

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19444

研究課題名（和文）メモリーT細胞の疲弊化の分子機構の解明とそのリプログラム法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of memory T cell exhaustion and development of its reprogramming method

研究代表者

吉村 昭彦（Yoshimura, Akihiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：90182815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：記憶T細胞は腫瘍免疫で中心的な役割を担っているが、腫瘍環境の中でT細胞は疲弊化し十分な抗腫瘍効果を発揮できない。我々はT細胞疲弊の中心的な役割を担う転写因子NR4aファミリーを発見した。本研究では遺伝子改変マウスと単一細胞RNAシーケンシング法を活用してNR4aがT細胞メモリー分化にどのような影響を与えるのか、またNR4aを欠損することで疲弊を解除し若いメモリーT細胞へリプログラム可能かを検証した。その結果NR4aの欠損により疲弊が抑制されるばかりでなくT細胞が若いメモリーに転換する可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であったT細胞疲弊の分子機構の一端がNR4aを中心に初めて明らかにされた。さらにNR4aを阻害することで疲弊を解除するだけでなく、若いメモリーT細胞に転換できることを示したことは、T細胞分化の基礎研究のみならず、NR4aが抗腫瘍免疫の強力な標的分子になりうることを示せた意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Memory T cells play a central role in tumor immunity, but in the tumor environment T cells become exhausted and fail to exert sufficient antitumor effects. We have identified the NR4a family of transcription factors that play a central role in T cell exhaustion. In this study, we used genetically engineered mice and single-cell RNA sequencing to examine how NR4a affects T cell memory differentiation and whether deletion of NR4a can unexhaust T cells and reprogram them to young memory T cells. The results showed that NR4a deficiency not only suppresses exhaustion but also converts T cells to young memory cells.

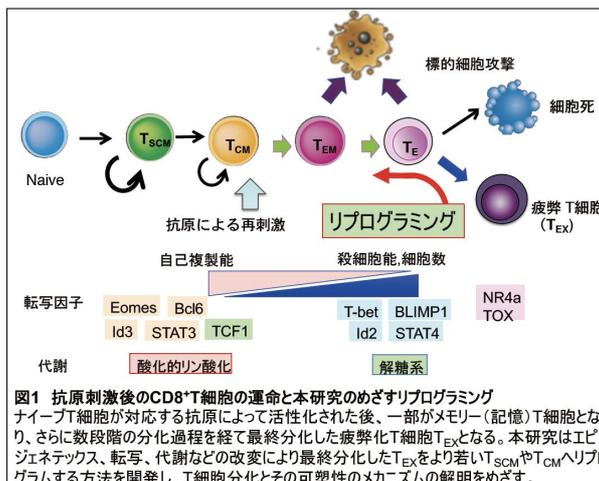
研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍免疫 T細胞 免疫記憶 疲弊 転写因子 CAR-T

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍免疫療法はがん治療の第4の柱として確立されつつあるが、腫瘍免疫の主体である細胞傷害性 CD8⁺T 細胞はがんなどの慢性的な炎症状態では持続的な刺激や腫瘍微小環境因子によって疲弊化(exhaustion)し抗腫瘍効果が減弱する。これらの T 細胞疲弊のメカニズムを解明しこれを回避し、さらにより抗腫瘍活性の高い T 細胞へ「脱分化」させることができれば、全く新しい抗腫瘍免疫療法を開発できる可能性がある(図1参照)。

