

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15542

研究課題名（和文）腫瘍局所での制御性T細胞の分化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of regulatory T cell differentiation in the tumor microenvironment

研究代表者

板橋 耕太（Itahashi, Kota）

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：10828990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞は腫瘍微小環境に豊富に浸潤し、有効な抗腫瘍免疫応答を抑制することで、腫瘍の進行を促進することが知られている。腫瘍微小環境におけるCD8陽性T細胞の疲弊状態への分化過程はよく研究されているが、制御性T細胞の分化過程は不明な点が多い。末梢血、正常肺組織、肺がん組織から制御性T細胞を採取して解析を進めることにより、腫瘍局所におけるヒト制御性T細胞の分化過程に寄与する転写因子のコアネットワークを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液、正常組織、がん組織内の制御性T細胞を詳細に解析して得られた結果は、がん組織内の制御性T細胞を標的とする免疫治療開発のみならず、制御性T細胞が発症に関わる自己免疫性疾患の理解などを始めとして、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）：Regulatory T (Treg) cells are required for maintaining self-tolerance and preventing the development of autoimmune diseases. However, in tumor immunity, Treg cells abundantly infiltrate the tumor microenvironment (TME) and promote tumor progression by suppressing effective anti-tumor immune responses. Although the differentiation process of CD8+ T cells toward the exhausted state in the TME has been well investigated, Treg cell differentiation in the TME is still an active area of investigation. Multi-omics analysis of lung tumor-infiltrating Treg cells have clarified the chromatin landscape and the core network of transcription factors that contribute to the differentiation process of human Treg cells in the TME.

研究分野：腫瘍

キーワード：腫瘍免疫 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、がんに対する免疫療法の開発が幅広く進められており、PD-1 阻害薬、CTLA-4 阻害薬、LAG-3 阻害薬などの免疫チェックポイント阻害剤が様々ながん種に対して承認されてきている。抗腫瘍免疫応答は主に CD8 陽性 T 細胞を介した細胞性免疫によって惹起されるが、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。免疫療法の開発によってがん治療は飛躍的に進歩しているものの、いまだに長期に奏効しない症例も多く、効果を予測する精度の高いバイオマーカーの開発や、より効果の高い治療法が開発が期待されている。

ヒトの腫瘍には制御性 T 細胞が多く浸潤しており、腫瘍に対する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。我々の研究室では、腫瘍内の PD-1 陽性制御性 T 細胞が PD-1 阻害剤投与によって活性化され、有効な抗腫瘍免疫を抑制し、PD-1 阻害剤耐性や急性増悪につながることを明らかにしてきた。肺がん、胃がん、悪性黒色腫の臨床検体を用いた検討から、腫瘍内の PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞と PD-1 陽性 Treg 細胞のバランスが、PD-1 阻害剤の効果を高精度に予測するマーカーになることが分かってきた。CD8 陽性 T 細胞に関しては、転写因子 TOX がエピゲノムを腫瘍特異的なプロファイルに再プログラムし、CD8 陽性 T 細胞を腫瘍局所で疲弊状態に分化させることや、PD-1 の発現を誘導することが報告されている。一方で、腫瘍浸潤制御性 T 細胞の重要性は明らかになってきたものの、制御性 T 細胞が腫瘍局所で活性化表現型に分化するメカニズムは不明な点が多かった。腫瘍から採取できる制御性 T 細胞の数が非常に少なく、十分な解析ができなかったことも一因に挙げられる。そこでまず研究代表者は、ヒトの肺がん組織や正常肺組織、末梢血から十分な制御性 T 細胞を採取して、ATAC シーケンスと RNA シーケンス、シングルセルシーケンスを実施する実験系を確立した。これらの得られたシーケンスデータの解析から、転写因子の BATF が制御性 T 細胞のエピゲノムを腫瘍特異的なプロファイルに改変する重要な因子である可能性を見出した。本研究では現在までの研究をさらに発展させ、腫瘍浸潤制御性 T 細胞における BATF の機能をマウスモデルにて明らかにするために開始した。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍浸潤制御性 T 細胞における BATF の機能を、マウスモデルを用いて解析することによって、腫瘍における制御性 T 細胞の活性化のメカニズムを明らかにし、免疫療法への抵抗性メカニズムの解明や新規免疫療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

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 細胞のナイーブあるいはエフェクター分画を採取し、ATAC シーケンスと RNA シーケンスを用いて、各々の T 細胞のクロマチンアクセシビリティと遺伝子発現の詳細な解析を実施した。肺がん組織内の制御性 T 細胞は、がん組織内の他の T 細胞や肺がん患者の血液中の制御性 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が明らかになった。これらのデータから、がんの微小環境に適応するために、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確認された。また、転写因子の BATF や IRF4、NF- κ B、NR4A などとその分化に関わっていることが示唆された。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。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ることが明らかになった。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ところ、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、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。これらのヒトの臨床検体を用いた解析を基に、BATF ノックアウトのマウスを用いた担癌マウスモデルにて、BATF の機能解析を開始した。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分かった。さらに、*Batf^{f1/f1} Foxp3^{EGFP-cre-ERT2}* マウスを作成し、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、大腸がん (MC38) や肺がん (3LL) の細胞株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ためには、BATF が必須であることが明らかになった。

4. 研究成果

本研究では、微量ながん組織を用いた 1 細胞レベルの解析手法を開発した。本手法を用いて、血液や正常肺組織、非小細胞肺がんの組織に存在する微量な制御性 T 細胞の網羅的解析を行い、がん組織に存在する制御性 T 細胞が特徴的なクロマチン構造と遺伝子発現制御機構を有してい

ることを見出した。さらに、転写因子の BATF が、クロマチン構造をリモデリングする機能を介して、がん組織における制御性 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て報告した。血液、正常組織、がん組織内の制御性 T 細胞を詳細に解析して得られた結果は、がん組織内の制御性 T 細胞を標的とする免疫治療開発のみならず、制御性 T 細胞が発症に関わる自己免疫性疾患の理解などを始めとして、様々な医学研究に応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------|
| 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 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 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|