

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15500

研究課題名（和文）疲弊化CD8 + T細胞における転写因子JunBの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role for transcription factor JunB in exhausted CD8 + T cells

研究代表者

平良 直幸（Taira, Naoyuki）

沖縄科学技術大学院大学・統合オープンシステムユニット・ポストドクトラルスカラー

研究者番号：40813621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がんの免疫療法においてCD8T細胞の疲弊化は重大な課題である。我々はエフェクター細胞生存にJunBが必須であることを見出しているが、疲弊化での機能はわかっていない。そこで疲弊化とJunBに着目して研究を行った。急性感染時と腫瘍内浸潤時のCD8T細胞のJunB発現は後者で高発現していた。腫瘍周辺リンパ節内の前活性化状態CD8T細胞はJunBを若干発現していたが、腫瘍内に浸潤すると高発現していた。腫瘍組織内のCD8T細胞は前駆疲弊細胞と終末疲弊化細胞からなるが、前駆疲弊細胞のJunB発現低下は終末疲弊化細胞に分化する結果を示した。これはJunB発現の維持が前駆細胞で重要であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がんの三大療法に次ぐ治療として免疫療法に注目が集まっている。しかしながら、免疫療法において解決すべき課題としてエフェクター機能の低下を伴うT細胞の疲弊化が知られている。この疲弊化を防ぐため精力的に世界中で研究が行われているが、未だ決定的な解決方法は見つかっていない。本研究で着目したJunBはエフェクター細胞の生存に関わるだけでなく、疲弊化を抑制する可能性が見出された。この研究結果を元にさらなる詳細なメカニズムが判明すれば、この疲弊化を制御するようなメカニズムが明らかになると考えている。その結果、がんの免疫療法のさらなる進展が期待でき、がんで苦しむ人々を救う治療法の確立に貢献できるだろう。

研究成果の概要（英文）：Exhaustion of CD8+ T cells is a critical issue in cancer immunotherapy. We have found that JunB is essential for effector cell survival, but its function in exhaustion is not known. Therefore, we focused our study on exhaustion and JunB. JunB expression on effector CD8+ T cells during tumor invasion was higher than on effector CD8+ T cells in the acute infection model. CD8+ T cells in the pre-activated state in the lymph nodes surrounding the tumor expressed little JunB but expressed high levels of JunB when infiltrating the tumor. Effector CD8+ T cells in the tumor tissue consisted of progenitor exhausted cells and terminal exhausted cells, and decreased JunB expression in progenitor exhausted cells resulted in their differentiation into terminal exhausted cells. This suggests that maintenance of JunB expression is important in progenitor cells.

研究分野：免疫学

キーワード：JunB Exhausted CD8+ T cells T_{pex} T_{ex}

1. 研究開始当初の背景

がんの三大療法に次ぐ治療法として、近年免疫療法が注目されている。免疫療法が奏効するにはがんを排除するエフェクターCD8⁺T細胞の疲弊化を防ぐことが重要であることは周知の事実である。この疲弊化のメカニズムは抗原刺激が繰り返し起こることによって生じると考えられており、それに伴い発現するPD-1やTim-3等の細胞表面マーカーやTox等の転写因子が関与していることが明らかとなっているが、未だにこの疲弊化を完全にコントロールする方法は報告されていない。申請者はJunファミリーであるc-Junの過剰発現が疲弊化を解除し、抗腫瘍効果を亢進する(Lynn et al., 2019)という報告から、同じJunファミリーであるJunBも疲弊化に関与するのではないかと仮説を立て、繰り返し抗原刺激を行うin vitroモデルで予備試験を行った。その結果、JunB欠損CD8⁺T細胞は繰り返し抗原刺激を行うと野生型のCD8⁺T細胞よりも少ない抗原刺激回数でPD-1やTim-3といった細胞表面たんぱく質の発現増加が確認された。さらに興味深いことに野生型CD8⁺T細胞は繰り返し抗原刺激が起こるとJunBの発現低下が確認された。これらの結果からJunBの発現とエフェクターCD8⁺T細胞の疲弊化が関与しているのではないかと推察し研究を開始した。

2. 研究の目的

以上の背景から、JunBとCD8⁺T細胞の疲弊化に関する関係性に独自に着目し、JunBがエフェクターCD8⁺T細胞の疲弊化にどのようにかわり、どのようなメカニズムでそれらを制御するのかを明らかにすることを目的とした。ここで得られるデータはJunBがエフェクター細胞の疲弊化に関わるという重要な知見、さらにそこから発展する制御メカニズムの開発などが、がんの免疫療法において非常に重要な役割を果たすことが期待される。