末梢での CD8 陽性 T 細胞分化過程は、これまでに詳しく解析されてきた。抗原に未感作のナイーブ T 細胞が樹状細胞などの抗原提示細胞から抗原刺激を受けると、抗原特異的な受容体(TCR)を持つ T 細胞が活性化されて増殖し、エフェクター T 細胞(T_E)となり細胞傷害機能を発揮する。抗原排除後、その多くは死滅するが、一部はメモリー T 細胞として残存し、免疫記憶の中心的役割を担う。メモリー T 細胞にはヒエラルキーが存在し、セントラルメモリー T 細胞(T_{CM})、エフェクターメモリー T 細胞(T_{EM})、エフェクター T 細胞(T_E)などの亜集団が存在する(図1)。ステムセルメモリー T 細胞(stem cell memory T cell: T_{SCM})は、ナイーブ T 細胞と T_{CM} の間に位置し、ナイーブマーカー Tcf1 と活性化マーカーを有するメモリー T 細胞で、自己複製能・長期生存能・幹細胞性を有し、抗原刺激によって T_{CM}、T_{EM}、T_E に分化する。T_{EM} および T_E 細胞は、T_{SCM} および T_{CM} に比べて標的細胞の殺細胞能力は高くなるが、腫瘍環境では、持続的な抗原刺激によって死滅するか疲弊状態に陥る。疲弊化 T 細胞(T_{EX})は、PD-1, CTLA4, Tim3, Lag3 などの抑制性受容体や SOCS1 などのシグナル抑制分子、p16 のようなサイクリンキナーゼ阻害分子を強く発現するために、抗原刺激しても増殖せずサイトカイン産生も低く、不応答の状態である。T_{EX} は T_{EM} や T_E から生まれると考えられる。我々は Rao 博士との共同研究により、NR4a が疲弊化の中心となる転写因子であることが示した(*Nature* 567: 530-534, 2019)。NR4a は以前、我々によって制御性 T 細胞(Treg)の発生と維持に必須の因子として単離された遺伝子である (*Nature Immunol.* 14: 230-237, 2013., *J.Exp.Med.* 212: 1623-1640, 2015)。本研究では CD8⁺T 細胞特異的 NR4a1/2 欠損マウス及び NR4a ノックダウンヒト CAR-T 細胞を用いて NR4a の阻害によってメモリー T 細胞の分化がどのような影響を受けるか、また抗腫瘍活性にどのような影響を与えるかを検証した。



2. 研究の目的

本研究は、メモリー T 細胞の最終分化段階である「疲弊」(exhaustion)を司る転写因子 NR4a に着目し、NR4a を阻害することで疲弊を解除しさらに Tcf1 陽性の若いメモリー T 細胞分化転換(リプログラミング)できるかを検証する。またヒト T 細胞において NR4a 阻害により強力な抗腫瘍効果を引き出す方法を開発するものである。

3. 研究の方法

CD8⁺T 細胞特異的 NR4a1/2 欠損マウスは NR4a1^{fllox/fllox}, NR4a2^{fllox/fllox} マウスと CD8-Cre を発現するマウスを交配して樹立した。また一部マウスは抗原特異的 CD8⁺T 細胞を得るために、卵白アルブミン(OVA)特異的 OT-I トランスジェニックマウスと交配した。CD8⁺T 細胞は脾臓、リンパ節、腫瘍から FACS により単離した。

scRNA-seq 解析のために腫瘍浸潤細胞より抗 CD45 抗体ビーズで血球系細胞を選別した後に 10×Chromium コントローラを用いて約 10,000 個の細胞を取得した。Chromium Next GEM Single

Cell 5 Reagent Kits v2 (10×Genomics) を用いてハッシュタグ scRNA-seq ライブラリーを調製した後に、Illumina NovaSeq S4 シーケンサーで配列決定した。詳細は発表論文 1 に記載。

(2) *NR4a* 欠損ヒト CAR-T 細胞の作成；末梢血単核細胞 (PBMC) は、末梢血から密度勾配遠心分離法を用いて分離した。Pan T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec 社)を用いて、PBMC からヒト T 細胞を分離した。分離した T 細胞を 5 %AB 血清添加 AIM-V 培地中で、CD3/CD28 抗体ビーズおよび IL-2 (10 ng/mL) により 14 日間刺激培養した。T 細胞活性化の 24 時間後ウイルススピニング法により、抗上皮成長因子受容体 2 型(HER2) CAR-遺伝子を搭載した Lentivirus によって形質転換させた。3 日目に CRISPR-Cas9 とヒト *NR4a* 特異的 sgRNA またはコントロール sgRNA からなる RNP 複合体を 100 万個の T 細胞にエレクトロポレーション法によって導入した。エレクトロポレーション翌日、編集した細胞を 5 %AB 血清添加 AIM-V 培地にて増殖させ、 2.5×10^5 細胞/ml の密度に保った。

