

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16881

研究課題名(和文)PD-1阻害による抗腫瘍効果の最大化を目指したTr2細胞の応用性の解析

研究課題名(英文)Evaluation of Tr2 cells to maximize the efficiency of PD-1 blockade in tumor immunity

研究代表者

但馬 正樹(Tajima, Masaki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50815032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌に対する免疫チェックポイント阻害治療において、免疫関連副作用の発症リスクをコントロールすることは腫瘍治療効果を最大化するための課題となっている。本研究では、免疫抑制サイトカインであるIL-10を高産生するTr2細胞が誘導されるための分子基盤としてIL-4/STAT6/GATA3経路およびa-KG/mTOR/CEBPb経路の重要性を明らかにした。また、マウス癌モデルにてこれらのシグナル経路を活性化させたところ、抗腫瘍効果を維持しながら免疫関連副作用の抑制効果を有することを確認した。このことは、免疫チェックポイント阻害の副作用に対する新たな治療戦略の創出につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、免疫関連副作用によって免疫チェックポイント阻害治療が制限されてしまう癌患者において、抗腫瘍効果が担保された上で自己免疫応答が抑制可能な治療アプローチの可能性を示すことができた。また、免疫チェックポイント阻害治療による抗腫瘍効果および免疫関連副作用を同一個体で解析することが可能なマウスモデルを確立した。これにより癌免疫応答および自己免疫応答の連関を検討することが容易となり、今後免疫チェックポイント阻害の効果を最大化するための癌治療戦略の創出を目的とした基礎研究に有用な病態モデルであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint blockade is one of the most promising therapeutic applications for treating cancer patients. However, managing the risk of immune-related adverse effects (irAE) in these patients is essential for maximal anti-tumor responses. In this study, the potent immunosuppressive function of IL-10-producing CD4+ T cell subset (Tr2) to ameliorate irAEs was evaluated by using tumor-bearing NOD mice injected with PD-1 blocking antibody, which develops severe type-1 diabetes. By activating IL-4/STAT6/GATA3 pathway together with a-KG/mTOR/CEBPb pathway by Zymosan-Depleted (Dectin-1 ligand) injection, these mice showed strong resistance to type-1 diabetes compared to control, without any negative effect on anti-tumor responses. This suggests the therapeutic potential of Tr2 cells for treating irAEs in cancer patients under immune checkpoint therapy.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 免疫代謝 IL-10 Dectin-1

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬の主要な作用機序は、免疫のブレーキである分子を阻害することで相対的にアクセルの強度を増強し、抗腫瘍効果を誘導するものである。しかしながらこの免疫のブレーキの解除は癌に対する免疫応答を惹起するだけではなく、本来は PD-1 によって維持されている免疫恒常性の破綻をもたらし、自己に対する免疫応答をも惹起するリスクをはらんでいる。実際、約 80 % の抗 PD-1 抗体投与患者で間質性肺炎、皮膚障害、糖尿病など、なんらかの副作用の症状が見られ、最悪の場合これらの有害事象によって投薬が中止されることもある。このことから免疫チェックポイント阻害の効果を最大化するストラテジーとして、①抗腫瘍メカニズムの異なる薬剤との併用、②自己組織への免疫応答の抑制、の2点が考えられる。①に関しては世界中でさまざまな薬剤との併用療法が試みられ、膨大な数の臨床試験が実施されている。その反面、②については、副作用のコントロールに主眼をおいた研究は非常に少ないのが現状であった。このことから、免疫チェックポイント阻害の効果を最大化することをゴールとして、免疫関連副作用の発症抑制および病態のコントロール方法を確立することを目的に本プロジェクトに着手した。

