

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06149

研究課題名(和文) PD-1シグナル阻害によるTregの免疫抑制解除と抗腫瘍免疫活性化の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of anti-tumor immune mechanism including Treg inhibition by PD-1 blockade.

研究代表者

茶本 健司 (Chamoto, Kenji)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：50447041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん免疫の中心となる免疫細胞はCD8+キラーT細胞であるが、ヘルパーT細胞やB細胞による制御メカニズムは不明である。本研究では、B細胞不全マウス(IgAを産生できないマウス)では、高い抗腫瘍免疫を示すことを発見した。その理由としては、Tregの割合が減っていること、またnaive CD8+T細胞が野生型とくらべて予め活性化状態にあることを明らかにした。B細胞不全マウスでは腸内細菌異常により、腸内環境と末梢を循環するnaive CD8+T細胞が優先的にType-I IFN刺激により活性化していた。Tregや腸内環境因子により総合的に制御されてる複雑な抗腫瘍免疫機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-1を中心としたがん免疫治療ががん治療の第一選択治療として実施されている。しかし、半数以上は不応答性である。腫瘍免疫はCD8+T細胞を中心とした細胞性免疫が重要である。なぜ抗PD-1抗体治療に不応答な患がいるのか、その原因を解明するためには、これらのCD8+T細胞を中心とした細胞性免疫の免疫力を制御する様々な要因を総合的に理解する必要がある。本研究をとおして、CD8+T細胞による免疫制御がヘルパーT細胞やB細胞、腸内細菌によって複雑に制御されている機構を改題した。これらの結果は将来的に、がん治療の効果を上げるための基礎的知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The final effector cells in cancer immunity are CD8 + killer T cells. However, the regulatory mechanisms by helper T cells and B cells remains unknown. In this study, we found that B-cell-deficient mice (IgA-deficient mice) exhibited higher anti-tumor immunity. We found that the proportion of Treg was decreased and that naive CD8+ T cells were pre-activated compared with wild-type CD8+ T cells. In B-cell-deficient mice, intestinal bacterial abnormalities preferentially pre-activated naive CD8 + T cells by Type-I IFN stimulation, which were circulating between gut and periphery. We elucidated a complex anti-tumor immune mechanism that is comprehensively regulated by Treg, B cells and intestinal environmental factors.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がん免疫 体液性免疫 B細胞 腸内細菌 IFN

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫の治療薬として2014年に初めて認可された免疫チェックポイントの阻害抗体 (抗PD-1 抗体: ニボルマブ) は、我が国発の画期的免疫治療薬である。我々の研究グループはPD-1分子を同定し、世界に先駆け抗PD-1 抗体がん治療薬の開発を行ってきた(Okazaki et al. Nat Immunol. 14:1212-8, 2013, review)。その後、PD-1阻害がん免疫治療法は様々ながん種に適応され、がん免疫治療ががん治療の第一選択として選ばれている。従来開発されてきた、既存治療法や、他のがん免疫治療と比較すると、臨床試験での奏成功率は約30-50%と劇的に向上したが、約半数の患者には依然大きな治療効果は見られない(Chowdhury et al. J Intern Med. 283:110-20, 2018, review)。PD-1阻害治療によって発揮される効果はCD8⁺T細胞を中心とした細胞性免疫が重要である。なぜ抗PD-1 抗体治療に不応答な患がいるのか、その原因を解明するためには、これらのCD8⁺T細胞を中心とした細胞性免疫の免疫力を制御する様々な要因を総合的に理解する必要がある。

