

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20149

研究課題名(和文) 婦人科がんにおけるがん免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cancer immunity escape mechanism in gynecological cancer

研究代表者

安岡 稔晃 (Yasuoka, Toshiaki)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60648624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍抑制因子Meninの欠損によりT細胞の抗腫瘍活性が低下し、その原因として、T細胞における疲弊が原因であると考えられた。従って我々は、Menin欠損によりT細胞の抗腫瘍活性が低下した担がんマウスモデルを構築することに成功した。今後はこのT細胞疲弊マウスモデルを中心に、疲弊抑制による抗腫瘍活性の増強法の開発に取り組む予定である。

研究成果の概要(英文)：Because of the deficiency of the tumor suppressor Menin, T cell antitumor activity decreased, which is thought to be caused by exhaustion in T cells. Therefore, we succeeded in constructing a model of tumor-bearing mice in which the antitumor activity of T cells was decreased due to Menin deficiency. From now on, we intend to develop a method for enhancing antitumor activity by suppressing fatigue mainly in this T cell exhaustion mouse model.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：婦人科腫瘍 がん免疫

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の排除に働く細胞傷害性T細胞は抗原刺激を受けた後、T細胞受容体からのシグナルを受けて活性化し、その細胞傷害機能を発揮するが、単独の刺激のみでは、細胞死や不応答を起こす。T細胞には、T細胞受容体以外にさまざまな補助刺激受容体が発現しており、それらはT細胞の活性化、分化や増殖などを調節している。補助刺激受容体には、T細胞の活性化に対して正の働きをするものと、負の働きをするものとが知られている。そのような免疫調節因子 (immune checkpoints) の制御が免疫細胞療法の効果を増強する上で重要と考えられている。近年、T細胞の活性化を制御する免疫調節因子として cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) /B7 共刺激経路や programmed cell death protein-1 (PD-1) /PD-1 ligand (PD-L1) 系などの機能が明らかとなっており、これらの免疫調節因子を標的とし、その機能を抑制することで腫瘍免疫反応を促進する分子標的治療薬が開発され、臨床試験でも有効性が明らかとなっている。具体的には、悪性黒色腫において、CTLA-4抗体である ipilimumab は二つの第 Ⅲ 相試験において生存期間を改善することが報告された (Hodi FS et al N Engl J Med. 2010, Robert C et al. N Engl J Med. 2011)。さらに抗 PD-1抗体である nivolumab においては第 Ⅲ 相試験で ipilimumab より高い奏効率が報告され、また第 Ⅲ 相試験 (checkmate-066 試験) においても高い奏効率が得られている。婦人科領域では本邦でも、京都大学医学部において卵巣癌に対する抗 PD-1抗体療法の医師主導治験が行われ良好な成績を得ていると報告されており、今後はこれらの分子標的治療が婦人科がんを含めた各種のがんにおいても標準治療になることが期待される。しかしながら、単独の抑制性受容体の制御では効果が期待あまりできないか、もしくは持続

しない可能性が高いことから、このようなときに見られるT細胞機能不全いわゆるT細胞疲弊という現象を回避するため、抑制性受容体の発現制御機構を明らかにする研究が必要となっている。ところが、T細胞疲弊を抑制する研究を推進するにあたっては、適切で有効なモデルが存在しないことが、研究推進の大きな妨げとなっている。そこで、当研究室においてT細胞の疲弊や老化を促進することを見出した腫瘍抑制因子 Menin (Kawahara et al. Nat. Commun. 2014) の欠損マウスを用い、これをT細胞疲弊モデルとした本研究の着想に至った。抗腫瘍免疫で重要なT細胞疲弊問題において、それを解決する鍵となる適切なT細胞疲弊マウスモデルを使用し、得た知見を基盤としてがんの免疫抑制性環境において誘導される、T細胞機能不全のメカニズムについて解明できれば、より効果の期待できる腫瘍免疫の誘導法を提唱できると考えられる。

## 2. 研究の目的

排除されないがん組織には、がん細胞の免疫逃避メカニズムの一つとして誘導されるT細胞の疲弊や老化による免疫抑制性環境の構築が観察される。しかしながら、担がん環境がいかにしてT細胞の疲弊や老化状態の形成に必要な抑制性受容体の協調的発現やT細胞の機能不全を誘導するのか、その分子機構については未だ不明な点が多い。婦人科領域のがん細胞は、その細胞が元来持つ性質から、T細胞の機能不全を誘導しやすいことが予想される。そこで、免疫抑制性環境によって誘導されるT細胞疲弊の分子機構を解明するとともに、婦人科がんにおいてより効率的な免疫調節法の提唱を行なうため、適切なT細胞疲弊マウスモデルの構築を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

これまでの当研究室における解析から、腫瘍抑制因子 Menin の欠損が、CD4 陽性 T 細胞において活性化早期に細胞疲弊や老化を引き起こすことを見出し報告している (Kuwahara et al. Nat. Commun. 2014)。そこで、CD8 陽性 T 細胞における抗腫瘍活性における Menin の役割について解析するため、胸腺腫瘍細胞である EG7 細胞を野生型マウスあるいは T 細胞特異的に Menin を欠損させたマウスに  $1 \times 10^6$  細胞を接種することにより担がんマウスの構築を行い、腫瘍の増殖比較による抗腫瘍アッセイを行った。また、*in vitro* で活性化した CD8 陽性 T 細胞の抑制性受容体発現や BrdU の取り込みによる増殖アッセイや AnnexinV 染色による細胞死 (アポトーシス) についてフローサイトメトリーを用いた比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

