

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07615

研究課題名(和文) 加齢に伴うPD-1経路障害治療耐性の機構解明と制御法の確立

研究課題名(英文) The mechanism of age-related unresponsiveness to PD-1 blockade cancer therapy

研究代表者

和久 由佳(仲島由佳)(Waku, Yuka)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員

研究者番号：40399499

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)：近年、加齢とPD-1抗体治療効果の低下との相関が示唆されてきているが、加齢に伴うPD-1抗体治療耐性の機構はほとんど明らかになっていない。申請者らは、高齢マウスにおいて見られるPD-1経路障害治療効果の低下と新たなCD8陽性細胞群(P4)の誘導障害が相関していることを見出していた。本研究により、P4細胞誘導障害には抗原依存的なナイーブ細胞からの分化抑制が関与し、1炭素代謝経路の異常を引き起こすことで加齢に伴うPD-1抗体治療耐性に関与することが明らかになった。さらに、これらの現象には抑制性フォスファターゼがTCR経路を抑えることでPD-1障害治療の効果を阻害していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫系の老化は、がんの発症や進展のみならず、感染症や関節リウマチ、動脈硬化などの加齢関連疾患の発症や病態形成に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。そのため、本研究結果から得られる免疫老化とその改善に関する知見は、新しいがん免疫治療法の開発につながるだけでなく、様々な加齢関連疾患に対する新たな診断マーカーや治療基盤の創出につながると考えられるものである。

研究成果の概要(英文)：Recent reports showed that the efficacy of PD-1 blockade cancer therapy is impaired in aged-animal models, with similar attenuation to that observed in some clinical reports. However, the mechanism underlying this age-related decrease in the efficacy of PD-1 blockade remains largely unknown.

Previously, we found that suppression of a subset of CD8+ T-cells (CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>low</sup> subset P4) correlates with resistance to PD-1 blockade anti-tumor therapy in aged mice. In this study, our data showed that reduced emergence of P4 cells was caused by the depression of P4 cell differentiation from naive cells, and thereby inhibited one-carbon metabolism in CD8+ T cells from aged mice. Moreover, our results suggest that elevated expression of the suppressive phosphatase is responsible for the lack of P4 cells through the inhibition of TCR pathway, which is linked to reduce the efficacy of PD-1 blockade therapy.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：免疫老化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの予防や治療の鍵として遺伝子変異よりも加齢による免疫系の低下が寄与している可能性が示唆されて来ており、その重要性が見直されている (Palmer *et al.*, 2018, *PNAS*)。加齢に伴い様々な免疫細胞が量的や機能的に変化することが知られており、最も加齢により変化する細胞として T 細胞が挙げられる。T 細胞の中でも CD8 陽性 T 細胞は PD-1 経路を抑制する抗体治療に不可欠な細胞であり、CD8 陽性 T 細胞を活性化させることでがん細胞を駆逐することが明らかになっている (Chamoto *et al.*, 2016, *PNAS*)。近年、加齢と PD-1 抗体治療耐性との関係が解析されはじめ、加齢と奏効率の低下との相関が示唆されてきている (Brahmer *et al.*, 2015, *N Engl J Med*; Borghaei *et al.*, 2015, *N Engl J Med*; Padron *et al.*, 2018, *Exp Gerontol*)。しかしながら、PD-1 抗体治療の中核となる CD8 陽性 T 細胞や関連因子の加齢による変化や改善させる方法はほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、担がんマウスモデルによって腫瘍形成に対する PD-1 経路阻害の効果が老化により強く抑制されることを確認していた。さらに、加齢マウスの所属リンパ節において有為に減少する新たな CD8 陽性細胞群 (P4) を見出していた。この P4 細胞は、若いマウスのリンパ節内で抗原刺激により誘導されていたことから、P4 細胞は抗原刺激により誘導される細胞群であり、その誘導抑制が加齢に伴う PD-1 阻害治療耐性につながる可能性が示唆されていた。しかしながら、P4 細胞の機能や役割は全く不明であった。そこで本研究では、CD8 陽性サブpopulation の減少を介した加齢による PD-1 抗体治療耐性の制御機構を解明し、改善法の確立を目指すことを目的とした。