2. 研究の目的

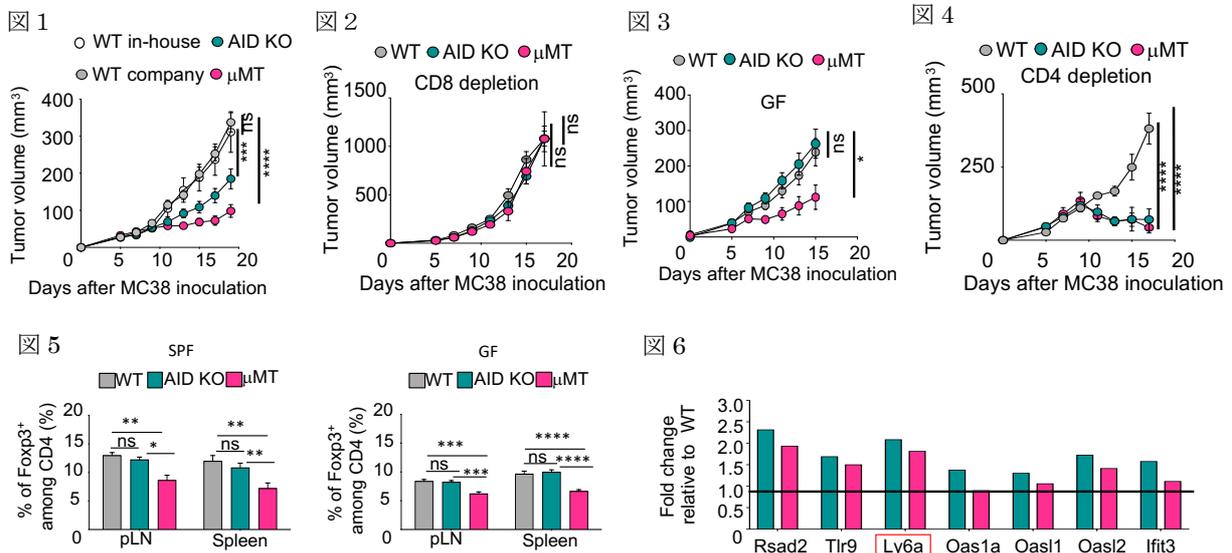
抗腫瘍免疫を制御する因子として、regulatory T cell (Treg) を含むCD4⁺ヘルパーTや、B細胞を中心とした体液性免疫が挙げられる。しかし、PD-1阻害抗体に対する不応答性の原因とこれらの細胞群による抗腫瘍免疫の制御については不明な点が多い。がん免疫において抗腫瘍効果は細胞性免疫であるCD8⁺キラーT細胞によって発揮される。本研究では、担癌生体内で新たに誘導されるCD4⁺T細胞 (Treg) や体液性免疫 (B細胞) の、CD8⁺キラーT細胞に対する影響を解析し、がん免疫による抗腫瘍メカニズムを総合的に解明・理解することを目的とする。

3. 研究の方法

腫瘍モデルでは大腸がん MC38 を用いた。C57BL/6 バックグラウンドの B 細胞不全マウスに皮内接種し、腫瘍系を測定した。CD4⁺ヘルパーT 細胞 CD8⁺やキラーT 細胞の除去には特異的抗体を投与した。脾臓 (spleen) やリンパ節 (LN) より様々な CD8⁺T 細胞群を単離し、それらの遺伝子発現や、ミトコンドリア活性、細胞増殖能、機能をマイクロアレイ、Seahorse、³H 取り込みアッセイやFACS 等を用いて総合的に解析した。免疫細胞の腸管と末梢の循環に関連する解析では、UV レーザーにより細胞が緑色から赤色の波長に切り替わる KiKGR マウスを用い、照射後 24 時間後の生体内における T 細胞の臓器間移動を検討した。

4. 研究成果

獲得性免疫の中でも体液性免疫の腫瘍免疫における影響を調べるため、B 細胞を欠損する uMT マウス、IgA を欠損する AID KO マウスを用いて、抗腫瘍効果を検討した。その結果、両マウスにおいて野生型マウスよりも強い抗腫瘍効果を示した (図 1)。そこでこれらのマウスに CD8 抗体投与し CD8⁺T 細胞を除去したところ、抗腫瘍増強効果は消失した (図 2)。この結果は B 細胞不全マウスでは CD8⁺T 細胞を介して強い抗腫瘍効果を発揮していることを示している。IgA がないマウスでは腸内細菌叢が変化していることが知られているが(Fagarasan et al, Nat Rev Immunol, 3:63-72, 2003.)、実際に腸内細菌構成がこれらのマウスでは変化していた (data not shown)。そこで、腸内細菌の影響を調べるため、germ free (GF) マウスを用いたところ、GF uMT マウスや GF AID OK マウスにおける抗腫瘍免疫の増強効果は減弱した (図 3)。このことは腸内細菌が CD8⁺T 細胞の免疫力を制御していることを示している。CD4 抗体にて Treg とともに CD4⁺T 細胞を除去すると抗腫瘍効果が増強されたことより、Treg の除去の影響が考えられた (図 4)。そこで Foxp3⁺ Treg の割合を B 細胞不全マウスで調べると野生型 (WT) と比べてその割合が少なかった (図

