

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17391

研究課題名（和文）造血器悪性腫瘍における活性化制御性T細胞の制御機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of activated regulatory T cells in hematopoietic malignancies

研究代表者

湯田 淳一郎（Yuda, Junichiro）

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医長

研究者番号：20813934

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）：腫瘍環境下の活性化した制御性T細胞の重要性と、その活性化制御機構を明らかにするために、臓器横断的に固形腫瘍及び造血器悪性腫瘍の検体を用いて、腫瘍環境下の制御性T細胞の特徴を明らかにする研究を開始した。まず初めに、制御性T細胞は非常に少ない細胞集団であり、さらに腫瘍局所に浸潤する制御性T細胞はごく少数で、詳細な解析が困難であったことから、局所に浸潤する活性化制御性T細胞をセルソーターで採取し、トランスクリプトーム解析とオープンクロマチン解析を可能にする実験系を樹立した。この実験系を用いて、肺がん及び、造血器悪性腫瘍の検体を使い、腫瘍局所に浸潤する制御性T細胞の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血器悪性腫瘍の病勢進展における制御性T細胞の役割、その活性化機序を示した研究成果が少ない。固形がんとの共通する役割や活性化機序、造血器悪性腫瘍に特徴的な活性化機序を明らかにする研究意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the importance of activated regulatory T cells in the tumor environment and their activation regulation mechanism, we started a study to characterize regulatory T cells in the tumor environment using cross-organ samples of solid tumors and hematopoietic malignancies. First of all, regulatory T cells are a very small population, and only a small number of regulatory T cells infiltrate the tumor local area. Therefore, we established an experimental system that enables transcriptome analysis and open chromatin analysis by collecting activated regulatory T cells infiltrating the tumor local area using a cell sorter. Using this experimental system, we analyzed regulatory T cells infiltrating the tumor local area using samples of lung cancer and hematopoietic malignancies.

研究分野：造血器悪性腫瘍

キーワード：造血器悪性腫瘍 制御性T細胞 白血病 リンパ腫 トランスクリプトーム解析 オープンクロマチン解析

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 造血器悪性腫瘍における活性化制御性 T 細胞の制御機構解明

国立がん研究センター東病院 湯田淳一郎

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害薬の有効性が固形癌や血液腫瘍において証明され、がんに対する免疫療法は一段と注目を集めている。その一方で、免疫チェックポイント阻害薬が効かない症例も多く、効果予測バイオマーカーの探索や、有効性を高めるため他剤との併用療法の開発などが盛んに行われている。制御性 T 細胞は、腫瘍に多く浸潤して腫瘍環境下の免疫応答を抑制しており、予後不良因子であることが知られている。我々は免疫チェックポイント阻害薬を投与された臨床検体の解析から、腫瘍環境下の PD-1 陽性制御性 T 細胞が、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測マーカーになることを明らかにした。そこで、腫瘍環境下の活性化した制御性 T 細胞の重要性と、その活性化制御機構を明らかにするために、臓器横断的に固形腫瘍及び造血器悪性腫瘍の検体を用いて、腫瘍環境下の制御性 T 細胞の特徴を明らかにする研究を開始した。まず初めに、制御性 T 細胞は非常に少ない細胞集団であり、さらに腫瘍局所に浸潤する制御性 T 細胞はごく少数で、詳細な解析が困難であったことから、局所に浸潤する活性化制御性 T 細胞をセルソーターで採取し、2000-3000 細胞程度の制御性 T 細胞から、トランスクリプトーム解析とオープンクロマチン解析を可能にする実験系を樹立した。この実験系を用いて、肺がん及び、白血病やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の検体を使い、腫瘍局所に浸潤する制御性 T 細胞の解析を行った。

肺がん検体を用いて行った、モチーフ解析と footprint 解析からは、BATF や c-REL といった転写因子が、制御性 T 細胞の活性化に重要であることが明らかとなった<sup>1)</sup>。また、肺がんの腫瘍局所に存在する制御性 T 細胞は、CCR8 や IL1R1 などの細胞表面分子を特異的に発現していた。さらに、これらの分子の誘導や、腫瘍特異的な制御性 T 細胞の分化には、TNFRSF 1 からの NF- $\kappa$ B 経路が重要であることを見出した。このシグナル経路は、PD-1 の発現にも寄与する可能性がある。次に、造血器悪性腫瘍局所の活性化制御性 T 細胞のデータを使用して、主成分分析と t-SNE 解析による解析を行ったところ、肺がんと造血器悪性腫瘍の活性化制御性 T 細胞は異なる遺伝子発現、エピジェネティクス・プロファイルを呈しており、さらに、いずれの腫瘍の活性化制御性 T 細胞とも、健常者の末梢血の活性化制御性 T 細胞とは、大きく異なる性質を有していた。モチーフ解析を行い、腫瘍環境下の制御性 T 細胞で新規に開いたクロマチン領域に結合しうる転写因子を推定したところ、FOS や JUN、REL、BATF といった肺がんと造血器悪性腫瘍の活性化制御性 T 細胞で共通で見られる転写因子に加えて、造血器悪性腫瘍患者だけに特徴的な転写因子が誘導されていることを明らかにした。

