

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10435

研究課題名（和文）中皮腫に対する細胞治療の実現を目指して

研究課題名（英文）Towards the implementation of the cell therapy for mesothelioma

研究代表者

藤田 博美 (FUJITA, Hiroyoshi)

獨協医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：60142931

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）：自然免疫型T細胞であるMAIT細胞を初期化してiPS細胞を樹立し、iPS細胞からMAIT様細胞（reMAIT細胞）を選択的に分化誘導する技術を確立した。reMAIT細胞はアゴニストによって活性化され、種々のサイトカイン・ケモカインを産生した。また、reMAIT細胞を予め野生型マウスに養子移入した群では移入なしの対照群と比較して、がん移植に対して抵抗性を示した。以上の結果から、iPS細胞由来MAIT細胞を用いたがん細胞治療の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAIT細胞はヒト最大のT細胞亜集団を形成し、がん浸潤リンパ球中にも豊富に存在することが知られている、しかし、MAIT細胞ががん促進あるいは抗がんに機能するのことはこれまで不明であった。その理由の一つはマウスにおけるMAIT細胞の希少さである。今回、iPS細胞技術を用いてマウスMAIT細胞をiPS細胞へと初期化して再びMAIT様細胞（reMAIT細胞）へと再分化誘導することにより、その抗がん活性を明らかにした。本成果はヒトreMAIT細胞を用いたがんの細胞治療への可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：A member of the innate-like T cells, MAIT cells, are reprogrammed into iPS cells. reMAIT cells (MAIT-like cells) are induced from iPS cells via in vitro differentiation. reMAIT cells are activated and produce a plethora of cytokines and chemokines upon challenge with the agonists. C57BL/6 mice received reMAIT cells prior to tumor inoculation exhibit a better survival relative to the controls which received no reMAIT cells. The data demonstrate the utility of reMAIT cells in tumor immune therapy

研究分野：公衆衛生学

キーワード：養子移入 iPS細胞 分化誘導 自然免疫型T細胞 MAIT細胞 がん細胞治療 肺がん細胞

1. 研究開始当初の背景

中皮腫はアスベストへの暴露を原因として 20 年から 30 年の長い潜伏期間を経て発症する。他のがんとは異なり、効果的な治療薬がなく、対症療法しか存在しないのが現状である。中皮腫の中でも良性中皮腫にどどまらせることができれば患者の QOL を維持し、生命への脅威も軽減できる。そこで、従前にはない、新たな中皮腫の治療法開発が求められていた。

2. 研究の目的

MAIT 細胞は自然免疫と適応免疫とを橋渡しする免疫細胞で自然免疫細胞と適応免疫細胞の両方の性質を有する自然免疫型 T 細胞に帰属する。MAIT 細胞はある種のがんにおいて末梢血から消失してがん組織に移行する、固形がんにおいて浸潤リンパ球中に豊富に存在する等、抗がんあるいはがん促進に寄与すると考えられる。そこで、本研究ではマウスを用いて MAIT 細胞ががんにおいていかなる機能を持つのか、またその機能の分子基盤は何かを明らかにすることを目標とした。本研究を通して MAIT 細胞ががん細胞治療に有用であるとの proof-of-concept を確立し、MAIT 細胞を用いた細胞治療を実現することが最終目的である。

3. 研究の方法

以下の手順に従って MAIT 細胞のがんにおける機能、および、その作用機序を明らかにした。

(1) マウス MAIT 細胞の初期化(iPS 細胞作製)と iPS 細胞からの MAIT 様細胞(reMAIT 細胞)の分化誘導

① マウス MAIT 細胞の初期化：C57BL/6 マウス肺から MAIT 細胞をフローサイトメトリーにより分取・精製した。MAIT 細胞に山中因子を有するセンダイウイルスベクターを感染させた。

