

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05376・20K20384

研究課題名（和文）代謝とエピゲノム改変によるT細胞リプログラミング法の開発

研究課題名（英文）Development of T cell reprogramming method by metabolic and epigenomic modification

研究代表者

吉村 昭彦（Yoshimura, Akihiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：90182815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞の疲弊化は腫瘍免疫の効果を減弱させるだけでなく、チェックポイント阻害療法抵抗性の原因となる。しかしT細胞疲弊化の分子機構の解明は始まったばかりである。本研究では核内受容体NR4aファミリーがCD8+T細胞の疲弊化に中心的な役割を果たすことを見出した。さらにNR4aを欠損させることで強い抗腫瘍効果が得られることを見出した。一方で疲弊化したT細胞を若いメモリーにリプログラムする方法としてCAR-Tなどの活性化したT細胞をNotchリガンドを発現するOP9細胞と共培養することにより幹細胞メモリーT（Tscm）様細胞（iTscm）に転換できることを示した。現在このメカニズムを解明しつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんにおける免疫チェックポイント阻害療法はノーベル賞を受賞したこともあって大きな注目を集めている。しかし療法抵抗性の患者も多く、より強力な免疫療法の開発が望まれている。腫瘍免疫の効果を減弱させる大きな要因のひとつはがんを攻撃するT細胞疲弊化である。我々のグループは疲弊化を起こす原因遺伝子としてNR4aを発見し、さらに疲弊化したT細胞をより若いメモリー幹細胞にリプログラム方法を開発した。このメカニズムを解明できればがんの免疫療法の可能性を大きく広げることになる。

研究成果の概要（英文）：T cell exhaustion not only reduces the effectiveness of tumor immunity, but also causes resistance to checkpoint inhibitor therapy. However, the molecular mechanisms of T cell exhaustion have only just begun to be elucidated. In this study, we found that the NR4a family of nuclear receptors plays a central role in the exhaustion of CD8+ T cells. Furthermore, we found that deletion of NR4a resulted in a strong anti-tumor effect. On the other hand, as a method to reprogram exhausted T cells into young memory, we showed that activated T cells such as CAR-T can be converted into stem cell memory T (Tscm)-like cells (iTscm) by co-culturing with Notch ligand-expressing OP9 cells. This mechanism is now being elucidated.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 免疫記憶 腫瘍免疫 サイトカイン 代謝

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍免疫療法はがん治療の第4の柱として確立されつつあるが、腫瘍免疫の主体である細胞傷害性 CD8⁺T 細胞はがんなどの慢性的な炎症状態では持続的な刺激や腫瘍微小環境因子によって疲弊化(exhaustion)し抗腫瘍効果が減弱する。これらの T 細胞疲弊のメカニズムを解明しこれを回避し、さらにより抗腫瘍活性の高い T 細胞へ「脱分化」させることができれば、全く新しい抗腫瘍免疫療法を開発できる可能性がある(図1参照)。

末梢での CD8 陽性 T 細胞分化過程は、これまでに詳しく解析されてきた。抗原に未感作のナイーブ T 細胞が樹状細胞などの抗原提示細胞から抗原刺激を受けると、抗原特異的な受容体(TCR)を持つ T 細胞が活性化されて増殖し、エフェクター T 細胞(T_E)となり細胞傷害機能を発揮する。抗原排除後、その多くは死滅するが、一部はメモリー T 細胞として残存し、免疫記憶の中心的役割を担う。メモリー T 細胞にはヒエラルキーが存在し、セントラルメモリー T 細胞 (T_{CM})、エフェクターメモリー T 細胞(T_{EM})、エフェクター T 細胞(T_E)などの亜集団が存在する(図1)。ステムセルメモリー T 細胞 (stem cell memory T cell: T_{SCM})は、ナイーブ T 細胞と T_{CM} の中間に位置し、ナイーブマーカーと活性化マーカーを有するメモリー T 細胞で、自己複製能・長期生存能・幹細胞性を有し、抗原刺激によって T_{CM}、T_{EM}、T_E に分化する。T_{EM} および T_E 細胞は、T_{SCM} および T_{CM} に比べて標的細胞の殺細胞能力は高くなるが、腫瘍環境では、持続的な抗原刺激によって死滅するか疲弊状態に陥る。疲弊化 T 細胞(T_{EX})は、PD-1, CTLA4, Tim3, Lag3 などの抑制性受容体や SOCS1 などのシグナル抑制分子、p16 のようなサイクリンキナーゼ阻害分子を強く発現するために、抗原刺激しても増殖せずサイトカイン産生も低く、不応答の状態である。T_{EX} は T_{EM} や T_E から生まれると考えられる。本研究では疲弊を誘導する転写因子の単離を目指した。

各分化段階では図1のように特徴的な転写因子、エピジェネティクスや代謝の変化は知られているが、それらの強制発現だけではリプログラムすることはできない。我々は一旦活性化した T 細胞を Notch シグナル分子を発現しているフィーダー細胞(OP9-DL1)と共培養することで T_{SCM} 様細胞(induced T_{SCM}:iT_{SCM})へと誘導する方法を確立した (*Nature Commun.* 8: e15338, 2017, *Cancer Sci* 109: 2130-2140, 2018.)。本研究ではさらにその分子機構の解明を目指した。

