

令和 2 年 8 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07215

研究課題名(和文) T細胞最終分化系譜の分子機構の解明と腫瘍免疫への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of T cell terminal differentiation lineage for cancer immunotherapy

研究代表者

藤木 文博 (Fujiki, Fumihiro)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：40456926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌免疫療法の効果を増強するために、効率的なメモリーT細胞の誘導が求められる。本研究ではT細胞がターミナルエフェクターT細胞に分化する責任遺伝子を同定した。この遺伝子をT細胞に強制発現させると、T細胞の増殖能が低下しアポトーシスが亢進した。一方で、発現抑制することでターミナルエフェクターT細胞の増殖能やアポトーシス抵抗性が回復した。したがって本研究で同定した遺伝子は癌免疫療法の効果を増強する標的となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌免疫療法は癌治療の一つとして急速に発展してきた。しかしながら、その効果は限定的であり、その理由の一つとして患者の癌細胞を攻撃する免疫細胞の「質」が低下していることが明らかとなっている。本研究では、この免疫細胞の「質」が低下する責任遺伝子を同定した。この成果は将来、より強力な癌免疫療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Efficient induction of memory T cells are required for optimal anti-tumor immune response. In this study, we identified a novel gene responsible for terminal effector T cell differentiation. Overexpression of the gene in T cells attenuated the expression of CD62L, proliferation capacity, and the resistance to apoptosis. Furthermore, the knockdown of the gene restored them in terminal effector T cells. Thus, the gene should be a promising target for enhancing cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：ターミナルエフェクター 癌免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞は最終的にメモリーT細胞からターミナルエフェクターT細胞へ分化する。ターミナルエフェクターT細胞は、強い細胞傷害活性を持つ一方で、生体内における生存能力に乏しく、癌免疫療法の効果を一時的で弱いものにする原因となる。したがって、癌免疫療法において、分化段階をターミナルエフェクターではなくメモリーT細胞に留めた癌抗原特異的T細胞を効率的に誘導する方法が求められている。しかしながら、メモリーT細胞がターミナルエフェクターT細胞に分化する分子機構は明らかではない。これまでに我々は、T細胞自身がRdh10という酵素を用いてビタミンA(レチノール)をレチナルに代謝すること、その代謝経路やレチナルやレチノイン酸によって誘導される刺激シグナルがT細胞のターミナルエフェクターT細胞への分化を促進させることを明らかにしてきた。しかしながら、どのようなメカニズムでそれらがターミナルエフェクター分化促進を制御しているか明らかではなかった。

2. 研究の目的

ターミナルエフェクターT細胞分化誘導のメカニズムを明らかにするために、特に、レチノイン酸シグナルに焦点を当ててT細胞に起こるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を詳細に解析することで、ターミナルエフェクター分化を制御する遺伝子(群)を同定すること、

我々が継続しているWT1ペプチドワクチン療法を中心とした臨床研究を継続することで、その成果を迅速に臨床応用するためのプラットフォームを確立・整備すること、以上を目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

メモリーT細胞の培養系にレチノイン酸を添加すると、メモリーT細胞はターミナルエフェクターT細胞(CD62L-CD127-T細胞)に分化し、homeostatic cytokineであるIL-7刺激やTCR刺激による増殖能の低下、アポトーシス感受性の上昇、そしてNOGマウスへの生着が低下していた。また、重要なことに、それらの形質は安定していた。これらの事実より、レチノイン酸は、T細胞の表現型のみならず、ターミナルエフェクターT細胞の機能的形質も一挙に制御していること、そして、その制御は一過性ではなく安定的に持続したものであること、が推察される。そこで本研究では、まずi)レチノイン酸によって誘導されたターミナルエフェクターT細胞とメモリーT細胞の遺伝子発現の差をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。同時に、ii)レチノイン酸によって動員されるターミナルエフェクターT細胞に特徴的なepigenetic markerを次世代シーケンサー(ChIP-Seq)を用いて網羅的に同定する。以上の解析により、なぜレチノイン酸がメモリーT細胞にターミナルエフェクターT細胞の形質を付加するのか、その全体像を俯瞰することができ、さらには、i)とii)で共通する遺伝子(群)を同定することで、ターミナルエフェクターT細胞分化の責任遺伝子(群)を明らかにすることができると考えた。

4. 研究成果

(1) レチノイン酸はメモリーT細胞プロファイルを消失させる

レチノイン酸によるエピジェネティック変化を解析するために、T細胞をDMSO(コントロール)、レチノイン酸、もしくはLE540(レチノイン酸受容体アンタゴニスト)存在下で培養し、ゲノムに生じるH3K9/14acおよびH3K27me3修飾の変化をChIP-seqを用いて解析したところ、クロマチンのopenを示すH3K9/14ac修飾がレチノイン酸によって網羅的に減少すること、逆にクロマチンのcloseを示すH3K27me3が増加することが明らかとなった。さらにレチノイン酸によって「close」される遺伝子としてTCF7、BCL2などメモリーT細胞に関与するとこれまでに報告されている多くの遺伝子が同定された。

