

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07754

研究課題名(和文) 癌免疫微小環境における腫瘍特異的細胞傷害性T細胞誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanisms of inducing anti-tumor cytotoxic T cells in the tumor immune microenvironment

研究代表者

望月 一弘 (Mochizuki, Kazuhiro)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30448633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：同種CD4陽性T細胞群及びコントロールとして投与した同系CD4陽性T細胞群において、腫瘍内から分離したドナー活性化CD4陽性T細胞におけるRT-PCRを実施し、腫瘍内投与後24時間において同種CD4陽性T細胞群にて強いIL-2産生を認めた。mRNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析では、同種CD4陽性T細胞群の同系CD4陽性T細胞群に対する発現比が10倍以上高い分子が119個同定された。その中で免疫調節に関与する13分子が同定された。また、免疫調節における機能が未知であるものの同発現比が50倍以上高い8分子が同定された。今後、同分子(群)の抗腫瘍免疫誘導への関与を精査する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌に対する第四の治療法として細胞免疫誘療法の有効性は公知となり、腫瘍局所における腫瘍細胞と免疫細胞との相互作用の理解が進むにつれ腫瘍免疫微小環境(Tumor immune microenvironment: TIME)の重要性が認識されてきている。我々は、同種免疫反応というこれまでにないアプローチにより、TIMEにおいて抗腫瘍免疫を誘導することに成功し、本研究における網羅的遺伝子発現解析にて、抗腫瘍免疫誘導に関連する複数因子の同定に成功した。これらTIMEにおける局所動態の解明及びそこから得られる知見は、新たな細胞免疫療法の開発や既存の細胞免疫療法の効果増強に大きく資するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Real-time RT-PCR assays revealed that the expression of IL-2 mRNA in the CD44^{hi} donor CD4⁺ T cells of the allogeneic CD4⁺ T cell group dramatically increased within the tumor 24 h after injection, relative to 4 h after injection, while IL-2 mRNA was not increased in the auto- CD4⁺ T cell control group. Analysis of mRNA microarray detected 119 molecules that showed 10 times higher expression in the allogeneic CD4⁺ T cell group compared to the auto- CD4⁺ T cell control group. Among them, thirteen molecules were identified as an immune reaction associated genes. Although their functions in immune reaction are unknown there are eight genes whose mRNA expression in the allogeneic CD4⁺ T cell group was more than 50 times higher than those in the auto- CD4⁺ T cell control group. We will investigate their roles and functions in an induction of anti-tumor specific immunity in the tumor microenvironment.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん免疫療法 同種免疫反応 がんワクチン療法 CD4陽性T細胞

1. 研究開始当初の背景

我が国における癌の罹患率・致死率は年々増加しており、既存治療に抵抗性を示す難治性癌の予後は依然として不良である。近年、それら難治性癌に対する新たな治療法として細胞免疫療法が注目され、多数の臨床試験により有効性が明らかにされている。一方、同じ細胞免疫療法を実施しても期待した効果が得られる場合と得られない場合があり、抗腫瘍免疫が誘導されるメカニズムの多くは未だ不明である。

近年、癌細胞は自己の増殖に好都合な環境を周囲の支持細胞や腫瘍内に浸潤している免疫関連細胞と協調して作り上げていることが明らかにされ、そのような局所環境は癌免疫微小環境 (Tumor immune microenvironment: TIME) と呼ばれている。最近の報告では TIME は化学療法や放射線療法などの既存治療に対する反応性や癌転移にも係っていることが明らかにされている。癌に対する細胞免疫療法においても TIME は注目されているが、通常は好腫瘍性環境である TIME において、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されるメカニズムは不明であり、その過程で様々な TIME 構成細胞が担っている役割も明確にされていない。これら癌特異的な抗腫瘍免疫誘導に係る局所動態の解明及びそこから得られる知見は、新たな細胞免疫療法の開発や既存の細胞免疫療法の効果増強に大きく資するものと期待される。

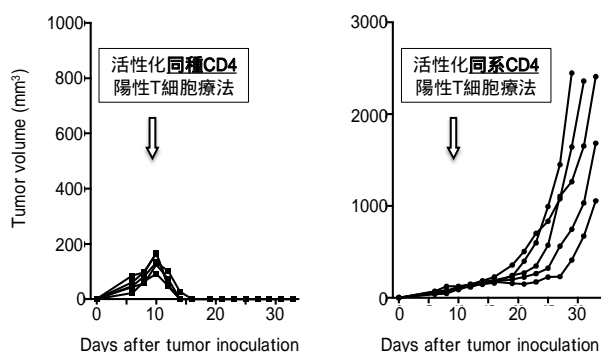
2. 研究の目的

本研究の目的は、TIME 内の免疫担当細胞における遺伝子発現解析を通して、腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞誘導に関わる因子を明らかにし、抗腫瘍免疫誘導メカニズムの解明につなげることである。

3. 研究の方法

我々はこれまでにメラノーマ細胞株を皮下接種した担癌マウスの腫瘍局所に、体外にて活性化させた同種 CD4 陽性 T 細胞を投与することにより、腫瘍局所における炎症反応に伴って宿主の細胞傷害性 (CD8 陽性) T 細胞が誘導され、強力な抗腫瘍効果を発揮し、宿主マウスが長期生存するモデルを確立した (図 1.)。同生存マウスから分離した CD8 陽性 T 細胞が同じメラノーマ細胞株に対する特異的な増殖抑制効果を示したことから、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されたことを確認した。更に、我々は同マウスモデルの切除した腫瘍から腫瘍細胞及び各 TIME 構成細胞をソーティングする方法を確立した。これにより腫瘍から分離した TIME 内の様々な細胞別に遺伝子発現解析を行うことが可能となった。尚、本モデルにおける抗腫瘍免疫は、同種 CD4 陽性 T 細胞を用いた場合にのみ誘導され、同系 CD4 陽性 T 細胞を用いた場合には誘導されない。

図 1.



