

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16736

研究課題名（和文）腫瘍由来DAMPsによるT細胞の機能不全誘導メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名（英文）Metabolite secretome of necrotic tumor cells contributes to T cell dysfunction in cancer

研究代表者

日比野 沙奈（Hibino, Sana）

東京大学・先端科学技術研究センター・特別研究員

研究者番号：30836424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍局所は血管形成の異常により低酸素・低栄養の状態にあり、そのような過酷な微小環境へ暴露される結果、腫瘍組織内では大量の細胞死が生じる。本研究にて申請者は、ネクロシス癌細胞の代謝物セクレトームが、腫瘍局所におけるT細胞の機能抑制に寄与していることを明らかにした。特に、代表的ポリアミンであるSpermidineについて、これまで知られていた細胞内におけるオンコメタボライトとしての機能に加え、エフェクターT細胞応答のネガティブレギュレーターとしての細胞外における役割を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD8+ T細胞は抗腫瘍免疫応答の要となるが、固形がんの局所に浸潤しているT細胞の多くは、がんに対する攻撃力を失った“機能不全”状態にある。腫瘍浸潤T細胞が機能不全に至るプロセスの分子基盤、特にがん細胞側の因子の関与については未だ不明な点が多い。本研究より、腫瘍局所には細胞死を起こしたがん細胞から放出される免疫抑制性の低分子代謝物が豊富に存在し、CD8+ T細胞の機能抑制に寄与している可能性が示された。ネクロシス癌細胞の代謝物セクレトームは、がん免疫療法における新規治療標的として期待できる。

研究成果の概要（英文）： Solid tumors often undergo massive necrotic cell death during disease progression as a result of enforced exposure to the severe microenvironment such as hypoxia and nutrient starvation. Here we demonstrate that necrotic tumor cells release arrays of immunosuppressive metabolites into the extracellular fluids, which cooperatively inhibit T cell effector function. Notably, we elucidate a novel role for the major polyamine Spermidine; intracellular spermidine function as an essential metabolic fuel in growing cancer cells, but extracellular spermidine also contribute to tumor progression by dampening downstream T cell receptor signaling and c-Myc-driven effector programs under in vivo situations. Additionally, pharmacological inhibition of polyamine synthesis effectively invigorates tumor-infiltrating CD8+ T cells and breaks resistance to anti-PD-1 therapy in mice. Thus, targeting the “metabolite secretome” of necrotic tumor cells can be a promising approach in cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：T細胞 腫瘍免疫 オンコメタボライト ポリアミン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍局所は血管形成の異常により低酸素・低栄養の状態にあり、そうした過酷な微小環境へ暴露される結果、腫瘍組織内では大量の細胞死が生じる。ヒト固形癌組織における壊死(ネクローシス)細胞領域の拡大は、進行性固形癌に特徴的な病理学的所見の1つであり、多くの癌種において患者の予後不良と相関する(Richards et al. Future Oncol. 2011)。我々のグループはこれまでに、病態進展の過程で壊死を起こした癌細胞が放出する脂質や核内タンパク質が、マクロファージや好中球といった自然免疫細胞の機能制御を介して抗腫瘍免疫応答を抑制し、腫瘍増殖を促進することを明らかにしてきた(Hangai et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016、未発表データを含む)。一方で、死細胞由来因子が、進行性固形癌のコントロールにおいて要となるCD8+ T細胞が主体の獲得免疫応答に対して直接的に与える影響については、ほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、がん死細胞が放出する分子群の中から T 細胞機能の新規制御因子を同定し、その機能解析を通じて、難治・進行性固形癌の新規治療法の開発に向けた分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

癌細胞に対するネクローシス細胞死の誘導は、i)凍結融解、ii)低酸素、iii)低栄養(グルコース欠乏)の3種類の方法で実施した。それぞれの実験より得られたネクローシス細胞上清について、キャピラリー電気泳動(CE)と質量分析計(TOF-MS)を組み合わせたCE-TOFMSシステムによる網羅的メタボローム解析を実施した。

In vitro の T 細胞アッセイについては、C57BL/6 マウスの脾臓及びリンパ節より単離した T 細胞を、抗 CD3/CD28 を表面に結合した磁気ビーズ及び IL-2 の存在下で培養した。T 細胞機能については、エフェクターサイトカイン(IFN- γ , IL-2, TNF- α)の産生、及び細胞増殖マーカーKi-67の発現をフローサイトメトリー(FACS)法により検討し、これらの陽性細胞の割合(%)を指標に評価した。In vivo の T 細胞アッセイについては、抗 CD3 抗体(145-2C11)のマウス腹腔内投与の実験系を用いて実施した。また、T 細胞の網羅的遺伝子発現解析には、Mouse Clariom S Array を利用した。

In vivo のマウス腫瘍モデルについては、マウス癌細胞株の同種移植の系を用いて実験を行った。定期的に腫瘍径を測定することで、腫瘍増殖のモニタリングを行った。一定期間後、安楽死させた担癌マウスから単離した腫瘍組織より single cell suspension を調製し、前述と同様に、FACS により腫瘍浸潤 T 細胞の phenotype 解析を実施した。