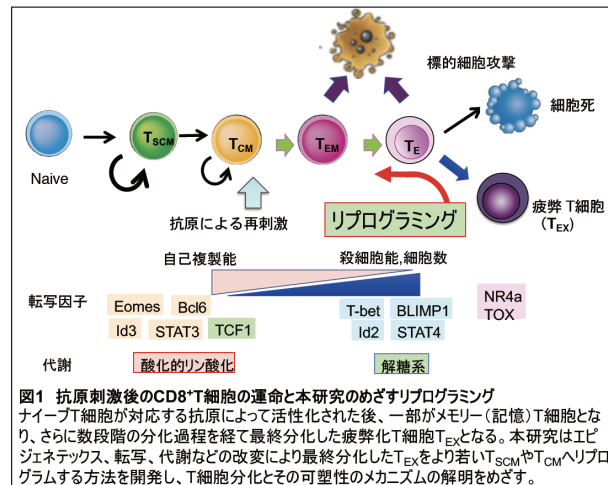
本研究は、メモリー T 細胞の最終分化段階である「疲弊」(exhaustion)の分子メカニズムを解明し、これを解除ないし分化転換(リプログラミング)する方法を開発するものである。具体的には腫瘍特異的な疲弊化 T 細胞を用いて疲弊化促進遺伝子を破壊あるいは抑制する遺伝子を強制発現して、幹細胞性をもつステムセルメモリー T 細胞(T_{SCM})に転換させる。さらに、本研究は単なるリプログラミングの技術開発にとどまらず、メモリー T 細胞の分化およびその可塑性に関する基本原理の理解をめざすものである。

2. 研究の目的

本研究は、メモリー T 細胞の最終分化段階である「疲弊」(exhaustion)の分子メカニズムを解明し、これを解除ないし分化転換(リプログラミング)する方法を開発するものである。具体的には腫瘍特異的な疲弊化 T 細胞を用いて疲弊化促進遺伝子を破壊あるいは抑制する遺伝子を強制発現して、幹細胞性をもつステムセルメモリー T 細胞(T_{SCM})に転換させる。さらに、本研究は単なるリプログラミングの技術開発にとどまらず、メモリー T 細胞の分化およびその可塑性に関する基本原理の理解をめざすものである。

3. 研究の方法

- (1) NR4a 完全欠損 T 細胞は NR4a1flox/flox, NR4a2flox/flox, NR4a3^{-/-}マウスより T 細胞を単離し、Cre を発現するレトロウイルスを導入して樹立した。
- (2) 分離した CD8⁺ T 細胞は、ヒト CD3/CD28 抗体により活性化させ、抗 CD19 CAR レトロウイルスで導入した。6 日目に、CD8+CAR⁺細胞を FACS Aria III セルソーターで選別し、



40Gy 照射した K562-hCD19 (E:T 比=4:1) と 6~8 日間共培養して増殖させた。その結果 T 細胞はすべて CD45RA-CD45RO+CCR7- の活性化型となり、PD1 などの疲弊分子を発現していた。この CAR-T 細胞を IL-7 の存在下、OP9-hDLL1 細胞と 10 日間共培養し CAR-iTscm とした。(3)細胞表面のマーカーは FACS で、遺伝子発現は RNAseq やマイクロアレイによって測定した。代謝の測定にはフラックスアナライザーを用いた。また CD19 陽性白血病細胞である NARM6 と CAR-T 細胞を免疫不全 NSG マウスに移植し、腫瘍細胞の増殖や生存率を比較した。

4. 研究成果

(1) 我々は Rao 博士との共同研究により、NR4a が疲弊化の中心となる転写因子であることが示した(Nature 567: 530-534, 2019)。

NR4a は以前、我々によって制御性 T 細胞(Treg)の発生と維持に必須の因子として単離された遺伝子である

(Nature Immunol. 14: 230-237, 2013., J.Exp.Med. 212: 1623-1640, 2015)。CD8⁺T 細胞においては、NR4a は T_{EX} で特に強く発現していた。CD8⁺T 細胞において NR4a を欠損させることで T 細胞疲弊化が抑制され、IFN γ 、TNF α などのサイトカイン産生や殺腫瘍効果が増強されることがわかった。

Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq)解析の結果、NR4a は PD1 や Tim3 などの疲弊化分子の転写を直接促進する一方で API や NF-kB を阻害することでサイトカインなどのエフェクター分子の発現を抑制することがわかった(図2)。

担がんマウスモデルに NR4a 阻害剤を投与したところ、腫瘍の退縮が認められた。予想通り NR4a 阻害剤は浸潤 CD8⁺T 細胞を増加させ Treg を減少させる効果があった。NR4a 阻害剤が抗腫瘍免疫を増強し新たな抗がん剤となりうることを示された(Cancer Res 78: 3027-3040, 2018.)。