### 2. 研究の方法

・ *in vivo* での CD8 陽性細胞の活性化：卵白アルブミン (OVA) 特異的な T 細胞受容体 (TCR) を発現している CD8 陽性 T 細胞を保持する若齢と高齢の OT-1 マウスに OVA を発現する MC38 (MC38-OVA) 細胞を静脈注射により移植した。移植から 5 日後に P4 細胞を含む CD8 陽性細胞の各サブセットの割合を CD44 と CD62L の発現を指標に BD FACSCanto を用いたフローサイトメーター解析により検討した。

・ *in vitro* での CD8 陽性細胞の活性化：(ビーズを用いた活性化に伴う CD8 陽性サブセット変動の検討) リンパ節から CD8 陽性 P4、ナイーブとメモリー T 細胞をセルソーター (BD FACSAria) を用いて単離し、U プレートに播種した後、抗 CD3 と抗 CD28 抗体が結合した T 細胞刺激用ビーズ (Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28) を加えることで CD8 陽性細胞の活性化を誘導した。活性化誘導から 2 日と 3 日後の CD8 陽性サブセットの変動を CD44 と CD62L の発現を指標にしたフローサイトメーター解析により検討した。

(OVA を用いた活性化による TCR 経路解析) はじめに、若齢と高齢の OT-1 マウス由来の CD8 陽性 T 細胞 (OT-I 細胞) をリンパ節から CD8a<sup>+</sup> T cell Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec) を用いて単離した。単離した OT-I 細胞はマイトマイシン C 処理を行った MC38-OVA 細胞と 2-3 時間の共培養を行った。その後、0.05  $\mu$ M の抑制性フォスファターゼの阻害剤を加えて 1 時間培養し、老化と阻害剤の影響を BD LSRFortessa と抗リン酸化 ZAP70 (pZAP70) 抗体 (Invitrogen, clone n3kobu5) を用いた pZAP70 発現解析を行った。

・ 担がんマウスモデル：(P4 細胞の抗腫瘍能の検討) 腫瘍を形成させるために、MC38-OVA 細胞を CD8 KO マウスの皮内に移植した。移植から 5 日後に、OT-1 マウスの脾臓から単離した P4 細胞を担がん CD8 KO マウスへ静脈内注射により移植した。ポジティブコントロールとして単離したエフェクター細胞を同様に担がん CD8 KO マウスに移植し、腫瘍体積を計測し抗腫瘍能の比較検討を行った。その間に血液を採取し、移植した CD8 陽性細胞のサブセットの変化をフローサイトメーター (BD FACSCanto) を用いて解析した。

(抑制性フォスファターゼ阻害剤による抗腫瘍能改善の検討) 若齢と高齢の PD-1 KO マウス又は CD8 KO マウスに抑制性フォスファターゼ阻害剤の腹腔内注射 (3 mg/kg) を行った。注射から 3 日後に MC38 細胞の皮内注射による移植を行い、継時的な腫瘍体積の測定を行った。

・ 網羅的遺伝子発現解析：P4 細胞の機能を解析するために PD-1 KO マウスのリンパ節や脾臓から単離した P4 又はナイーブ、エフェクター、メモリー細胞を CD44 と CD62L の発現を指標に BD FACSAria を用いて単離した。さらに、老化ナイーブ細胞における抑制とアジュバント療法による回復機構を検討するために、アジュバント注射有り又は無しの若齢と加齢 PD-1 KO マウスの脾臓からナイーブ CD8 陽性細胞を単離した。単離した細胞から NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を用いて RNA の抽出と精製を行った。次に精製した RNA と Mouse 8 x 60K v2 Microarray チップ

プ (Agilent Technologies) を用いてマイクロアレイ解析を行った。得られたデータを用いて Gene ontology (GO) enrichment 解析を行い特異的に活性化している因子や経路の同定を行った。

・エネルギー産生変動解析:野生型と PD-1 KO の若齢と加齢の MC38 担がんマウスの脾臓から CD8 陽性細胞を単離し、酸素消費速度 (OCR) の測定を Seahorse XFe96 Extracellular Flux assay kit と Seahorse XF Cell Mito Stress test kit (Agilent Technologies) を用いて XFe96 Extracellular Flux analyzer (Agilent Technologies) により測定した。出てきたデータをもとに基礎呼吸、ATP 産生および最大呼吸量を算出し、老化のエネルギー産生への影響を検討した。