3. 研究の方法

疲弊化におけるJunBの発現低下を確認するために、まずJunBの発現比較をOVA (Ovalbumine:鶏卵白構成タンパク質)抗原発現リステリアによる急性感染モデルとOVA抗原を発現しているB16 (マウスメラノーマ細胞: OVA-B16)腫瘍モデルにOT-1 naive CD8⁺T細胞移入することでエフェクターCD8⁺T細胞を回収した。具体的には急性感染モデルでは感染5日後(OVA-CD8⁺T細胞)、OVA-B16腫瘍モデルでは十分に腫瘍が形成された後にOT-1 naive CD8⁺T細胞を移入し7日目および21日目に腫瘍組織を摘出し、そこに浸潤しているエフェクターCD8⁺T細胞(Tumor infiltrating lymphocyte:TIL-CD8⁺T細胞)のJunBの発現を解析した。次に腫瘍組織に浸潤する前にエフェクターCD8⁺T細胞は腫瘍排出リンパ節(Tumor draining lymph node:TdLN)で前活性化されることが知られているので、TIL-CD8⁺T細胞とTdLN中のCD8⁺T細胞(TdLN-CD8⁺T細胞)のJunBの発現を比較した。また、JunB欠損の影響を確認するためにJunB野生型あるいは欠失型のOT-1 naive CD8⁺T細胞をOVA-B16腫瘍モデルに移入し、腫瘍組織の大きさを経時的に測定した。また移植後20日目にマウスからTIL-CD8⁺T細胞とTdLN-CD8⁺T細胞の細胞数や表現形質を比較した。

腫瘍組織内におけるJunBの発現低下の影響をex-vivoで確認するためにdTAGシステムを利用して作成したdTAG-JunB-OT-1マウスから分離したnaive CD8⁺T細胞をB16-OVA腫瘍マウスに移入し14日後に腫瘍を回収しフローサイトメトリーを用いてLY108とTim-3で共染色した前駆疲弊細胞(LY108⁺Tim-3⁺細胞:Tpex)および終末分化疲弊細胞(LY108⁻Tim-3⁺細胞:Tex)を回収した。その際に別個体のB16-OVA腫瘍マウスの腫瘍中から樹状細胞を分離し、OVAペプチドを取り込ませた後に樹上細胞をTpexあるいはTexと5日間共培養することで腫瘍内環境を再現した。その際にdTAGを添加することで、JunBの発現低下を誘導しどのような変化が起こるのかを検証した。

4. 研究成果

疲弊化とJunBの関連性について、当初は疲弊化しているエフェクターCD8⁺T細胞のJunBの発現は低下していると推察していたので、急性感染モデルと腫瘍周辺に存在するエフェクターCD8⁺T細胞間でJunBの発現比較を行った。予想に反して、急性感染モデルのエフェクターCD8⁺T細胞よりも、腫瘍内に浸潤している疲弊化が誘導されていると考えられるTIL-CD8⁺T細胞の方がJunBを高発現していた(図1)。近年、TdLN

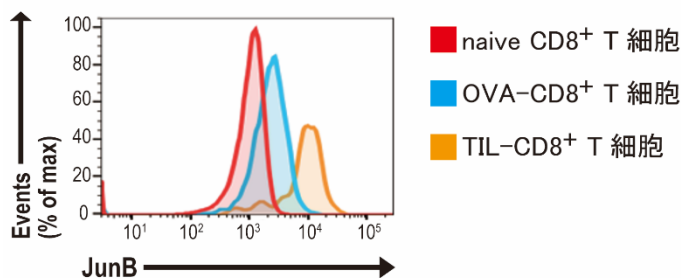


図1 エフェクターCD8⁺T細胞におけるJunBの発現

に存在する前活性化されたナイーブCD8⁺T細胞は幹細胞

様の形質を獲得し、そこから腫瘍組織へ浸潤しエフェクター機能を獲得するためさらに活性化するというモデルが提唱された(Prokhnevska et al., 2023)。そこで TdLN-CD8⁺T 細胞と TIL-CD8⁺T 細胞の JunB の発現を比較した。その結果、TdLN-CD8⁺T 細胞よりも TIL-CD8⁺T 細胞の方が JunB の発現が高い結果となった(図 2-1)。この結果はエフェクターCD8⁺T 細胞の疲弊がより亢進していると考えられる 21 日目においても同様の結果となった(図 2-2)。このことから、TdLN 中よりも TIL 中におけるエフェクター CD8⁺T 細胞において JunB は重要な働きがあることが示唆された。

