

令和元年6月23日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16853

研究課題名(和文) 婦人科がんを標的とした細胞内グルタミン代謝調節によるCD8T細胞の抗腫瘍活性増強

研究課題名(英文) Reinforce the antitumor activity of CD8 T cells via restriction of the intracellular glutamine metabolism

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境下におけるCD8 T細胞の抗腫瘍活性は、代謝不適合により制限されると考えられる。そこで我々は、抗腫瘍活性におけるCD8 T細胞内グルタミン代謝の役割について、担がんマウスを用いた解析を行った。低グルタミン(dGln)培養した腫瘍特異的CD8 T細胞を養子免疫したところ、通常培地(Ctrl)で培養した細胞に比べ、効果的な腫瘍排除と担がんマウス生存率の改善が見られた。また、腫瘍浸潤CD8 T細胞におけるPD-1の発現低下とKi67陽性率の増加が見られたことから、生体内でのCD8 T細胞疲弊の抑制が考えられた。これらの結果、抗腫瘍活性におけるグルタミン代謝の重要な役割が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタミン代謝を抑制したCD8 T細胞の培養を行ったところ、細胞の疲弊が抑制され、通常培養に比べて抗腫瘍活性が増強されることが明らかとなった。そのメカニズムとして、我々は、低グルタミン培養によりCD8 T細胞のメモリー分化が促進することを明らかにした。腫瘍特異的CD8 T細胞内のグルタミン代謝の抑制は、メモリー分化を促進し、腫瘍微小環境下でも疲弊を免れ増殖を続け、結果として効果的な腫瘍細胞の除去につながると考えられ、腫瘍特異的CD8 T細胞の養子免疫療法として将来、有効な培養方法になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The antitumor activity of activated CD8 T cells in the tumor microenvironment seems to be limited due to their being metabolically unfit. We therefore assessed the role of glutamine metabolism in the antitumor activity of CD8 T cells using a tumor-inoculated mouse model. The adoptive transfer of tumor-specific CD8 T cells cultured under glutamine-restricted (dGln) conditions or CD8 T cells treated with specific inhibitors of glutamine metabolism efficiently eliminated tumors and led to a better survival of tumor-inoculated mice than with cells cultured under control (Ctrl) conditions. The decreased expression of PD-1 and increased Ki67 positivity among tumor-infiltrating CD8 T cells cultured under dGln conditions suggested that the inhibition of glutamine metabolism prevents CD8 T-cell exhaustion in vivo. Given these findings, our study uncovered an important role of glutamine metabolism in the antitumor activity of CD8 T cells.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：抗腫瘍免疫 CD8 T細胞 細胞内エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍免疫に働く T 細胞の研究から、増殖腫瘍に浸潤している CD8 T 細胞では、PD-1 や CTLA-4 といった抑制性受容体の高発現を主体する T 細胞疲弊により、腫瘍細胞に対する傷害活性が低下していることが明らかとなっている(文献 )。このことから、効果的な抗腫瘍免疫の獲得には T 細胞疲弊の抑制が不可欠であると考えられるが、この T 細胞疲弊を効果的に抑制する手法は、まだ開発されていない。近年、T 細胞の疲弊を回避する方法として、抑制性受容体に対する抗体を用いた治療法が開発され、婦人科領域においても、卵巣癌に対する抗 PD-1 抗体療法の治験が行われ良好な成績を得ている。今後は、これらの分子標的治療が各種のがんにおいてもキードラッグとなることが期待される。しかしながら、抗体医薬は高額であり、単独の抑制性受容体の制御では大きな治療効果が期待出来ない。従って、抑制性受容体の協調的な発現を制御する治療法の開発が急務となっている。最近、我々は腫瘍抑制因子 Menin 欠損 CD8 T 細胞において、抑制性受容体 PD-1 の高発現に伴い増殖の急激な低下など、典型的な T 細胞疲弊が誘導されることを見出した(文献 )。この Menin 欠損 CD8 T 細胞を用いたメタボローム解析から、Menin 欠損により細胞内エネルギー代謝であるグルタミン代謝、およびグルコース代謝が過剰亢進することが明らかとなり、細胞内エネルギー代謝の亢進が、T 細胞疲弊と抗腫瘍免疫低下の原因である可能性が示唆された(文献 )。そこで、細胞内エネルギー代謝活性を調節することにより、T 細胞疲弊が抑制され高い抗腫瘍活性が得られることが期待される(図 2)。以上から、我々は細胞内エネルギー代謝調節により、CD8 T 細胞における疲弊の抑制につながると考え、高い抗腫瘍活性の獲得を目的とした本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

