

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430162

研究課題名(和文)新規メモリーT細胞制御遺伝子の特性を活用した癌免疫療法の開発

研究課題名(英文)A novel pathway regulating memory T cell development for cancer immunotherapy

研究代表者

藤木 文博(Fujiki, Fumihiro)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：40456926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：メモリーT細胞の効率的な誘導法の確立は、強力な癌免疫療法の開発につながる。しかしながら、メモリーT細胞の分化誘導メカニズムは明らかではない。これまでに、我々はメモリーT細胞分化を調節する新規の栄養素代謝を同定することに成功した。本研究では、この栄養素代謝を阻害する低分子化合物を同定し、癌に対するT細胞移入療法の効果を増強できることを示した。さらに、メモリーT細胞のマーカーであるCD62Lの新しい発現制御メカニズムを同定した。この成果は、将来、T細胞の分化を自在に制御する方法論の確立および強力な癌免疫療法の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Efficient memory T cell induction has been demanded for the development of a potent cancer immunotherapy. However, it remains unclear how memory T cell is induced. We previously identified a novel nutrient metabolism regulating the differentiation of memory T cell. Here, we show that new inhibitors against the metabolism process can enhance the efficacy of T cell-based cancer immunotherapy. Furthermore, we also demonstrate a novel mechanism regulating the expression of L-Selectin (CD62L), an important functional marker for memory T cells, in T cells. Thus, these results should provide us with a methodology for controlling T cell differentiation and contribute to develop more effective cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学、免疫学

キーワード：メモリーT細胞

1. 研究開始当初の背景

メモリーT細胞の効率的な誘導は、癌免疫療法や感染症の予防ならびに治療に大きく貢献する。しかしながら、メモリーT細胞の分化メカニズムは十分に明らかにされていない。近年、メモリーT細胞の分化やその維持にT細胞自身の栄養代謝が密接に関与することが明らかとなってきた。我々は、これまでにT細胞自身による栄養素A(特許出願中のため仮名)の代謝がT細胞の分化を促進することを明らかにしてきた。実際、T細胞特異的に栄養素Aの代謝酵素である metabolic enzyme gene (MEG、仮名)を欠損させると、リステリア菌感染症後に形成されるメモリーT細胞が増大し、また、そのメモリーT細胞の二次免疫応答も増強することを観察した。さらに、栄養素Aの代謝産物をT細胞培養系に添加することでT細胞の分化が加速され急速にターミナルエフェクターT細胞に分化した。したがって、T細胞における栄養素A代謝パスウェイはT細胞の分化を制御し、メモリーT細胞の効率的な誘導法を確立するための標的となりうる。

2. 研究の目的

上記の知見を癌免疫療法に応用するために、MEGの酵素活性を阻害する低分子化合物の探索・創製、ならびに、栄養素Aの代謝パスウェイによるT細胞の分化促進メカニズムを解明することを目的と本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) MEG 酵素活性阻害剤の探索と創製

MEGを強制発現させたヒト胎児由来腎臓上皮細胞株である293T細胞より、MEGタンパクが含まれる画分を抽出した(以後、MEGタンパクと記載する)。このMEGタンパクと基質であるトリチウム(^3H)で標識した栄養素Aを細胞内液を模した緩衝液中で反応させた後、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離した。栄養素Aの代謝産物が含

まれるフラクションの ^3H 量を線シンチレーションカウンタで測定することで、MEGタンパク酵素活性を評価した。この評価系に候補化合物を添加し、各候補化合物のMEGタンパク酵素活性に与える影響を検討した。さらに、この検討から阻害剤として優れた活性を示したものをを用いて抗腫瘍免疫応答増強作用を評価した。