(2) T細胞をターミナルエフェクター様に強制的に分化させる遺伝子Xの同定

レチノイン酸によるターミナルエフェクターT細胞分化の責任遺伝子を同定するために、上記のChIP-seqとマイクロアレイの解析結果より、レチノイン酸によってクロマチンが「open」になる領域に位置する遺伝子群とレチノイン酸によって発現が増強される遺伝子群に共通する遺伝子X(未発表のため仮称)を同定した。マウスCD8+T細胞における遺伝子Xの発現を解析したところ、脾臓由来T細胞では、CD44+CD62L-のエフェクター分画で高発現しており、またリステリア菌感染症モデルでは、感染後day10のKLRG1+分画や感染後day30+のCD62L-分画で高発現しており、増殖能が乏しいCD8+T細胞で高発現していることが示唆された。この遺伝子XのT細胞における機能を明らかにするために、強制発現系を用いて解析した結果、遺伝子Xの強制発現は、T細胞にCD62Lの発現を抑制させること、アポトーシスを亢進させること、増殖能を低下させること、IFN-g産生を抑制させることが明らかとなった。これらは、エフェクターやターミナルエフェクターT細胞の機能的特徴であることから、この遺伝子XがこれらのT細胞において、アポトーシス亢進や増殖能低下などの機能不全をT細胞に付与している可能性が考えられた。そこで次に、shRNA発現システムを用いてエフェクターT細胞の遺伝子Xを抑制したところ、CD62L発現、アポトーシス抵抗性、増殖能が回復した。

(3) 遺伝子XをT細胞特異的に欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作製

我々が同定した遺伝子Xは、抗腫瘍免疫応答を増強する良い標的となりうる。これを実証するた

めのモデルとして遺伝子 X を T 細胞特異的に欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。また癌抗原特異的 T 細胞における遺伝子 X の機能を理解するために、この作製したコンディショナルノックアウトマウスを OT-I-Tg Rag1-null CD45.1 マウスと交配させた。今後、これらのマウスを用いて、遺伝子 X が腫瘍局所で T 細胞の抗腫瘍効果を減弱していることを明らかにし、遺伝子 X が癌治療の良い標的となることを示していく予定である。

