

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：26301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07680

研究課題名（和文）腫瘍特異的T細胞のエピジェネティック制御による抗腫瘍活性の増強

研究課題名（英文）Enhancement of antitumor activity by epigenetic regulation of tumor-specific T cells

研究代表者

山田 武司（Takeshi, Yamada）

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：40333554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストンH3K27脱メチル化酵素を阻害する薬剤GSK-J4を用いたマウスCD8 T細胞の培養実験を行ったところ、T細胞の疲弊が抑えられ、長期免疫に働くメモリー分化が促進することが明らかとなった。またさらに、この脱メチル化酵素を活性化するグルタミン代謝経路の阻害剤BPTESでも同様の効果が得られる事を明らかにした。これらの成果を元に、実際に抗腫瘍効果が上がるかについて、担がんマウスを用いて調べた結果、GSK-J4あるいはBPTESを添加培養したCD8 T細胞を移入したグループでは、コントロール培養したCD8 T細胞を移入したグループに比べて、腫瘍増殖が効率よく抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期免疫の獲得に重要な記憶（メモリー）T細胞分化の誘導は、難治性がん克服のための重要な研究課題と考えられる。実用的なワクチンや免疫療法の開発を行う上で、T細胞分化メカニズムの理解は不可欠であるが、その分化を制御するエピジェネティック調節機構については、まだ明らかとなっていない。そこで本研究は、CD8 T細胞におけるヒストン脱メチル化酵素の役割に焦点を当てた解析を行い、エピジェネティック変化によるメモリーCD8 T細胞分化の制御メカニズムの一部を明らかにした。これらの成果は、エピジェネティック調節をすることで人為的にT細胞分化制御を行い、腫瘍に対する長期免疫を誘導できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Our culture experiment of mouse CD8 T cells using GSK-J4, a drug that inhibits histone H3K27 demethylase, revealed that T cell exhaustion was suppressed and memory differentiation, which plays a role in long-term immunity, was promoted. Furthermore, we clarified that BPTES, an inhibitor of the glutamine metabolic pathway that activates this demethylase, has the same effect. Based on these results, we used tumor-bearing mice to investigate whether the antitumor effect of CD8 T cells adoptive transferred into the mice was actually increased by the use of these inhibitors. We confirmed that tumor growth was suppressed more efficiently in the group of CD8 T cells cultured with GSK-J4 or BPTES than in the group of control CD8 T cells cultured without any inhibitors.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：抗腫瘍免疫 CD8 T細胞 エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性腫瘍に対する T 細胞免疫療法の開発が積極的に行われ、難治性がんの治療を目的とした養子免疫療法の臨床への応用が進んでいる。しかし、患者体外で活性化培養される T 細胞は、しばしば疲弊状態に陥り治療効果を十分発揮できないという問題がある。養子免疫療法で高い治療効果を得るには、抗腫瘍活性が長期にわたり持続する手法の開発が不可欠である。この課題に対し、我々は、先行研究でほとんど着眼されてこなかった「T 細胞の培養法を改善することで、T 細胞の疲弊が抑制できるのではないか」という仮説をたてた。これまでの研究から我々は、T 細胞の活性化培養で生じるグルタミン代謝の亢進が、エピジェネティック変化をひきおこし、T 細胞疲弊を誘発することをすでに明らかにしている。本研究ではこの研究成果をさらに発展させ、エピジェネティック制御により T 細胞疲弊を抑制する手法の開発をめざし、本研究の最終段階では、従来よりも抗腫瘍効果の高い T 細胞免疫療法のプロトコル提案を目標とした。

2. 研究の目的

これまで腫瘍排除を目的とした養子免疫療法では、腫瘍特異的 T 細胞の活性化と増殖に重点が置かれ、疲弊による抗腫瘍活性の低下については、あまり考慮されてこなかった。そこで本研究では、活性化 T 細胞の培養法を改善することにより、T 細胞疲弊を抑制し、抗腫瘍活性の高い養子免疫療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、悪性腫瘍に対する効果的な T 細胞免疫療法を開発するため、養子免疫として使用する CD8 T 細胞のエピジェネティック制御による培養法の確立をめざす。これに向け、3 年の研究期間を設定し、以下の実験を行った。

