

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09911

研究課題名(和文) ヒト口腔癌における制御性T細胞の新規制御メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of a novel control mechanism of regulatory T cells in human head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

今井 優樹 (Imai, Masaki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：30440936

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)：近年、C5aR が FOXP3+制御性T細胞 (Treg) を介して抗腫瘍免疫を抑制することが示されている。しかしながら、腫瘍微小環境でTregを活性化するC5aRの役割は、未だ明らかにされていない。そこで、ヒト頭頸部癌患者および健常人組織に浸潤したリンパ球における C5aRの細胞特異的発現を公開されているscRNA-seqデータを用いて検討した。C5AR1の発現は、HNSCC浸潤TregはC5aRを発現は検出できなかったが、単球/樹状細胞 (DC) クラスタで高発現していた。これらのデータは、C5aR がTregを間接的に活性化するが、直接的に活性化しないことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗腫瘍免疫応答の抑制に中心的な働きを担うTregに対してC5aRがどのように作用するかは未だに明らかでない。また、これらの報告はマウスモデルのみで、ヒトの腫瘍浸潤リンパ球を用いたC5aRの検討は皆無であり、それをヒトで明らかにした意義は大きいと考える。さらなる研究は必要だが、本研究により、C5aRの阻害剤は新たな癌治療薬となる可能性が示された。その上、免疫チェックポイント阻害剤とは作用点が異なるため、併用することで相乗効果が期待できる。さらに、口腔癌のみならず、口腔癌以外の難治癌にも応用の可能性があり、次世代の新しい癌治療薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies demonstrate that the complement receptor C5aR suppresses antitumor immunity via FOXP3+ regulatory T cells (Tregs). However, the role of C5aR to activate Tregs in the tumor microenvironment is in general poorly understood. We evaluated the cell specific expression of C5aR in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and non-cancer control. Tregs in HNSCC did not express C5aR. However, C5AR1 highly expressed in the monocyte/dendritic cell (DC) cluster of tumor-infiltrated lymphocytes (TILs) in HNSCC but not in the Treg. These data indicate C5aR indirectly activate Tregs, but not directly.

研究分野：免疫学

キーワード：補体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然免疫を担う補体タンパク質である C5a は、補体活性化によって産生され、C5aR を発現する免疫細胞を遊走または活性化することで、病原微生物の侵入を防いでいる。一方、腫瘍に対しては負の働きが多く、がん細胞の産生した C5 が癌組織局所で C5a に分解され、がん細胞の増殖・転移を促進することが報告されている。また、C5aR の阻害剤を用いたマウス腫瘍モデルの研究では、C5aR 阻害剤投与により、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の活性化をはじめとする抗腫瘍免疫を高めるとともに、癌組織中の制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の比率および抑制性サイトカインや CTLA-4 の発現が減少する報告が多数ある。すなわち、癌微小環境で生じた C5a が C5aR を介して Treg を誘導し、抗腫瘍免疫を抑制することが考えられる。しかしながら、抗腫瘍免疫応答の抑制に中心的な働きを担う Treg に対して C5aR がどのように作用するかは未だに明らかでない。また、これらの報告はマウスモデルのみで、ヒトの腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を用いた C5aR の検討は皆無である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト口腔癌を含む頭頸部癌において C5aR がどのように Treg を活性化し、抗腫瘍免疫を抑制しているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

① mRNA 発現に関する TCGA データ分析

頭頸部癌の The Cancer Genome Atlas (TCGA) 公開データセットは、cBioPortal からダウンロードし、mRNA の発現レベルの相関をピアソンの積率相関分析で検討した。

② 頭頸部癌腫瘍浸潤リンパ球のシングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) 公開データセットの解析

ヒト頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) および健康なドナーの扁桃腺の scRNA-seq データの遺伝子発現マトリックスは、Gene Expression Omnibus、GSE1393241 からダウンロードした。ダウンロードしたデータは、R (ver. 4.0.4) の Seurat 4.0.1 標準ワークフローを使用して Seurat オブジェクトに変換し、発現遺伝子が 200 未満または 2500 を超え、ミトコンドリアゲノム転写物が 5% を超える細胞を除去した後、正規化した。統合、セル クラスタリング、および次元削減は、Seurat の標準パイプラインを使用し、各クラスターは、CD3E、CD4、CD8 (T 細胞)、FOXP3 (Treg)、GZMB、GNLY、NKG7 (細胞傷害性 T、NK 細胞)、MS4A1、CD19 (B 細胞)、CD38、LMO2 (中心細胞)、XBP1 (形質細胞)、CD14、S100A9 (単球)、CEBPD、LYZ、FCER1G (DC)、GZMB、LILRA4、SERPINF1 (形質細胞様 DC)、INHBA、C1QC (マクロファージ) などの細胞特異的マーカーによってアノテーションされた。

