

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22362

研究課題名（和文）TIL療法の限界を克服する～メトホルミンを用いた代謝調節によるT細胞若返りの試み

研究課題名（英文）Attempt of the T cell restoration of youth by metabolic control using metformin. Overcoming a limit of the TIL therapy.

研究代表者

中川 貴之（Nakagawa, Takayuki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：40447363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：固形腫瘍組織内には、腫瘍細胞を認識する抗腫瘍T細胞が存在するが、様々な要因により、T細胞機能が抑制され、抗腫瘍応答が阻害されている。本研究では、腫瘍細胞や免疫細胞が過剰発現するIDOと呼ばれるアミノ酸代謝酵素に着目し、その阻害による抗腫瘍応答増強作用を検証した。その結果、犬膀胱癌や腫瘍浸潤免疫細胞において、IDOの高発現を認めること、IDO阻害薬により犬T細胞の抗腫瘍応答が増強されることを発見した。本研究により、IDOを標的とした抗腫瘍犬T細胞の抑制解除による新たな腫瘍免疫療法の開発につながる成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍は、犬・猫・人において主要な死亡原因であり、その克服は社会的な重要課題である。近年、抗腫瘍T細胞の増強による腫瘍免疫療法が明確な臨床効果を認め、新たな腫瘍治療法として期待されている。本研究では、IDO阻害薬により犬T細胞および犬固形腫瘍細胞の代謝を是正することで、抗腫瘍T細胞応答を増強できることを実証し、腫瘍免疫学分野における発展に貢献した。また、本研究では、犬腫瘍細胞株や犬T細胞を用いており、臨床応用性が高いことから臨床獣医学における新たな腫瘍治療法の基盤となる重要な成果を報告できた。

研究成果の概要（英文）：Antitumor T cells that recognize tumor cells are exist in solid tumor tissue, but various factors suppress T cell function and inhibit antitumor response. In this study, we focused on an amino acid-metabolizing enzyme called IDO, which is overexpressed by tumor cells and immune cells, and examined the antitumor effect of IDO blocking therapy. As a result, it was found that high expression of IDO was observed in canine bladder cancer cells and tumor infiltrating immune cells, and that the antitumor response of canine T cells was enhanced by IDO inhibitors. As a further study, the IDO blocking therapy will be developed based on the results of this research.

研究分野：獣医学

キーワード：犬 固形腫瘍 腫瘍免疫 T細胞 代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) がん免疫療法のブレークスルーのきっかけとなった免疫チェックポイント阻害抗体は、腫瘍内に浸潤している抗腫瘍 T 細胞の抑制を解除することで、その機能を再活性化し、治療効果を認めた。

(2) 全ての腫瘍腫に、抗腫瘍 T 細胞浸潤を認めるが、他の様々な機序による T 細胞への抑制も強く、実際に治療効果を認める患者は一部である。

(3) 申請者は、犬腫瘍浸潤 T 細胞(TIL)を、免疫抑制を排除した環境で ex vivo 大量培養後、再び患者に投与する養子免疫療法(TIL 療法)の開発に取り組み、これまでに、多くの症例で、一時的な TIL 培養が可能であるが、TIL は疲弊マーカーを発現し短命で、大量培養までたどり着けないことがわかってきた。

(4) 腫瘍環境中の T 細胞は、様々な免疫抑制要因により、代謝がリプログラミングされた疲弊 T 細胞となり、増殖能や傷害活性が減弱し、寿命が短くなっていることが知られている。

(5) 申請者は、犬腫瘍細胞の研究の中で、メトホルミンにより糖代謝が、エパカドスタットによりアミノ酸代謝を変化させられることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、新たな TIL 療法の開発を目指して、メトホルミンおよびエパカドスタットを用いた抗腫瘍 T 細胞のエネルギー代謝変換による、T 細胞の増殖・傷害活性の増強法の検証を目的とした。

3. 研究の方法

(1) エパカドスタットの標的分子であるインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ(IDO)の犬正常組織および各種犬固形腫瘍における発現をパラフィン包埋ブロックを用いた免疫染色法により解析した。

(2) 各種犬腫瘍細胞株(犬悪性黒色腫、犬乳腺癌、犬膀胱癌、犬骨肉腫、犬肥満細胞腫)における IDO の遺伝子発現を qPCR 法により検証した。

(3) 犬膀胱癌細胞株における IDO の機能的発現を検証するために、IDO の基質であるトリプトファンおよび代謝産物であるキヌレニンの培養上清中における濃度を、液体クロマトグラフィー