2. 研究の目的

申請者は IL-10 を高産生する新規抑制性 T 細胞サブセットとして Tr2 細胞を同定し、その免疫抑制メカニズムの解析を行ってきた。Tr2 細胞は樹状細胞上の糖鎖認識受容体である C-type lectin レセプターからのシグナル伝達によって誘導され、免疫抑制サイトカインである IL-10 を高産生する。その分子メカニズムとして 1 IL-4-STAT6-GATA3 pathway および 2 mTOR-C/EBP β pathway が同時に活性化することにより IL-10 産性能が付与されており、これは Th2 細胞や Tr1 細胞のような IL-10 産生が確認されている他のヘルパー T 細胞サブセットでは見られないユニークなものであった。そこで、Tr2 細胞を誘導することが免疫チェックポイント阻害に伴う免疫関連副作用の治療ターゲットになりうるかを検討した。

また、IL-10 が強力な免疫抑制能を有する一方、癌微小環境においてはむしろ免疫賦活による CD8⁺T 細胞の抗腫瘍効果をもたらすことも報告されている。この相反する性質を鑑みると、IL-10 が免疫チェックポイント阻害による抗腫瘍効果を増強すると同時に、自己組織に対する免疫応答を抑制することで副作用を低減できる可能性を示唆している。本研究ではがん治療における免疫チェックポイント阻害薬の効果を最大限に得るために、免疫賦活化 / 免疫抑制化のバランスを人為的に制御可能かどうか、Tr2 細胞を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Tr2 細胞を効率よく誘導するための詳細な分子基盤の同定を目的として、質量分析を用いた IL-10 産生機能の活性化に關与する代謝経路の同定を試みた。さらに、C-type lectin レセプター刺激を受けた樹状細胞の転写プロファイルの変化を解析するために、Dectin-1 リガンドとして知られている Zymosan Depleted もしくは *C. albicans* (酵母型・菌糸型) とともに培養し、RNA-sequence を行った。

免疫チェックポイント阻害治療を行った癌患者で起こる免疫関連副作用をマウスで再現するために、1 型糖尿病を自然発症することが知られている NOD (Non-obese diabetes) マウスをベースとした病態モデルを作成した。NOD マウスにおいて PD-1 阻害を起こすと 1 型糖尿病を誘導できることが広く知られている。このマウスに腫瘍を接種して PD-1 阻害をすることにより、抗腫瘍効果を解析しながら 1 型糖尿病の病態を評価することが理論上可能である。しかしながら、NOD マウスはユニークな MHC のハプロタイプを有しており、既存の癌細胞を使用できないため、本研究において NOD マウスに接種可能な新たな癌細胞の作成を試みた。NOD マウスに強力な発癌剤である 3-メチルコラントレンを皮内投与し、数か月経過観察をしたのちに腫瘍を形成したものを回収しそれらを培養した。これらの癌細胞を、再度 NOD マウスに接種して腫瘍形成能を有するものを取得した。これを用いて、Dectin-1 刺激で誘導される IL-10 が免疫チェックポイント阻害と協調的に抗腫瘍効果を作動しうるか、さらには免疫関連副作用の発症を抑制することが期待できるかについて解析を行った。

4. 研究成果

Tr2 細胞を誘導する代謝経路の同定のために質量分析を行なった結果、グルタミン代謝が亢進していることが明らかになった。グルタミン代謝の中間体である α -ケトグルタル酸(α -KG)は mTOR

シグナルを活性化することがすでに知られている。ここで、Tr2 細胞の誘導には mTOR を介した C/EBP β の発現制御が重要であることが以前の解析から認められたことから、 α -KG を主体とした mTOR の活性化が Tr2 細胞からの IL-10 産生を誘導している可能性が示唆された。この仮説を検討することを目的に、 α -KG アナログ (DMK) を用いて IL-4 とともに CD4⁺T 細胞を刺激したところ、mTOR 活性の上昇および高い IL-10 産生能を誘導することを確認した。さらにはグルタミン代謝の中核を担う酵素である Glutaminase の活性を阻害したところ、強い IL-10 産生抑制が認められた。このことから、この Tr2 細胞はグルタミン代謝によって産生される α -KG が mTOR 活性を誘導することを明らかにした。

