

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16531

研究課題名（和文）腫瘍反応性レジデントメモリーT細胞の誘導とその抗腫瘍効果

研究課題名（英文）Induction of tumor-reactive resident memory T cells and their antitumor effects

研究代表者

渡部 晃大（Watanabe, Akihiro）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40866034

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）：本研究では、食道癌におけるTRM細胞の役割を明らかにするため、マウスモデルとヒト食道癌サンプルを用いた解析を行った。マウスモデルの作成には難渋したが、ヒトサンプルの解析では、TRM細胞の動態把握と自動検出システムのアノテーションが進んでいる。また、DL-ICであるCu-Cytoは細胞同定において良好な性能を示した。今後、ヒトサンプルの解析結果をもとに考察を深め、Cu-Cytoの性能向上により、DL-ICがプレジジョンオンコロジーの実現に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食道癌におけるTRM細胞の役割解明と、DL-ICツールであるCu-Cytoの性能評価により、癌免疫の基礎研究とAIを用いた病理学的診断の発展に寄与する知見を提供した。これらの知見は、食道癌の診断・治療の進歩とプレジジョンオンコロジーの実現に貢献することが期待され、学術的にも社会的にも大きな意義を持つ。今後のさらなる研究により、食道癌患者のQOL向上と医療の質の向上が期待される。マウス研究はさらなる解析と結果が待たれるところである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the role of tissue-resident memory T (TRM) cells in esophageal cancer by analyzing both mouse models and human esophageal cancer samples. Although difficulties were encountered in establishing the mouse models, significant progress was made in the analysis of human samples, including the characterization of TRM cell dynamics and the successful annotation of an automatic TRM cell detection system. Furthermore, we evaluated the performance of Cu-Cyto, a deep learning-based image cytometry (DL-IC) tool, in cell identification. Cu-Cyto demonstrated excellent performance in identifying cells in tumor tissue slide images with immunohistochemical staining. The findings obtained thus far suggest the potential role of TRM cells in esophageal cancer and their clinical application. Further research based on human sample analysis and the enhancement of the performance will pave the way for advancements in the diagnosis and treatment of esophageal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：NKT細胞 樹状細胞ワクチン 電気穿孔法 組織滞在型メモリー細胞 腫瘍細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん免疫療法の分野で免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) が大きな注目を集めている。これらの薬剤は、がん細胞が免疫系から逃れるために利用する機構を阻害することで、体内の免疫応答を活性化し、がん細胞を攻撃するように働きかける。中でも、腫瘍微小環境において抗腫瘍免疫応答の中心的役割を担う CD8<sup>+</sup>T 細胞が、ICI の効果発現に重要であることが明らかになってきた。

特に注目されているのが、組織滞在型メモリーT細胞 (T<sub>RM</sub>) だ。T<sub>RM</sub> は、がん組織内に長期間とどまり、高い腫瘍活性と ICI への反応性を示すことが報告されている。しかしながら、T<sub>RM</sub> の予後との関連性、体内での動態、および分化機構については、まだ不明な点が多く存在している。

最近の研究で、NKT 細胞が T<sub>RM</sub> の誘導に貢献していることが示唆された。NKT 細胞は、がん免疫において重要な役割を果たす細胞種の一つであり、ヒトにおいても T<sub>RM</sub> の指標として機能していると考えられる。NKT 細胞と T<sub>RM</sub> の関連性を明らかにすることで、T<sub>RM</sub> の分化メカニズムの解明が進み、新たながん治療法の開発につながる可能性がある。

今後、T<sub>RM</sub> を中心とした抗腫瘍免疫応答のメカニズムを更に解明していくことで、ICI をはじめとするがん免疫療法の効果を最大限に引き出し、より多くの患者に恩恵をもたらすことが期待される。同時に、T<sub>RM</sub> の誘導に関与する NKT 細胞などの免疫細胞の役割を明らかにすることで、新たな治療ターゲットの同定や、より効果的ながん免疫療法の開発が可能になると考えられる。がん免疫療法の発展には、基礎研究と臨床応用の両面からのアプローチが不可欠であり、今後のさらなる研究の進展が望まれる。

## 2. 研究の目的

我々は、がん免疫療法の新たなアプローチとして、樹状細胞を用いた NKT 細胞活性化ワクチンベクターの開発に取り組んできた。この方法では、まず腫瘍細胞を溶解して得られた腫瘍溶解物 (tumor cell lysate ; TCL) を、電気穿孔法を用いて樹状細胞に全長タンパクの形で導入する。次に、NKT 細胞を活性化させる糖脂質である  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) を樹状細胞に付加することで、TCL と  $\alpha$ -GalCer の複合体を形成させる。この複合体を持つ樹状細胞は、NKT 細胞を効果的に活性化するワクチンベクター (TCL-EP-GalDC) として機能する (図 1)。