(1) 薬剤処理による抗腫瘍活性の増強効果の検討

まず初年度は、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素の阻害剤である GSK-J4、あるいはグルタミン代謝阻害剤 BPTES を用いた腫瘍特異的 CD8 T 細胞の培養を行い、グルタミン代謝を介したエピジェネティック制御による抗腫瘍活性の増強において最適な培養条件を検討する。具体的には、疑似抗原としてニワトリ卵白アルブミン OVA を発現する胸腺腫瘍細胞 (E.G7) をマウスの皮下に接種して作製した担がんマウスモデルを用いた抗腫瘍解析を行う。養子免疫として使用する腫瘍特異的 CD8 T 細胞に関しては、OVA を認識する OT-1 トランスジェニックマウス由来の CD8 T 細胞を用い、T 細胞活性化の条件下で薬剤の添加培養をしたのち、担がんマウスに移入し、経時的に腫瘍サイズを計測することで、T 細胞の抗腫瘍活性を測定する。CD8 T 細胞の培養条件を変えながら抗腫瘍活性の比較を行うことで、薬剤の添加する濃度や期間、細胞数など最適となる培養条件を明らかにする。

(2) 薬剤処理による抗腫瘍活性の増強メカニズムの解明

次年度には、実験 1 の結果を踏まえて、最適となる条件下で培養した CD8 T 細胞における変化を明らかにするため、培養細胞を用いた細胞の増殖や分化についてフローサイトメーターを用いた詳細な解析をする。また、担がんマウスから腫瘍に浸潤した移入 T 細胞を採取して同様の解析を行い、薬剤 GSK-J4 や BPTES の添加培養による抗腫瘍活性の増強メカニズムを明らかにする。さらに、薬剤処理によりエピジェネティック制御される遺伝子を解析するため、薬剤を添加培養した T 細胞を用いたリアルタイム PCR を用いた解

析により、T細胞分化に関与する標的遺伝子を同定し、抗腫瘍活性の増強メカニズムを解明する。

4. 研究成果

1. GSK-J4 の培養により CD8 T 細胞の抗腫瘍活性が増強する

活性化後、通常培地で4日間培養 (Ctrl 培養) した OT-1 CD8 T 細胞と、GSK-J4 添加培地で4日間培養 (GSK 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、OT-1 CD8 T 細胞を移入した場合 (Ctrl 培養、GSK 培養) 移入しない場合に比べて腫瘍の成長が抑制され、またさらに、GSK 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腫瘍が効率よく抑制される (図1上) ことが分かった。また、GSK 培養によりマウスの高い生存率が観察された (図1下)。この結果、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素阻害剤 GSK-J4 の添加培養により、CD8 T 細胞抗腫瘍活性が高まることが示された。

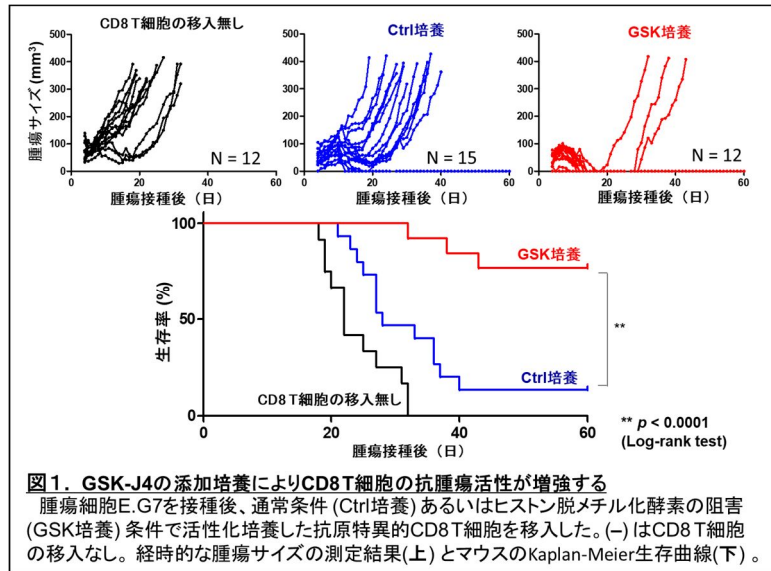


図1. GSK-J4の添加培養によりCD8T細胞の抗腫瘍活性が増強する
腫瘍細胞E.G7を接種後、通常条件 (Ctrl培養) あるいはヒストン脱メチル化酵素の阻害 (GSK培養) 条件で活性化培養した抗原特異的CD8T細胞を移入した。(-)はCD8T細胞の移入なし。経時的な腫瘍サイズの測定結果(上)とマウスのKaplan-Meier生存曲線(下)。

