

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07715

研究課題名(和文)細胞傷害性T細胞の疲弊化における、転写因子Eomesoderminの役割の解明

研究課題名(英文)Analyses on the role of Eomesodermin in CD8+ T cell exhaustion

研究代表者

江島 耕二(Eshima, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30327324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内に浸潤している腫瘍特異的T細胞の中には、機能不全に陥り、腫瘍を攻撃できなくなっている「疲弊化」細胞が見られ、腫瘍の治療においてしばしば問題となる。本研究では疲弊化T細胞内に高発現する転写因子Eomesodermin(Eomes)に注目し、EomesをT細胞に常に高発現させるようなトランスジェニックマウスを作成し解析した。その結果、EomesはT細胞疲弊化を複数の機構により促進することが示唆された。またEomesはT細胞疲弊化誘導において、T細胞疲弊化に重要であることが示唆されているmiR-31とよばれる分子の転写を介していることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗腫瘍免疫療法において「免疫チェックポイント阻害」が非常に有効であることは、抗腫瘍療法において腫瘍特異的なT細胞の疲弊化からの回復が重要であることを示している。しかし、T細胞疲弊化の機序の詳細について未だ不明の部分が多く、PD-1やCTLA-4に対する抗体などを用いた既存の治療法以外、このような観点からの新たな治療法開発はあまり進んでいない。本研究において疲弊化T細胞内に高発現する転写因子EomesがT細胞疲弊化に寄与していることが示唆され、Eomesが疲弊化解除のための標的分子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although in treating cancers, T cell exhaustion often emerges as one of the problems to be overcome, the detailed mechanisms of induction of T cell exhaustion still remain largely unclear. In this study, to investigate the possible involvement of Eomesodermin(Eomes), a transcriptional regulator found in exhausted T cells, we generated and analyzed the transgenic mice where Eomes is constitutively expressed in T cells. The results suggested that in Eomes-Tg, T cells expressed some of exhaustion markers and their responsiveness was attenuated, indicating that Eomes may indeed contribute to induce T cell exhaustion. The results also suggested that Eomes may regulate the expression of exhaustion markers either by enhancing the effect of antigen stimulation or by acting independently of TCR stimulation. Furthermore, it was also suggested that Eomes may elicit T cell exhaustion by inducing miR-31, which were recently shown to be an important accelerator of T cell exhaustion.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞疲弊化 Eomesodermin トランスジェニックマウス 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

「T細胞疲弊化」は、主に CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T細胞 (CTL) が、慢性感染や抗腫瘍反応において抗原刺激を長期間受け続けることにより陥る機能不全の状態であり、抗腫瘍免疫療法において大きな障害となっている。疲弊化 T細胞は PD-1 などの抑制性共刺激受容体を発現するが、その抑制活性を抗体で阻害する「免疫チェックポイント阻害療法」の顕著な有効性は、腫瘍抗原特異的 CD8<sup>+</sup> CTL の疲弊状態からの回復が、腫瘍の排除に大変重要であることを示している。

疲弊化 CD8<sup>+</sup> CTL 内に発現する分子が解析される中、疲弊化 T細胞中に T-box ファミリーの転写因子、Eomesodermin (Eomes) が強く発現していることが、腫瘍の系のみならず慢性感染などいくつかの慢性炎症の系で報告されている。しかしこの Eomes の高発現と T細胞疲弊化の間に何らかの因果関係があるかどうかは不明であった。

CD8<sup>+</sup> CTL の疲弊化に関与する転写因子としては Blimp-1 や BATF, FoxO1, NF-AT1 などの報告があり、いずれも欠損させると疲弊化が起こりにくいことが示されていたが、それぞれ単独で発現させた場合に疲弊化が誘導できるかどうかについては検討されていない。また NF-AT1 をはじめ、これらの転写因子は様々な細胞に発現する分子であり、CD8<sup>+</sup> CTL の疲弊化の機序として、これらの分子のみでは説明が難しいという状況にあった。我々は CD8<sup>+</sup> CTL への特異性を規定するという意味でも Eomes は CD8<sup>+</sup> CTL 疲弊化誘導に寄与する重要な候補分子であると考え、T細胞疲弊化における Eomes の役割について詳細な解明を目指した。

