

令和元年6月26日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10450

研究課題名(和文) 腫瘍切除後のメモリーCD8T細胞誘導による新規癌免疫アジュバント療法の開発

研究課題名(英文) adjuvant therapy

研究代表者

矢島 俊樹 (Yajima, Toshiki)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20346852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：通常のマウス皮下腫瘍モデルでは、腫瘍切除後のリンパ組織における抗原特異的メモリーCD8T細胞の検出は難しかった。

そこでその絶対数を増やすためOT-Iマウスの細胞をあらかじめ移入してからEG-7を皮下投与し同様の解析を行うと、リンパ組織で抗原特異的細胞が通常20倍程度誘導でき、さらに腫瘍切除後でもメモリー細胞が検出できた。このOT-I細胞のPD-1発現は、腫瘍切除前ではほぼ全部の細胞が発現していたが、腫瘍切除後は発現が低下していた。IFN-g産生能は腫瘍切除前から低かったが、切除後にはさらに低くなっており、通常のメモリー細胞と異なった状態となっている可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍免疫応答において抗原特異的メモリーCD8T細胞が、腫瘍の再発制御に重要な役割を担っていると考えられるが、その産生・維持の分子機構はいまだに不明な点が多い。

特に外科的に腫瘍切除後のメモリーCD8T細胞の産生・維持に関する研究は皆無であり、それを解明し制御することは癌再発制御につながると考えられる。これまでそれを解析する有用なモデルがなかったため、我々はOT-Iマウスを用いて抗原特異的CD8T細胞の動態を解析するモデルを作成した。本モデルでは腫瘍切除後にもメモリー細胞が産生され維持されていることが確認できた。このメモリー細胞の詳細な解析が可能となり再発制御につながる研究が可能となった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the generation and maintenance of Ag-specific memory CD8+ T cells after surgical resection of tumor, we examined the fate of OT-I cells that were transferred into C57BL/6 mice followed by sc challenge with recombinant EL-4 expressing OVA (EG-7) after surgical resection.

We found that the memory OT-I cells was detected on 4 weeks after tumor resection. Almost all of OT-I cells were expressed PD-1 indicating these cells were exhausted phenotype, whereas expression of PD-1 on memory OT-I cells were down-regulated after tumor resection.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：癌免疫アジュバント療法 免疫記憶 抗原特異的CD8T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系は外来性の病原菌の排除だけでなく個体内で自律性に発生する癌細胞などの変異細胞に対しても恒常的に排除する免疫監視機構を担っている。しかし、癌細胞が免疫監視機構を逃れ増殖、悪性化すると、それは破綻し腫瘍制御が困難となる。免疫監視機構では、抗原特異的 CD8T 細胞が重要な役割を担っていることが知られているが、そのメモリー細胞の産生・維持の分子機構については不明な点が多い。

近年、病原菌感染後の抗原特異的メモリーCD8T 細胞の産生・維持の分子機構が解明されてきた。申請者らのグループは、IL-15 トランスジェニック(Tg)マウスまたは IL-15 ノックアウト(KO)マウスを用いたリステリア感染モデルで、抗原特異的メモリーCD8T 細胞の産生・維持における IL-15 の役割を解析し、メモリー細胞の長期維持には IL-15 が必要であることを明らかにした(Yajima T et al., J. Immunol., 2001)。また、Dr. AhmedまたはDr. Lefrancoisらのグループは、IL-15 KO マウスまたは IL-15R KO マウスを用いた LCMV またはワクシニアウイルス感染モデルでも、メモリー細胞の維持には IL-15 が必要であることを報告している(Becker et al. J. Exp. Med., 2002, Schluns et al. J. Immunol. 2002)。これらの研究成果により抗原特異的メモリーCD8T 細胞の維持には IL-15 が重要であることが免疫学のコンセンサスとなった。