Tr2 細胞を誘導するために、樹状細胞が Dectin-1 刺激を何らかの因子を介して T 細胞へと伝達していることが分かっているが、これを同定するために樹状細胞の RNA-sequence を行った。異なる Dectin-1 刺激を加えた樹状細胞において、共通した遺伝子発現パターンを示すものを探索したところ、Inhibin beta-A が顕著に発現上昇していることを認めた。この Inhibin beta-A は Activin A および Inhibin A のサブユニットであり、T 細胞上で発現している受容体 ALK4/5 からのシグナルを介して Glutaminase の発現制御に関わっていることから、ALK4/5 に対する阻害剤を投与したところ Tr2 細胞からの IL-10 産生を著しく抑制することができた。このことから、Inhibin beta-A が Tr2 細胞誘導の重要な因子であることが示唆された。

Tr2 細胞が *in vivo* で免疫抑制能を有するかを確認するために、PD-1 阻害によって誘導される NOD マウスの 1 型糖尿病モデルを用いて、Dectin-1 リガンドである Zymosan Depleted 投与が病態発症に影響があるかを検討した。Zymosan Depleted の投与により、1 型糖尿病の発症は著しく改善され、Dectin-1 刺激が生体内で免疫抑制能を付与していることを明らかにした。

NOD マウスを用いて、抗腫瘍効果と免疫関連副作用の発症を同時に評価するモデルを作成するために、NOD マウスに摂腫可能な癌細胞ラインを十数種類作成した。これらを実際に NOD マウスに接種し、PD-1 阻害による抗腫瘍効果を検討すると、完全に腫瘍消失するものや、ほとんど抗腫瘍効果が認められないものなど、パラエティーに富む癌パネルであることが確認できた。これらの癌細胞に対する PD-1 阻害による抗腫瘍効果と 1 型糖尿病の発症を同時に検討したところ、PD-1 阻害抗体投与によって腫瘍縮小が認められた個体においては 1 型糖尿病の症状を呈しており、一方、PD-1 阻害抗体投与によって腫瘍退縮が確認できなかった個体においては血糖値の上昇も認められなかった。臨床において、自己免疫疾患の既往歴がある癌患者が免疫関連副作用発症のリスクが高いことが知られている。さらには免疫関連副作用を発症する癌患者の方が免疫チェックポイント阻害による抗腫瘍効果が高いことも明らかになっている。つまり、本マウスモデルで見られる症状はこれらの臨床知見を反映していると考えられ、PD-1 阻害による抗腫瘍免疫応答と自己免疫応答の連関を評価するのに有用であると考えられる。

取得した癌パネルの中で、PD-1 阻害効果が認められる癌腫を選抜し、PD-1 阻害抗体とともに Zymosan Depleted を投与した。PD-1 阻害抗体によって認められる抗腫瘍効果は Zymosan Depleted 投与で変化はなかったが、1 型糖尿病の発症は約 50% 程度に抑制することができた。Zymosan Depleted による 1 型糖尿病発症の抑制は特に実験開始後 20 日以降で顕著であることから、慢性的な炎症が引き起こす病態に特に有効であることが示唆された。

これらの結果から、Dectin-1 シグナルを介して誘導される IL-10 産生性のヘルパー T 細胞である Tr2 細胞が、自己免疫疾患および免疫チェックポイント阻害に付随して発症する免疫関連副作用の抑制が期待できることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、免疫チェックポイント阻害による抗腫瘍効果を最大化するためのストラテジーとして応用できる可能性を示すものである。

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 0件）

1. 著者名 Chamoto Kenji, Yaguchi Tomonori, Tajima Masaki, Honjo Tasuku	4. 巻 -
2. 論文標題 Insights from a 30-year journey: function, regulation and therapeutic modulation of PD1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41577-023-00867-9	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 Tajima Masaki, Strober Warren	4. 巻 2
2. 論文標題 Evaluation of Glutaminolysis in T Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpz1.540	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 但馬正樹
2. 発表標題 Glutaminolysis-induced mTOR-C/EBP β signaling drives the differentiation of IL-10-producing regulatory T cells
3. 学会等名 日本免疫学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 但馬正樹
2. 発表標題 全身性真菌感染症によって誘導される IL-10 高産生新規ヘルパーT 細胞サブセットTr2 の同定
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------