

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07514

研究課題名(和文) サイトカインシグナルの増強による抗腫瘍効果の増大と新たな抗腫瘍薬の開発

研究課題名(英文) Enhancement of anti-tumor response by augmentation by cytokine signaling.

研究代表者

三瀬 節子 (Mise-Omata, Setsuko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00269052

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)：SOCS3はSTAT3を活性化するサイトカインシグナルを負に制御する。SOCS3をT細胞で欠損したマウスは強い抗腫瘍効果を示す。SOCS3欠損CD8T細胞は強いエフェクター作用を持ち、CD4T細胞では制御性T細胞が減少する。これらはSOCS3によって制御されるIL6によるものである。IL6はCD8T細胞を酸化的リン酸化よりも解糖系優位の代謝へと変化させると共に、ミトコンドリアの膜電位や活性酸素を上昇させる。これらの変化がSOCS3欠損CD8T細胞に強いエフェクター作用を与えている。ヒトのキメラ抗原受容体T細胞でSOCS3を欠損させてもマウスと同様な効果が見られ、ヒト細胞への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプジーボの登場によってこれまで治療手段のなかった癌に対して治療が可能になったが、すべての癌に効くわけではないことや、重篤な副作用の危険性や薬価の問題などがある。免疫反応を司るT細胞の性質はサイトカインによって決まるが、私はその作用を強めることで、腫瘍に強いT細胞を作り出そうと考えた。そのためにサイトカインを抑制するSOCS3をマウスのT細胞で欠損させた。SOCS3を欠損したT細胞は腫瘍に強く反応し腫瘍を拒絶する。この反応にはIL6という腫瘍にたくさん存在するサイトカインが働く。ヒトのT細胞でも人為的にSOCS3を欠損させると腫瘍に強いT細胞になることを発見し、新たな治療法に使える知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) family protein is a negative regulator of cytokine signaling which induces the activation of STAT3. By using T cell-specific Socs3 conditional knockout mice, we demonstrated that SOCS3 regulates anti-tumor T cell responses by modulating the effect of IL-6 on CD4+ and CD8T cells. The mice showed a strong anti-tumor immunity, accompanying the expansion of CD8T cells with strong effector functions and reduced regulatory T cells compared with wild-type (WT) mice. IL-6 modifies energy metabolism to switches from OXPHOS to glycolysis in Socs3^{-/-} CD8+T cells. This is accompanied by increases in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species. CRISPR/Cas9-mediated SOCS3 deletion enhances the anti-tumor effects of human chimeric antigen receptor (CAR)-T cells in vivo. Thus, SOCS3 in T cells is a novel target for cancer immunotherapy by converting tumor-promoting IL-6 into an anti-tumor effector.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 T細胞 サイトカイン エフェクター細胞 代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤の登場によってこれまで治療できなかった悪性腫瘍に対しても延命することが可能になった。それでも治療できない悪性腫瘍も多く、免疫関連有害事象が起こるケースもある上に、生物製剤であるため薬価が高い。そのため、より広い範囲の腫瘍に適応でき、安価で安全な次世代の免疫チェックポイント阻害剤の開発が待望される。T細胞の免疫反応は抗原受容体刺激やCD28の副刺激に加えて、サイトカイン刺激によって惹起される。免疫チェックポイント阻害剤が、抗原受容体や副刺激を阻害するのに対して、我々はサイトカイン刺激を調節することで新たな悪性腫瘍の治療方法が開発できないかと考えた。

2. 研究の目的

SOCSファミリー分子はサイトカインのシグナルを負に制御する細胞内分子である。T細胞でSOCS3を欠損したマウス(SOCS3 cKO マウス)は移植した腫瘍細胞に対して高い抗腫瘍効果を示し、腫瘍内では強いエフェクター作用をもつCD8T細胞が多く存在することを発見した。本研究はSOCS3 cKOマウスの強い抗腫瘍作用のメカニズムを解明し、新たな腫瘍の治療方法の開発につなげることを目的としている。

具体的には、SOCS3 cKOマウスの腫瘍ではどのような細胞が分化し、どのサイトカインがどのような変化を細胞に引き起こすことで抗腫瘍効果が上がるのかを明らかにする。更にヒトのCAR-T細胞でもSOCS3を欠損させた時に抗腫瘍作用が増強するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) T細胞でSOCS3を欠損させた時の抗腫瘍効果の解析

