

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82606  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K07112  
研究課題名（和文）シングルセル解析による腫瘍微小環境PD-1陽性制御性T細胞の分化メカニズムの解明  
研究課題名（英文）Elucidating the differentiation mechanisms of PD-1 positive regulatory T cells in the tumor microenvironment by single-cell analysis.  
研究代表者  
入江 拓磨（Irie, Takuma）  
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  
研究者番号：50625944  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々の研究室では臨床検体の解析を通じて、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測バイオマーカーとして腫瘍局所のPD-1陽性制御性T細胞が重要であることを見出した。しかしながら腫瘍局所のPD-1陽性制御性T細胞の働き、分化の機序や、その他の制御性T細胞との相違に関する検討は少ない。本研究では腫瘍浸潤制御性T細胞のシングルセル解析を通じ腫瘍中の制御性T細胞の活性化に関してキーとなる遺伝子の抽出を試みた。その結果、転写因子BATFが腫瘍内においてPD-1陽性制御性T細胞へと分化する転写因子ネットワークの中核として機能することを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、転写因子BATFが、がん組織内の制御性T細胞のクロマチンのリモデリングに重要であり、制御性T細胞の活性化プログラムの中核を担っていることを発見した。本研究による成果は、がん組織内の制御性T細胞を標的とする免疫治療開発や制御性T細胞が発症に関わる自己免疫性疾患の理解、様々な医学研究に応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Through analysis of clinical samples treated with immune checkpoint inhibitors, our laboratory has found PD-1-positive regulatory T cells to be an important biomarker to predict efficacy. However, there are few studies on tumor-infiltrating PD-1-positive regulatory T cells, the mechanisms of differentiation leading to their characteristic phenotype and their differences from other regulatory T cells. In this study, through single-cell analysis of tumor-infiltrating regulatory T cells, we show that the transcription factor BATF functions as the core of a transcription factor network that differentiates into PD-1-positive regulatory T cells within tumors.

研究分野：分子生物学

キーワード：制御性T細胞 腫瘍浸潤T細胞 シングルセル解析 scrRNA-seq scATAC-seq

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害薬の有効性が様々ながん種において証明されがんに対する免疫療法は一段と注目を集めている。抗腫瘍免疫の本態は CD8 陽性 T 細胞による細胞性免疫であると考えられているが、抗腫瘍免疫抑制機構としての制御性 T 細胞の重要性も認識されつつある。開発が飛躍的に進んでいる免疫療法だが、治療無効症例も相当割合で存在し、高精度の効果予測バイオマーカーやさらに有効性の高い治療開発が期待されている。制御性 T 細胞は腫瘍に多く浸潤して腫瘍局所の免疫応答を抑制しており、予後不良因子であることが知られている (Nishikawa H, et al. Int J Cancer. 2010; )。我々の研究室では免疫チェックポイント阻害薬を投与された臨床検体の解析を通じて、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測バイオマーカーとして PD-1 陽性制御性 T 細胞が重要であることを見出した (Kumagai S, et al. Nat Immunol. 2020; )。PD-1 阻害薬を投与することにより、腫瘍局所の CD8 陽性 T 細胞だけではなく、“PD-1 陽性制御性 T 細胞”の活性化も誘導され、CD8 陽性 T 細胞による有効な抗腫瘍免疫が阻害されることを明らかにした (Kamada T, et al. PNAS. 2019; )。PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞に関しては世界的に解析が進められており、IFN や TNF の産生能が低下している深い疲弊状態にあること、PD-1 阻害薬によって抑制が解除されること、更には PD-1 阻害薬の高精度な効果予測マーカーになることが報告されている。その一方で、腫瘍浸潤 PD-1 陽性制御性 T 細胞の腫瘍局所での働き、その特徴的な表現型に至る分化の機序や、その他の腫瘍浸潤制御性 T 細胞との相違に関しては殆ど検討されていない。“腫瘍浸潤 PD-1 陽性制御性 T 細胞”は制御性 T 細胞の中でもごく少数の細胞集団であることから従来の細胞集団的なアプローチは困難である。したがってその実態の解明にはシングルセルレベルの解像度からのアプローチが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は腫瘍内制御性 T 細胞のエピゲノム状態の変遷を解析することで、腫瘍中の“PD-1 陽性 制御性 T 細胞”に特徴的な遺伝子、転写制御領域を明らかにする。以上を通して、免疫療法の効果予測バイオマーカーや耐性機序、更には将来的な新規の免疫療法の開発につなげることを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究で腫瘍浸潤制御性 T 細胞の scATAC-seq を 2-3 例収集する。フローサイトメトリー (または CyTOF) を用いて、腫瘍局所の制御性 T 細胞の免疫学的情報 (PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG3、TIGIT、CD39 などの活性化マーカー) を取得する。