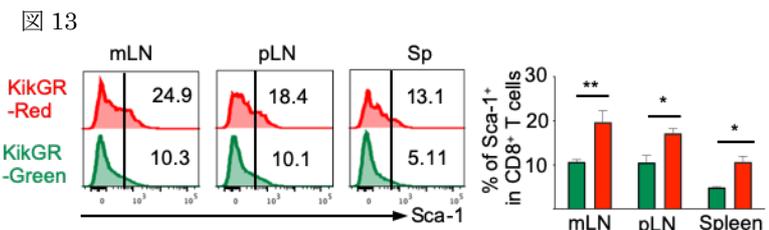
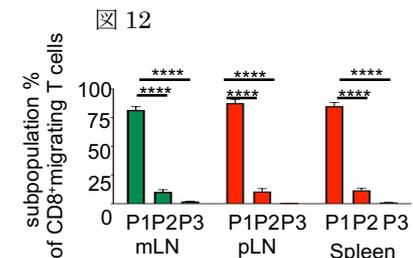
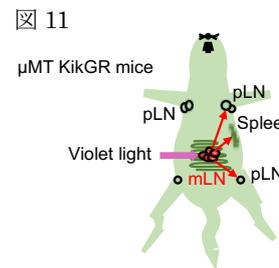
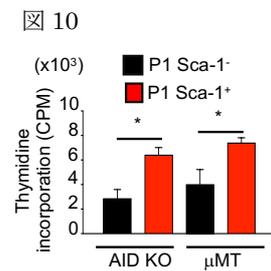
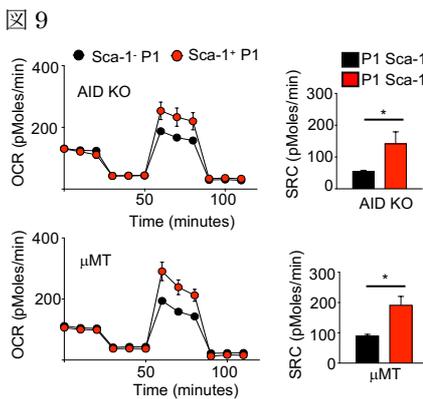
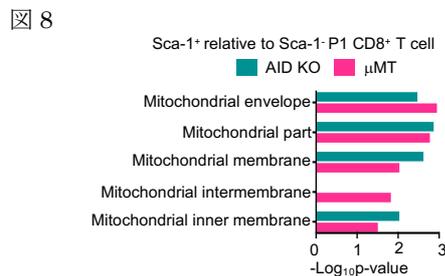
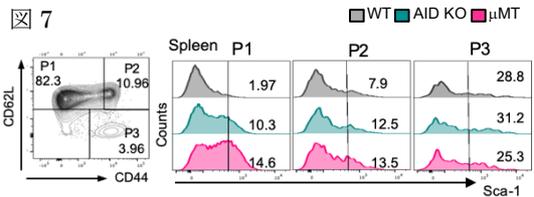


5 左)。一方で GF マウスでは B 細胞不全マウスでも Treg 割合の変化はなかったため、Treg 割合の現象は腸内細菌非依存的であることが示された (図 5 右)。次に B 細胞不全マウスの末梢 (リンパ節や脾臓) における CD8⁺T 細胞の遺伝子発現を網羅的に検討したところ、野生型マウスに比べて type-I IFN シグナル下流の遺伝子発現が高かった (図 6)。その中に、T 細胞表面にも発現している抗原 Ly6a (Sca-1) に注目したところ、この発現は予想外にも CD62L⁺ CD44⁻ naïve CD8⁺T 細胞 (P1) において、野生型 (WT) または他の細胞群 (P2, P3) よりも有意に高かった (図 7)。これらのことは IgA の欠損によって引き起こされる異常な腸内細菌叢により、naïve CD8⁺T 細胞が優先的に type-I IFN の刺激を受けている可能性を示唆している。Naïve CD8⁺T 細胞を Sca-1⁺ と Sca-1⁻ に分けてそれらの遺伝子発現を網羅的に検討したところ、type-I IFN シグナル下流遺伝子だけでなく、ミトコンドリア活性に関連する遺伝子が Sca-1⁺ にて高発現していた (GO pathway 解析、図 8)。そこで Naïve CD8⁺ Sca-1⁺ と Sca-1⁻ におけるミトコンドリア活性や細胞増殖能を検討したところ、naïve CD8⁺ Sca-1⁻ に比べて Sca-1⁺ 細胞にてミトコンドリア酸素消費量 (OCR) (図 9) や細胞増殖能が高かった (図 10)。これらのことは naïve T 細胞が type I IFN の刺激を優先的に受け、エネルギー状態が高い細胞群に移行しつつあることを示している。