一方、外科的に腫瘍切除後の抗原特異的 CD8T 細胞の動態に関する研究は、ほとんどなされていない。腫瘍切除により腫瘍抗原がなくなった後、感染症と同様な機構でメモリー細胞が産生、維持されている可能性が考えられる。癌の再発制御のためには、メモリー細胞の産生・維持を検討することは重要であり、さらにその分子機構を解明することは、腫瘍切除後の再発予防のための新規癌免疫アジュバント療法の開発につながると考えられる。

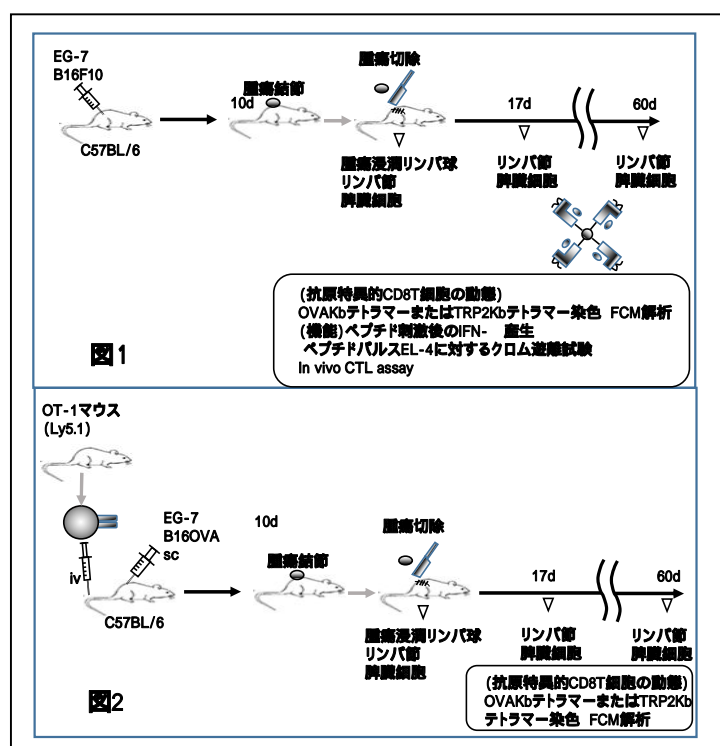
2. 研究の目的

腫瘍免疫応答において抗原特異的メモリーCD8T 細胞が、腫瘍の再発制御に重要な役割を担っていると考えられるが、その産生・維持の分子機構はいまだに不明な点が多い。特に外科的に腫瘍切除後のメモリーCD8T 細胞の産生・維持に関する研究は皆無であり、それを解明し制御することは癌再発制御につながると考えられる。

本研究では、マウス腫瘍モデルを用いて腫瘍抗原特異的メモリーCD8T 細胞の産生・維持の分子機構を解析し、癌再発を制御する新規癌免疫アジュバント療法の開発をめざす。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに卵白アルブミン産生胸腺腫の EG-7、マウスメラノーマ細胞株の B16F10 を皮下接種し、接種後 10 日目の腫瘍結節を切除し、以後経時的に所属リンパ節または脾臓における抗原特異的 CD8T 細胞の動態を検討する(図 1)。抗原特異的 CD8T 細胞は、OVA₂₅₇₋₂₆₄ または TRP₁₈₀₋₁₈₈ H-2K^b テトラマーを用いてフローサイトメトリーで検討する。またその細胞の機能を検討するために、OVA₂₅₇₋₂₆₄ または TRP₁₈₀₋₁₈₈ ペプチド刺激後の IFN- γ 産生能また