マウスを用いた腫瘍予防モデルにおいて、TCL-EP-GalDC の投与が腫瘍の増殖を抑制することが確認された。さらに、このワクチンベクターの投与により、腫瘍特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞と組織滞在型メモリーT細胞 (T<sub>RM</sub>) がマウスの表皮に誘導されることが明らかとなった。T<sub>RM</sub> は、がん組織内に長期間とどまり、高い腫瘍活性を示すことが知られており、がん免疫療法の重要なターゲットとして注目されている。

そこで本研究では、以下の2点を明らかにすることを目的として研究を行った。

1. TCL-EP-GalDC の投与により、腫瘍内に TRM 細胞が誘導されるのか。
2. 誘導された TRM 細胞は、有効な抗腫瘍効果を持つのか。

これらの点を解明することで、我々が開発した NKT 細胞活性化ワクチンベクターの抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにし、より効果的ながん免疫療法の開発に貢献することを目指している。具体的には、マウスの腫瘍モデルを用いて、TCL-EP-GalDC の投与後の腫瘍内の TRM 細胞の動態を解析し、その抗腫瘍効果を評価する。さらに、誘導された  $T_{RM}$  細胞の機能的特性を明らかにするために、腫瘍内のサイトカイン産生や細胞傷害活性などを解析する予定である。

本研究の成果は、NKT 細胞を介した TRM 細胞の誘導という新たながん免疫療法の可能性を示すものであり、将来的な臨床応用に向けた重要な知見となることが期待される。

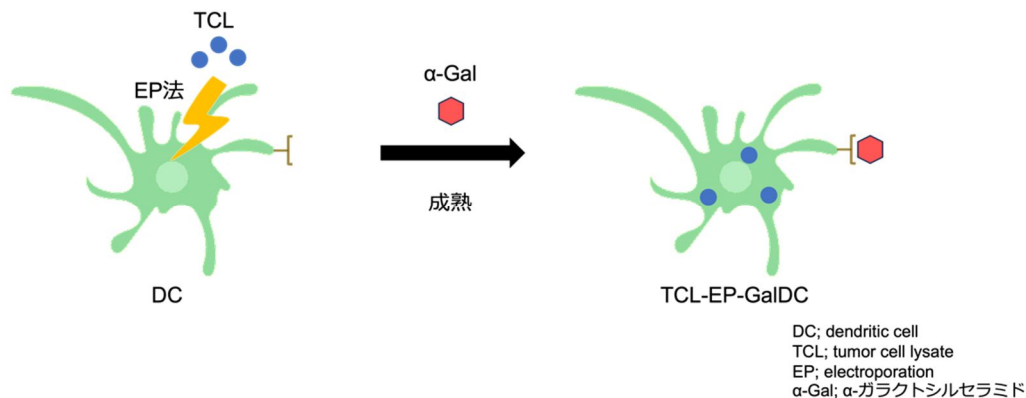


図 1 .NKT 細胞活性化樹状細胞ワクチンの開発

マウス骨髄由来樹状細胞に電気穿孔法を用いて TCL を導入した。そこに  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを付加することにより NKT 活性化樹状細胞ワクチン (TCL-EP-GalDC) を作成した。

### 3 . 研究の方法

研究 1. TCL-EP-DC/Gal 治療(腫瘍細胞ライセートを用いた NKT 細胞活性化ワクチン)の治療モデルの開発

食道癌誘発マウスモデルにおける腫瘍内  $T_{RM}$  細胞の 誘導食道癌誘発マウスモデルである、14-ニトロキノリン 1-オキシドを C57BL/6 マウスに経口投与し、mEC25 細胞株樹立を行い、腫瘍溶解物の作成を予定している。現在は、4-NQO 経口投与を行い、発癌と細胞株樹立を目指す。

研究 2. TCL-EP-DC/Gal による腫瘍内  $T_{RM}$  細胞の動態の解析 TCL-EP-DC/Gal で治療を行ったモデルを基盤として腫瘍浸潤リンパ球の動態解析を行う。

治療後の腫瘍内  $T_{RM}$  細胞の TCR レパトア解析を行い、もともと腫瘍内に存在した T 細胞由来なのか、TCL-EP-DC/Gal の治療によって、外部から流入してきたものなのかを確認する。また、FTY720 の投与(リンパ球遊走阻害作用をもつ薬剤)で、外部からリンパ球が可及的に流入しない状況を作成し、腫瘍浸潤  $T_{RM}$  細胞を解析する。