4. 研究成果

① mRNA 発現に関する TCGA データ分析

TCGA で公開されている頭頸部癌の臨床データを用いて、Treg のマスター転写因子である FOXP3 と C5AR1 の発現レベルの相関をピアソンの積率相関分析で検討したところ、C5AR1 の mRNA 発現はともに FOXP3 と強い相関があった (図 1)。これは、ヒト頭頸部癌においても、C5aR が Treg を活性化に関与している可能性が示唆された。

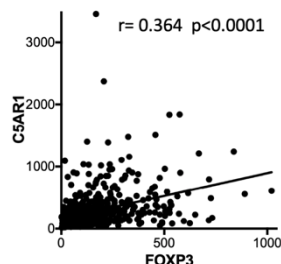


図 1. TCGA データセットからの HNSCC における C5AR1 と FOXP3 の発現の相関。

② 頭頸部癌腫瘍浸潤リンパ球の scRNA-seq 公開データセットの解析

Seurat の標準パイプラインを使用し、クラスタリングされ、計 16 個のクラスターが検出された (図 2 左)。検出された各クラスターは、細胞特異的マーカーによって Treg、CD4+T 細胞など各種細胞が同定された (図 2 右・左)。次いで、UMAP 上で Treg に発現する FOXP3 と C5AR1 の発現分布を健康扁桃と頭頸部癌腫瘍浸潤リンパ球で比較したところ、FOXP3 と C5AR1 の発現分布は異なり、Treg 上に C5aR が発現していないことが明らかになった (図 3)。この結果から頭頸部癌浸潤 Treg が補体系によってダイレクトに活性化されてはならず、他の細胞によって間接的に活性化

されていることが明らかになった。さらに、*C5AR1* を発現している細胞の同定を試みたところ、頭頸部癌浸潤細胞の単球/樹状細胞のクラスターのみ *C5AR1* の発現が観察された。これら結果から頭頸部癌浸潤 Treg が補体系によってダイレクトに活性化されてはならず、C5aR が発現している単球/樹状細胞を介して間接的に活性化されていることが示唆された。

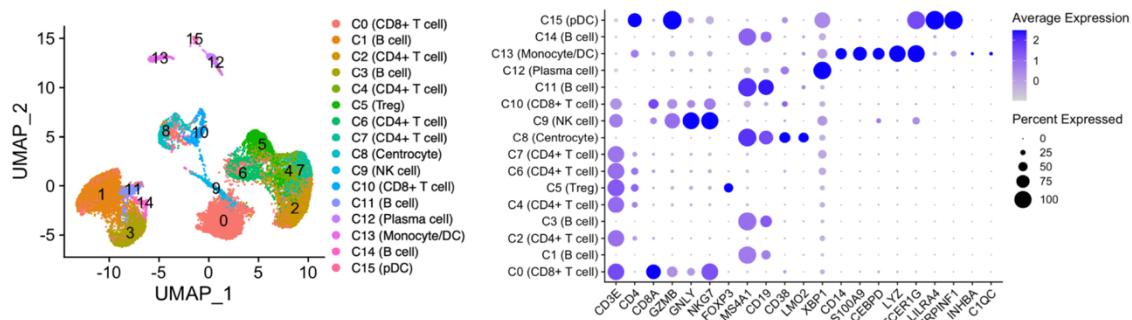


図 2. 頭頸部癌浸潤リンパ球と健常返答を統合した UMAP プロット (左)。細胞タイプは、右側のパネルにまとめた。各細胞型における特定のマーカーの発現レベルのドットプロット (右)。

