

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18446

研究課題名(和文) 単一細胞遺伝子プロファイルに基づく真に抗腫瘍効果を発揮するT細胞の同定とその制御

研究課題名(英文) Identification of T cells that exhibit cytotoxic activity against tumor based on the single-cell gene expression profiles and control their function

研究代表者

森本 創世子 (Morimoto, Soyoko)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：10649023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：平成25-26年度の科研費若手Bの助成によりWT1-EM CTLの遺伝子のmRNA発現をsingle cell定量RT-PCR法を用いて網羅的に解析した。その結果、WT1-EM CTLは遺伝子発現量によって“activated (A)”と“quiescent (B)”の2群に分かれ、良好な臨床効果が認められた患者では治療後にWT1-EM CTLの遺伝子発現パターンがBに、認められない患者ではAに属することを明らかにした。また、平成27-28年度に科研費若手Bの助成により、TCR avidityの違いがT細胞の分化の運命決定に関与している可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Multiple gene-expression analysis using single-cell real-time PCR showed that WT1 specific effector-memory CTL (WT1-EM CTL) population from cancer patients could be divided into two groups: the “activated” and “quiescent” states and WT1-EM CTL in good responder turn from “activated (Group: A)” to “quiescent (Group: B)” after WT1 peptide vaccination. We further show that TCR avidity could have played an essential role in differentiation of self-antigen-reactive T cells.

研究分野：癌免疫学

キーワード：single cell RT-PCR WT1 specific CTLs memory

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は手術や抗癌剤、放射線療法に次ぐ第四の癌治療法として注目されている。中でも CAR-T 細胞療法や免疫チェックポイント抗体療法の登場は、癌治療分野に衝撃を与え、がん免疫療法を癌の一般的な治療法へと位置付けるほどに世界中で日々多くの臨床試験や治験、治療が行なわれるほどにまでなった。しかし、未だその効果は十分とは言えず、全ての患者で良好な効果がもたらされるわけではない。その理由として細胞傷害性 T 細胞の細胞傷害活性が一時的で体内で十分な期間働くことができないということが挙げられる。つまり、がん免疫療法の効果増強は、強力な細胞傷害活性をもつ細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を一過性ではなくいかに長期的に誘導できるかにかかっている。

強力な細胞傷害活性を持つ CTL を誘導するために、強力な細胞傷害活性を持つ CTL を同定する必要がある。しかし、これまでの実験系ではこのような CTL を突き止めることは困難であった。なぜなら、例えば癌患者末梢血中単核球に含まれる癌抗原特異的 CTL の存在頻度、その分化・活性化段階および機能解析をがん免疫療法の前後で評価する系では、どのような性質の CTL 集団が治療によって増減したかを評価するにとどまる。また、癌抗原特異的 CTL の T 細胞受容体 (TCR) の repertoire 解析でも同様に、治療によって増減する TCR を追跡することはできるが、clonal expansion した CTL clone によって抗腫瘍効果がもたらされたか、は分からず、CTL の clonal expansion と細胞傷害活性の直接的な因果関係は突き止められない。そこで、真に強力な抗腫瘍効果をもたらす T 細胞を同定するために、癌抗原特異的 CTL を単一細胞レベルで解析できる実験系の構築が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、平成 25-26 年度の科研費若手 B の助成により明らかにできた、9 名の癌患者の WT1 ペプチドワクチン療法前における WT1 特異的エフェクターメモリー CTL の遺伝子発現パターンが、治療後にどのように変化するかを突き止めることを一つの目的とした。さらに、WT1 特異的 CTL に長期的な細胞傷害活性を付与する遺伝子の同定を二つ目の目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究結果より我々は、真に抗腫瘍効果をもたらす T 細胞を同定するために、ヒトの細胞を用いた遺伝子発現パターンの解析とマウスの細胞を用いた TCR の種類による T 細胞の機能評価 2 方向から実験を進めることとした。