SOCS3^{fllox}マウス(Socs3^{f/f})にCD4CreマウスあるいはCD8Creマウスを交配することで、CD4とCD8T細胞両方で、あるいはCD8T細胞単独でSOCS3を欠損させたマウスを作製する。このマウスにMC38やB16などの腫瘍細胞株を皮下に移植し、Creを持たない野生型のマウスと比較する。腫瘍に浸潤したT細胞の性質をFACS解析やsingle cell RNAseq、単離したCD8T細胞のRNAseqなどで明らかにする。

(2) SOCS3欠損によって抗腫瘍効果が増強するサイトカインの同定

SOCS3でシグナルが制御されるサイトカインのうちIL6とIL21の関与を調べる。IL6欠損マウスやIL21リセプター欠損とSOCS3 cKOマウスとのダブルノックアウトマウスを作製し、どちらのサイトカインが関与しているか明らかにする。更に同定したサイトカインがT細胞にどのような影響を与えているかをin vitroの実験によって明らかにする。

(3) ヒト細胞への応用

ヒトのCAR-T細胞のSOCS3遺伝子をCRISPR/Cas9でノックダウンし、マウスと同様な効果が得られるかをin vivoおよびin vitroで検証する。

4. 研究成果

(1) T細胞でSOCS3を欠損させたマウスの抗腫瘍効果の解析

SOCS3欠損T細胞ではエフェクターCD8T細胞が多く、制御性T細胞が少ない。CD4CreによってCD4T細胞とCD8T細胞の両方でSOCS3を欠損させたマウスは移植した腫瘍細胞に対して強い抗腫瘍効果を顕し、腫瘍の成長を阻害する。しかしCD8CreによってCD8T細胞のみで

SOCS3を欠損させた場合、それほど抗腫瘍効果は得られなかった。このことはCD4T細胞とCD8T細胞の両方でSOCS3が欠損することが重要であることを示している(図1)。SOCS3cKOマウスの腫瘍内

では、CD8T細胞ではグラナザイムBやIFN γ を強く発現す

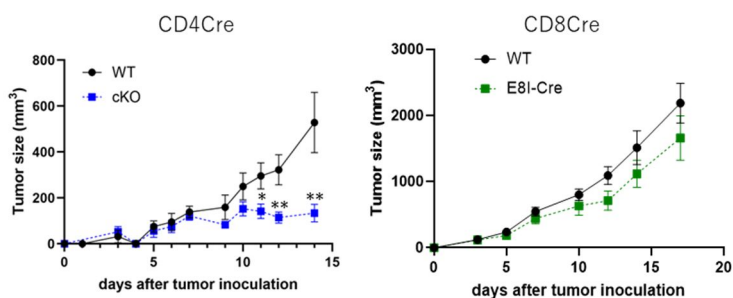


図1 CD4CreでCD4T細胞とCD8T細胞の両方でSOCS3を欠損させたマウスは強い抗腫瘍作用を示すが、CD8CreでCD8T細胞だけで欠損させた時は強い抗腫瘍作用を発揮しない。

SOCS3を欠損させた場合、それほど抗腫瘍効果は得られなかった。このことはCD4T細胞とCD8T細胞の両方でSOCS3が欠損することが重要であることを示している(図1)。SOCS3cKOマウスの腫瘍内