② iPS 細胞からの reMAIT 細胞への分化誘導：MAIT 細胞由来 iPS 細胞(MAIT-iPS 細胞)をフィーダー細胞である OP9/DLL1 (マウス骨髄由来 OP9 細胞に Notch ligand である DLL1 を強制発現させた細胞。DLL1 は iPS 細胞などの多能性幹細胞から T 細胞系列への分化誘導に必須な分子) 上で培養することにより中胚葉、リンパ球幼若細胞を経て reMAIT 細胞へと分化誘導した。

(2) reMAIT 細胞の性状解析

① 細胞表面分子の解析：iPS 細胞由来 MAIT 細胞(reMAIT 細胞)が MAIT 細胞であるのか否かを明らかにするために、reMAIT 細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

② reMAIT 細胞の活性化：reMAIT 細胞がこれまでに知られている MAIT 細胞アゴニスト等により活性化されるのか否か、フローサイトメトリーにて解析した。

③ reMAIT 細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生：②により活性化された reMAIT 細胞から産生されるサイトカイン・ケモカインを LegendPlex (一度に 13 種類のサイトカインやケモカインを定量可能な試薬)にて測定した。

(3) 養子移入された reMAIT 細胞のマウス内での動態

養子移入した reMAIT 細胞がマウス内でどの組織に移動し、また成熟するのかを明らかにするため、レシピエントマウスとして同じ遺伝背景を持つ Ly5.1 抗原を発現する C57BL/6 マウスを用いた。reMAIT 細胞は Ly5.2 抗原を発現するマウスより樹立したので、Ly5.1/Ly5.2 抗原を抗体によって区別することにより研究対象となる MAIT 細胞が reMAIT 細胞(Ly5.2 を発現)由来か Ly5.1 マウス由来かが識別可能となる。

(4) reMAIT 細胞の抗がん活性

野生型マウスへの reMAIT 細胞養子移入による生存期間測定

野生型マウス C57BL/6 に reMAIT 細胞の用量を変動させて養子移入した後に、肺がん細胞株 LLC (Lewis Lung Carcinoma) を移植し、マウス生存期間を測定した。また、reMAIT 細胞の養子移入回数を変化させ、LLC を移植して、その生存に及ぼす効果を測定した。

(5) reMAIT 細胞の抗がん活性の作用機序解析

① NK 細胞との in vitro 相互作用解：reMAIT 細胞の抗がん活性の作用機序を解明するため、自然リンパ球である NK 細胞との相互作用を reMAIT 細胞活性化やこれに伴うサイトカイン・ケモカイン産生の観点から、また、がん細胞に対する細胞傷害活性の観点から測定した。

② reMAIT 細胞の in vivo 抗がん活性における NK 細胞の機能解明：①で想定された NK 細胞と reMAIT 細胞との相互作用が in vivo でがんを移植されたマウスの生存期間にどのように影響するのかを明らかにするため、NK 細胞をマウスから除去する抗体を使用して対照群とマウス生存期間を比較・測定した。

4. 研究成果

(1) マウス MAIT 細胞の初期化(iPS 細胞作製)と iPS 細胞からの MAIT 様細胞(reMAIT 細胞)の分化誘導

① MAIT-iPS 細胞の樹立と多能性の証明：肺 MAIT 細胞から 10 以上の MAIT-iPS 細胞を樹立した。これらが多能性幹細胞の性状を有するのか否かについて、4 つの MAIT-iPS 細胞を用いてキメラ形成能を調べた。その結果、これら MAIT-iPS 細胞はキメラマウスを発生させる能力がある、すなわち多能性幹細胞であることが確認できた。

② iPS 細胞からの reMAIT 細胞への分化誘導：1.0 x10⁵ の MAIT-iPS 細胞から OP9/DLL1 上で分化誘導を行うことで 1.0 x10⁸ 以上の reMAIT 細胞が産生された。

(2) reMAIT 細胞の性状解析

① 細胞表面分子の解析：reMAIT 細胞は TCRβ⁺5-OP-RU-マウス MR1-tetramer⁺ (αβ 型 T 細胞であってマウス MAIT 細胞を検出する試薬にて認識される細胞) であることが明らかになった。