2. ヒストン H3K27 脱メチル化酵素の阻害剤はメモリー分化を促進する

実験結果からヒストン H3K27 脱メチル化酵素の阻害により長期免疫が誘導されていることが推測されたため、GSK-J4 の添加培養後の CD8 T 細胞のメモリー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トリーで解析したところ、Ctrl 培養に比べ、GSK 培養により CD62L 高発現メモリー分化型細胞の割合が増加することが分かった (図2A)。次に、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、GSK-J4 の添加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*、および *Lef1* の発現が高いことが分かった (図2B)。

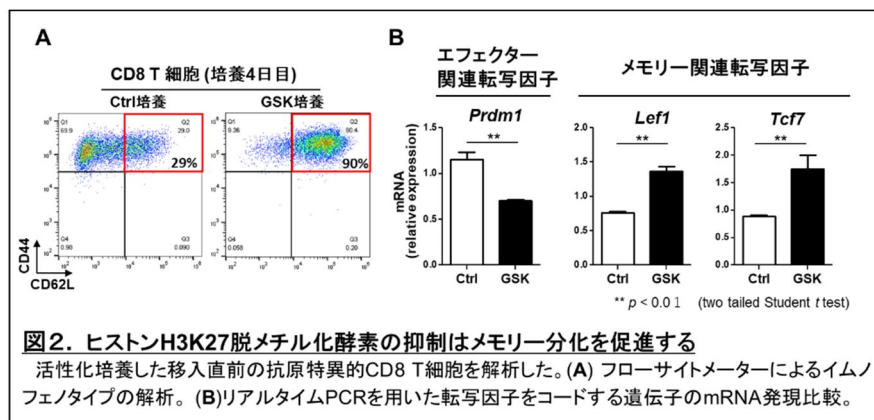
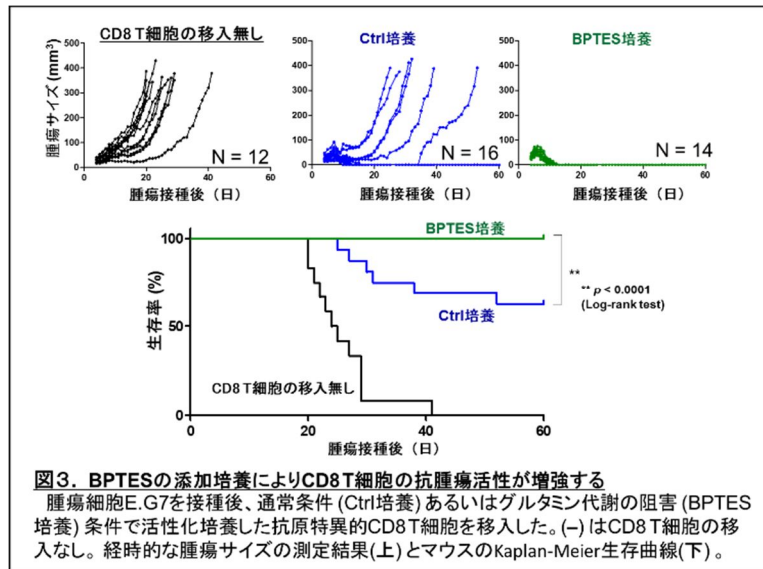


図2. ヒストンH3K27脱メチル化酵素の抑制はメモリー分化を促進する
活性化培養した移入直前の抗原特異的CD8 T細胞を解析した。(A) フローサイトメーターによる免疫ノフェノタイプの解析。(B)リアルタイムPCRを用いた転写因子をコードする遺伝子のmRNA発現比較。

3. BPTES の培養により CD8 T 細胞の抗腫瘍活性が増強する

GSK-J4 の添加培養と同様に、活性化後、通常培地で 4 日間培養 (Ctrl 培養) した OT-1 CD8 T 細胞と、BPTES 添加培地で 4 日間培養 (BPTES 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、OT-1 CD8 T 細胞を移入した場合 (Ctrl 培養、BPTES

