

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08531

研究課題名(和文) 肺がん局所におけるCD8陽性細胞の疲弊化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of CD8+ T cell exhaustion in lung cancer

研究代表者

西中村 瞳 (Nishinakamura, Hitomi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90597692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺がん検体の腫瘍内浸潤リンパ球を用いた解析の結果、CD8陽性T細胞の活性化にはT-betとEomesが重要であることが明らかになった。一方、ATAC-seq、RNA-seqを行ったところ、疲弊化したCD8陽性T細胞ではTOX1、TOX2の発現がナイーブCD8陽性T細胞に比べて有意に高いことが分かった。さらに公開されたシングルRNA-seqのデータを解析した結果、CD8陽性T細胞が疲弊化した場合、T-betやEOMESの発現が低下し、転写因子TOX1およびTOX2の発現が上昇していた。CD8陽性T細胞が活性化、疲弊化する際に発現が変化する代表的な4転写因子が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-1抗体を用いたがん治療の奏効率では20-30%に止まる。この効果を上げるために様々な薬剤との併用療法の開発が進んでいる。しかしながら腫瘍内のCD8陽性T細胞が活性化して疲弊化に至る際の転写因子の作用機序については不明な点が数多く残されている。ヒト検体の網羅的解析から発見した転写因子の関係性を明らかにすることでより実臨床へ還元することが可能な研究である。

研究成果の概要(英文)：Analysis of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) from non-small cell lung cancer (NSCLC) specimens revealed that T-bet and Eomes are important for the activation of CD8-positive T cells. On the other hand, ATAC-seq and RNA-seq of NSCLC TILs revealed that the expression of transcription factors TOX1 and TOX2 was significantly higher in exhausted CD8-positive T cells than in naive CD8-positive T cells. Furthermore, scRNA-seq open data of lung cancer TILs showed that when CD8-positive T cells were exhausted, the expression of T-bet and EOMES was decreased and that of transcription factors TOX1 and TOX2 was increased significantly. These data suggested four representative transcription factors whose expression is significantly altered when CD8-positive T cells are activated or exhausted in human lung cancer.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：T細胞の活性化 T細胞の疲弊化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