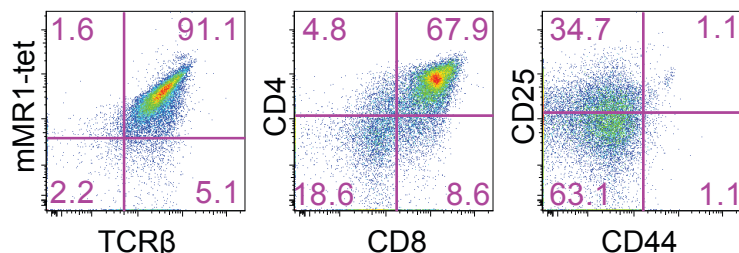


図1 MAIT-iPS 細胞から分化誘導した reMAIT 細胞のフローサイトメトリーによる表面分子発現解析

reMAIT 細胞は αβ 型 T 細胞を認識する TCRβ 抗体と 5-OP-RU-MR1 tetramer (mMR1-tet) によって認識され、CD4、CD8 並びに、活性化マーカーである CD25 を発現する。

② reMAIT 細胞の活性化:reMAIT 細胞は MAIT 細胞拘束分子である MR1 を発現する抗原提示細胞、あるいはアゴニスト、5-OP-RU-マウス MR1-tetramer によって、濃度依存的に活性化された。reMAIT 細胞の活性化は活性化指標である CD25、CD69 分子の発現亢進によって評価した。

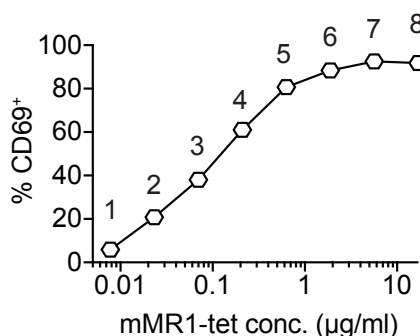


図2 5-OP-RU-MR1-tetramer (mMR1-tet)による reMAIT 細胞の活性化
5-OP-RU-MR1 tetramer(mMR1-tet)の濃度を変化させて、reMAIT 細胞に添加した。翌日、reMAIT 細胞中で、CD69 (活性化マーカー) を発現する細胞の割合をプロットした (%CD69⁺)。

③ reMAIT 細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生：アゴニストや 5-OP-RU-マウス MR1-tetramer の刺激によってインターフェロン γ、TNFα、インターロキニン(IL)-17F、IL-22、IL-23、IL-6、IL-10、IL-13 などのサイトカイン、RANTES、CXCL1、CXCL6 等の炎症性ケモカインの産生が用量依存的に見られた。

(3) 養子移入された reMAIT 細胞のマウス内での動態

Ly5.1 マウスに養子移入された reMAIT 細胞(Ly5.2 を発現)は脾臓、肝臓、肺、腸管、骨髓、胸腺へと移行し、成熟マーカーである CD44 発現を亢進させた。

(4) reMAIT 細胞の抗がん活性

野生型マウスへの reMAIT 細胞養子移入による生存期間への影響

reMAIT 細胞の野生型マウスへの養子移入は用量依存的にがんを移植したマウスの生存期間を延伸したが、ある閾値以上ではさらなる延伸効果は観察されなかった。また、reMAIT 細胞を 1 回、3 回養子移入した群では非移入群に比して生存期間延伸が見られたが、投与回数による生存期間の相違はなかった。

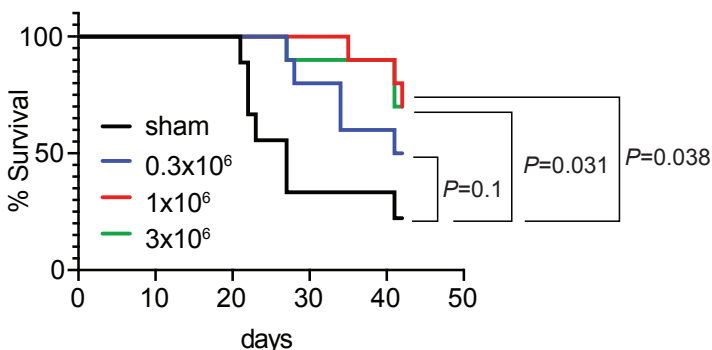


図3 reMAIT 細胞養子移入によるがん移植マウスの生存期間 (カプラン・メイヤー曲線)

