された (図 7)。

【考察】

これまで胃がんにおいて特定の遺伝子変異が免疫応答に与える影響は明らかではなかった。本研究により *RHOA* 変異胃がんでは、腫瘍微小環境に制御性 T 細胞の浸潤が多く抗腫瘍免疫応答が弱いという特徴があることが明らかになった。がんドライバー遺伝子変異である *RHOA* 変異によるシグナルは従来がん細胞の生存や増殖に関わると考えられてきたが、それだけではなく、脂肪酸を合成することで制御性 T 細胞の生存、活性化に有利な環境を形成し、強い免疫抑制性腫瘍微小環境を形成しているという新

しい概念が示された。制御性 T 細胞は炎症性の腫瘍微小環境に浸潤すると考えられてきたが、本研究によりがん細胞自身が多数の制御性 T 細胞が存在できる環境を提供しているということが明らかになり、制御性 T 細胞を標的としたがん免疫療法の新たな展開につながると考えられた。特に *RHOA* 変異胃がんでは、*RHOA* 変異の下流シグナルである PI3K を阻害し、抗 PD-1 抗体と併用治療を実施すると治療抵抗性が改善する可能性が示され、今後の新たな胃がん治療戦略につながることが期待される。

【結論】

RHOA 変異胃がんでは、PI3K/AKT 経路を介して CD8+T 細胞のがん組織への浸潤が抑えられるとともに、制御性 T 細胞が生存するのに有利な代謝学的環境を作り、がん免疫療法に抵抗性を示すことが示された。その免疫抑制機序が解明されたことで、PI3K 阻害剤ががん免疫療法の治療効果を改善する可能性が明らかになった。