がん細胞が免疫系から逃れる仕組みを標的としたがん免疫療法の開発・臨床応用が進んでいる。これに伴い抗腫瘍免疫応答の仕組みを理解することは重要である。抗腫瘍免疫応答において、CD8⁺T細胞は、がん細胞が提示するがん抗原をT細胞受容体(TCR)で認識し、活性化して、IFN- γ やTNF- α などのサイトカインを産生し、パーフォリンやグランザイムBなどを介してがん細胞を殺傷する。ただし、慢性的ながん抗原刺激によって過剰に活性化された場合には、免疫チェックポイント分子(PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, TIGITなど)を細胞表面に発現したまま細胞傷害活性を失い、疲弊する。免疫チェックポイント阻害薬(抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体)によって、疲弊化CD8⁺T細胞を回復させる方法は、がん細胞を標的とする従来の治療とは異なり、一定の治療効果がある。しかし、免疫チェックポイント分子のみを阻害しても、CD8⁺T細胞の細胞傷害活性を完全に復活させることは出来ない。実際に免疫療法(抗PD-1抗体薬治療)を受けた非小細胞肺癌患者検体の腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)をフローサイトメトリー(FACS)マスマイトメトリー(CytoF)で解析し、末梢血単核球細胞(PBMC)の抗原特異的CD8⁺T細胞の誘導実験を行った。がん細胞が免疫系から逃れる仕組みを標的としたがん免疫療法の開発・臨床応用が進んでいる。これに伴い抗腫瘍免疫応答の仕組みを理解することは重要である。抗腫瘍免疫応答において、CD8⁺T細胞は、がん細胞が提示するがん抗原をT細胞受容体(TCR)で認識し、活性化して、IFN- γ やTNF- α などのサイトカインを産生し、パーフォリンやグランザイムBなどを介してがん細胞を殺傷する。ただし、慢性的ながん抗原刺激によって過剰に活性化された場合には、免疫チェックポイント分子(PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, TIGITなど)を細胞表面に発現したまま細胞傷害活性を失い、疲弊化する。免疫チェックポイント阻害薬(抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体)によって、疲弊化CD8⁺T細胞を回復させる方法は、がん細胞を標的とする従来の治療とは異なり、一定の治療効果がある。しかし、免疫チェックポイント分子のみを阻害しても、CD8⁺T細胞の細胞傷害活性を完全に復活させることは出来ない。実際に免疫療法(抗PD-1抗体治療)を受けた非小細胞肺癌患者検体の腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)をフローサイトメトリー(FACS)マスマイトメトリー(CytoF)で解析し、末梢血単核球細胞(PBMC)の抗原特異的CD8⁺T細胞の誘導実験を行った。その結果、CD8⁺T細胞はがん細胞が提示したがん抗原をTCR-カルシニューリン-NFATのシグナル依存的に認識する(図1右上のNFAT阻害剤の結果)。活性化したNFATは細胞質から核内へ移行し、PD-1の上流のNFAT結合領域に結合する。その後、PD-1などの遺伝子の発現・誘導が起こり、活性化CD8⁺T細胞はがん細胞を攻撃・死滅させるが、何かが原因で疲弊し、機能を失うと考えられる。疲弊の原因を調べるため、非小細胞肺癌患者検体のATAC-seq, RNA-seqを行ったところ、疲弊化CD8⁺T細胞の転写因子TOX1, TOX2の発現がナイーブCD8⁺T細胞に比べて有意に高かった(未発表)。さらに公開されている肺癌TILのシングルセル(sc)RNA-seqのデータを解析した。その結果、PD-1の発現が上昇して疲弊したヒトCD8⁺T細胞では、TOX1およびTOX2の発現がナイーブCD8⁺T細胞に比べて有意に上昇していた(図2左)。特にTOX1の発現はナイーブ、活性化、疲弊化の変化に従って上昇した(図2右)。また、疲弊化マーカーであるCD39, TIM-3, PD-1と、TOX1, TOX2の発現には強い相関関係が認められた(図3-1)。一方、慢性感染による疲弊化で発現上昇すると報告されている転写因子T-bet, EOMESは相関しなかった(図3-2)。以上よりTOX1, TOX2の発現・誘導、働きが肺癌局所のCD8⁺T細胞の疲弊化に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌においてT-bet, EOMES, TOX1, TOX2などの転写因子の動きに着目してヒトCD8⁺T細胞が疲弊化する機序を解明する。