では、CD8T細胞ではグラナザイムBやIFN γ を強く発現す

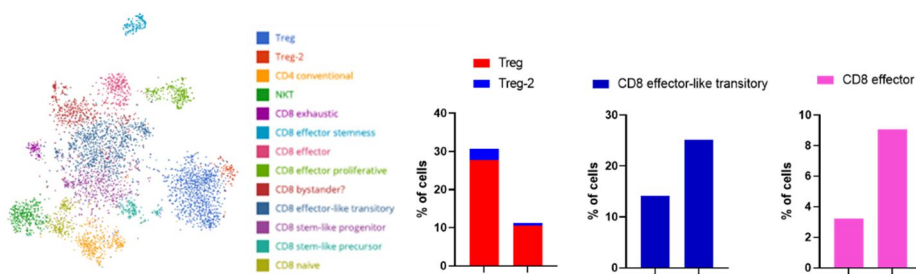


図2 scRNAseq解析により、SOCS3cKOマウスでは制御性T細胞が減少し、分化の初期段階のCD8陽性エフェクター細胞が多く存在することが明らかになった。

る。CD4T 細胞では免疫反応を抑える制御性 T 細胞が減少し代わりに IFN γ を発現している細胞が多くいることが、FACS 解析や scRNAseq によって明らかになった。scRNAseq では、エフェクターに分化したばかりの増殖能を高く持つ CD8T 細胞が SOCS3 欠損で多く存在し、その後分化するエフェクター細胞を供給していることが分かった(図 2)。

ここまでの結果で SOCS3cKO マウスの強い抗腫瘍作用には CD4T 細胞と CD8T 細胞の両方で SOCS3 を欠損している必要があり、CD4T 細胞では制御性 T 細胞の減少と CD8T 細胞ではエフェクター細胞の増加があった。

(2)SOCS3 cKO マウスに強い抗腫瘍効果をもたらすサイトカインの同定

強いエフェクター作用をもたらすサイトカインの探索

オプアルブミン(OVA)を腫瘍抗原としている腫瘍細胞株 B16-OVA と OVA 特異的 T 細胞抗原受容体を発現しているマウスを用いて、腫瘍特異的 CD8T 細胞の遺伝子発現を RNAseq によって解析した。これまでの結果と同様に SOCS3 欠損 CD8T 細胞ではエフェクター分子の発現が高かった。パスウェイ解析によって SOCS3 欠損 CD8T 細胞の強いエフェクター作用には IL6 あるいは IL21 が関与している可能性が示唆された。

IL6 が SOCS3 cKO マウスに強い抗腫瘍効果をもたらす。

SOCS3 cKO マウスの強い抗腫瘍作用には IL6 と IL21 が関与している可能性が示されたので、IL6 欠損マウスあるいは IL21 リセプター欠損マウスと、CD4CreSOCS3f/f マウスとを交配し、ダブルノックアウトマウスを作製した。これらのマウスに MC38 腫瘍株を移植し、抗腫瘍効果を検証した。IL6 の欠損は、SOCS3 cKO マウス強い抗腫瘍効果を完全に抑制したが、IL21 リセプターの欠損は何ら影響を与えていなかった(図 3)。この結果は SOCS3 を欠損すると IL6 のシグナルが増強されて強い抗腫瘍効果を発揮するようになることを示している。IL6 のダブルノックアウトマウスでは、SOCS3 のシングルノックアウトマウスで見られたエフェクターCD8T 細胞の増加や制御性 T 細胞の減少も見られなくなった。

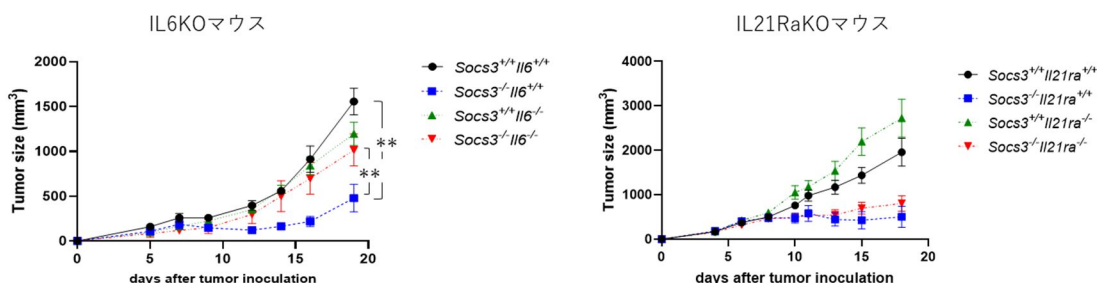


図3 IL6欠損はSOCS3cKOマウスの抗腫瘍作用をキャンセルするが、IL21リセプター欠損はしない。これはIL6が重要であることを示している。

IL6 が SOCS3 欠損 T 細胞にもたらす変化の解析

CD4T 細胞、CD8T 細胞それぞれを TCR 刺激と共に IL6 で処理した際の影響を明らかにした。SOCS3 欠損 CD4 陽性制御性 T 細胞は IL6 刺激により数が減少するとともに、免疫抑制に働く CTLA4 の発現が低下した。CD8T 細胞ではグランザイム A やグランザイム B などのエフェクター分子の発現が SOCS3 欠損型で増加していた。そのため IL6 は制御性 T 細胞やエフェクターCD8T 細胞に直接影響を及ぼしていることが分かった。