(2) 栄養素A代謝パスウェイによるT細胞分化制御メカニズムの解明

栄養素Aの代謝産物(以後、物質Bと記載する)は、核内受容体Cと結合し様々な遺伝子の発現制御を行うことが知られている。我々のこれまでの研究より、この物質BをT細胞培養系に添加すると、メモリーT細胞に特徴的な分子であるCD62L(L-selectin)の発現が低下するのみならず、増殖能や多分化能が喪失し、アポトーシス感受性が亢進することが明らかとなっている。また、このin vitroでの結果と一致して、MEG欠損T細胞は野生型T細胞と比較してCD62Lの発現が増強していた。これらの結果は、T細胞における栄養素A代謝パスウェイがCD62L発現を制御することを示している。そこで、我々は、T細胞における物質BによるCD62L発現抑制メカニズムに焦点を当て、そのメカニズム解明を試みた。

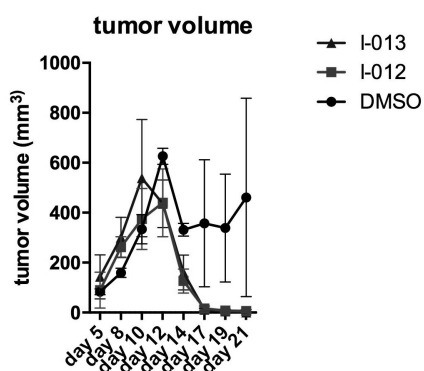
4. 研究成果

(1) MEG 酵素活性阻害剤の探索と創製

MEGノックアウトマウスは胎生致死を示す。そこで我々はまず最初に、メモリーT細胞の効率的な誘導法としてMEGが安全な標的となりうるか検討した。そのためにタモキシフェン誘導性に全身のMEGを欠損させることのできるマウスを作製した。このマウス(6-8週齢)にタモキシフェンを5日間連続投与することでMEGを欠損させたのち、血液・組織に変化が認められるか検討した。その結果、明らかな異常所見は認められな

った。また、タモキシフェン投与後のマウス体重を経時的に観察したが、タモキシフェンを投与されていないマウスと比べて差は認められなかった。これらの結果は、胎生期とは異なり成体のマウスにおける MEG 欠損は致命的な有害事象を発生させないことを示し、MEG を標的としたメモリー T 細胞の効率的な誘導法は安全に行える可能性が高いことを示す。

このような結果を受けて、MEG タンパクの酵素活性を阻害する低分子化合物を探索した。MEG タンパクが属するファミリーの中の一つの酵素に対する阻害剤が報告されていたことから、その阻害剤の基本骨格を用いて 36 種類の低分子化合物を作製しスクリーニングした。その結果、阻害活性の強い化合物、I-012 と I-013 を同定することに成功した。この化合物が癌免疫療法の抗腫瘍効果を増強するか検討するために、あらかじめ腫瘍細胞特異的 CD8+T 細胞を移入した (T 細胞移入療法) T 細胞を移入した day 5 から day 12 まで、I-012 および I-013 投与群の腫瘍量はコントロールである DMSO 投与群と比較して変わらず増大した。day 12 以降、T 細胞移入療法の効果が出現し 3 群ともに腫瘍量が減少した。しかしながら、その減少の様子は DMSO 群に比較して I-012 および I-013 投与群では顕著であり、完全に腫瘍が消失したマウスも認められた (下図参照)。



また、この腫瘍退縮効果は、マウス体内における移入した CD8+T 細胞の expansion と関連していたことから、I-012 および I-013 の投与が T 細胞の「質」の改善に寄与したことが示唆された。