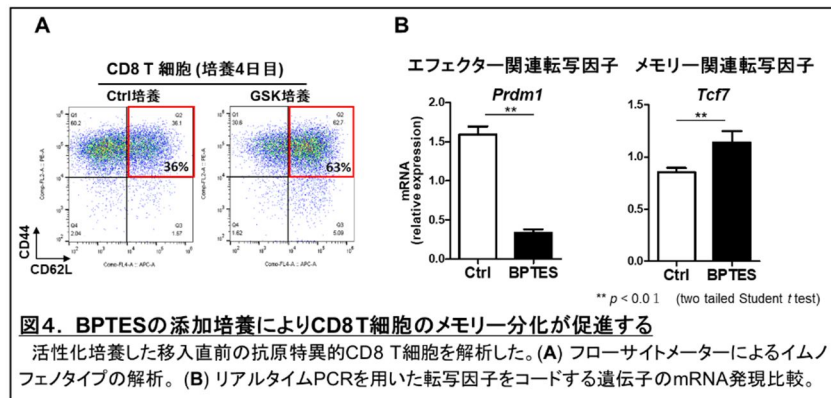


培養) 移入しない場合に比べて腫瘍の成長が抑制され、またさらに、BPTES 培養した OT-1 CD8 T 細胞を移入したグループでは、Ctrl 培養した OT-1 CD8 T 細胞を移入したグループに比べて腫瘍が効率よく抑制される (図3上) ことが分かった。また、BPTES 培養によりマウスの高い生存率が観察された (図3下)。この結果、グルタミン代謝阻害剤 BPTES の添加培養により、CD8 T 細胞抗腫瘍活性が高まることが示された。

4. グルタミン代謝の阻害剤はメモリー分化を促進する

実験結果からグルタミン代謝の阻害により長期免疫が誘導されていることが推測されたため、BPTES の添加培養後の CD8 T 細胞のメモリー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トリーで解析したところ、Ctrl 培養に比べ、BPTES 培養により CD62L 高発現メモリー分化型細胞の割合が増加することが分かった (図4A)。

次に、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、BPTES の添加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* の発現が高いことが分かった (図4B)。

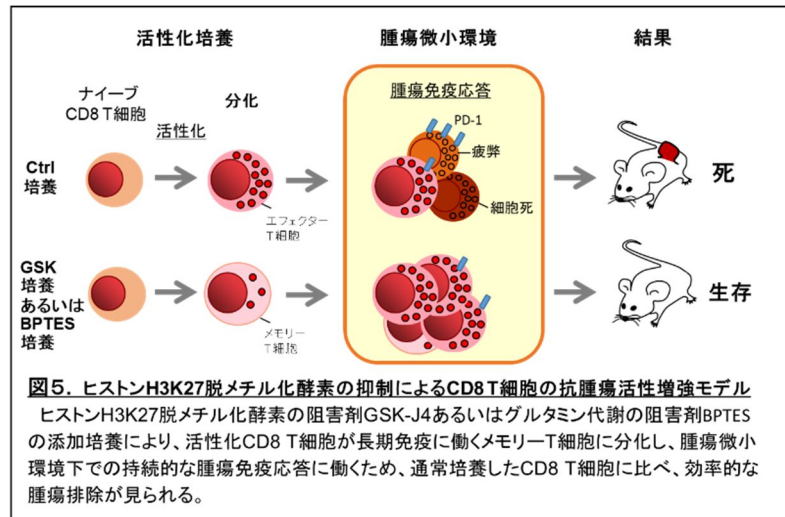


考察

今回我々は、腫瘍免疫に働く CD8 T 細胞の抗腫瘍免疫を増強させるため、細胞内エピジェネティクス変化に注目し、担がんマウスを用いた実験を行った。通常培養では T 細胞の疲弊を招くことから、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素活性を抑制する薬剤 GSK-J4 あるいはヒストン H3K27 脱メチル化酵素を活性化するグルタミン代謝を抑制する薬剤 BPTES を用いた CD8 T 細胞の培養を行ったところ、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。そのメカニズムを解明するため、CD8 T 細胞の分化について解析したところ、GSK 培養および BPTES 培養によりメモリー分化が促進することが明らかとなった。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報告されており、今回の結果と一致する。

結果をまとめると、腫瘍特異的な CD8 T 細胞内におけるグルタミン代謝を介して起こるヒストン H3K27 脱メチル化酵素活性の抑制は、メモリー分化を促進し、腫瘍微小環境下でも疲弊を免れ、結果として効果的ながん細胞の効率的な排除につながると考えられる (図 5)。

以上から本研究で我々が得た成果は、腫瘍特異的 CD8 T 細胞の養子免疫療法として有効な培養方法につながることを期待される。



結語

腫瘍免疫に働く CD8 T 細胞のエピジェネティクス制御により、抗腫瘍活性の増強が可能であることを、我々は担がんマウスモデルを用いた解析から明らかにした。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamada T, Arakawa Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Enhancement of antitumor activity by epigenetic regulation of tumour-specific T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 6,8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2021.8.6	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Toriyama K, Kuwahara M, Kondoh H, Mikawa T, Takemori N, Konishi A., Yorozuya T, Yamada T, Soga T., Shiraishi A, and Yamashita M.	4. 巻 3
2. 論文標題 T cell-specific deletion of Pgam1 reveals a critical role for glycolysis in T cell responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01122-w	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0件

〔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
---------	---------