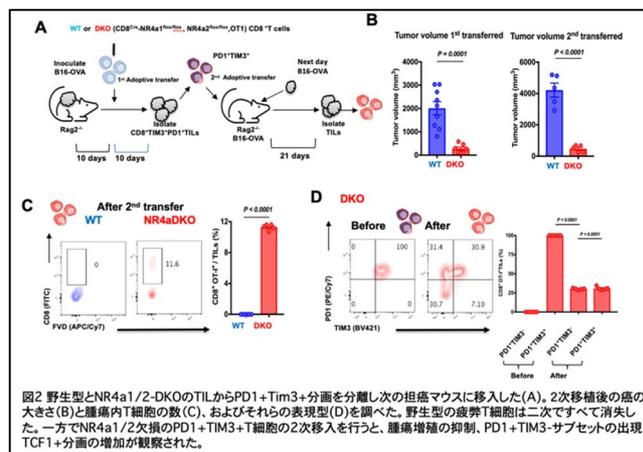
4 . 研究成果

(1) CD8⁺T 細胞特異的 *NR4a* 欠損マウスの解析

CD8⁺T 細胞において *NR4a* は PD-1 陽性 Tim3 の疲弊化した T 細胞で強く発現が認められた。3 つの *NR4a*(*NR4a1*, *NR4a2*, *NR4a3*)をマウス CD8⁺T 細胞で欠損させると、T 細胞は疲弊化しにくく、細胞移入療法において強い抗腫瘍効果を示した。ATATseq などのゲノム解析の結果、*NR4a* は PD-1 遺伝子のエンハンサー領域に結合し PD-1 の発現を安定化することがわかった。さらに AP-1 や NF-κB と競合することで IFN などの抗腫瘍性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。このように *NR4a* は T 細胞の寛容と疲弊の共通した現象を担う重要な因子であることが明らかとなった。

次に、CD8Cre を用いて CD8⁺T 細胞特異的 *NR4a1/2* 欠損マウスを作成し腫瘍モデルでの解析を進めた。B16 メラノーマや MC38 大腸癌細胞の移植モデルでは、*NR4a1/2* 欠損マウスは極めて強い抗腫瘍免疫応答を示した。また腫瘍内への T 細胞の浸潤が著しく増加していた。次に腫瘍内浸潤細胞を scRNAseq 法にて解析を行った。まず *NR4a1/2* 欠損マウス腫瘍内において CD8⁺T 細胞では疲弊化 T 細胞 (Tex) が減少し、いわゆる疲弊前駆 T 細胞 (pre-Tex) が増加していることが確認された。興味深いことに *NR4a1/2* 欠損マウスでは CD8⁺T 細胞の浸潤が増加し、Treg の減少も認められた。*NR4a* 欠損マウスでは PD-1 陽性の CD8⁺T 細胞も存在するが、ミトコンドリア代謝 (酸化的リン酸化) が亢進し、サイトカイン産生能も高く、いわゆる疲弊前駆細胞の状態に留まっていることが示唆された。

さらに次に、*NR4a1/2* の欠損が枯渇した T 細胞の自己再生を促進するかどうかを調べた。B16-OVA 腫瘍を移植した Rag2 欠損マウスより疲弊状態に陥った PD1+TIM3⁺T 細胞を次の Rag2 欠損マウスに二次移植し、その後 B16-OVA 腫瘍細胞でチャレンジした。その結果野生型の疲弊 T 細胞は二次ですべて消失した。一方で *NR4a1/2* 欠損の PD1+TIM3⁺T 細胞の二次移入を行うと、腫瘍増殖の抑制、PD1+TIM3⁺サブセットの出現、TCF1+分画の増加が観察された(図 2)。この結果から *NR4a1/2* の欠失は以前に活性化された T 細胞から新しい TCF1+メモリー T 細胞の形成を促進することが示唆された。*NR4a* 阻害は単に疲弊に抵抗性を示すだけではなく、若いメモリーへのリプログラムを促進する可能性が示唆された。本成果は *Cell Rep* (2024; 43(3):113898)に発表した。