担癌マウスモデル：C57BL/6 マウスに B16F1 を皮下接種し担癌マウスを作成する。別の C57BL/6 マウスの骨髄細胞から GM-CSF, CSF, IL-4, TNF を用いて樹状細胞(DC)を培養し活性化した後、BALB/c マウスの脾臓から分離した CD4 陽性 T 細胞と混合培養して活性化同種 CD4 陽性 T 細胞を得る。同活性化同種 CD4 陽性 T 細胞を担癌マウスの腫瘍内に直接投与することにより、宿主の細胞傷害性 T 細胞が誘導され腫瘍は退縮する(抗癌免疫誘導群)。一方、同系 CD4 陽性 T 細胞 (C57BL/6 マウスの脾臓から分離した CD4 陽性 T 細胞)を同様に活性化して投与した群では腫瘍は退縮しない(非誘導群)。これら抗腫瘍免疫誘導群・非誘導群を用いて以下を実施。

- (1) 腫瘍内投与 24 時間後に腫瘍を切除し、直ちに液体窒素にて凍結した。薄切標本を作り各種抗体による免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy: CLSM) を用いて、TIME 構成細胞の腫瘍内局在を病理学的に検討した。
- (2) TIME 構成細胞における遺伝子発現解析：活性化 CD4 陽性 T 細胞投与の 4 時間後及び 24 時間後に腫瘍を切除し、コラゲナーゼ及び DNase 処理後にパーコールを用いて腫瘍細胞と TIME 構成単核細胞を分離した。続いて、TIME 構成単核細胞を蛍光抗体にて染色し、フローサイトメーターを用いて CD8 陽性 T 細胞、宿主及びドナー別の CD4 陽性 T 細胞、マクロファージにソーティングした。ソーティングした各 TIME 構成細胞から RNA を抽出し、mRNA から cDNA を合成し、同 cDNA を用いて RT-PCR 及び mRNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。

4 . 研究成果

- (1) 腫瘍内投与 24 時間後の CLSM にて、ドナー CD4 陽性 T 細胞の腫瘍内分布は両群共に不均一であったが、同種 CD4 陽性 T 細胞を用いた抗腫瘍免疫誘導群の方がより多くの領域に分布し、GM-CSF を強く産生していた。同様に宿主 CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤も、同種 CD4 陽性 T 細胞を用いた抗腫瘍免疫誘導群においてより多くの領域にて認められた。
- (2) 近年、抗腫瘍免疫誘導における制御性 T 細胞 (Treg) の重要性が指摘されているため、本モデルにおける Treg の関与を検討した。末梢血、腫瘍内共に同種 CD4 陽性 T 細胞群で Treg はやや減少するものの有意差はなく、本モデルでの抗腫瘍効果における Treg の関与は強くないと考えられた。
- (3) 腫瘍内から分離したドナー CD4 陽性 T 細胞における RT-PCR にて、両群ともに IFN γ , TNF α , IL-2 産生を認めた。特に IL-2 に関しては腫瘍内投与後 24 時間において同種 CD4 陽性 T 細胞を用いた抗腫瘍免疫誘導群にてより強い産生を認めた。
- (4) mRNA マイクロアレイ：腫瘍内から分離された同種 CD4 陽性 T 細胞において、同じく分離された同系 CD4 陽性 T 細胞の mRNA に対する発現比が 10 倍以上高い分子が 119 個同定された。その中で免疫調節に関わる 13 分子が同定された。また、免疫調節における機能が未知であるものの上記 mRNA 発現解析の結果から、TIME における発現比が 50 倍以上高い 8 分子が同定され、今後、これらの分子に関して抗腫瘍免疫誘導における腫瘍内免疫反応への関与を精査していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Mochizuki K, Kobayashi S, Takahashi N, Sugimoto K, Sano H, Ohara Y, Mineishi S, Zhang Y, Kikuta A.	4. 巻 40
2. 論文標題 Alloantigen-activated (AAA) CD4 + T cells reinvigorate host endogenous T cell immunity to eliminate pre-established tumors in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp Clin Cancer Res.	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） 10.1186/s13046-021-02102-6	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mochizuki K, Kobayashi S, Takahashi N, Sano H, Ohara Y, Mineishi S, Zhang Y, Kikuta A.
2. 発表標題 Ex vivo-activated allogeneic CD4+ T-cells disrupt immunosuppressive tumor microenvironment, and induce host tumor-specific cytotoxic T-cells in mice
3. 学会等名 Society for immunotherapy of cancer 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 腫瘍の治療及び/又は予防のための組成物	発明者 望月一弘	権利者 公立大学法人福島県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-199195	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 腫瘍の治療及び/又は予防のための組成物	発明者 望月一弘	権利者 公立大学法人福島県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 40920	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	菊田 敦 (KIKUTA ATSUSHU) (40224894)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐野 秀樹 (SANO HIDEKI) (20448632)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
研究分担者	小林 正悟 (KOBAYASH SHOGO) (30566849)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	高橋 信久 (TAKAHASHI NOBUHISA) (30769485)	福島県立医科大学・医学部・助手 (21601)	
研究分担者	郷 勇人 (GO HAYATO) (30443857)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	

	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
研究協力者	杉本 幸太郎 (SUGIMOTO KOTARO)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	CLSM実施支援

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