IL6 が SOCS3 欠損 CD8T 細胞の代謝に影響を与える。

CD8T 細胞の分化状態とエネルギー代謝とは密接な関係がある。エフェクター作用の高いものは解糖系優位な代謝になり、より幹細胞性を保った細胞はミトコンドリアによる酸化的リン酸化が優位になる。CD8T 細胞に IL6 を作用させたとき、代謝に変化するかをフラックスアナライザーで解析した。野生型細胞は、IL6 処理により OCR で表される酸化的リン酸化優位になるが、SOCS3 欠損型は ECAR で表される解糖系優位に変化した(図 4)。この結果は SOCS3 欠損 CD8T 細胞が強いエフェクター作用を示すことと合致する。IL6 はミトコンドリアにも影響を与え SOCS3 欠損型ではミトコンドリアの膜電位と活性酸素の濃度が上昇した。これらの変化もエフェクター作用の増強に伴って起こる事象である。

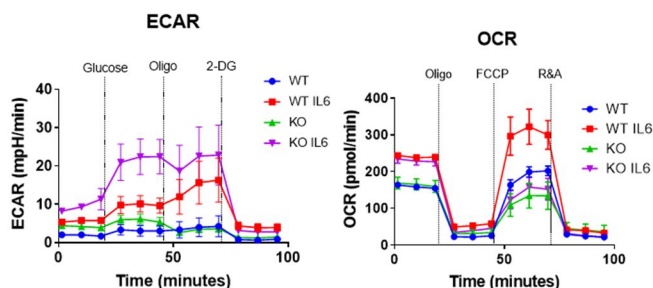


図4 SOCS3欠損CD8T細胞はIL6の作用により、解糖系の指標である細胞外酸化速度(ECAR)が上昇するが、野生型の細胞はミトコンドリア呼吸の指標である酸素消費速度(OCR)が高くなる。

SOCS3 cKO マウスの強い抗腫瘍作用は IL6 によってもたらされていることが明らかになった。

IL6 は CD4T 細胞や CD8T 細胞に直接作用して、制御性 T 細胞の減少やエフェクター細胞の増加をそれぞれ引き起こす。IL6 は CD8T 細胞のミトコンドリアに作用して膜電位の上昇や活性酸素の増加を引き起こし、解糖系へと代謝状態をシフトさせる。この変化が CD8T 細胞のエフェクター作用を増強していることがわかった。

(3)SOCS3 欠損はヒト T 細胞の抗腫瘍作用も増強させる。

ここまででマウスで得られた知見がヒトの T 細胞に応用できるかを検証するために、SOCS3 欠損の CAR-T 細胞を作製した。ヒトの末梢血 T 細胞に CD19 分子をターゲットにし CD28 と CD3ζ の細胞内ドメインを持つ CAR を導入し、Cas9 タンパク質と SOCS3 に対するガイド RNA の複合体をエレクトロポレーションすることで、SOCS3 を欠損させた。この細胞は CD4T 細胞、CD8T 細胞とも IFN γ を多く発現するエフェクター細胞に分化した。CD19 を発現している B 細胞白血病細胞 (NALM6) を移植された超免疫不全マウスに養子移入すると、SOCS3 欠損 CAR-T 細胞はマウスを延命させた (図 5)。