(2) ヒト *NR4a* 欠損 CAR-T 細胞の樹立と抗腫瘍効果

マウス CD8+T 細胞では NR4a の欠失により、固形がんに対する CAR-T 細胞治療効果が強く増強されることを示した。しかし、ヒト CAR-T 細胞における NR4a 遺伝子ノックアウトの固形がんに対する抗腫瘍効果については、これまで検討されていなかった。今回、HER2 を認識する CAR-T 細胞において、NR4a1、NR4a2、NR4a3 の 3 つの NR4A ファミリー因子すべてを CRISPR/Cas9 システムにより欠失させ、NR4a-TKO CAR-T 細胞を作成した。NR4a-TKO CAR-T 細胞は、試験管内で抗原刺激を繰り返すことで生じる疲弊に対して抵抗性があり、コントロールの CAR-T 細胞と比較して高い殺腫瘍活性を維持していた。また、免疫不全マウスに移植した *in vivo* ヒト肺がんモデルにおいても、NR4a TKO CAR-T 細胞は、より強い腫瘍の退縮と高い生存率を示した。メカニズム的には、NR4a TKO CAR-T 細胞は、コントロール CAR-T 細胞と比較して、IFN、IL-2、TNF などのサイトカインを高レベルで発現し、PRDM1、TOX、SOCS1、TIGIT、LAG3、PDCD1 などの疲弊関連遺伝子の発現が低下していた。さらに、NR4a-TKO CAR-T 細胞は、酸化的リン酸化速度が向上し、腫瘍内でより長い時間持続することが確認された。NR4a はヒト固形がんに対する優れた CAR-T 細胞を作製するための非常に有望な標的であることが示唆された。本研究成果は現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakamichi R, Hishikawa A, Chikuma S, Yoshimura A, Sasaki T, Hashiguchi A, Abe T, Tokuhara T, Yoshimoto N, Nishimura ES, Hama EY, Azegami T, Nakayama T, Hayashi K, Itoh H	4. 巻 42
2. 論文標題 DNA-damaged podocyte-CD8 T cell crosstalk exacerbates kidney injury by altering DNA methylation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 112302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112302	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 Sekiya, T., H. Kasahara, R. Takemura, S. Fujita, J. Kato, N. Doki, Y. Katayama, Y. Ozawa, S. Takada, T. Eto, T. Fukuda, T. Ichinohe, M. Takanashi, M. Onizuka, Y. Atsuta, S. Okamoto, A. Yoshimura, S. Takaki, and T. Mori	4. 巻 208
2. 論文標題 Essential Roles of the Transcription Factor NR4A1 in Regulatory T Cell Differentiation under the Influence of Immunosuppressants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 2122-2130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100808	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 Mise-Omata, S., M. Ikeda, M. Takeshita, Y. Uwamino, M. Wakui, T. Arai, A. Yoshifuji, K. Murano, H. Siomi, K. Nakagawara, M. Ohyagi, M. Ando, N. Hasegawa, H. Saya, M. Murata, K. Fukunaga, H. Namkoong, X. Lu, S. Yamasaki, and A. Yoshimura.	4. 巻 209
2. 論文標題 Memory B Cells and Memory T Cells Induced by SARS-CoV-2 Booster Vaccination or Infection Show Different Dynamics and Responsiveness to the Omicron Variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 2104-2113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200525	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 Wang, T. W., Y. Johmura, N. Suzuki, S. Omori, T. Migita, K. Yamaguchi, S. Hatakeyama, S. Yamazaki, E. Shimizu, S. Imoto, Y. Furukawa, A. Yoshimura, and M. Nakanishi	4. 巻 611
2. 論文標題 Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 358-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-05388-4	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 Khan, M. G. M., N. Boufaied, M. Yeganeh, R. Kandhi, S. Petkiewicz, A. Sharma, A. Yoshimura, G. Ferbeyre, D. P. Labb, S., S. Ramanathan, and S. Ilangumaran.	4. 巻 15
2. 論文標題 SOCS1 Deficiency Promotes Hepatocellular Carcinoma via SOCS3-Dependent CDKN1A Induction and NRF2 Activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15030905	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 SOCS, SPRED and NR4a: Negative regulators of cytokine signaling and transcription in immune tolerance
3. 学会等名 ICIS2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 T細胞の疲弊と老化を司る転写因子; NR4a
3. 学会等名 ゲノム創薬・創発フォーラム第12回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉村昭彦、安藤眞、Tanakorn Srirat
2. 発表標題 NR4aによるT細胞疲弊機構とその解除による抗腫瘍免疫増強
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 T細胞の老化、疲弊化と疾患
3. 学会等名 国際個別化医療学会第27回学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 昭彦, 安藤 眞, 中川原 賢亮, 三瀬 節子
2. 発表標題 T細胞疲弊の解除による抗腫瘍効果増強
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>疲弊したT細胞を若返らせ、強い抗腫瘍効果をもつT細胞の作製に成功 https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2021/10/20/28-83203/</p>
--

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			
米国	Massachusetts Institute of Technology			
カナダ	University de Sherbrooke			