C57BL/6 マウス 1 匹あたり、図中に記載されている数の reMAIT 細胞を養子移入した。その後、肺がん細胞株である LLC を尾静脈経路で移植し、マウス生存期間を測定した。各群間の統計的有意差 (P) は Log-rank test により算出した。Sham:reMAIT 細胞を養子移入していないマウス群

(5) reMAIT 細胞の抗がん活性の作用機序解明

① NK 細胞との in vitro 相互作用解析：NK 細胞と reMAIT 細胞とを共培養することにより reMAIT 細胞が活性化され、インターフェロン γ、TNFα、IL-17A 等の炎症性サイトカイン産生が亢進された。また、reMAIT 細胞単独でも各種がん細胞に対する細胞傷害活性が観察できたが、NK 細胞を加えることによりこの活性は亢進した。

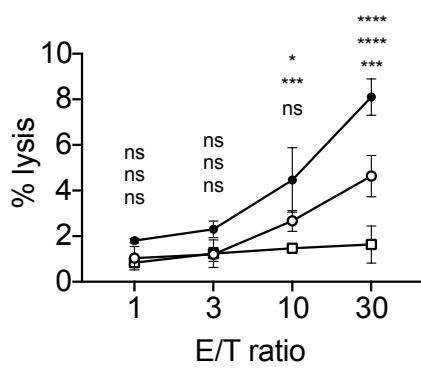


図4 reMAIT細胞/NK細胞によるがん細胞に対する傷害活性
 エフェクター細胞(E)と、がん細胞(ここでは肺がん細胞株であるLLC)を標的(T)としてE/Tの比を変動させながら共培養し(E/T ratio)、傷害されたがん細胞の割合を測定した(% lysis)。エフェクターとしてreMAIT細胞のみを用いた場合(○)、エフェクターとしてNK細胞を用いた場合(□)、reMAIT細胞とNK細胞をエフェクターとして用いた場合(●)
 NK細胞単独ではがん細胞を殺傷できないが、reMAIT細胞は単独でがん細胞を殺傷し、この活性はNK細胞により亢進される。

② reMAIT細胞の in vivo 抗がん活性におけるNK細胞の機能：マウスにNK細胞を除去する抗体を投与してがんを移植するとreMAIT細胞によるマウス生存延伸効果が観察されなくなった。以上から in vivo においてreMAIT細胞の抗がん活性はNK細胞に依存すると結論できる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sugimoto Chie, Murakami Yukie, Ishii Eisuke, Fujita Hiroyoshi, Wakao Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Reprogramming and redifferentiation of mucosal-associated invariant T cells reveal tumor inhibitory activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	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） 10.7554/eLife.70848	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 Sugimoto Chie, Fujita Hiroyoshi, Wakao Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Harnessing the Power of Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells in Cancer Cell Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 3160 ~ 3160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10123160	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 Sugimoto Chie, Fujita Hiroyoshi, Wakao Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Mice Generated with Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Mucosal-Associated Invariant T Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 137 ~ 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines12010137	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 Sugimoto Chie, Fujita Hiroyoshi, Wakao Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 A flow-cytometry-based assay to assess the cytolytic activity against tumor cells by combination of mouse MAIT cells and natural killer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102620 ~ 102620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102620	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 0件）

1. 発表者名 杉本 智恵 若尾 宏
2. 発表標題 新規MAIT細胞研究用マウスモデルの確立
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroshi WAKAO Chie Sigimoto	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academich press	5. 総ページ数 261
3. 書名 Recent Advances in iPSC-derived cell type	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 マウスMAIT様細胞及びMAIT細胞豊富なマウス	発明者 若尾宏、杉本智恵	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、7050381	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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	若尾 宏 (Wakao Hiroshi) (10280950)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	杉本 智恵 (Sugimoto Chie) (60469955)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	

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