#### (1) バイオインフォマティクス解析

scrRNA-seq・scATAC-seq を統合的に情報解析する。制御性 T 細胞の分化経路推定を通じて、“腫瘍局所 PD-1 陽性制御性 T 細胞”に至るまでの特徴的な因子 (転写因子、エンハンサー領域) を情報学的手法により抽出する。現在までに集めた scrRNA-seq・scATAC-seq の結果、腫瘍浸潤制御性 T 細胞中に PD-1 陽性細胞がクラスタリングされ、その集団に転写因子 (NR4A1、NFKB、BATF など) が発現していること (図 2)、PDCD1 (PD-1) 近傍領域に特徴的なオープンクロマチン領域があることを確認した (図 3)。scATAC-seq、scrRNA-seq のマルチモーダルな解析によって転写因子と下流の遺伝子制御ネットワークを明らかにし、PD-1 陽性制御性 T 細胞へ至るキーとなる因子 (転写因子、パスウェイ) を解明する。複数検体の情報を集約することで解析の精度を高める。

#### (2) *in vitro*での検証

情報解析から推定された転写因子、パスウェイ、エンハンサーについて、ノックダウン・レポーターアッセイ・CRISPRi を駆使して PD-1 や免疫関連遺伝子への影響を評価する。現在 scATAC-seq 1 検体の解析の結果、NR4A1、REL、BATF など複数の転写因子結合モチーフについてシングルセルレベルで多様性が存在し (図 4)、擬時間に応じたスコアの変化を計算したところ、それらの転写因子が連続的に活性化することを示唆する結果が得られた (図 5)。現在 BATF について検証実験を進めており、制御性 T 細胞の活性化やクロマチン制御に関わることを示す結果がすでに得られている。これらの転写因子が制御性 T 細胞の機能をどのように制御し、多様性を生み出しているのか *in vitro* 解析で検証し、どの段階のどの転写因子が PD-1 陽性制御性 T 細胞の機能に重要なのか明らかにする。

#### (3) *in vivo*での検討

転写因子をノックダウンまたはエンハンサー活性を CRISPRi で落とした制御性 T 細胞をマウスに注入し、腫瘍中の制御性 T 細胞の挙動を解析することで腫瘍中の PD-1 陽性制御性 T 細胞の生物学役割を明らかにする。また PD-1 阻害剤現在 BTAF をノックダウンした制御性 T 細胞の *in vivo* 解析では、クロマチン状態や腫瘍への移行に影響があることが示されている。複数の転写因子について制御性 T 細胞における制御メカニズムを明らかにし、PD-1 陽性制御性 T 細胞への

分化・がん治療の標的として妥当であるか評価する。

#### 4. 研究成果

これまでに、がん組織内の制御性 T 細胞の特徴を明らかにするために、肺がん組織から制御性 T 細胞と制御性 T 細胞以外の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を採取し、バルク ATAC シーケンスとバルク RNA シーケンス法を用いて、各々の T 細胞のクロマチンの状態と遺伝子発現の詳細な解析を実施した。その結果、腫瘍中の制御性 T 細胞は、腫瘍内の他の T 細胞や血液中の制御性 T 細胞のいずれとも全く異なるクロマチン構造と遺伝子発現のプロファイルを有していることを明らかにした。がんの微小環境下に適応するために、制御性 T 細胞のクロマチンは特徴的な構造にリモデリングされていることが示唆された。統合的な解析から、がん組織内での制御性 T 細胞の分化と活性化のキーとなる分子を探索したところ、転写因子の BATF が候補として同定された。ゲノム中のオープンクロマチン領域を解析したところ、腫瘍内制御性 T 細胞では BATF 結合クロマチン領域がオープンクロマチンの状態にあったことから、腫瘍内制御性 T 細胞のクロマチン構造のリモデリングに BATF が関与している可能性が示唆された。特に転写が促進される遺伝子として、制御性 T 細胞の抑制活性に重要な PDCD1 などが含まれていた。