## 2. 研究の目的

T細胞疲弊化における Eomes の関与を解明することは Eomes を分子標的とした治療法の開発にも資することができると期待される。我々は本研究課題の開始当時、CTL の動態における Eomes の役割を解析する目的で、Eomes を T細胞に構成的に発現させるトランスジェニックマウス (Eomes-Tg) を作成し、Eomes-Tg 内の T細胞が疲弊 T細胞に類似した表現型を示すという予備的実験結果を得ていた。そこで本研究課題では、Eomes の T細胞疲弊化における役割、またその分子機構についての知見を得るために、Eomes-Tg の T細胞について、抗原刺激に対する反応性 (増殖やエフェクター機能発現) や発現遺伝子等を解析することによって、(1) Eomes が高発現することにより CD8<sup>+</sup> CTL 疲弊化をどの程度再現できるか、またその場合、(2) どのような遺伝子の発現を介して行われているか、を明らかにすることを目的として解析を行った。

## 3. 研究の方法

疲弊 T細胞が発現する抑制性受容体や活性化マーカーの多くは、抗原刺激により発現が誘導されるものであるため、Eomes の機能を抗原刺激存在下・非存在下で正確に検証するには、ナイーブ T細胞と活性化細胞を含む細胞群とに分けて解析する必要がある。そこでここでは T細胞抗原受容体 (TCR) のトランスジェニックマウス (TCR-Tg) と Eomes-Tg を交配して解析を行った。使用した Tg-TCR はアロ抗原 H-2<sup>k</sup> 特異的な TCR で、飼育環境に存在する様々な抗原と交差反応しない。Tg-TCR のみを発現した単一の特異性の細胞群と、内在性 TCR も同時に発現した多様な特異性を持つ細胞群は Tg-TCR の発現量により区別することができるが、Tg-TCR の発現が低い細胞群 (Tg-TCR 以外に内在性 TCR も発現した細胞群) では活性化マーカーを発現した細胞が見られ、飼育環境にある抗原に反応したと考えられる細胞を含んでいたのに対し、Tg-TCR のみを発現した Tg-TCR の発現が高い細胞群ではすべてがナイーブ T細胞であった。すなわち、Tg-TCR の発現量を指標に様々なマーカーの発現を解析することにより、これまで観察された Eomes の効果が抗原刺激無しでも見られるのか、それとも Eomes は抗原刺激による効果を促進するのかを区別しながら疲弊化/活性化マーカーの発現量や apoptotic な細胞の解析を、フロ

ーサイトメトリーを用いて行った。また抗原刺激を受けていない細胞における Eomes 発現の影響を解析する場合には TCR-Tg と Eomes-Tg/TCR-Tg から Tg-TCR を高発現した細胞をソーティングして解析した。

#### 4. 研究成果

- (1) Eomes-Tg におけるトランスジーン発現、胸腺細胞数・成熟 T 細胞数への影響について  
まず Eomes-Tg におけるトランスジーン発現や T 細胞の数を含め、詳細な characterization を行った。その結果以下の結果が得られた。

Eomes-Tg では末梢の成熟 T 細胞の数が減少していたが、胸腺細胞数についてはほぼ正常であった。胸腺細胞における transgene の発現を確認したところ CD4/CD8 両陰性の未熟な段階から Eomes の発現が見られた。しかし疲弊化マーカーの発現上昇は、胸腺中の成熟 T 細胞ではあまり見られず、Eomes による疲弊化マーカー発現誘導には成熟後一定時間を要することが示唆された。

Eomes-Tg における末梢での成熟 T 細胞数減少の原因について検討したところ、Eomes-Tg の T 細胞では野生型の細胞に比べて Annexin V 陽性細胞の割合が有意に高く、細胞死が亢進していた。

Eomes-Tg の末梢の成熟 T 細胞では、PD-1 や TIM-3 だけでなく、CD39 や CD160 など他の疲弊化マーカーの発現の上昇も見られた。活性化マーカーにおいては CD44 や Ly-6C, KLRG-1 などの発現上昇も見られた。