ヒトの細胞を用いた実験
良好な臨床効果が認められた癌患者およ

び認められなかった癌患者の WT1 特異的エフェクターメモリー CTL について、WT1 ペプチドワクチン投与前後における遺伝子発現パターン変化の可視化を試みた。

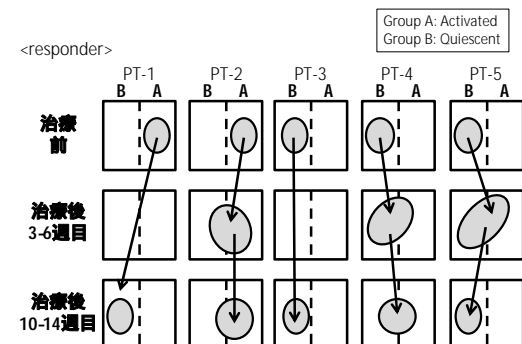
マウスの細胞を用いた実験

ヒトの細胞を用いた実験で得られた遺伝子発現パターンの違いが、TCR を介した signal の強さの違いによってもたらされると考えた。そこで、複数種類の TCR 遺伝子を cloning するために、複数種類の WT1 特異的 CTL の誘導を試みた。具体的には、WT1 ペプチドで免疫したマウスの脾細胞を in vitro でさらに WT1 ペプチドで刺激し、WT1 特異的 CTL を誘導した。誘導した 2 種類の WT1 特異的 CTL より TCR を単離および cloning し (TCR1 および TCR2) TCR1 および TCR2 導入 T 細胞の WT1 ペプチドに対する反応性の違いを評価した。

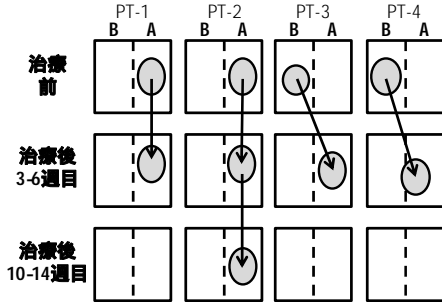
4. 研究成果

9 名の WT1 ペプチドワクチン投与癌患者のうち、臨床効果が認められた 5 名は、WT1 特異的 CTL の遺伝子発現パターンが治療後に "quiescent" に分類されたのに対し、認められなかった 4 名は、"activated" に分類された (図 1)。この遺伝子発現パターンの変化は、WT1 ペプチドワクチンによって clonal expansion した一つまたは数種の CTL clone の変化を表しているのかそれとも多様な CTL clone 全てで起こった変化なのかは明らかではない。そこで、TCR の種類によって抗原への反応性が異なるかを調べる実験系を構築するために、TCR affinity の異なる 2 種類の TCR (TCR affinity の高い外来抗原 CMV 特異的 CTL 由来 TCR および TCR affinity の低い自己抗原 WT1 特異的 CTL 由来 TCR) を単離および cloning し、それら TCR を T 細胞に遺伝子導入した。CMV および WT1 特異的 CTL をそれぞれ抗原ペプチドで繰り返し刺激したところ、CMV 特異的 TCR 導入 T 細胞は増殖できたのに対し、WT1 特異的 TCR 導入 T 細胞は一定期間は増殖したものの途中で増えなくなった (未掲載データ)。以上の結果より、TCR の種類によって T 細胞の機能に違いが生じることが示唆された。

図1 WT1ペプチドワクチン投与によって想定される CTLの遺伝子背景パターンの変化

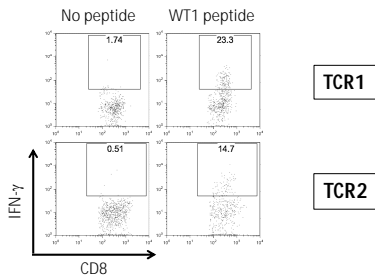


<non-responder>



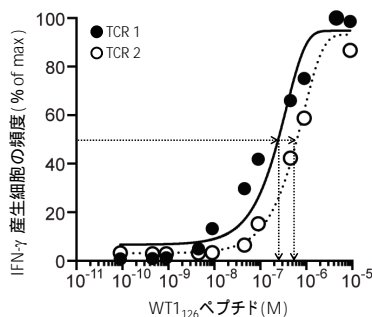
次に、マウスを用いた実験では、WT1 ペプチドを免疫したマウス脾細胞より 2 種類の WT1 特異的 CTL を単離することに成功した。TCR1 導入 CTL および TCR2 導入 CTL いずれも WT1 ペプチドに対して IFN- γ を産生できる CTL であることが分かった (図 2)。