#### 4. 研究成果

これまでに本申請者らの研究により免疫老化への関与が示唆されている P4 細胞の特性や機能を解析するために、P4 細胞の由来の検討を行った。P4 細胞は活性化に伴い増加することから、in vivo における CD8 陽性細胞の活性化を、若齢と高齢 OT-1 マウスに MC38-OVA 細胞を移植することで誘導した。移植から 5 日後、P4 細胞の割合は若齢マウスにおいて増加し、加齢マウスにおいては有意な変動は見られなかった。次に、単離した P4 細胞を抗 CD3 と抗 CD28 抗体結合ビーズを用いて in vitro で活性化させると、エフェクター細胞へと変化した。これらの結果から、P4 細胞は TCR 刺激により誘導され、エフェクター細胞へと分化する細胞であり、この経路は加齢により抑制されていることが示唆された。そのため、エフェクター細胞へと分化可能なナイーブ細胞とメモリー細胞を単離し、in vitro での活性化を誘導した。その結果、ナイーブ細胞からは P4 細胞が誘導されたが、メモリー細胞からは誘導されなかった。これらの結果から、P4 細胞は TCR を介した活性化によりナイーブ細胞から誘導され、エフェクター細胞へと分化する細胞であることが示された。

次に、P4 細胞の腫瘍形成における役割を検討するために、OT-1 マウス由来の P4 細胞を担がん (MC38-OVA) CD8 KO マウスへ導入し、腫瘍増殖への影響を検討した。その結果、ポジティブコントロールであるエフェクター細胞を導入した場合と同様に、P4 細胞移植により腫瘍増殖は強く抑えられた

(図 1 左)。さらに、移植した P4 細胞がエフェクター細胞に変化していることを末梢血液を用いた解析により明らかにした (図 1 右)。これらの結果は、P4 細胞はエフェクター細胞へと変化することにより抗腫瘍効果を発揮することを示している。

P4 細胞の特徴を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現比較解析を行った。比較検討するために、P4 細胞やその他の CD8 陽性サブセット細胞から RNA を単離し、マイクロアレイ解析に用いた。遺伝子発現データの中から P4 細胞で最も発現が高い遺伝子を選択し GO 解析を行った結果、P4 細胞で亢進している生物学的プロセスの中に多くの一炭素代謝に関与するプロセスが含まれていた (図 2 上、赤字)。さらに、一炭素代謝に関わる遺伝子の発現の比較を行うと、他のサブセット細胞よりも P4 細胞においてそれらの発現が高いことが明らかになった (図 2 下)。

一炭素代謝は核酸合成やメチル化修飾に関与していることから、老化に伴う P4 細胞の誘導不全により核酸合成やメチル化修飾が抑制されているためにがん抗原に反応出来ず、免疫治療耐性に陥る可能性が示唆された。

これまでに、PD-1 阻害治療により

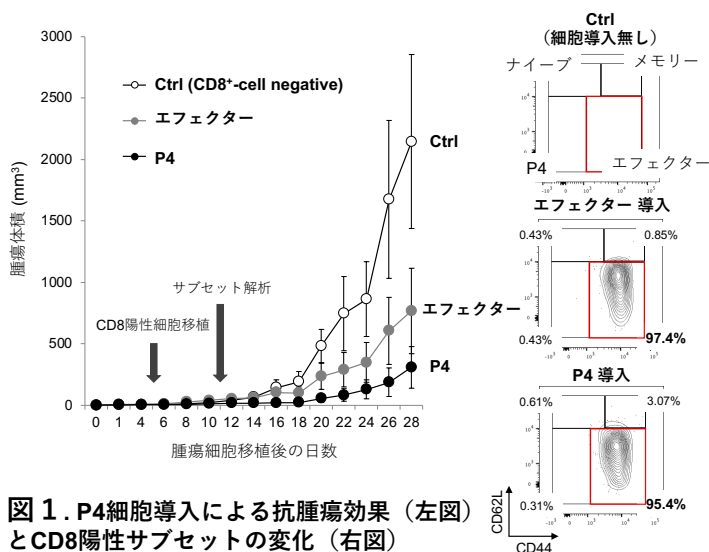


図 1. P4細胞導入による抗腫瘍効果 (左図) と CD8陽性サブセットの変化 (右図)