を用いた質量分析法(LC-MS/MS)にて検証した。IDO 陰性の犬骨肉腫細胞株を対照として用いた。

(4) 犬 IDO に対するエパカドスタットの阻害活性を検証するために、犬膀胱癌細胞株にエパカドスタットを添加し、液体クロマトグラフィーを用いた質量分析法(LC-MS/MS)にてトリプトファンおよびキヌレニンの濃度を検証した。

(5) 犬膀胱癌細胞株と犬末梢血由来 T 細胞の共培養系に、エパカドスタットまたはメトホルミンを添加し、T 細胞の増殖をフローサイトメーターを用いて、T 細胞の傷害活性やサイトカイン産性能を PCR 法にて検証した。

4 . 研究成果

(1) IDO は犬正常組織においては、IDO はリンパ節や腸管の免疫細胞において発現を認め、その他組織では発現が認められなかった。犬固形腫瘍においては、犬膀胱癌や扁平上皮癌、肛門嚢腺癌、肺腺癌組織の腫瘍細胞および各種腫瘍に浸潤した免疫細胞で発現を認めた。腫瘍細胞における発現では犬膀胱癌における発現が最も強かった。正常組織および腫瘍組織内の免疫細胞において、IDO が発現していたことから、犬免疫細胞において IDO が様々な免疫制御を担っている可能性が明らかとなった。

(2) 犬腫瘍細胞株における IDO 遺伝子発現は、臨床検体における解析同様に、犬膀胱癌細胞株において、高発現を認めた。

(3) IDO を高発現する犬膀胱癌細胞株では、培養前培地や犬骨肉腫細胞株(IDO 陰性)培養培地に比べ、キヌレニン/トリプトファン比の顕著な増加を認め、IDO の機能的発現が示唆された。

(4) 犬膀胱癌細胞株へのエパカドスタット添加により、非添加群に比べキヌレニン/トリプトファン比の低下が認められ、エパカドスタットによる犬 IDO の阻害活性が示された。

(5) 犬膀胱癌細胞株と犬末梢血由来 T 細胞の共培養系へのエパカドスタットの添加により、T 細胞増殖の増加、細胞傷害性因子や抗腫瘍サイトカイン産生の増加が認められた。本成果により、世界で初めて、エパカドスタットによる犬 T 細胞の抗腫瘍効果増強作用が実証され、エパカドスタットが TIL 療法や犬腫瘍に対する新たな免疫療法薬として利用可能な候補薬であること、犬の腫瘍が IDO 研究のモデルになりうることを示された。一方、メトフォルミン添加群では、有意な変化を確認することができなかった。その要因として、メトフォルミン添加濃度が至適濃度と異なった可能性や共培養系において腫瘍環境同様の T 細胞抑制環境が形成されなかった可能性、メトフォルミンが犬 T 細胞の調節作用を持たない可能性などが挙げられ、さらなる検証が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 衛藤翔太郎, 佐伯亘平, 吉竹涼平, 加藤大貴, 坪井誠也, 吉本翔, 品田真央, 池田凡子, 嘉本諭, James Chambers, 内田和幸, 西村亮平, 中川貴之 |
| 2. 発表標題 犬移行上皮癌における腫瘍免疫微小環境の解析と関連因子の探索 |
| 3. 学会等名 第19回東京大学生命科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 N Ikeda, D Kato, S Eto, R Yoshitake, S Yoshimoto, M Shinada, S Kamoto, N Fujita, R Nishimura, T Nakagawa |
| 2. 発表標題 NSAIDS inhibit Ido1 gene expression in canine transitional cell carcinoma cell lines |
| 3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialities (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shotaro Eto, Kohei Saeki, Ryohei Yoshitake, Masaya Tsuboi, James Chambers, Kazuyuki Uchida, Ryohei Nishimura, Takayuki Nakagawa |
| 2. 発表標題 The influences of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tumor microenvironment in dogs with transitional cell carcinoma |
| 3. 学会等名 The 1st ToBeST symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kato Daiki, , Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki. |
| 2. 発表標題 Cancer immunotherapies targeting novel canine solid tumor antigens |
| 3. 学会等名 The 1st ToBeST symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田 凡子、加藤 大貴、衛藤 翔太郎、吉竹 涼平、吉本 翔、品田 真央、嘉本 諭、曾我 恭花、坪井 誠也、チェンバース ジェームズ、内田 和幸、藤田 直己、西村 亮平、中川 貴之 |
| 2. 発表標題 犬膀胱移行上皮癌における indoleamine 2,3-dioxygenase 1の発現とその制御機構 |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医外科学研究室ホームページ(所属研究室 研究紹介) http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/geka/</p> |
|--|

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 |
|-------|---|---|----|
| 連携研究者 | 加藤 大貴 (Kato Daiki) (60843216) | 東京大学・農学生命科学研究科・特定研究員 (12601) | |

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 |
|---------|---------|