次にシングル RNA シーケンスとシングルセル ATAC シーケンスを用いて、血液、正常肺組織、がん組織内の制御性 T 細胞の 1 細胞解析を実施した。その結果、がん組織内の制御性 T 細胞は、複数の特徴的な制御性 T 細胞集団に分類することができ、多様な細胞集団の集合であった (図 1)。

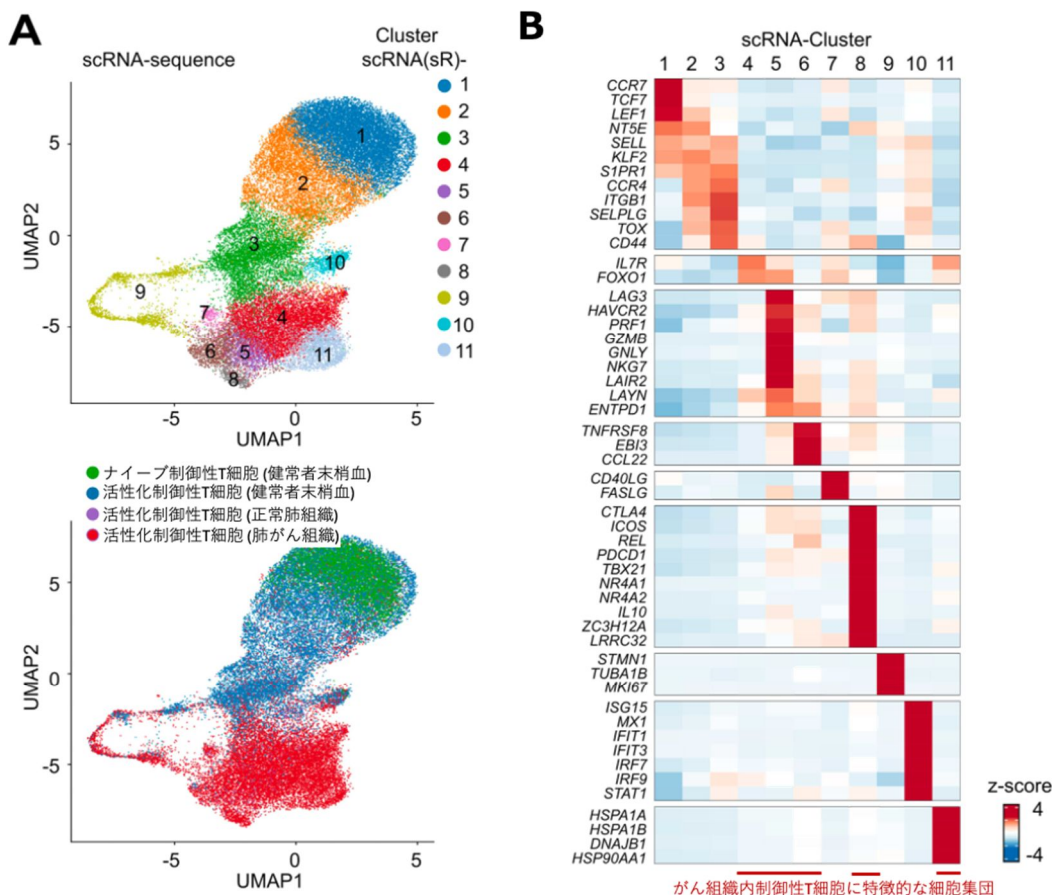


図 1. 制御性 T 細胞のシングルセル解析

血液、正常肺組織、肺がん組織内の制御性 T 細胞のシングルセル RNA シーケンスを実施し、その遺伝子発現のプロファイルから、がん組織内の制御性 T 細胞が遺伝子発現パターンからさらに細分化できることを見出した。