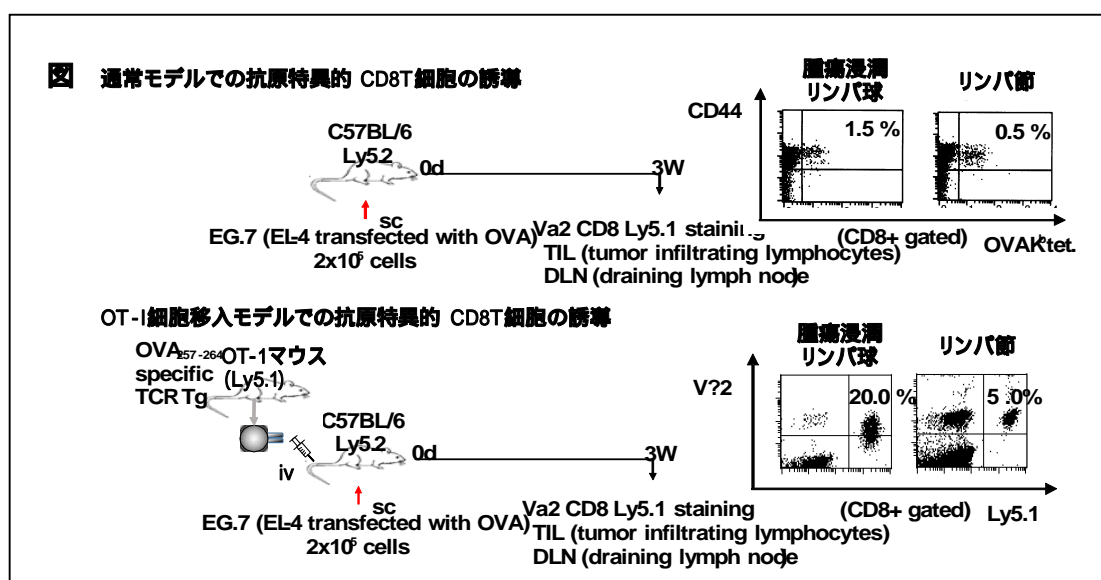
はグランザイム B 発現を細胞内染色で検討する。さらに抗原特異的 CD8T 細胞の *in vivo*での細胞傷害活性を調べるためペプチドパルスしたコンジェニックマウスの脾臓細胞を標的細胞とし、担癌マウスに経静脈的に移入後 *in vivo* 細胞傷害活性を調べる。*in vitro*でも OVA または TRP ペプチドをパルスした EL-4 (H-2^b) 腫瘍細胞を標的細胞として ⁵¹Cr で標識しクロム遊離試験で細胞傷害活性を測定する。抗原特異的 CD8T 細胞の Fas の発現または Bcl-2 の発現を調べ、さらにその細胞のアポトーシスを調べるため AnnexinV または活性化カスパーゼ 3 の発現を検討する。

また、腫瘍により誘導される抗原特異的 CD8T 細胞の数は非常に少ないため詳細な解析が困難なことが予想される。そこで抗原特異的 CD8T 細胞の数を増やすために OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的 T 細胞レセプター-Tg マウスである OT-I マウスのナイーブ CD8T 細胞を単離し正常マウスに移入後、EG.7 または B16-OVA を皮下接種し上記の検討を移入した OT-I 細胞について行う(図 2)。

4. 研究成果

正常マウス (C57BL/6) に、メラノーマ細胞株の B16F10 または EG.7 (卵白アルブミン発現 EL.4 細胞) を皮下接種し、抗原特異的 CD8T 細胞の動態を腫瘍浸潤リンパ球、リンパ節、脾臓細胞で解析した。B16F10 を皮下投与後の抗原特異的 CD8T 細胞を TRP2 ペプチド MHC テトラマーで検討したが、数が少なくその動態を解析できなかったが、EG.7 で腫瘍接種後の抗原特異的 CD8T 細胞の動態を解析すると数は少ないが 14~21 日目をピークに抗原特異的 CD8T 細胞が検出できた。接種 10 日目の腫瘍結節を切除し、以後継時的にリンパ節、脾臓細胞の抗原特異的 CD8T 細胞の動態を検討したが、切除後は検出が難しかった。