4. 研究成果

実験的にネクローシスを誘導したマウス悪性黒色腫 B16F10 細胞から放出される分子群より、T 細胞機能の抑制因子の探索を行ったところ、非タンパク質の水溶性低分子分画が *in vitro* で T 細胞の増殖・エフェクター活性を顕著に抑制することを見出した。そこで、網羅的メタボローム解析を実施した結果、ネクローシス癌細胞は複数の免疫抑制性メタボライトを放出し、それらが協調的に作用し T 細胞機能を負に制御することが明らかになった。また、それらのメタボライトはいずれも腫瘍間質液中に高濃度で検出されたことから、ネクローシス癌細胞の代謝物セクレトームが、実際に腫瘍局所における T 細胞の機能抑制に寄与している可能性が示された。

続いて、定義した代謝物セクレトームのうち、既知のオンコメタボライトである Spermidine に着目した。Spermidine は細胞の増殖・生存に必須のメタボライトであるポリアミンの1つであり、癌細胞内において正常組織に比べて高濃度で存在することや、癌患者の尿や唾液中にも高値で検出され、癌のバイオマーカーともなりうる事が数多く報告されている。一方で、細胞外 Spermidine の生物学的意義及び機能、特に、抗腫瘍免疫応答に対して与える影響については未だ明らかになっていない。そこで我々は、細胞外 Spermidine が *in vivo* の T 細胞応答に与える影響について検討を行った。PBS もしくは Spermidine を前投与した Balb/c マウスに抗 CD3 抗体を投与し、*in vivo* で T 細胞のポリクローナルな活性化を誘導したところ、Spermidine 投与群では、IFN- γ や IL-2 といった T 細胞性サイトカインの血中への放出が劇的に減少していたのに加え、脾臓内 T 細胞においても、T cell receptor (TCR) 下流シグナルの伝達強度の指標である Nur77 (Nr4a1)の発現誘導の顕著な抑制が確認された。そこで、Spermidine が *in vivo* T 細胞応答を抑制する分子メカニズムを解明するため、前述のマウスモデルの脾臓より単離した T 細胞について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。Spermidine 投与により発現が変動していた遺伝子群に対して、MSigDB より入手した Hallmark 及び Transcription factor target の遺伝子セットについてエンリッチメント解析を実施し、その結果を統合的に解釈したところ、転写因子 C-myc により制御される mRNA のプロセッシングやリボソーム生合成のプロセスが Spermidine の主要な作用標的であることが明らかになった。C-myc 下流のこれらのイベントは、T 細胞が活性化しエフェクター活性を獲得する上で必須であり、抗 PD-1 抗体を含む癌免疫療法後に T 細胞内

で活性化される生物学的事象の1つであることも明らかになっている (Buchan et al. Clin Cancer Res. 2018)。興味深いことに、Spermidine の前駆体のポリアミンである Putrescine が、*in vitro* で膀胱癌細胞株に対して C-myc タンパク質の degradation を誘導するとの報告があることから (Murai et al. Sci Rep. 2018)、我々の見出した事象も類似したメカニズムに基づいている可能性もあり、今後の検討課題とする。

続いて、実際に癌細胞によるポリアミン合成をブロックすることで抗腫瘍 T 細胞応答が賦活化され、癌免疫療法の治療効果を高めることが可能か否か、B16F10 細胞のマウス皮下移植モデルを用いて検討を行った。ポリアミン合成過程の律速酵素である ornithine decarboxylase (ODC) の阻害剤である Difluoromethylornithine (DFMO) を、腫瘍移植後 7 日目より 8 日間連続で腹腔内投与したところ、腫瘍増殖には変化はなかったものの、腫瘍浸潤 CD8⁺T 細胞の顕著な増加や、そのエフェクター活性の亢進が認められた。また、B16F10 の移植モデルは抗 PD-1 抗体による治療に抵抗性を示すが、DFMO と抗 PD-1 抗体を併用投与することで、顕著に腫瘍増殖が抑制され、両者が相乗効果を発揮することが示された。

このように、本研究では、がん死細胞が放出するメタボライト、特に Spermidine を、腫瘍局所における T 細胞機能の新規ネガティブレギュレーターとして見出すことができた。がん死細胞の代謝物セクレトームは、癌免疫療法の新たな治療標的として今後期待できるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Senda Naoyuki, Yanai Hideyuki, Hibino Sana, Li Lei, Mizushima Yu, Miyagaki Tomomitsu, Saeki Mai, Kishi Yusuke, Hangai Sho, Nishio Junko, Sugaya Makoto, Taniguchi Tadatsugu, Sato Shinichi	4. 巻 118
2. 論文標題 HMGB1-mediated chromatin remodeling attenuates IL24 gene expression for the protection from allergic contact dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2022343118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2022343118	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 Hibino Sana, Kawazoe Tetsuro, Kasahara Hidenori, Itoh Shinji, Ishimoto Takatsugu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Taniguchi Koji	4. 巻 22
2. 論文標題 Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5421 ~ 5421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22115421	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日比野 沙奈、柳井 秀元
2. 発表標題 ネクローシス癌細胞が放出する低分子代謝物による、抗腫瘍T細胞免疫応答の制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第一回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日比野 沙奈、柳井 秀元
2. 発表標題 ネクローシス癌細胞から放出されるオンコメタボライトが、T細胞機能の制御におけるチェックポイントとして機能する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日比野 沙奈、柳井 秀元
2. 発表標題 ネクロシス癌細胞が放出するオンコメタボライトによる、抗腫瘍T細胞免疫応答の制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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