我々の予備的実験から、腫瘍特異的 CD8 T 細胞の培養において、細胞内エネルギー代謝経路の 1 つであるグルタミン代謝経路をグルタミン濃度の低下により抑制したところ、胸腺腫瘍細胞 (E.G7) 移植担がんマウスモデルにおいて、CD8 T 細胞の移入後に非常に強い抗腫瘍活性が観察された。この結果、移入 CD8 T 細胞の細胞内グルタミン代謝調節により、抗腫瘍活性を増強できる可能性が示唆された。以上から、本申請研究を推進することにより、CD8 T 細胞のグルタミン代謝調節を介した高い抗腫瘍活性の誘導が見込まれ、治療が困難とされる婦人科がんの制圧に向けた新しい免疫療法に発展する可能性が示唆された。そこで、本研究では、グルタミン代謝抑制によって誘導される抗腫瘍活性の増強メカニズムを解明すると共に、婦人科がんにおいて、より効率的な免疫療法の提唱を行なうことを本研究の目的とした。

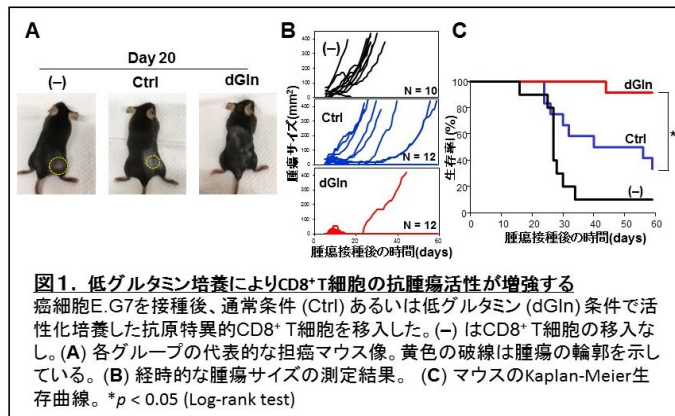
### 3. 研究の方法

まず、腫瘍特異的 CD8 T 細胞のグルタミン代謝調節による抗腫瘍活性の増強効果を、担がんマウスモデルを用いることにより検討した。具体的には、抗原刺激により活性化した CD8 T 細胞を、低グルタミン培地を用いることにより、細胞内グルタミン代謝抑制培養を行った。次に、CD8 T 細胞における抑制性受容体発現を指標とした T 細胞疲弊や、T 細胞の分化マーカーをフローサイトメトリーで解析し、T 細胞の疲弊抑制と長期免疫に働くメモリー分化に適した培養条件について検討を行った。また、腫瘍抑制に重要なサイトカインの産生や、腫瘍細胞を標的とした *in vitro* での細胞傷害活性の解析から、T 細胞機能についても検証し、高い抗腫瘍活性の獲得に最適と思われる CD8 T 細胞の培養条件を決定した。最後に、担がんマウスを用いた生体内での抗腫瘍活性について解析し、移入 CD8 T 細胞の細胞内グルタミン代謝調節を介した抗腫