これらのデータは、腫瘍環境下の制御性 T 細胞の活性化は、腫瘍の種類や罹患臓器の種類に関係なく保持されている共通の活性化機序に加えて、各々の腫瘍の種類や罹患臓器に特異的な活性化機序も存在することを示唆しており、腫瘍環境下の活性化制御性 T 細胞の表現型やエピジェネティクス・プロファイルは腫瘍によって大きく異なることが推定された。そのため、腫瘍環境下の活性化制御性 T 細胞の特徴を包括的に理解するためには、臓器横断的な研究と、それぞれの腫瘍に特化した研究を並行して行う必要があると考えられた。

#### 2. 研究の目的

本研究は、①活性化制御性 T 細胞は、血液腫瘍環境下でどのような特徴的な表現型、エピジェネティクス・プロファイルを呈しているのか、②血液腫瘍環境下の活性化制御性 T 細胞は、どのようなメカニズムで、その特徴的な表現型、エピジェネティクス・プロファイルへと分化、移行するのか、③腫瘍の違いや罹患臓器の違いによって、腫瘍環境下の活性化制御性 T 細胞の表現型やエピジェネティクス・プロファイルはどのように異なるのか、を明らかにすることで、現在の免疫療法の効果予測バイオマーカーの同定や耐性機序の解明を目指し、更には将来的な新規の免疫療法の開発につなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

血液悪性腫瘍患者の局所(あるいは骨髄)と末梢血から、セルソーターを用いて、ナイーブ制御性 T 細胞と活性化制御性 T 細胞を採取した。血液悪性腫瘍は白血病、悪性リンパ腫の検体を含んでいた。マルチカラーフローサイトメトリーや CyTOF を用いて、腫瘍環境下制御性 T 細胞の PD-1 などの免疫チェックポイント分子を含む免疫学的表現型の詳細な解析も実施する。蛋白分子発現、RNA 発現、エピゲノムプロファイルのレベルから、腫瘍環境下の活性化制御性 T 細胞に特徴的な因子を特定していく。腫瘍環境下の活性化制御性 T 細胞に特徴的なオープンクロマチン領域を特定し、結合モチーフ解析を行うことで、腫瘍局所の制御性 T 細胞の分化に関わる因子を予想する。予想される因子の中から更に、footprint 解析とクロマチン免疫沈降シーケンスを行い、真に活性化に関連のある遺伝子やシグナルを特定していく。

◆In vitro での検討：特定された遺伝子・シグナルについて強制発現株およびノックダウン株を作成、あるいはヒトの制御性 T 細胞のノックダウンや、阻害剤・活性化剤を投与することにより、制御性 T 細胞の免疫学的表現型、遺伝子発現、エピゲノムの変化を確認し、特定された遺伝子・シグナルの制御性 T 細胞における重要性を検証する。

◆In vivo での検討：特定された遺伝子・シグナルの制御性 T 細胞でのコンディショナルノックアウトマウスを作成し、制御性 T 細胞における重要性を検証する。また、特定された遺伝子・シグナルが治療標的になるのであれば、マウスのがん移植モデルを使用して、活性化剤や阻害剤を単剤あるいは併用で投与することで、免疫療法の効果の増幅を検証する。

### 4. 研究成果

慢性骨髄単球性白血病 (CMML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、及び急性骨髄性白血病 (AML) 患者の治療前後での CD4 (+) 及び CD8 (+) T 細胞の表現型の変化を解析した。治療開始前の CD4 (+) T 細胞における活性化制御性 T 細胞の割合の中央値は、1.1% (範囲:0~46.1) であり、治療前後で、CD4 (+) T 細胞に占める活性化制御性 T 細胞の割合に有意な変化は見られなかった (図 1A)。また、CD8 (+) T 細胞における免疫チェックポイント分子 (A、B、C、D、E) 陽性細胞の割合は、治療前後で有意な変化を示さなかった (図 1A)。これらの検体のうち、CMML の 1 例 (UPN1、治療奏効例) では、CD4 (+) T 細胞における活性化制御性 T 細胞の割合が、治療前 (46.1%) と比較し、治療後 (14 日後:0.28%、6 か月後:1.30%) で大きく減少していた (図 1B)。一方、CMML の別の 1 例 (UPN2、治療非奏効例) の CD4 (+) T 細胞における活性化制御性 T 細胞の割合は、治療前 (3.80%) と後 (14 日後:0.39%) で大きな変化は見られなかった (図 1B)。この結果は、治療薬 X が活性化制御性 T 細胞を減少させることで、抗腫瘍効果を示している可能性を示唆していることから、これらの症例の検体を用いて、治療前後での活性化制御性 T 細胞の遺伝子発現及びエピジェネティクス・プロファイルの変化を解析した。