(4) WT1 特異的 T 細胞の解析

上記の基礎研究の成果を迅速に臨床応用に発展させるためには、その基盤が必要である。我々は、数多くの WT1 特異的 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の単離に成功し、その有用性を示した。また、TCR の機能を客観的かつ簡便に評価するための手法の一つとしてプラットフォーム細胞を作製することに成功した。さらには、マウスで観察される現象がヒトでも起きるか調べていくことが基礎研究から得た成果を臨床へ橋渡しするためには重要である。我々は、WT1 ペプチドワクチン療法を受けた脳腫瘍患者の末梢血および脳腫瘍に含まれる WT1 特異的 T 細胞の解析を詳細に行い、検出される WT1 特異的 T 細胞が二つの細胞集団に分けることができることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tsuboi Akihiro, Hashimoto Naoya, Fujiki Fumihiro, Morimoto Soyoko, Kagawa Naoki, Nakajima Hiroko, Hosen Naoki, Nishida Sumiyuki, Nakata Jun, Morita Satoshi, Sakamoto Junichi, Oji Yusuke, Oka Yoshihiro, Sugiyama Haruo	4. 巻 68
2. 論文標題 A phase I clinical study of a cocktail vaccine of Wilms' tumor 1 (WT1) HLA class I and II peptides for recurrent malignant glioma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 331~340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-018-2274-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Sumiyuki, Tsuboi Akihiro, Tanemura Atsushi, Ito Toshinori, Nakajima Hiroko, Shirakata Toshiaki, Morimoto Soyoko, Fujiki Fumihiro, Hosen Naoki, Oji Yusuke, Kumanogoh Atsushi, Kawase Ichiro, Oka Yoshihiro, Azuma Ichiro, Morita Satoshi, Sugiyama Haruo	4. 巻 98
2. 論文標題 Immune adjuvant therapy using Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton (BCG-CWS) in advanced malignancies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e16771 ~ e16771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000016771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Sae, Imanishi Rin, Adachi Mayuko, Ikejima Sayaka, Nakata Jun, Morimoto Soyoko, Fujiki Fumihiro, Nishida Sumiyuki, Tsuboi Akihiro, Hosen Naoki, Nakajima Hiroko, Hasegawa Kana, Oka Yoshihiro, Sugiyama Haruo, Oji Yusuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Reader-free ELISPOT assay for immuno-monitoring in peptide-based cancer vaccine immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 244-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2020.1289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakata Jun, Nakajima Hiroko, Hayashibara Hiromu, Imafuku Kanako, Morimoto Soyoko, Fujiki Fumihiro, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Hasegawa Kana, Hosen Naoki, Tsuboi Akihiro, Oka Yoshihiro, Kumanogoh Atsushi, Oji Yusuke, Sugiyama Haruo	4. 巻 9
2. 論文標題 Extremely strong infiltration of WT1-specific CTLs into mouse tumor by the combination vaccine with WT1-specific CTL and helper peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 36029-36038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Campillo-Davo Diana, Fujiki Fumihiro, Van den Bergh Johan M. J., De Reu Hans, Smits Evelien L. J. M., Goossens Herman, Sugiyama Haruo, Lion Eva, Berneman Zwi N., Van Tendeloo Viggo	4. 巻 9
2. 論文標題 Efficient and Non-genotoxic RNA-Based Engineering of Human T Cells Using Tumor-Specific T Cell Receptors With Minimal TCR Mispairing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.02503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Morimoto Soyoko, Fujiki Fumihiro, Kondo Kenta, Nakajima Hiroko, Kobayashi Yoshiki, Inatome Miki, Aoyama Nao, Nishida Yuya, Tsuboi Akihiro, Oka Yoshihiro, Nishida Sumiyuki, Nakata Jun, Hosen Naoki, Oji Yusuke, Sugiyama Haruo	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 34132-34141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Versteven Maarten, Bergh Johan M.J. Van den, Broos Katrijn, Fujiki Fumihiro, Campillo-Davo Diana, De Reu Hans, Morimoto Soyoko, Lecocq Quentin, Keyaerts Marleen, Berneman Zwi, Sugiyama Haruo, Van Tendeloo Viggo F.I., Breckpot Karine, Lion Eva	4. 巻 9
2. 論文標題 A versatile T cell-based assay to assess therapeutic antigen-specific PD-1-targeted approaches	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 27797-27808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Anguille Sebastien, et al	4. 巻 130
2. 論文標題 Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1713 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-04-780155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oji Yusuke, Inoue Masayoshi, Takeda Yoshito, et al	4. 巻 142
2. 論文標題 WT1 peptide-based immunotherapy for advanced thymic epithelial malignancies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2375 ~ 2382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Sumiyuki, Ishikawa Takeshi, Egawa Shinichi, Koido Shigeo, Yanagimoto Hiroaki, Ishii Jun, Kanno Yoshihide, Kokura Satoshi, Yasuda Hiroaki, Oba Mari Saito, Sato Maho, Morimoto Soyoko, Fujiki Fumihito, et al	4. 巻 6
2. 論文標題 Combination Gemcitabine and WT1 Peptide Vaccination Improves Progression-Free Survival in Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase II Randomized Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 320 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-17-0386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Fumihito Fujiki, Akihiro Tsuboi, Soyoko Morimoto, Naoya Hashimoto, Miki Inatome, Yoshihiro Oka, Yusuke Oji, Haruo Sugiyama
2. 発表標題 Comparison of WT1-specific T cell responses in recurrent glioma patients received CTL + Helper peptide vaccine vs CTL peptide vaccine alone
3. 学会等名 International Conference on WT1 Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Soyoko Morimoto, Fumihiro Fujiki, Maarten Versteven, Kenta Kondo, Hiroko Nakajima, Yoshiki Kobayashi, Miki Inatome, Nao Aoyama, Yuya Nishida, Akihiro Tsuboi, Yoshihiro Oka, Yusuke Oji, Eva Lion, Haruo Sugiyama
2. 発表標題	Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity and its application
3. 学会等名	International Conference on WT1 Biology (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	藤木文博、坪井昭博、森本創世子、橋本直哉、稲留美希、中島博子、中田潤、保仙直毅、尾路祐介、岡芳弘、杉山治夫
2. 発表標題	再発脳腫瘍患者におけるWT1ヘルパーペプチド併用WT1ペプチドワクチン療法の免疫モニタリング解析
3. 学会等名	第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	森本創世子、藤木文博、近藤健太、中島博子、中田潤、保仙直毅、橋井佳子、坪井昭博、岡芳弘、尾路祐介、杉山治夫
2. 発表標題	癌抗原特異的T細胞受容体のfunctional avidity を効率よく正確に評価できるplatform細胞の作製とその応用例
3. 学会等名	第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	中田潤、中江吉希、川上学、森本創世子、中島博子、藤木文博、西田純幸、保仙直毅、坪井昭博、尾路祐介、岡芳弘、杉山治夫
2. 発表標題	急性骨髄性白血病に対するWT1ワクチン療法の現状および今後の展望
3. 学会等名	第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 森本創世子、坪井昭博、藤木文博、橋本直哉、稲留美希、中島博子、中田潤、保仙直毅、尾路祐介、岡芳弘、杉山治夫
2. 発表標題 脳腫瘍患者におけるWT1ヘルパーペプチド併用WT1ペプチドワクチン療法の免疫モニタリング解析
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本創世子
2. 発表標題 癌抗原特異的 T 細胞受容体の functional avidity を効率よく正確に評価できる platform 細胞の作製
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soyoko Morimoto
2. 発表標題 Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity
3. 学会等名 9th International Conference on WT1 in Human Neoplasia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本創世子、西田純幸、他
2. 発表標題 切除不能進行膵癌に対するゲムシタピン併用HLA拘束性WT1ペプチドワクチン療法で誘導されたWT1特異的CTLの免疫学的機能解析
3. 学会等名 第21回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----