(2) 栄養素 A 代謝パスウェイによる T 細胞分化制御メカニズムの解明

T 細胞における CD62L 発現低下のメカニズムとして、細胞膜上に存在する CD62L がプロテアーゼによって切断・放出される shedding と mTOR シグナル亢進による CD62L の転写活性因子 KLF2 の発現低下が知られている。しかしながら、物質 B による CD62L 発現低下は、mRNA レベルで生じていること、また、その時 KLF2 の発現レベルは低下しておらず逆に増加していた。そこで我々は、新規の CD62L 発現抑制メカニズムが関与していると考えた。これを明らかにするために、T 細胞系白血病細胞株である Jurkat 細胞をモデル細胞として研究を行った。Jurkat 細胞に核内受容体 C を高発現させることで、物質 B による CD62L 発現抑制が誘導されることから、これには核内受容体 C が関与していることが明らかとなった。また、この核内受容体 C の DNA 結合ドメインおよび転写調節ドメインを欠損させた変異型核内受容体 C では、物質 B による CD62L 発現低下が誘導されないことから、核内受容体 C による genomic な制御が関与していることが考えられた。この核内受容体 C はエピジェネティック制御により標的遺伝子の発現を正負どちらにでも制御することが知られていることから、発現抑制に関与するリプレッサータンパクが、この CD62L 発現抑制に関与するか検討した。リプレッサータンパクに対する shRNA を設計し核内受容体 C を発現する Jurkat に共発現させたところ、物質 B による CD62L 発現抑制が阻害された。

さらに、物質 B による CD62L 発現抑制が生じた Jurkat では CD62L プロモーター領域の H3K9/14 の脱アセチル化が亢進していた。このような現象が Jurkat のみならず T 細胞においても実際に起きるか検討したところ、期待した通り、物質 B により CD62L プロモーター領域の H3K9/14 の脱アセチル化が亢進していた。興味深いことに、我々は、このエピジェネティック制御が起こる際に、核内受容体 C は CD62L プロモーター領域には結合していないことをゲルシフトアッセイによって明らかにした。これは、物質 B による T 細胞の遺伝子発現制御が 1 対 1 の関係ではないことを示唆し、実際の物質 B が T 細胞に及ぼす影響が CD62L 発現抑制に留まらず、その他のターミナルエフェクター T 細胞らしさの形成にも影響することからも、この概念が妥当であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Takashima S, Oka Y, Fujiki F, et al. Syndecan-4 as a biomarker to predict clinical outcome for glioblastoma multiforme treated with WT1 peptide vaccine. *Future Sci OA*. 2016;2(4):FS096.
2. Kondo K, Fujiki F, Nakajima H, Yatsukawa E, Morimoto S, Tatsumi N, Nishida S, Nakata J, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H. An Essential Role of the Avidity of T-Cell Receptor in Differentiation of Self-Antigen-reactive CD8+ T Cells. *J Immunother*. 2016;39(3):127-139.
3. Nakae Y, Oka Y, Fujiki F, et al. Two distinct effector memory cell populations of WT1 (Wilms' tumor gene 1)-specific cytotoxic T lymphocytes in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Immunol*

Immunother. 2015;64(7):791-804.

4. Katsuhara A, Fujiki F, et al. Transduction of a novel HLA-DRB1*04:05-restricted, WT1-specific TCR gene into human CD4+ T cells confers killing activity against human leukemia cells. *Anticancer Res*. 2015;35(3):1251-1261.

[学会発表](計 3 件)

1. Diana Campillo-Davo, Fumihiko Fujiki, et al. Electroporation of Dicer-Substrate siRNA Duplexes Targeting Endogenous TCR Enhance Tumor Killing Activity of Wilms' Tumor 1 (WT1)-Specific TCR-Redirected Cytotoxic T Cells. ASH Annual Meeting, San Diego, Dec. 15, 2016
 2. Fumihiko Fujiki, et al. Cloning of WT1₃₃₂ helper peptide-specific TCRs and their application for cancer immunotherapy. The 8th international Conference on WT1 in Human Neoplasia 2015, Kyoto, Nov. 20, 2015
- 3 勝原晶子、藤木文博、他。HLA class II 拘束性 WT1 由来ヘルパーペプチド特異的 TCR 遺伝子を導入された CD4+T 細胞は in vivo において anti-leukemia activity を発揮する。第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、京都大学、9 月 6 日、2014 年

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤木 文博 (FUJIKI Fumihiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：40456926