図2 WT1 peptide特異的にIFN-gを産生するCTLクローンの樹立



TCR1 導入 CTL および TCR2 導入 CTL の WT1 peptide 濃度依存的な IFN- γ 産生を解析することで TCR1 および TCR2 の TCR avidity を評価した。図 3 に示すように、IFN- γ 産生細胞の割合が解析細胞の 50% となる時の WT1 ペプチドの濃度が TCR2 導入 CTL は TCR1 導入 CTL の約 2 倍であることから、TCR avidity は TCR1 が TCR2 の約 2 倍であることが分かった。

図3 IFN- γ 産生細胞の頻度が50%となるときの W T1₁₂₆ ペプチドの濃度 (ED 50) がTCR2はTCR1の約2倍 (TCR1のavidityはTCR2の約2倍程度である)



以上の結果より、わずかな TCR avidity の違いによってその TCR を持つ T 細胞の機能が異なることが明らかとなった。したがって、真に抗腫瘍効果を発揮する CTL を同定する

ためには、どのような特徴 (つまり、TCR affinity や TCR avidity、signal 伝達の強さなど) を有する TCR が CTL に強い抗腫瘍効果とその効果を長期間維持する能力を付与するかの 2 点に注目する必要があることを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Takashima S, Oka Y, Fujiki F, Morimoto S, et al. (他 12 名, 4 番目) Syndecan-4 as a biomarker to predict clinical outcome for glioblastoma multiforme treated with WT1 peptide vaccine. Future Science OA, 2016.

Hasegawa K, Tanaka S, Fujiki F, Morimoto S, et al. (他 18 名, 4 番目) Glycosylation status of CD43 protein is associated with resistance of leukemia cells to CTL-mediated cytolysis. PLoS ONE, 11: e0152326, 2016.

Oji Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Murakami Y, Iwai M, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Elisseeva OA, Ichinohasama R, Sakamoto J, Morita S, Nakajima H, Takashima S, Nakae Y, Nakata J, Kawakami M, Nishida S, Hosen N, Fujiki F, Morimoto S, et al. (他 5 名, 21 番目) Association of WT1 IgG antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. Int. J. Cancer, 139, 1391-1401, 2016.

Tatsumi N, Hojo N, Sakamoto H, Inaba R, Moriguchi N, Matsuno K, Fukuda M, Matsumura A, Hayashi S, Morimoto S, et al. (他 9 名, 10 番目) Identification of a novel c-terminal truncated WT1 isoform with antagonistic effects against major WT1 isoforms. PLoS ONE, 10: e0130578, 2015.

Hojo N, Tatsumi N, Moriguchi N, Matsumura A, Morimoto S, et al. (他 10 名, 5 番目) A Zbtb7a proto-oncogene as a novel target for miR-125a. Mol Carcinog, 55, 2001-2009, 2015.

[学会発表](計 2 件)

Morimoto Soyoko, Control of measurement uncertainty in WT1-tetramer assay –Our experience in WT1 peptide-based immunotherapy-

The 8th International Conference on WT1 in human neoplasia, 2015年11月19日~2015年11月20日、「Kyoto (Japan)」

Sumiyuki Nishida, Randomized phase II study of WT1 peptide vaccine plus gemcitabine for advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): Clinical efficacy and immune response, ASCO Annual Meeting, 2016年6月3日~2016年6月7日、「Chicago (USA)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 創世子 (MORIMOTO, Soyoko)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講

座助教

研究者番号：10649023