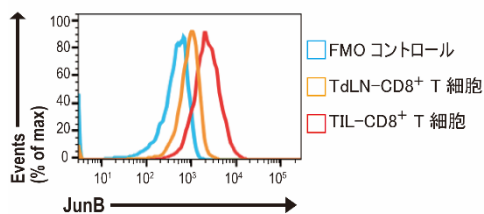


図 2-1 腫瘍排出リンパ節および腫瘍内浸潤した CD8⁺T 細胞における JunB の発現

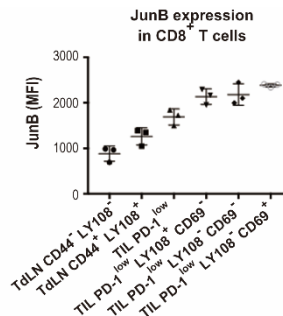


図 2-2 腫瘍排出リンパ節および腫瘍内浸潤した CD8⁺T 細胞における JunB の発現 (day21)

JunB が欠失した際に腫瘍組織の排除が起こるのかを確認した結果、JunB を欠失すると腫瘍組織の成長を阻害できなかった(図 3-1)。JunB が急性感染モデルにおけるエフェクターCD8⁺T 細胞の生存に必須であることを我々は以前の研究で報告しており、この結果は予期できたことだが興味深いことに JunB 欠失 naïve CD8⁺T 細胞を移植すると、TIL 中ではほとんど移植した細胞は確認できないが TdLN 中において移植した細胞は野生型と同程度存在していた(図 3-2)。TdLN における JunB 欠失の影響を明らかにするために細胞増殖の指標である Ki-67 の発現やアポトーシスに関連するカスパーゼ 3 の活性化を野生型と比較したが、両群間で大きな違いは確認できなかった。TdLN 内のメモリー様の形質をもつ初期活性化状態の CD8⁺T 細胞は CD44⁺LY108⁺であることが報告されている(Beltra et al., 2020; Kurtulus et al., 2019; Huang et al., 2022)ことから両群間で比較したところ大きな違いは見られなかった。その他の表現型(サイトカイン産生能や CD62L, CD122, CD127 等)も野生型と JunB を欠失した TdLN 中の CD8⁺T 細胞で大きな違いはなかった。

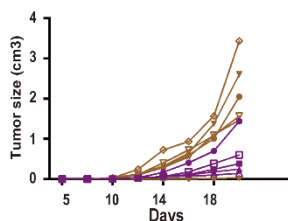


図 3-1 腫瘍組織成長阻害における JunB 欠失の影響

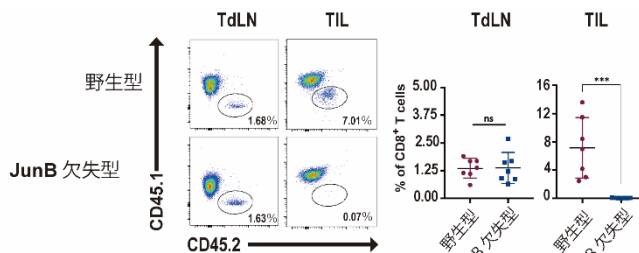


図 3-2 腫瘍排出リンパ節および腫瘍組織における移入した細胞数

これらの結果から、JunB は初期活性化状態のエフェクターCD8⁺T 細胞がいる TdLN 中で若干発現し、TIL 中に浸潤するにしたがって JunB の発現がより増加していくと考えられた。TIL 中に存在するエフェクターCD8⁺T 細胞は Tpex と Tex からなり、Tpex が Tex になることで、腫瘍免疫反応が低下すると考えられており、Tpex を維持することが重要であることが示唆されている(Siddiqui et al., 2019)。そこで申請者は Tpex と Tex における JunB の働きが異なる可能性があるのではないかと考えた。しかしながら、JunB が欠失した状態で細胞を移入すると細胞がほとんど残らないことから、その表現型を解析するために dTAG システムを利用して ex-vivo で JunB の発現を低下させるモデルを構築した。その結果、Tpex は JunB の発現が維持されているとある程度の集団はその形質が維持されていたが、着目すべきは JunB の発現が低下すると Tpex だった細胞は Tex に分化していることが確認された(図 4)。この観察結果は JunB の発現が Tpex 細胞形質の維持に重要であることを示唆していると考えられた。そこで分化に関わる転写因子のたんぱく質発現が変化しているのではないかと推測し、TCF-1 や TOX, Eomes、T-bet 等の発現を JunB 発現が低下した状態で比較してみたが、大きな違いは見られなかった。現在はメカニズム制御を明らかにするために ATAC 解析を利用したクロマチン構造の変化を検証しており、そこから判明した候補遺伝子の発現変化を過剰発現