そこで、抗原特異的 CD8T 細胞の絶対数を増やすため OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドを認識する T 細胞レセプターのトランスジェニックマウスである OT-I マウスの移入モデルで以後の解析を行って見た。OT-I マウスの脾臓細胞から CD8T 細胞を AutoMACS にてネガティブセクションで単離し、正常マウスに経静脈的に移入後、EG.7 を皮下接種し OT-I 細胞の動態を検討した。OT-I 細胞のクローン増殖も検討するため CFSE で蛍光標識した OT-I 細胞を移入し同様に評価した。腫瘍接種後 7 日目では OT-I 細胞は腫瘍局所で検出されず、脾臓細胞、リンパ節で検出されたが細胞分裂は起きておらず、腫瘍結節形成初期には抗原特異的 CD8T 細胞は腫瘍局所に浸潤せずリンパ組織でもクローン増殖が起きていないことがわかった。腫瘍が増大するにつれ 14 日目、21 日目



と OT-I 細胞の分裂が起こり、局所、脾臓細胞、リンパ節でその数が増えてきているが、腫瘍は

そのまま増大し制御できていなかった。腫瘍接種 10 日目で腫瘍結節を切除し、さらに切除後 14 日目でリンパ節および脾臓における OT-I 細胞の数を検討すると切除時よりその数は減少していたが検出でき、それ以後の解析が可能と判断した。まずは腫瘍切除前に、この誘導された抗原特異的 CD8T 細胞の詳細な特徴を解析するため、腫瘍接種後の免疫チェックポイント分子の発現を解析した。PD-1, TIM-3, LAG-3, TIGIT の発現を経時的に解析すると、腫瘍接種 14 日目で PD-1 の発現が高く、TIGIT, TIM-3 も比較的高発現であった。この細胞の IFN- γ 産生能は低く疲弊化していると考えられた。これらの疲弊化 CD8T 細胞は以後減少しアポトーシスに陥っておりそのアポトーシスには Fas-FasL 経路が重要であることを明らかにした。次に、腫瘍切除後の抗原特異的 CD8T 細胞の動態を解析すると、抗原特異的 CD8T 細胞の PD-1 の発現が低下していた。サイトカイン産生能も低いままで通常のメモリー細胞と異なる状態となっている可能性があり、切除前と後で疲弊化の状態が異なっている可能性があきらとなった。現在、さらなる解析を進めている状況である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Toshiki Yajima, Kouki Hoshino, Ryo Muranushi, Akira Mogi, Ryoichi Onozato, Ei Yamaki, Takayuki Kosaka, Shigebumi Tanaka, Ken Shirabe, Yasunobu Yoshikai, Hiroyuki Kuwano
Fas/FasL signaling is critical for the survival of exhausted antigen-specific CD8+ T cells during tumor immune response. *Molecular Immunology* 2019 97-105. 10.1016/j.molimm.2019.01.014. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：茂木 晃

ローマ字氏名：Mogi Akira

所属研究機関名：群馬大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10323362

研究分担者氏名：久保 憲生
ローマ字氏名：Kubo Norio
所属研究機関名：群馬大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：10464744

研究分担者氏名：堤 荘一
ローマ字氏名：Tsutsumi Soichi
所属研究機関名：群馬大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：30323356

研究分担者氏名：高坂 貴行
ローマ字氏名：Kosaka Takayuki
所属研究機関名：群馬大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：00507329

研究分担者氏名：伊部 崇史
ローマ字氏名：Ibe Takashi
所属研究機関名：群馬大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：80826264

研究分担者氏名：東 陽子
ローマ字氏名：Azyrna Yoko
所属研究機関名：東邦大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：30770002

研究分担者氏名：宮崎 達也
ローマ字氏名：Miyazaki Tatsuya
所属研究機関名：群馬大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：70372349

研究分担者氏名：清水 公裕

ローマ字氏名：Shimizu Kimihiro

所属研究機関名：群馬大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 90375535

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。