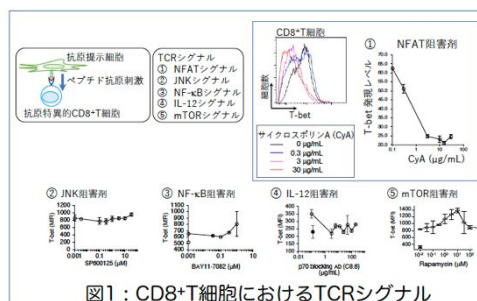


図1: CD8⁺T細胞におけるTCRシグナル

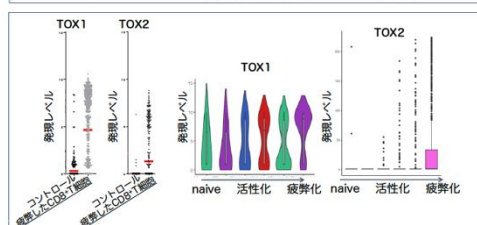


図2: ヒト肺癌検体CD8⁺T細胞のscRNA-seq解析

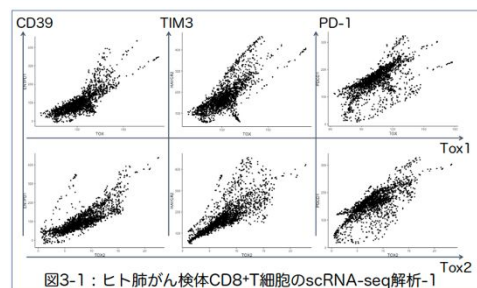


図3-1: ヒト肺癌検体CD8⁺T細胞のscRNA-seq解析-1

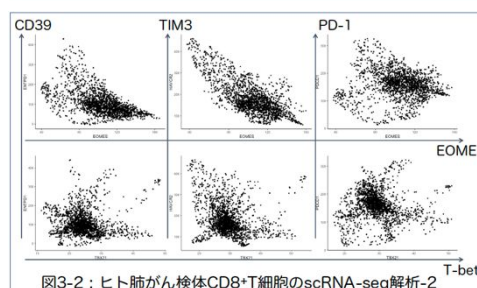


図3-2: ヒト肺癌検体CD8⁺T細胞のscRNA-seq解析-2

3. 研究の方法

ヒト肺がん検体を用いた検討

PBMC や TIL を用いて FACS および CyTOF の解析を行う。CD8⁺T 細胞の PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, TIGIT, CD39, IFN- γ , TNF- α , T-bet, EOMES, TOX1, TOX2 などの発現解析を行う。加えて免疫療法を受けた奏功症例と非奏功症例の比較検討も行う。これまでに蓄積されている scRNA-seq や TCGA のデータも利用して網羅的な発現解析を進める。

In vitro の作用機序の解析

それぞれの転写因子が発現し、機能する作用機序を明らかにするため、阻害剤などを用いた検討を行う。

転写因子のレポーターマウスを用いた解析

T-bet レポーター、Eomes レポーターマウス、Tox1 レポーターマウス、Tox2 レポーターマウスなどを用いて担がんモデルマウスから経時的に TIL を採取し、TIL 中の CD8⁺T 細胞を分取して scRNA-seq の解析を行う。さらにレポーターの色を利用して 3 次元の動態解析を行い、ヒト肺がん検体での解析結果を詳細に検証し、疲弊化を防ぐ、もしくは活性化状態に戻すシグナル経路や転写因子の同定に繋げる。

4. 研究成果

外科手術を受けた非小細胞肺癌の患者検体の腫瘍から TIL を採取して CD8⁺T 細胞の割合を調べた。その結果、CD8⁺T 細胞の割合は 20% から 80% までばらつきがあり、多様性が認められた (図 4A)。次に、この TIL の CD8⁺T 細胞に発現する活性化を示すマーカーである PD-1 を FACS で解析した結果、CD8⁺T 細胞の割合と活性化を示す PD-1 発現の強さは正の相関関係にあることが示唆された (図 4A)。さらに TCGA の RNA 発現解析のデータを使って、CD8 および PD-1 の発現が高い場合に発現が高い遺伝子を検索した結果、転写因子 T-bet と Eomes の発現が上位にランクされた (図 4B)。健康人の末梢血から採取したナイーブ CD8⁺T 細胞を、抗 CD3 抗体による TCR 刺激によって活性化させて、これらの遺伝子の発現を解析した。その結果、抗 CD3 抗体の濃度依存的に PD-1 の発現が上昇するとともに T-bet, EOME の発現が有意に増加した (図 4C)。以上の結果から、TCR 刺激によって活性化した CD8⁺T 細胞において、T-bet や EOMES は CD8⁺T 細胞の活性化マーカーとなる可能性が肺がん検体の解析から示唆された。実際に、患者検体 TIL の CyTOF 解析を行った結果、高次元クラスタリングによって T 細胞は 5 つの CD8⁺T 細胞集団に分類され、活性化マーカーや転写因子 T-bet, EOMES, Bcl-2 などを高発現していることが分かった (図 5A)。NFAT のシグナルも解析してみたところ、T-bet の発現レベルが高いほど TCR シグナル直下の ZAP70 のリン酸化や NFAT の発現が高い傾向が認められた。(図 5B)。一方、背景に述べたように、非小細胞肺がん検体の ATAC-seq (図 6)、RNA-seq の結果および公開されている肺がん TIL の scRNA-seq のデータ解析から、PD-1 の発現が上昇して疲弊したヒト CD8⁺T 細胞では、TOX1 および TOX2 の発現がナイーブ CD8⁺T 細胞に比べて有意に上昇し、疲弊化マーカーである CD39, TIM-3, PD-1 と、TOX1, TOX2 の発現には強い相関関係が認められたことから、活性化状態から疲弊化に至るまで、PD-1 の上流において、主に T-bet, EOMES, TOX1, TOX2 の転写因子が重要な役割を果たしていることが示唆された。