そこで次に B 細胞不全マウスにて type-I IFN シグナルが naïve CD8⁺T 細胞で優先的に高くなるメカニズムを uMT KikGR マウスを用いて解析した。uMT KikGR マウスの腸管リンパ節 (mLN) 局所に UV を照射したところ 99% 以上の CD8⁺T 細胞が緑波長から赤波長に移行した (図 11, data not shown)。

24 時間後には、興味深いことに、末梢リンパ節 (pLN) や脾臓 (spleen) で、メモリー T 細胞 (P2) やエフェクター T 細胞 (P3) と比較してナイーブ T 細胞 (P1) にて赤波長の T 細胞が有意に多かった (図 12)。この結果は、腸管リンパ節から末梢に naïve CD8⁺T 細胞が優先的に循環していることを示している。さらにその時末梢リンパ節では緑波長 T 細胞 (元からいた細胞) よりも赤波長 T 細胞 (腸管から流入してきた細胞) のほうが Sca-1 発現が高かった (図 13)。

以上のことより、B 細胞不全マウス (IgA を産生できないマウス) では、Treg の割合が減っていること、また naïve CD8⁺T 細胞が野生型とくらべて予め活性化状態にあることが強い抗腫瘍効果の理由であることが考えられた。B 細胞不全マウスでは腸内細菌異常により、腸内環境と末梢を循環する naïve T 細胞が優先的に Type-I IFN 刺激により pre-activation されている状態になることを明らかにした。このように CD8⁺T 細胞を中心とした抗腫瘍免疫反応は、ヘルパー T 細胞、体液性免疫、腸内細菌と多岐にわたり制御されていることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chowdhury PS*, Chamoto K* (*equally contributed), Honjo T.	4. 巻 283
2. 論文標題 Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: A new era in cancer immunotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Intern Med.	6. 最初と最後の頁 110-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joim.12708	査読の有無 有
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 Chamoto K*, Muna Al-Habsi* (*equally contributed), Honjo T	4. 巻 198
2. 論文標題 Role of PD-1 in immunity and diseases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Top Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 3757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2017_67.	査読の有無 有
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 Akrami M, Menzies R, Chamoto K, Miyajima M, Suzuki R, Sato H, Nishii A, Tomura M, Fagarasan S, Honjo T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Circulation of gut-preactivated naïve CD8 + T cells enhances antitumor immunity in B cell-defective mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 23674-23683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2010981117.	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 -

〔学会発表〕 計55件（うち招待講演 31件／うち国際学会 14件）

1. 発表者名 茶本健司
2. 発表標題 代謝環境を考慮したバイオマーカー開発と抗腫瘍免疫メカニズム解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会特別シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計25件

1. 著者名 仲島由佳、茶本健司、河上 裕	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Cell press	5. 総ページ数 in press
3. 書名 Trends in Cancer Immunology 4	

1. 著者名 嶋崎元宣、茶本健司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 癌と化学療法社	5. 総ページ数 5
3. 書名 免疫チェックポイント阻害剤とT細胞代謝	

1. 著者名 平野智子、茶本健司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Bio Clinica.	5. 総ページ数 5
3. 書名 免疫チェックポイント阻害薬によるがん治療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

PD-1プロジェクト http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/pd-1_project.html 京都大学大学院医学研究科免疫ゲノム医学 PD-1プロジェクト http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/pd-1_project.html 低分子化合物との併用による PD - 1阻害抗体がん免疫治療効果の大幅な増強 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/170117_1.html

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