抗腫瘍活性における Menin の役割について解析するため、担がんマウスを用いた抗腫瘍アッセイを行った。腫瘍接種後、経時的に腫瘍の大きさを測定した結果、野生型マウスに比べ、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスでは、腫瘍が増大し、抗腫瘍活性が低いことが分かった (図 1)。

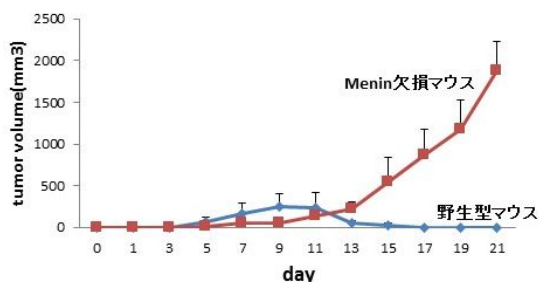


図1. Menin欠損マウスに見られる抗腫瘍活性の異常

次に、疲弊の指標となる抑制性受容体の発現について解析するため、*in vitro* で活性化し、5日間培養した CD8 陽性 T 細胞を用いてフローサイトメトリー解析したところ、Menin 欠損 CD8 陽性 T 細胞における抑制性受容体の発現が野生型に比べ高いことが分かった (図

2)。

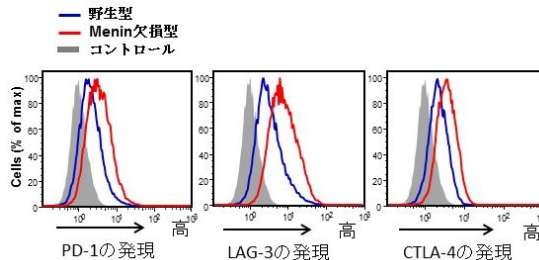


図2. Menin欠損CD8陽性T細胞に見られる抑制性受容体の高発現

また、これら抑制性受容体の高発現に伴い Menin 欠損により細胞増殖の低下 (図 3 A) やアポトーシスによる細胞死の誘導 (図 3 B) が観察されたことから、Menin 欠損 CD8 陽性 T 細胞に T 細胞疲弊が認められた。

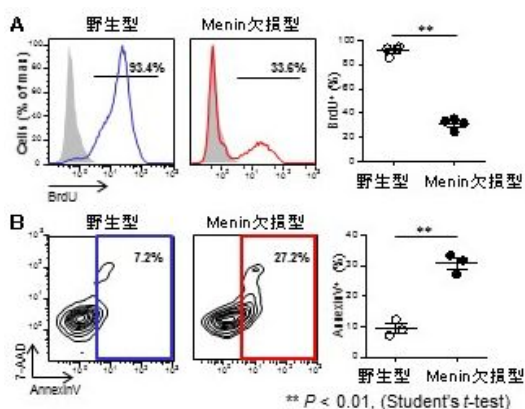


図3. Menin欠損によるCD8陽性T細胞の増殖低下(A)と細胞死の誘導(B)

以上の結果から、腫瘍抑制因子 Menin の欠損により T 細胞の抗腫瘍活性が低下し、その原因として、T 細胞における疲弊が原因であると考えられた。従って我々は、Menin 欠損により T 細胞の抗腫瘍活性が低下した担がんマウスモデルを構築することに成功した。今後はこの T 細胞疲弊マウスモデルを中心に、疲弊抑制による抗腫瘍活性の増強法の開発に取り組む予定である。

< 引用文献 >

Hodi FS et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic

melanoma. N Engl J Med. Aug 19;  
363(8):711-23.2010.

Robert C et al. Ipilimumab plus  
dacarbazine for previously untreated  
metastatic melanoma. N Engl J Med. Jun  
30;364(26):2517-26.2011

Kuwahara M et al. The Menin-Bach2 axis  
is critical for regulating CD4 T-cell  
senescence and cytokine homeostasis.  
*Nature Communications*, 5:3555, 2014.

## 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 2件)

Yasuoka T, Kuwahara M, Yamada T,  
Maruyama S, Suzuki J, Taniguchi M,  
Yasukawa M, Yamashita M.

The transcriptional repressor Gfi1 plays  
a critical role in the development of NKT1-  
and NKT2-type iNKT cells. *Plos One*, June;  
11(6):e0157395, 2016. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0157395

Yamada T, Kanoh M, Nabe S, Yasuoka T,  
Suzuki J, Matsumoto A, Kuwahara M,  
Maruyama S, Fujimoto T, Sakisuka R,  
Yasukawa M, and Yamashita M.

Menin plays a critical role in the  
regulation of the antigen-specific CD8<sup>+</sup> T  
cell response upon *Listeria* infection. *J.  
Immunol.* 197(10):4079-4089, 2016. 査読有  
DOI: 10.4049/jimmunol.1502295

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

該当無し

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

安岡 稔晃 (Yasuoka, Toshiaki)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60648624

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

該当無し