上記の結果から 4 つの転写因子に着目して活性化から疲弊化に至る解析を進めている。in vitro での解析は、転写因子の関係性を調べるため ChIP アッセイを進めており、担がんモデルマウスを用いた実験ではそれぞれの転写因子のレポーターマウスを用いて解析中である。マウスの大腸癌細胞株 MC38 や悪性黒色腫の細胞株 B16F10 を担がんし、経時的に TIL を採取して T-bet⁺ T 細胞をセルソーターによって分取し、先進ゲノム支援によって scRNA-seq の結果を得た。その他 3 つの転写因子も同様の解析を進めている。またこれらのマウスを交配することによって、活性化から疲弊化していく CD8⁺T 細胞の 3 次元動態解析も進行中である。

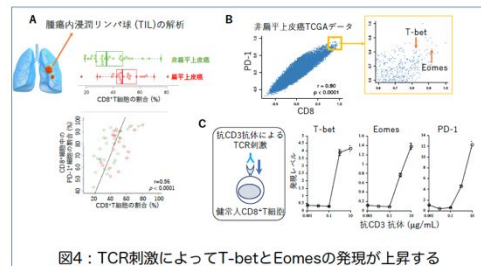


図4: TCR刺激によってT-betとEomesの発現が上昇する

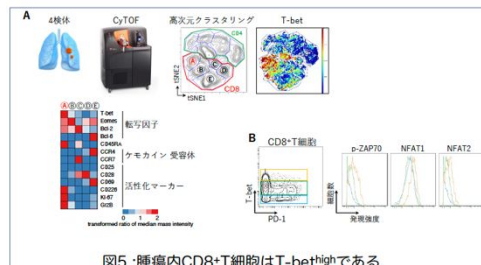


図5: 腫瘍内CD8⁺T細胞はT-bet^{high}である

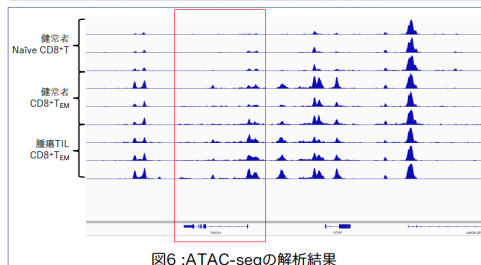


図6: ATAC-seqの解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kumagai S et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 201 ~ 218.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2022.01.001	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 Kawazu M et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 HLA Class I Analysis Provides Insight Into the Genetic and Epigenetic Background of Immune Evasion in Colorectal Cancer With High Microsatellite Instability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 799 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.10.010	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 Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, Vitaly K, Itahashi K, Maeda Y, Matsui S, Shibahara T, Yamashita Y, Irie T, Tsuge A, Fukuoka S, Kawazoe A, Udagawa H, Kirita K, Aokage K, Ishii G, Kuwata T, Nakama K, Kawazu M, Ueno T, Yamazaki N, Goto K, Tsuboi M, Mano H, Doi T, Shitara K, Nishikawa H	4. 巻 21
2. 論文標題 The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0769-3	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 Itahashi Kota, Irie Takuma, Yuda Junichiro, Kumagai Shogo, Tanegashima Tokiyoshi, Lin Yi-Tzu, Watanabe Sho, Goto Yasushi, Suzuki Jun, Aokage Keiju, Tsuboi Masahiro, Minami Yosuke, Ishii Genichiro, Ohe Yuichiro, Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Suzuki Yutaka, Koyama Shohei, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 BATF epigenetically and transcriptionally controls the activation program of regulatory T cells in human tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	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) 10.1126/sciimmunol.abk0957	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	板橋 耕太 (Itahashi Kota) (10828990)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員 (82606)	

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