研究 3. 術前化学療法を施行したヒト食道癌検体における腫瘍内  $T_{RM}$  細胞と NKT 細胞の解析を行う。

術前化学療法後、食道切除術を行った患者の術後検体を用いて、深層学習アルゴリズムを用いた病理診断を行う。腫瘍内  $T_{RM}$  細胞、NKT 細胞の評価を行う。多重免疫染色の方法は既に確立しており、これを用いて腫瘍内  $T_{RM}$  細胞と NKT 細胞の数や局在、 $T_{RM}$  細胞と NKT 細胞の腫瘍内での距離等を測定し、術前化学療法の治療効果との相関を評価している。

#### 4 . 研究成果

本研究の目的は、食道癌における  $T_{RM}$  細胞の役割を明らかにすることである。この目的を達成するために、マウスモデルの作成とヒト食道癌サンプルの解析を行った。

マウスモデルの作成では、当初、14-ニトロキノリン 1-オキシドを C57BL/6 マウスに経口投与し、mEC25 細胞株の樹立を目指したが、非常に困難な状況であった。そのため、代替として MC38-OVA モデルと B16-F10-OVA モデルを使用することとした。また、エレクトロポレーションに関連した全蛋白導入システムが機能しなくなったため、マクロピノサイトーシスを用いたタンパク導入の条件設定を行った。結果として、食道癌誘発モデルの確立には難渋したが、代替モデルを用いることで研究を継続することができた。

ヒト食道癌サンプルの解析では、深層学習に基づくイメージサイトメトリー (DL-IC) の一つである Cu-Cyto を用いて、細胞同定の性能評価を行った。Cu-Cyto はビットパターンカーネルフィルタリングアルゴリズムを備えた DL-IC であり、免疫組織化学染色 (IHC) を施した腫瘍組織スライド画像での細胞同定性能を評価するのに適している。解析の結果、CD8-CD103 の二重染色による面染色の条件設定と食道癌内の  $T_{RM}$  細胞の動態把握がほぼ完了し、 $T_{RM}$  細胞の自動検出システムのアノテーションも成功した。Cu-Cyto の性能評価では、学習の初期段階で免疫染色された  $CD8^{+}T$  細胞の F1 スコアが他の細胞よりも高く、トレーニングとバリデーションの進行に伴い、すべての細胞の F1 スコアが改善した。学習の最終段階では、腺癌細胞、リンパ球、 $CD8^{+}T$  細胞の F1 スコアはそれぞれ 0.589、0.889、0.911 と良好な結果が得られた。このことから、IHC が学習効率を高めることが明らかになり、Cu-Cyto が細胞同定において優れた性能を示すことが確認された。

研究期間の制約により解析が不十分な部分があるものの、現在までに得られた知見は、食道癌における  $T_{RM}$  細胞の役割や臨床応用の可能性を示唆するものである。マウスモデルでの研究再開とヒトサンプルの解析結果をもとに、さらなる考察を深めていくことが重要である。また、Cu-Cyto の性能は継続的な学習によってさらに向上することが期待され、DL-IC がプレジジョンオンコロジーの実現に貢献することが示唆された。

今後は、マウスモデルとヒトサンプルの両面から、食道癌における  $T_{RM}$  細胞の役割をより詳細に解明していく必要がある。また、DL-IC の性能向上と臨床応用に向けた研究を進めることで、食道癌の診断および治療の発展に寄与す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 Abe T, Yamashita K, Nagasaka T, Fujita M, Agawa K, Ando M, Mukoyama T, Yamada K, Miyake S, Saito M, Sawada R, Hasegawa H, Matsuda T, Kato T, Harada H, Urakawa N, Goto H, Kanaji S, Yanagimoto H, Oshikiri T, Ajiki T, Fukumoto T, Kakeji Y	4. 巻 43
2. 論文標題 Deep Learning-based Image Cytometry Using a Bit-pattern Kernel-filtering Algorithm to Avoid Multi-counted Cell Determination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3755 ~ 3761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16560	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 Yamada K, Saito M, Ando M, Abe T, Mukoyama T, Agawa K, Watanabe A, Takamura S, Fujita M, Urakawa N, Hasegawa H, Kanaji S, Matsuda T, Oshikiri T, Kakeji Y, Yamashita K	4. 巻 12
2. 論文標題 Reduced Number and Immune Dysfunction of CD4+ T Cells in Obesity Accelerate Colorectal Cancer Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010086	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
---------	---------