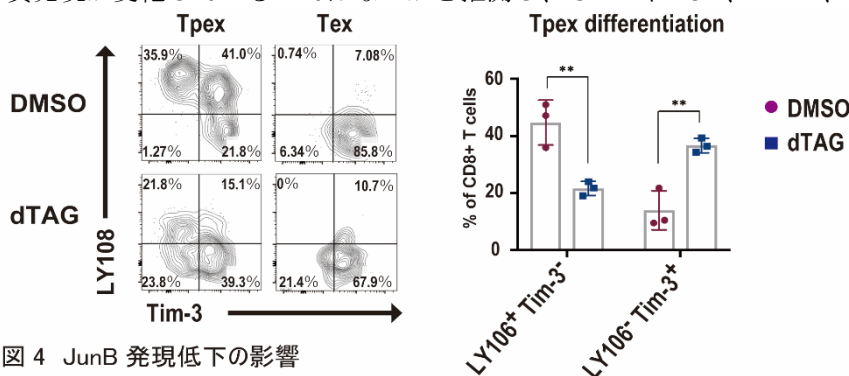


図 4 JunB 発現低下の影響

や KO 実験等を行うことでその制御メカニズムを確認する予定である。

<参考文献>

- Beltra, J. C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M. S., Kurachi, M., Giles, J. R., Chen, Z., Casella, V., Ngiow, S. F., Khan, O., Huang, Y. J., Yan, P., Nzingha, K., Xu, W., Amaravadi, R. K., Xu, X., Karakousis, G. C., Mitchell, T. C., Schuchter, L. M., Huang, A. C., & Wherry, E. J. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8(+) T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*, *52*(5), 825-841 e828. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.014>
- Huang, Q., Wu, X., Wang, Z., Chen, X., Wang, L., Lu, Y., Xiong, D., Liu, Q., Tian, Y., Lin, H., Guo, J., Wen, S., Dong, W., Yang, X., Yuan, Y., Yue, Z., Lei, S., Wu, Q., Ran, L., . . . Ye, L. (2022). The primordial differentiation of tumor-specific memory CD8(+) T cells as bona fide responders to PD-1/PD-L1 blockade in draining lymph nodes. *Cell*, *185*(22), 4049-4066 e4025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.020>
- Kurtulus, S., Madi, A., Escobar, G., Klapholz, M., Nyman, J., Christian, E., Pawlak, M., Dionne, D., Xia, J., Rozenblatt-Rosen, O., Kuchroo, V. K., Regev, A., & Anderson, A. C. (2019). Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1(-)CD8(+) Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity*, *50*(1), 181-194 e186. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.014>
- Lynn, R. C., Weber, E. W., Sotillo, E., Gennert, D., Xu, P., Good, Z., Anbunathan, H., Lattin, J., Jones, R., Tieu, V., Nagaraja, S., Granja, J., de Bourcy, C. F. A., Majzner, R., Satpathy, A. T., Quake, S. R., Monje, M., Chang, H. Y., & Mackall, C. L. (2019). c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature*, *576*(7786), 293-300. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1805-z>
- Prokhnevska, N., Cardenas, M. A., Valanparambil, R. M., Sobierajska, E., Barwick, B. G., Jansen, C., Reyes Moon, A., Gregorova, P., delBalzo, L., Greenwald, R., Bilen, M. A., Alemozaffar, M., Joshi, S., Cimmino, C., Larsen, C., Master, V., Sanda, M., & Kissick, H. (2023). CD8(+) T cell activation in cancer comprises an initial activation phase in lymph nodes followed by effector differentiation within the tumor. *Immunity*, *56*(1), 107-124 e105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.12.002>
- Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S. A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S. J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., Luther, S. A., Speiser, D. E., & Held, W. (2019). Intratumoral Tcf1(+)PD-1(+)CD8(+) T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity*, *50*(1), 195-211 e110. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.021>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 平良直幸, Shukla Sarkar、石川裕規
2. 発表標題 AP-1転写因子JunBによる疲弊化エフェクターCD8T細胞制御の可能性
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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