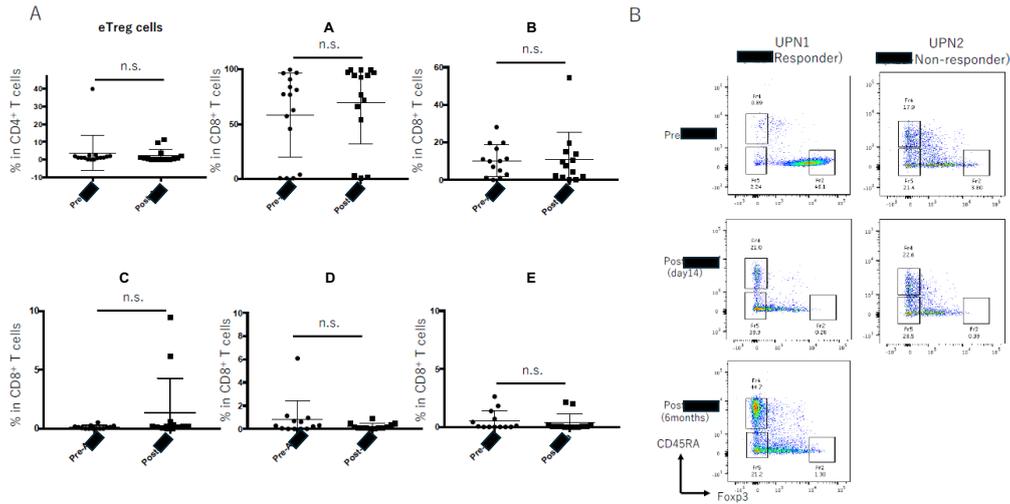


図 1. 造血器腫瘍患者の治療前後での T 細胞表現型の変化

UPN1 (治療奏効例)、UPN2 (治療非奏効例) 及び健常人 (n=3) の末梢血単核球から分離した活性化制御性 T 細胞を用いて、RNA-seq 解析と ATAC-seq 解析により、遺伝子発現とオープンクロマチン領域を解析した。RNA-seq と ATAC-seq で得られた結果を t-SNE でクラスタリングしたところ、治療前の UPN1 の活性化制御性 T 細胞の遺伝子発現とオープンクロマチン領域は、UPN2 や健常人と比較して、独立した領域にクラスタ化された (図 2A)。UPN1 の活性化制御性 T 細胞の遺伝子発現とオープンクロマチン領域は、治療開始から 14 日後、6 か月後と時間が経つにつれ、UPN2 や健常人のクラスタ領域に近づいていった (図 2A)。一方、UPN2 の活性化制御性 T 細胞における遺伝子発現とオープンクロマチン領域のクラスタパターンは、健常人のパターンと類似しており、治療の前後でパターンに変化は見られない傾向にあった (図 2A)。次に、治療前の UPN1 の活性化制御性 T 細胞の遺伝子発現及びオープンクロマチン領域と、健常人の活性化制御性 T 細胞の遺伝子発現量及びオープンクロマチン領域を比較したところ、UPN1 の活性化制御性 T 細胞では、健常人と比べ、いくつかの特徴的なシグナル伝達経路が活性化していることが示された (図 2B)。さらに、健常人と比べて、治療前の UPN1 の活性化制御性 T 細胞の方が、発現量が高く、クロマチンが開いており、かつ、治療前と比較し、治療後に発現量が低下し、クロマチンが閉じた遺伝子を探索した (図 2C)。その結果、転写因子 A が、治療前の活性化制御性 T 細胞の増殖と治療後の活性化制御性 T 細胞の減少に関係していることが明らかになった。また、ATAC-seq のデータを用いて、モチーフ解析を行った結果、UPN1 の活性化制御性 T 細胞では、健常人と比べ、転写因子 A、転写因子 B、転写因子 C、転写因子 D、及び転写因子 E の結合配列が多く検出された。(図 2D)。さらに、ATAC-seq データを使用したフットプリント解析の結果、健常人及び UPN1 の活性化制御性 T 細胞における転写因子 A 結合領域の DNA 切断頻度が減少することが明らかになった (図 2E)。

