

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07651

研究課題名（和文）細胞リプログラミングを用いたT細胞疲弊解除の分子機構の解析

研究課題名（英文）Development of novel T cell rejuvenation approach utilizing partial reprogramming

研究代表者

大内 靖夫（Yasuo, Ouchi）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70553858

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）：近年、がん免疫療法は「第四の治療法」として注目されている。しかし、治療効果は限定的であり、T細胞の疲弊がその効果を減弱させる要因とされている。本研究では山中4因子を一過性に発現させて部分的初期化を誘導することでT細胞の疲弊を解除し、がん免疫細胞療法のための新しいT細胞若返り技術を開発することを目指した。その結果、マウスモデルにおいて部分的初期化によりT細胞の増殖が誘導され、疲弊マーカーが減少し、抗腫瘍活性が向上することが示された。またヒトT細胞でも同様の効果が確認された。以上の結果よりT細胞における山中4因子を用いた部分的初期化はT細胞の若返りを誘導でき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

本研究はこれまで不可逆的な細胞変化であると考えられてきたT細胞の疲弊、老化は山中4因子の一過性発現による部分的初期化により若返りさせることができる可能性を示した研究成果である。この発見は近年「第四の治療法」として注目されているがん免疫療法において、がん患者、高齢者において疲弊しているT細胞を若返らせる技術として応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In recent years, cancer immunotherapy has been recognized as the "fourth therapy." However, its effectiveness is limited due to T cell exhaustion. This study aimed to develop a novel T cell rejuvenation technique for cancer immunotherapy by transiently expressing Yamanaka 4 factors and inducing partial reprogramming to alleviate T cell exhaustion. The findings demonstrated that partial reprogramming led to T cell proliferation, reduced exhaustion markers, and increased anti-tumor activity in mice. Similar effects were observed in human T cells, suggesting that partial T cell initialization with Yamanaka 4 factors could rejuvenate T cells.

研究分野：免疫学、幹細胞生物学、加齢医学

キーワード：がん免疫療法 部分的初期化 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん免疫療法の有効性が示されたことで免疫細胞療法が注目されている。本治療法では(1)免疫 checkpoint 阻害剤を用いた免疫の活性化、(2) ウイルスベクターを用いて作成した TCR 遺伝子改変 T 細胞やキメラ抗原受容体導入 T 細胞を利用した治療法が、次世代がん治療法として注目されている。しかし、これらのがん免疫療法の効果は限定的であり、がん微小環境や老化に伴う T 細胞の抗腫瘍活性の減弱化が要因であると考えられており、近年、T 細胞の疲弊および老化の分子機構の解析が世界的に精力的に研究が進められている(Khan O et al., Nature 2019, Chen J et al., Nature 2019, Wherry EJ, Nat Immunol 2011)。これらの老化、がんの発症に伴う T 細胞の疲弊はこれまでの研究からエピジェネティックな変化によって誘導されると考えられており、サイトカイン、免疫チェックポイント阻害剤などでは完全に解除できないことから不可逆的な細胞機能の変化であると考えられている。特に近年、超高齢化社会を迎えた我が国ではがん患者の平均年齢は約 68.5 歳と高くなっており、T 細胞の老化はがん治療の効果を減弱化させる大きな要因の一つであると考えられる。一方、米国 Salk 研究所の共同研究者らはこれまでに Partial Reprogramming (部分的細胞初期化) 技術、すなわち全身で一過性に山中 4 因子を発現させて、老化に伴うエピジェネティックな特質を消去・再構成する細胞リプログラミングを部分的に誘導することで早老症モデルマウスの寿命を大幅に伸ばせることを明らかにした (Oscampo et al., Cell 2016)。本研究成果は山中 4 因子を用いて一過性かつ部分的に細胞初期化を誘導することで、細胞の分化状態を維持したまま細胞老化に伴うエピジェネティックな変化を除去し、細胞老化を抑制できることを示唆した研究成果である。この発見はこれまで不可逆的であると考えられてきた様々な細胞の老化や疲弊を細胞の分化状態の初期化を介さずに解除できる可能性を示している。今後より細胞レベルでより詳細な下流の分子機構を解明することで新たな細胞機能再生方法の開発につながる知見が得られると期待されており、様々な細胞種で精力的に研究が進められている。