Monocle3 による擬似時間解析を用いて、ナイーブ制御性 T 細胞からがん組織内で最も活性化している制御性 T 細胞への擬似的な時間軸を作成し、制御性 T 細胞の分化における転写因子の発現変動を解析した結果、制御性 T 細胞の活性化に寄与することが報告されている他の転写因子と比較して、制御性 T 細胞の活性化の早期から転写因子 BATF の発現上昇が認められた。以上より、がん組織内の制御性 T 細胞の分化で BATF が早期相から働いていると考えられた (図 2)。

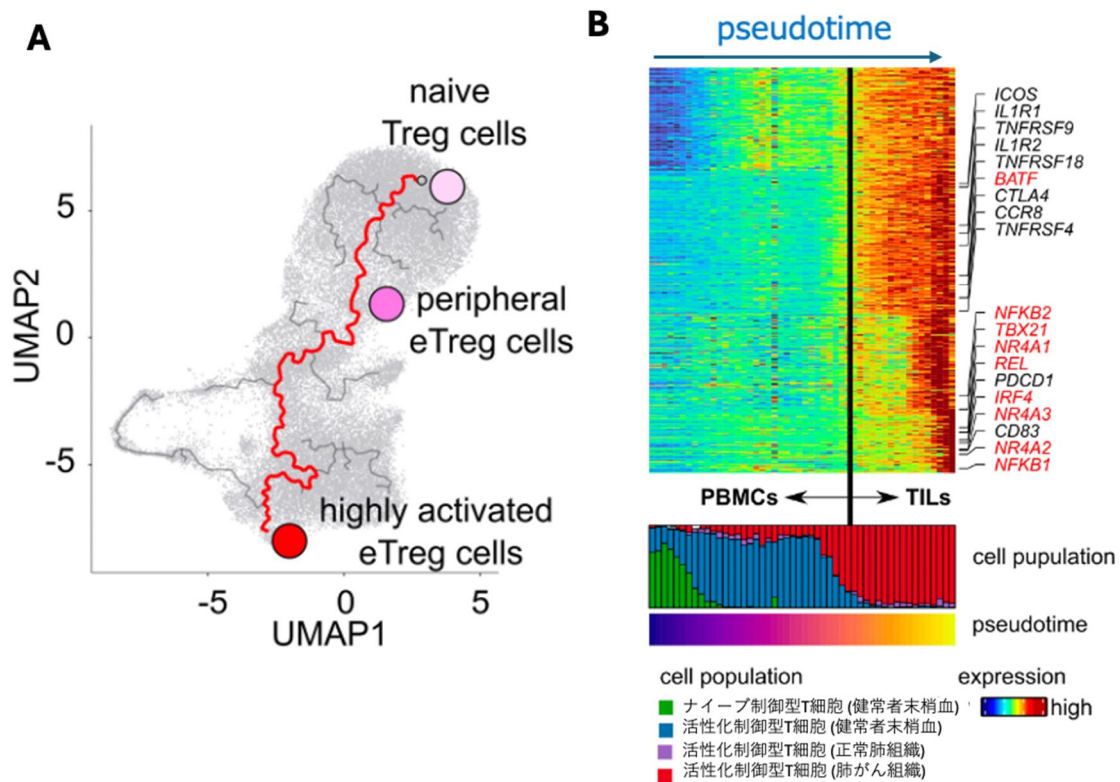


図2. 擬似間解析

制御性T細胞シングルセルデータからMonocle3による擬似間解析を実施した。その結果、転写因子BATFが制御性T細胞の活性化に寄与することが報告されている他の転写因子と比較して、活性化早期の段階から発現上昇が認められた。