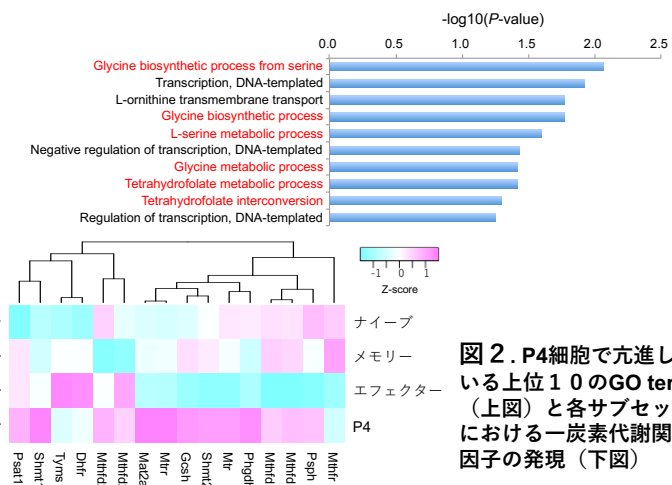


図 2. P4細胞で亢進している上位 10 の GO term (上図) と各サブセットにおける一炭素代謝関連因子の発現 (下図)

ミトコンドリア代謝が亢進することが報告されており、ミトコンドリア代謝亢進と T 細胞の活性化がリンクしていることが明らかになってきている。T 細胞老化のミトコンドリア代謝への影響を解析するために、若齢と高齢のマウス由来の CD8 陽性細胞における酸素消費速度の測定を行った。その結果、基礎呼吸、ATP 産生および最大呼吸量が加齢により低下していることが明らかになった。1 炭素代謝はミトコンドリアの生合成にも関与することが報告されていることから、老化 CD8 陽性細胞におけるミトコンドリア代謝の低下は、一炭素代謝関連因子の発現が高いサブセットである P4 細胞の誘導低下と一致している。

これまでに、あるアジュバント法により高齢マウスにおいて P4 細胞が誘導され、PD-1 阻害治療による抗腫瘍効果を回復させることを明らかにしている。そこで、この作用機序を解明するために、アジュバント注射を行った若齢と高齢マウスの脾臓から単離したナイーブ細胞を用いて、網羅的な遺伝子発現比較を行った。その結果、抑制性のフォスファターゼの発現が高齢マウスのナイーブ細胞で亢進し、アジュバント注射により抑制されることが明らかになった。この加齢による抑制性フォスファターゼの発現亢進は、フローサイトメーターによる解析でも確認された (図 3)。さらにこのアジュバント処理は、高齢マウスにおける P4 細胞の誘導増加に加えて (図 4)、一炭素代謝も回復させることが関連因子の発現解析により明らかになった。また、高齢担がんマウスにおける腫瘍浸潤リンパ球の数や抗原特異的な CD8 陽性細胞の数がこのアジュバント処理により増加することがフローサイトメーター解析により明らかになった。