2. 研究の目的

本研究課題では海外共同研究者の開発した Partial Reprogramming 技術を用いて再生させた T 細胞の機能解析およびその分子機構を解明することで、老化やがんの発症に伴う T 細胞の疲弊を解除する方法を明らかにし、効果的ながん免疫細胞療法の確立に有効な新規の T 細胞再生技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、前述の研究目的を達成するために、海外共同研究者の保有する Dox inducible 4F Tg マウスを活用し、T 細胞において一過性に山中 4 因子を発現させて部分的細胞初期化を誘導する。部分的細胞初期化を誘導したマウス T 細胞に対して以下の *in vitro*, *in vivo*, RNAseq による解析を行うことで、部分的細胞初期化の T 細胞疲弊に対する効果とその応用方法の開発を行なった。

- (1) 部分的細胞初期化 CD8(+)T 細胞の *in vitro* における抗腫瘍活性の評価
- (2) 部分的細胞初期化 CD8(+)T 細胞の *in vivo* における抗腫瘍活性の評価
- (3) 部分的細胞初期化による T 細胞疲弊解除の分子機構の解明および下流因子の同定
- (4) 同定した下流因子を標的とした CD8(+)T 細胞の老化・疲弊解除方法の開発

4. 研究成果

研究計画に従い、Salk 研究所 Juan Carlos Izpisua Belmonte 教授との共同研究を開始し、Tet-On システムを用いて DOX 投与依存的に全身性に山中 4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) を発現する遺伝子改変マウス (4F-Tg マウス) を入手し、本マウス (若齢、2 ヶ月齢) 脾臓より調整した CD8(+)T 細胞に対して、部分的細胞初期化を施し、細胞増殖、細胞表面抗原、抗腫瘍活性の解析を行なった。その結果、4F(-/+)-Tg マウス由来 CD8(+)T 細胞に対して CD3/CD28 刺激後 3 日目より 3 日間 DOX 投与、2 日間 DOX 非投与のサイクルで部分的細胞初期化を行ったところ、CD8(+)T 細胞の分化マーカーの発現を変化させることなく、早期疲弊マーカーである PD-1 の発現が抑制されることが明らかとなった。また部分的細胞初期化によって細胞の生存能が高まり、細胞増殖が長期維持できることを明らかにした。さらに本マウス (2 ヶ月齢) より調整した CD8(+)T 細胞に対して、レトロウイルスを用いて mCD19-CAR 遺伝子を導入し、DOX 投与により部分的細胞初期化を施し、1 週間後に mCD19 遺伝子安定発現 B16F10メラノーマ細胞に対する *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍活性の評価を行なった。その結果、部分的細胞初期化を施した CAR-T 細胞は非処理の細胞に対して高い抗腫瘍活性を有していることが明らかになった。続いてこの分子機構を明らかにするため研究計画に従い、本 Dox 依存性に山中 4 因子を発現する遺伝子改変マウス由来 CD8(+)T 細胞の機能およびトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、部分的初期化により細胞増殖の誘導、Stem-like memory T 細胞のマーカーとして知られている転写因子 TCF7 やナイーブ・メモリー T 細胞のマーカーである BTLA, CD62L, IL7R 遺伝子などの発現上昇、PD-1, Tim3 などの様々な T 細胞疲弊マーカーの減弱が確認された。さらには発現変

動の認められた遺伝子に対して GO 解析を行なった結果、部分的初期化によりアポトーシス、ストレス応答関連遺伝子の発現が低下し、免疫応答関連遺伝子の発現が上昇することが確認された。これらの結果から山中 4 因子の一過性発現による部分的初期化はマウス T 細胞の疲弊を抑制し、長期生存能を向上させることが明らかになった。