BATFの制御性T細胞活性化における重要性が示されたことから、BATF遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて、がん組織内の制御性T細胞におけるBATFの機能をさらに検討した。BATF遺伝子のノックアウトによって、マウスのがん組織中の制御性T細胞の数や、制御性T細胞/CD8陽性T細胞の比は著減し、その抑制活性も有意に低下しました。さらに、Ctla4、Icos、Il10、Ccr8、Tnfrsf8を始めとして、がん組織内の制御性T細胞で特に発現が上昇している遺伝子の特徴的なオープンクロマチン領域が、BATFのノックアウトによって失われることが明らかになった。以上より、BATFは、がん組織内で制御性T細胞がその特徴的なクロマチン構造を構築し、増殖、活性化するために必須であることが解明された。制御性T細胞のみでBATFの発現がノックアウトされるコンディショナルノックアウトマウスの  $Batf^{fl/fl} \text{ Foxp3}^{\text{EGFP-cre-ERT2}}$  マウスを作成して、がん細胞の増殖への影響を検討した。制御性T細胞特異的にBATFがノックアウトされたマウスでは、がんの増殖が著明に低下し、がん組織内で制御性T細胞が十分に活性化して抗腫瘍免疫応答を抑制するにはBATFが必須であることが証明され、制御性T細胞を標的としたがん免疫療法の新たな可能性が示された。

以上の研究成果について Science Immunology 誌にて発表した (PMID: 36206353)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Masuhiro K, Tamiya M, Fujimoto K, Koyama S, Naito Y, Osa A, Hirai T, Suzuki H, Okamoto N, Shiroyama T, Nishino K, Adachi Y, Nii T, Kinugasa-Katayama Y, Kajihara A, Morita T, Imoto S, Uematsu S, Irie T, Okuzaki D, Aoshi T, Takeda Y, Kumagai T, Hirashima T, Kumanogoh A	4. 巻 7
2. 論文標題 Bronchoalveolar lavage fluid reveals factors contributing to the efficacy of PD-1 blockade in lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e157915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.157915	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 Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, Kawazu M, Ueno T, Irie T, Tanji E, Morinaga T, Honobe A, Ohnuma T, Yoshino M, Iwata T, Kawase K, Sasaki K, Hanazawa T, Kochin V, Kawamura T, Matsue H, Hino M, Mano H, Suzuki Y, Nishikawa H, Togashi Y	4. 巻 38
2. 論文標題 PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110331 ~ 110331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110331	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, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 52
2. 論文標題 Regulatory T cell development in the tumor microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202149358	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 eabk0957
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 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 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 Maeda Yuka, Wada Hisashi, Sugiyama Daisuke, Saito Takuro, Irie Takuma, Itahashi Kota, Minoura Kodai, Suzuki Susumu, Kojima Takashi, Kakimi Kazuhiro, Nakajima Jun, Funakoshi Takeru, Iida Shinsuke, Oka Mikio, Shimamura Teppei, Doi Toshihiko, Doki Yuichiro, Nakayama Eiichi, Ueda Ryuzo, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Depletion of central memory CD8+ T cells might impede the antitumor therapeutic effect of Mogamulizumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27574-0	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 Takeuchi Y, Tanegashima T, Sato E, Irie T, Sai A, Itahashi K, Kumagai S, Tada Y, Togashi Y, Koyama S, Akbay EA, Karasaki T, Kataoka K, Funaki S, Shintani Y, Nagatomo I, Kida H, Ishii G, Miyoshi T, Aokage K, Kakimi K, Ogawa S, Okumura M, Eto M, Kumanogoh A, Tsuboi M, Nishikawa H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Highly immunogenic cancer cells require activation of the WNT pathway for immunological escape	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eabc6424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abc6424	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takuma Irie, Itahashi Kota, 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
2. 発表標題 Integrated multiomics profiling identifies the differentiation program of regulatory T cells in human tumors
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 Takuma Irie, Kota Itahashi, Junichiro Yuda, Shogo Kumagai, Tokiyoshi Tanegashima, Yi-Tzu Lin, Sho Watanabe, Yasushi Goto, Jun Suzuki, Keiju Aokage, Masahiro Tsuboi, Yosuke Minami, Genichiro Ishii, Yuichiro Ohe, Wataru Ise, Tomohiro Kurosaki, Yutaka Suzuki, Shohei Koyama, Hiroyoshi Nishikawa1
2. 発表標題 Integrated multiomics profiling identifies the differentiation program of regulatory T cells in human tumors
3. 学会等名 2nd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 莊	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 211
3. 書名 シン・マクロファージ あらゆる疾患を制御する機能的多様性	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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