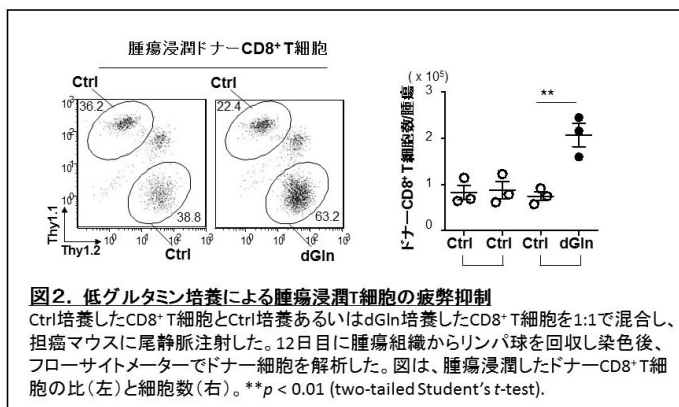
瘍効果について明らかにした。

#### 4. 研究成果

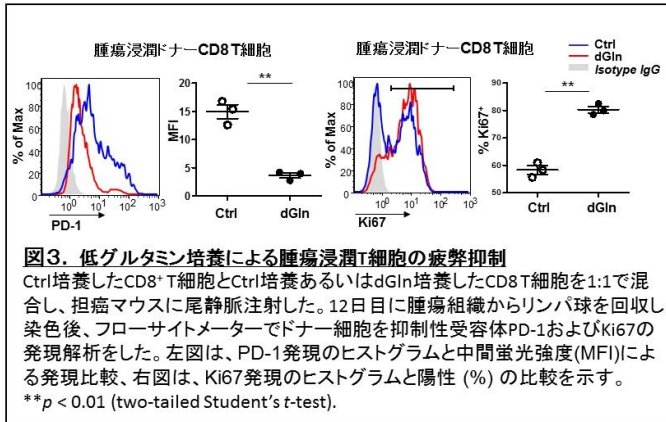
疑似抗原刺激による T 細胞の活性化後、通常培地(Comp.)で 4 日間培養 (Ctrl 培養) した OT-1 CD8 T 細胞と、低グルタミン培地で 3 日間プラス Comp. で 1 日間培養 (dGln 培養) した OT-1 CD8 T 細胞の抗腫瘍活性を比較するため、E.G7 細胞を皮下接種した担がんマウスに OT-1 CD8 T 細胞を移入した。その結果、移入しない場合 (-) に比べて、OT-1 CD8 T 細胞を移入した場合 (Ctrl, dGln) に腫瘍の成長抑制が見られた。また、dGln 培養した OT-1 CD8 T 細胞を移入したグループでは、Ctrl 培養した OT-1 CD8 T 細胞を移入したグループに比べて非常に効率よく腫瘍を抑制 (図 1A,B) することが分かり、さらに、dGln 培養によりマウスの高い生存率が観察された (図 1C)。この結果、グルタミン代謝抑制により、抗腫瘍免疫が増強されることが示された。



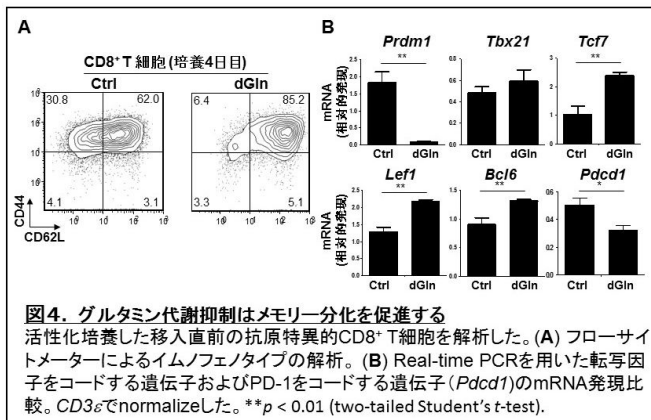
次に、グルタミン代謝の抑制が腫瘍特異的 CD8 T 細胞の増殖にどう影響するかを調べるため、Ctrl 培養した OT-1 CD8 T 細胞と dGln 培養した OT-1 CD8 T 細胞を同時に担がんマウスに移入し、腫瘍接種後 12 日目に腫瘍内の細胞数をフローサイトメトリーで比較解析した。その結果、Ctrl 培養に比べ dGln 培養した CD8 T 細胞数が有意に多く観察された (図 2)。



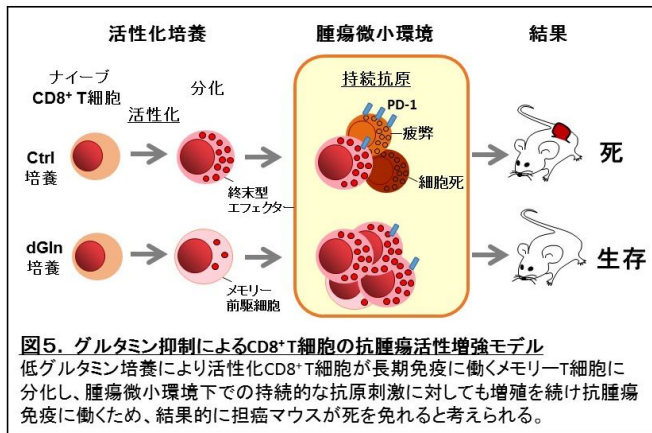
また、グルタミン代謝の抑制がどのようなメカニズムで CD8 T 細胞の抗腫瘍活性増強に働くかを調べるため、腫瘍接種後 12 日目に腫瘍に浸潤した CD8 T 細胞の疲弊マーカーPD-1 と増殖マーカーKi67 の発現について、フローサイトメトリーで解析した。その結果、dGln 培養による PD-1 の発現低下と Ki67 陽性細胞の増加が認められた (図 3)。以上の結果から、低グルタミン培養により、T 細胞疲弊が抑制され、T 細胞増殖が維持されることが示唆された。