- (2) Eomes による疲弊化/活性化マーカーの発現調節における抗原刺激の影響について  
疲弊化・活性化マーカーの発現量変化は、抗原刺激でも見られるものであるため、これらのマーカーの発現変化における Eomes の役割に関して、その抗原刺激への依存性を検討するため、上述の通りここでは T 細胞抗原受容体 (TCR) の Tg マウスを用いて解析した。その結果、Eomes による影響が Tg-TCR の発現量に依らずに観察される場合と、Eomes の活性が、主に Tg-TCR の発現が低い (抗原刺激が入りうる) 細胞群で顕著に見られる場合の 2 つのケースが観察された。すなわち、Eomes が抗原刺激に非依存的に発現調節を行う場合 (CD122 (IL-2R 鎖) の発現上昇、CD127 (IL-7R 鎖) の発現低下など) と、抗原刺激の効果を増幅する場合 (CD44, KLRG-1, PD-1, TIM-3, CD160, CD39 などの発現上昇) の 2 つのパターンに分けられることが明らかとなった。これらの結果は、Eomes は活性化・疲弊化マーカーの発現調節において、分子によって異なる様式で制御していることを示唆していると考えられる。

- (3) 抗原刺激後の増殖反応における Eomes 高発現の影響について  
疲弊化 T 細胞の最も大きな特徴は抗原刺激に対する低反応性であるため、Eomes-Tg の T 細胞における抗原刺激に対する反応性について検討した。ここでは抗原刺激を受けていない細胞における比較を行うため、TCR-Tg 背景の系を用いた。具体的には、TCR-Tg、または Eomes/TCR-double-Tg マウスより Tg-TCR を高発現したナイーブ T 細胞をソーティングし、抗原刺激後の増殖反応を比較したところ、Eomes-Tg の T 細胞では有意に反応性が低下するという結果が得られた。すなわち、疲弊化した T 細胞内に発現する Eomes は T 細胞疲弊化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

- (4) Eomes-Tg 成熟 T 細胞における miR-31 の発現について  
上述の結果は Eomes-Tg の T 細胞では疲弊化 T 細胞が示す多くの特徴を保持していることを示している。以前、Eomes を発現していない Th2 細胞に Eomes 遺伝子を導入したところ、T 細胞疲弊化に関与していることが示唆されているマイクロ RNA, miR-31 の発現が上昇していたことから、ここでは Eomes-Tg の T 細胞についても miR-31 の発現を解析したところ、野生型の T 細胞に比べてその発現が有意に上昇していた。Eomes は miR-31 の発現誘導を介して T 細胞疲弊化に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eshima Koji, Misawa Kana, Ohashi Chihiro, Noma Haruka, Iwabuchi Kazuya	4. 巻 160
2. 論文標題 NF- $\kappa$ B inducing kinase contributes to normal development of cortical thymic epithelial cells: its possible role in shaping a proper T cell repertoire	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 198 ~ 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13186	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 Morikawa Yuhki, Murakami Minami, Kondo Hitoshi, Nemoto Noriko, Iwabuchi Kazuya, Eshima Koji	4. 巻 5
2. 論文標題 Natural Killer Cell Group 7 Sequence in Cytotoxic Cells Optimizes Exocytosis of Lytic Granules Essential for the Perforin-Dependent, but Not Fas Ligand-Dependent, Cytolytic Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 234 ~ 245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2100029	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江島耕二, 三澤佳奈, 岩渕和也
2. 発表標題 胸腺皮質上皮細胞の機能におけるNF- $\kappa$ B-inducing kinaseの寄与について
3. 学会等名 第40回日本胸腺研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江島耕二, 村上南, 森川優樹, 大橋千尋, 岩渕和也
2. 発表標題 T細胞疲弊化における, 転写因子Eomesoderminの役割の解析
3. 学会等名 第29回 KTCC (Kyoto T cell Conference)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上南, 江島耕二, 岩淵和也
2. 発表標題 The role of Eomesodermin in T cell exhaustion.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江島耕二, 森川優樹, 村上南, 近藤均, 根本典子, 岩淵和也
2. 発表標題 Eomesodermin in CD8+ CTLs induces the expression of Nkg7 which specifically promotes perforin/granzyme-pathway of cytotoxicity by optimizing exocytosis of lytic granules.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江島耕二, 森川優樹, 村上南, 近藤均, 根本典子, 岩淵和也
2. 発表標題 転写因子EomesoderminによるNkg7発現誘導を介したPerforin経路特異的な傷害顆粒放出反応の促進
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------