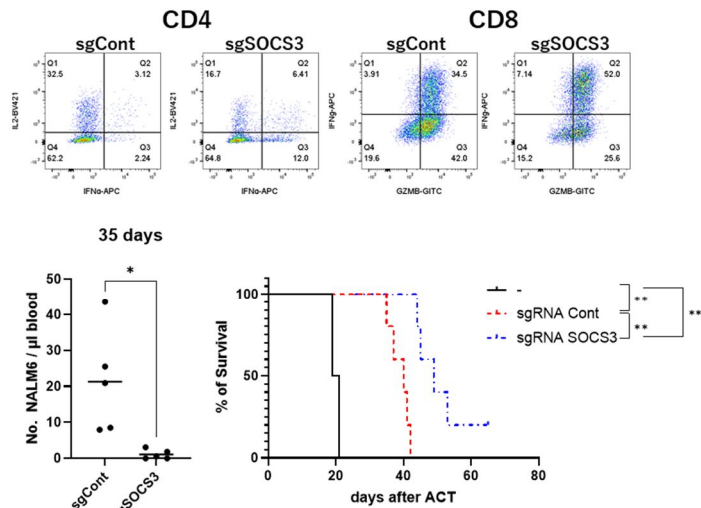


図 5 SOCS3欠損CAR-T細胞のCD4T細胞、CD8T細胞ではIFN γ の産生が上昇している。NALM6を移植した超免疫不全マウスに移植すると、NALM6の増殖を抑え、マウスの寿命を延長した。

SOCS3 欠損による抗腫瘍作用の増強はヒト細胞にも応用できることがわかった。

本研究では、サイトカインシグナルを調節する分子の発現を調節することによって抗腫瘍作用を増強できること示し、そのメカニズムを解明した。更にヒト細胞でも応用できることを明らかにした。SOCS3 の発現調節で抗腫瘍作用を操作する世界初の研究である。これまで IL6 は抗腫瘍作用に負に働くと考えられていたが、T 細胞に作用する条件によっては正に働くことを明らかにした。本研究によって将来治療にも応用できる知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Makoto Ando; Taisuke Kondo; Wataru Tomisato; Minako Ito; Shigeyuki Shichino; Tanakorn Srirat; Setsuko Mise-Omata; Kensuke Nakagawara ; Akihiko Yoshimura	4. 巻 1
2. 論文標題 Rejuvenating Effector/Exhausted CAR T Cells to Stem Cell Memory-Like CAR T Cells By Resting Them in the Presence of CXCL12 and the NOTCH Ligand.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research Communications	6. 最初と最後の頁 41-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2767-9764.CRC-21-0034	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 Akihiko Yoshimura, Minako Ito, Setsuko Mise-Omata, Makoto Ando	4. 巻 33
2. 論文標題 SOCS: negative regulators of cytokine signaling for immune tolerance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 711-716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab055	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 吉村昭彦、中司寛子、三瀬節子	4. 巻 29
2. 論文標題 T細胞のエピジェネティック改変による免疫疾患制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 533-539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 三瀬節子、安藝大輔、池田真理、吉村昭彦	4. 巻 39
2. 論文標題 サイトカインストームとT細胞疲弊 コロナウィルス感染を中心に	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 505-511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 三瀬節子、大谷木正貴、吉村昭彦	4. 巻 26
2. 論文標題 抗腫瘍免疫におけるT細胞の疲弊とその回避	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 694-701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 安藤 眞、三瀬節子、大谷木正貴、吉村昭彦	4. 巻 38
2. 論文標題 核内受容体NR4aによるT細胞疲弊と免疫寛容の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3178-3306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Kondo T, Ando M, Nagai N, Tomisato W, Srirat T, Liu B, Mise-Omata S, Ikeda M, Chikuma S, Nishimasu H, Nureki O, Ohmura M, Hayakawa N, Hishiki T, Uchibori R, Ozawa K, Yoshimura A.	4. 巻 80
2. 論文標題 The NOTCH-FOXM1 Axis Plays a Key Role in Mitochondrial Biogenesis in the Induction of Human Stem Cell Memory-like CAR-T Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 471-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-1196. Epub 2019 Nov 25.	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3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉村 昭彦、Tanakorn SRIRAT、安藤 眞、三瀬 節子
2. 発表標題 腫瘍免疫における T 細胞疲弊のメカニズム
3. 学会等名 第 25 回がん免疫学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三瀬 節子、吉村 昭彦
2. 発表標題 T 細胞で SOCS3 を欠損したマウスでは IL6 のシグナルの亢進により抗腫瘍作用が増強する
3. 学会等名 第 25 回がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Setsuko Mise-Omata, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Augmentation of IL6 signaling by the deletion of SOCS3 in T cells enhances tumor immunity through the modification of mitochondria states
3. 学会等名 第 50 回日本免疫学会学術総会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	吉村 昭彦	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授	
	(Yoshimura Akihiko)		
	(90182815)	(32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------