dGln 培養により疲弊が抑制され、長期間の増殖維持につながることから、次に、培養後の CD8 T 細胞分化について解析した。まず、表面マーカーを用いてフローサイトメリーで解析したところ、dGln 培養により長期免疫につながる CD62L 高発現セントラルメモリー型細胞の割合が増加することが分かった (図 4 A)。さらに、それぞれの培養細胞から RNA を抽出し、CD8 T 細胞分化に重要な転写因子の mRNA 発現を解析したところ、Gln 培養ではエフェクター分化を示す *Prdm1* の発現が低く、メモリー分化を示す *Tcf7*, *Lef1*, *Bcl6* の発現が高いことが分かった (図 4 B)。



以上の結果をまとめると、今回の研究から我々は、細胞内エネルギー代謝抑制により、腫瘍免疫に働く CD8 T 細胞の抗腫瘍活性が増強することを明らかにした。グルタミンは細胞増殖に必須のアミノ酸であるが、過剰なグルタミン代謝は T 細胞の疲弊を招くことから、グルタミン代謝を抑制した CD8 T 細胞の培養を行ったところ、予想したとおり細胞の疲弊が抑制され、通常培養に比べて抗腫瘍活性が増強されることが明らかとなった。そのメカニズムとして、我々は、低グルタミン培養により CD8 T 細胞のメモリー分化が促進することを明らかにした。これまで、CD8 T 細胞のメモリー分化が抗腫瘍活性の維持に重要であることがすでに報告(文献 )されており、今回の結果とよく一致する。腫瘍特異的な CD8 T 細胞内のグルタミン代謝の抑制は、メモリー分化を促進し、腫瘍微小環境下でも疲弊を免れ増殖を続け、結果として効果的な腫瘍細胞の除去につながると思われる(図 5)。今回、我々が得たこれらの研究成果は、腫瘍特異的 CD8 T 細胞の養子免疫療法として将来、有効な培養方法になることが期待される。



### < 引用文献 >

Sledzinska A, Menger L, Bergerhoff K, Peggs KS, Quezada SA. Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy *Mol. Oncol.* Dec;9(10):1936-65, 2015

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.* Nov;197(10):4079-4089, 2016.

Suzuki J, Yamada T, Inoue K, Nabe S, Kuwahara M, Takemori N, Takemori A, Matsuda S, Kanoh M, Imai Y, Yasukawa M and Yamashita M. The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T cell dysfunction via metabolic restriction by targeting mTOR activation. *Nature Communications*, Aug 17;9: 3296, 2018.

Gattinoni, L., E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C. M. Paulos, M. F. Quigley, J. R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D. C. Douek, D. A. Price, C. H. June, F. M. Marincola, M. Roederer, and N. P. Restifo. 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* 17: 1290-1297.

Enamorado, M., S. Iborra, E. Priego, F. J. Cueto, J. A. Quintana, S. Martinez-Cano, E. Mejias-Perez, M. Esteban, I. Melero, A. Hidalgo, and D. Sancho. 2017. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat. Commun.* 8: 16073.

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Nabe S, Yamada T, Suzuki J, Toriyama K, **Yasuoka T**, Kuwahara M, Shiraishi A, Takenaka K, Yasukawa M, and Yamashita M. Reinforce the antitumor activity of CD8<sup>+</sup> T cells via glutamine restriction. *Cancer Science*, Dec, 109:3737-3750, 2018. 査読有  
 DOI: 10.1111/cas.13827

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
該当無し

(2)研究協力者  
該当なし

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、研究者個人に帰属されます。