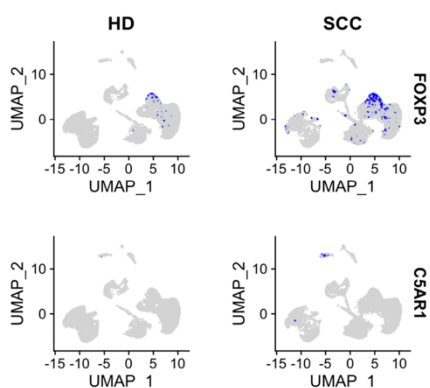


図 3. *FOXP3* および *C5AR1* 遺伝子発現によって色分けされたクラスターの UMAP プロット (灰色から青色)。(HD: 健常返答由来リンパ球、SCC: 頭頸部癌腫瘍浸潤リンパ球)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Minohara K, Imai M, Matoba T, Wing JB, Shime H, Odanaka M, Uraki R, Kawakita D, Toyama T, Takahashi S, Morita A, Murakami S, Ohkura N, Sakaguchi S, Iwasaki S, Yamazaki S.	4. 巻 114
2. 論文標題 Mature dendritic cells enriched in regulatory molecules may control regulatory T cells and the prognosis of head and neck cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1256-1269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15698	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 Kobayashi K, Ozeki T, Kim H, Imai M, Kojima H, Iguchi D, Fukui S, Suzuki M, Suzuki Y, Maruyama S, Ito Y, Mizuno M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Long-term peritoneal dialysate exposure modulates expression of membrane complement regulators in human peritoneal mesothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 9:972592.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.972592	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 Uraki R, Imai M, Ito M, Shime H, Odanaka M, Okuda M, Kawaoka Y, Yamazaki S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Foxp3+ CD4+ regulatory T cells control dendritic cells in inducing antigen-specific immunity to emerging SARS-CoV-2 antigens.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens,	6. 最初と最後の頁 e1010085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010085.	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 Nagano F, Mizuno T, Imai M, Takahashi K, Tsuboi N, Maruyama S, Mizuno M	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression of a Crry/p65 is reduced in acute lung injury induced by extracellular histones.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 192-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13322	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 Shime H, Odanaka M, Tsuiji M, Matoba T, Imai M, Yasumizu Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito AJ, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A, Yamazaki S	4. 巻 117
2. 論文標題 Proenkephalin + regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 20696-20705.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000372117.	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 該当する

1. 著者名 Shime H, Odanaka M, Tsuiji M, Matoba T, Imai M, Yasumizu Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito AJ, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A, Yamazaki S	4. 巻 118
2. 論文標題 Reply to Slominski et al.: UVB irradiation induces proenkephalin + regulatory T cells with a wound-healing function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2021919118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021919118.	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 該当する

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今井 優樹、の場 拓磨、大倉 永也、川北 大介、伊地知 圭、遠山 竜也、森田 明理、村上 信五、坂口 志文、山崎 小百合
2. 発表標題 頭頸部癌に特徴的な細胞表面CTLA-4発現制御性T細胞の遺伝子発現解析
3. 学会等名 NGS EXPO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Imai, Sayuri Yamazaki
2. 発表標題 The complement receptor C5aR may control regulatory T cells via activation of dendritic cell in head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyoshi Minohara, Masaki Imai, Takuma Matoba, James Badger Wing, Hiroaki Shime, Mizuyu Odanaka, Ryuta Uraki, Akimichi Morita, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Sayuri Yamazaki
2. 発表標題 The role of regulatory T cells and dendritic cells in controlling the tumor microenvironment of human head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井優樹、山崎小百合
2. 発表標題 シングルセルRNAシーケンスデータを用いたヒト腫瘍微小環境下の補体活性化及び制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第57回日本補体学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦木隆太、今井優樹、伊藤睦美、河岡義裕、山崎小百合
2. 発表標題 制御性T細胞を標的としたSARS-CoV-2に対する新規予防法の開発
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Odanaka M, Shime H, Tsuiji M, Matoba T, Imai M, Yasumizu Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito AJ, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A, Yamazaki S
2. 発表標題 Skin regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure have a unique gene expression profile compared to other tissue Treg cells.
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 Shime H, Odanaka M, Tsuiji M, Matoba T, Imai M, Yasumizu Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito AJ, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A, Yamazaki S
2. 発表標題 Proenkephalin+ regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function.
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 Uraki R, Imai M, Shime H, Kawaoka Y, Yamazaki S
2. 発表標題 Transient depletion of Treg cells induces adaptive immunity to SARS-CoV-2 antigens.
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 Yamazaki S, Shime H, Odanaka M, Tsuiji M, Matoba T, Imai M, Yasumizu Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito A, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A
2. 発表標題 Skin regulatory T cells possessing a healing function are expanded by ultraviolet-B exposure
3. 学会等名 The 45 th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2020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
研究分担者	志馬 寛明 (Shime Hiroaki) (70372133)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	

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