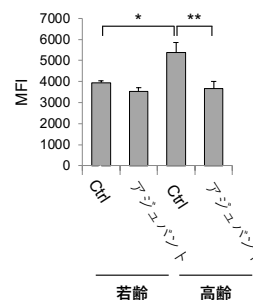


図 3. 抑制性フォスファターゼの老化やアジュバント注射による発現変動

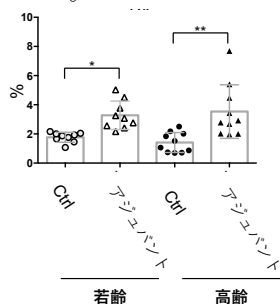


図 4. アジュバント注射による P4 細胞の割合の増加

網羅的な遺伝子発現比較により同定された加齢に伴い発現増加する抑制性フォスファターゼの PD-1 阻害治療耐性への関与を検討するために、その阻害剤を高齢 PD-1 KO マウスに投与した。投与から 3 日後に MC38 細胞を移植し、腫瘍形成の比較を行なった。その結果、阻害剤を投与した高齢マウスにおける腫瘍形成は、コントロール高齢マウスに比べて非常に強く抑制された。この阻害剤による抑制効果は、担がん CD8 KO マウスでは見られなかったことから、抑制性フォスファターゼは CD8 陽性 T 細胞の機能抑制を介して加齢に伴う PD-1 阻害治療耐性に関与していることが示唆された。そこで、高齢マウスにおける CD8 陽性 T 細胞の機能がこの阻害剤により改善するのかどうかを検討するために、OT-I 細胞を用いた解析を行なった。高齢マウス由来の OT-I 細胞は MC38-OVA 細胞との共培養による TCR 下流因子の活性化 (ZAP70 のリン酸化) は見られなかったが、阻害剤

を添加することにより ZAP70 のリン酸化が OVA 依存的に強く亢進された。さらに、抑制性フォスファターゼの発現が高い T 細胞と低い T 細胞を単離し、遺伝子発現解析を行なった結果、発現の高い T 細胞では低い細胞よりも TCR 経路に関係する因子の発現かが低く、抑制性フォスファターゼにより TCR シグナル伝達が抑制されていることが示唆された。

本研究で得られた結果から、加齢に伴う PD-1 阻害治療耐性には抗原依存的なナイーブ細胞から P4 細胞への分化誘導阻害や 1 炭素代謝経路の抑制が関与する可能性が示された。さらに、この抗原反応阻害には抑制性フォスファターゼの発現亢進が関与し、TCR 経路を抑えることで PD-1 阻害治療の効果が出にくい状態にしていることが示唆された。そのため、臨床において抑制性フォスファターゼの阻害が PD-1 阻害などのがん免疫治療の効果を高める可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Yuka Nakajima, Kenji Chamoto, Takuma Oura, and Tasuku Honjo   | 4. 巻<br>118               |
| 2. 論文標題<br>Critical role of the CD44lowCD62Llow CD8+ T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>PNAS  | 6. 最初と最後の頁<br>e2103730118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1073/pnas.2103730118  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Masato Ogishi, Rui Yang, Caner Aytakin, ~ Yuka Nakajima et al.                | 4. 巻<br>27              |
| 2. 論文標題<br>Inherited PD-1 deficiency underlies tuberculosis and autoimmunity in a child | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Nat. Med.   | 6. 最初と最後の頁<br>1646-1654 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41591-021-01388-5                                   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Muna Al-habsi, Kenji Chamoto, Ken Matsumoto, ~ Yuka Nakajima et al.                               | 4. 巻<br>378            |
| 2. 論文標題<br>Spermidine activates mitochondrial trifunctional protein and improves antitumor immunity in mice | 5. 発行年<br>2022年        |
| 3. 雑誌名<br>Science   | 6. 最初と最後の頁<br>2abj3510 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1126/science.abj3510  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>茶本健司, 仲島由佳, 本庶佑           |
| 2. 発表標題<br>老化によるがん免疫抑制機構の解明とその解除法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第25回 日本がん免疫学会総会           |
| 4. 発表年<br>2021年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Chamoto K, Nakajima Y, Honjo T   |
| 2. 発表標題<br>A combinational strategy for unresponsiveness to PD-1 blockade therapy in aged individuals |
| 3. 学会等名<br>The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association                                 |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>茶本健司, 仲島由佳, 本庶佑                        |
| 2. 発表標題<br>老化マウスT細胞ミトコンドリア不全による抗腫瘍免疫力の低下とその制御法の開発 |
| 3. 学会等名<br>Agilent 細胞解析ウェブナーシリーズ2021              |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sara DeIghandi, Kenji Chamoto, Yuka Nakajima, Tasuku Honjo                |
| 2. 発表標題<br>CD45 Modulation Recovers Resistance to PD-1 Blockade Cancer Immunotherapy |
| 3. 学会等名<br>The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology            |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計2件

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>仲島由佳、茶本健司              | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>北隆館                    | 5. 総ページ数<br>5   |
| 3. 書名<br>Bio Clinica 「老化はなぜ進むのか」 |                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>仲島由佳、茶本健司                     | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>羊土社                           | 5. 総ページ数<br>5   |
| 3. 書名<br>実験医学「がん微小環境におけるサイトカインを介した免疫制御」 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|