本研究成果で得られた新たな T 細胞の若返り方法をヒトに応用するため、ヒト山中 4 因子の mRNA を *in vitro* transcription 法で調製し、電気穿孔法を用いてヒト T 細胞に導入し、部分的初期化による細胞若返りの分子機構を解明するための研究を進めた。その結果、山中 4 因子の mRNA を導入したヒト T 細胞においてもマウスと同様に TCF7 の発現が 1 週間後に増加し、細胞増殖の誘導、T 細胞疲弊マーカーが減弱することが確認された。これらの結果より、山中 4 因子の一過性発現による部分的初期化は、マウス、ヒトにおける老化・疲弊 T 細胞の再生においても有効である可能性が示唆された。

最終年度、これらの研究成果に基づき、下流転写因子 TCF7 などを用いて部分的初期化処理をした T 細胞のさらなる機能解析を進める計画であったが、令和 4 年度に本研究開発と同様の技術が米国のがん免疫療法企業に学会発表された。興味深いことに本学会発表では彼らは山中 4 因子を搭載したセンダイウイルスを用いて部分的初期化したヒト T 細胞の機能の若返りを報告しており、T 細胞の疲弊マーカーの減弱、細胞増殖の亢進、抗腫瘍活性の亢進など本研究課題で得た私の発見と同様の知見を報告しており、さらには山中 4 因子を用いた部分的初期化の下流の標的分子として私と同様に TCF7 の発現上昇を報告していた。さらにはこの発見に関わる特許も公開されてしまったため、研究費の執行を一時停止して年度終了時まで研究計画の見直しを図った。しかし、本研究成果の学術発表と将来的な産業利用が困難な状況にあったことから年度終了をもって研究を終了した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato H, Maezawa Y, Ouchi Y, Takayama N, Sone M, Sone K, Takada-Watanabe A, Tsujimura K, Koshizaka M, Nagasawa S, Saitoh H, Ohtaka M, Nakanishi M, Tahara H, Shimamoto A, Iwama A, Eto K, Yokote K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of disease-specific and CRISPR/Cas9-mediated gene-corrected iPS cells from a patient with adult progeria Werner syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 102360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102360.	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 Kanno T, Nakajima T, Yokoyama S, Asou HK, Sasamoto S, Kamii Y, Hayashizaki K, Ouchi Y, Onodera T, Takahashi Y, Ikeda K, Hasegawa Y, Kinjo Y, Ohara O, Nakayama T, Endo Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 SCD2-mediated monounsaturated fatty acid metabolism regulates cGAS-STING-dependent type I IFN responses in CD4+ T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02310-y.	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 Ouchi Y, Sahu S, Belmonte JCI	4. 巻 -
2. 論文標題 FoxM1 delays senescence and extends lifespan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	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） なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Usui-Ouchi A, Eade K, Giles S, Ideguchi Y, Ouchi Y, Aguilar E, Guoqin W, Marra K, Berlow R, Friedlander M	4. 巻 -
2. 論文標題 Deletion of Tgf signal in activated microglia prolongs hypoxia-induced retinal neovascularization enhancing Igf1 expression and retinal leukostasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 GLIA	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） なし	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 Kato H, Maezawa Y, Takayama N, Ouchi Y, Kaneko H, Kinoshita D, Takada-Watanabe A, Oshima M, Koshizaka M, Ogata H, Kubota Y, Mitsukawa N, Eto K, Iwama A, Yokote K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Fibroblasts from different body parts exhibit distinct phenotypes in adult progeria Werner syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY)	6. 最初と最後の頁 4946-4961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.202696.	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 老化の評価方法	発明者 大内靖夫、加藤尚也、横手幸太郎、江藤浩之、金子ひよ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-097552	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アンチセンスオリゴマー	発明者 大内靖夫、加藤尚也、横手幸太郎、江藤浩之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-81389	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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			
米国	Salk Institute of Biological Studies			