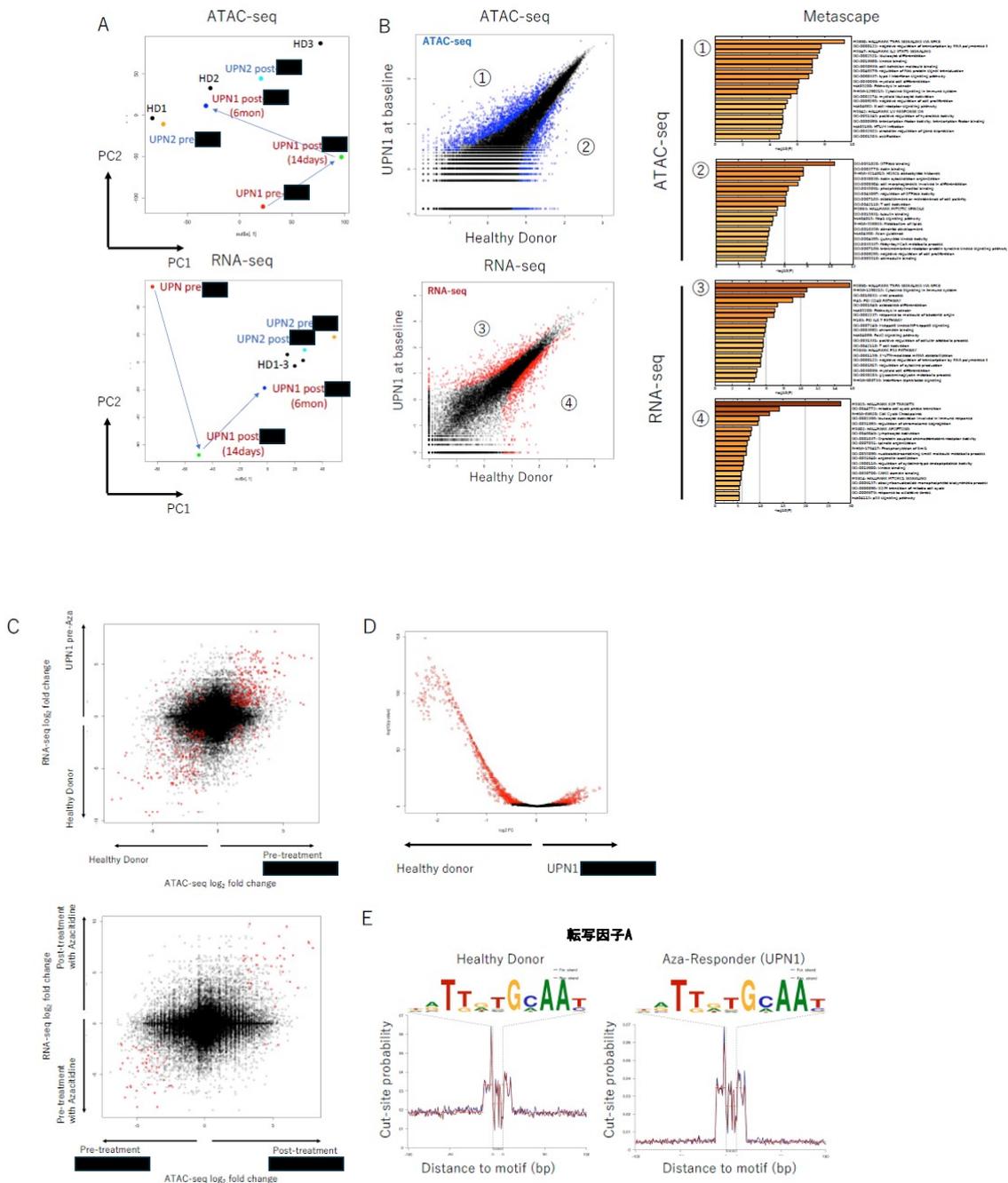


図 2. RNA-seq 及び Omni-ATAC-seq を用いた、治療奏効例、治療非奏効例、及び健常人の活性化制御性 T 細胞における遺伝子発現及びオープンクロマチン領域の解析

文献

1) Kota Itahashi, Takuma Irie, Junichiro Yuda, et al. Sci Immunol. 2022 Oct 14;7(76):eabk0957. doi: 10.1126/sciimmunol.abk0957. Epub 2022 Oct 7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Itahashi Kota, Irie Takuma, Yuda Junichiro, Kumagai Shogo, Tanegashima Tokiyoshi, Lin Yi-Tzu, Watanabe Sho, Goto Yasushi, Suzuki Jun, Aokage Keiju, Tsuboi Masahiro, Minami Yosuke, Ishii Genichiro, Ohe Yuichiro, Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Suzuki Yutaka, Koyama Shohei, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 BATF epigenetically and transcriptionally controls the activation program of regulatory T cells in human tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science 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） 10.1126/sciimmunol.abk0957	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

〔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
---------	---------