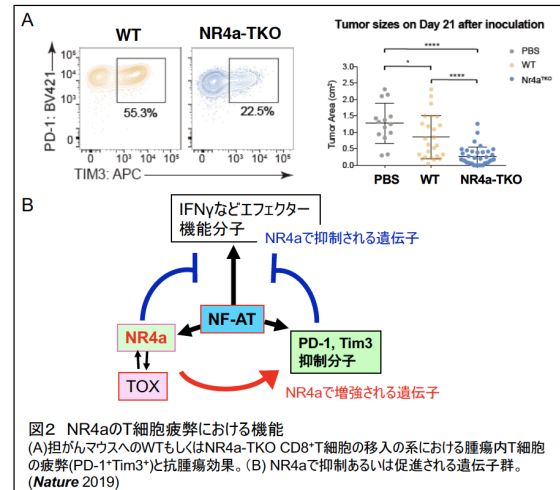


図2 NR4aのT細胞疲弊における機能 (A)担がんマウスへのWTもしくはNR4a-TKO CD8⁺T細胞の移入の系における腫瘍内T細胞の疲弊(PD-1⁺Tim3⁺)と抗腫瘍効果。(B) NR4aで抑制あるいは促進される遺伝子群。(Nature 2019)

(2) 疲弊化した T 細胞を脱分化させて良質なメモリー T 細胞に転化させる方法は報告されていない。

申請者らは一旦活性化した T 細胞を Notch シグナル分子を発現しているフィーダー細胞 (OP9-DL1) と共培養することで T_{SCM} 様細胞(induced T_{SCM}:iT_{SCM})へと誘導する方法を確立した。この方法は、特に CAR-T 細胞の様な長期の増幅を行う場合に有効であった(図3)(Cancer Res, 80: 471-483, 2020.)。さらに iT_{SCM} 化の重要な要素としてミトコンドリア代謝を見出した。iT_{SCM} 細胞は解糖系も脂肪酸酸化に依存した酸化的リン酸化が優位になっており、代謝リプログラミングによって iT_{SCM} 化が促進されることが明らかとなった。さらにその中心となる遺伝子として FoxM1 が候補となることを示した。

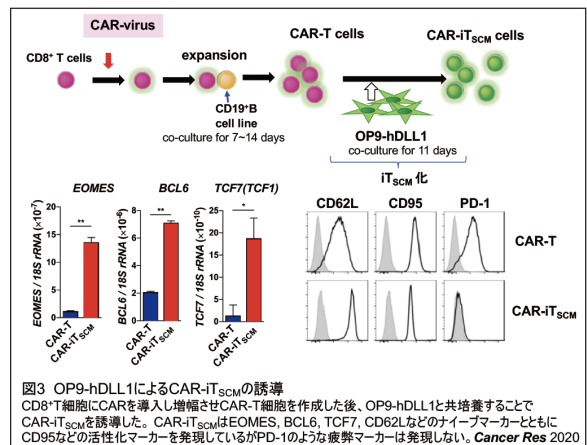


図3 OP9-hDLL1によるCAR-iTSCMの誘導 CD8⁺T細胞にCARを導入し増幅させCAR-T細胞を作成した後、OP9-hDLL1と共培養することでCAR-iTSCMを誘導した。CAR-iTSCMはEOMES, BCL6, TCF7, CD62LなどのナイーブマーカーとともにCD95などの活性化マーカーを発現しているがPD-1のような疲弊マーカーは発現しない。(Cancer Res 2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Chen J, Lopez-Moyado IF, Seo H, Lio CJ, Hempleman LJ, Sekiya T, Yoshimura A, Scott-Browne JP, Rao A	4. 巻 567
2. 論文標題 NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 530-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-0985-x.	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 該当する
1. 著者名 Kondo T, Ando M, Nagai N, Tomisato W, Srirat T, Liu B, Mise-Omata S, Ikeda M, Chikuma S, Nishimasu H, Nureki O, Ohmura M, Hayakawa N, Hishiki T, Uchibori R, Ozawa K, Yoshimura A.	4. 巻 80
2. 論文標題 The NOTCH-FOXM1 Axis Plays a Key Role in Mitochondrial Biogenesis in the Induction of Human Stem Cell Memory-like CAR-T Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 471-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-1196.	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 該当する
1. 著者名 Ito Minako, Komai Kyoko, Mise-Omata Setsuko, Iizuka-Koga Mana, Noguchi Yoshiko, Kondo Taisuke, Sakai Ryota, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Nakatsukasa Hiroko, Chikuma Shunsuke, Shichita Takashi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 565
2. 論文標題 Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 246 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0824-5	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 -
1. 著者名 Sekiya Takashi, Hibino Sana, Saeki Keita, Kanamori Mitsuhiro, Takaki Satoshi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1627 ~ 1638. e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.07.008	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 -

1. 著者名 Kondo Taisuke, Imura Yuki, Chikuma Shunsuke, Hibino Sana, Omata-Mise Setsuko, Ando Makoto, Akanuma Takashi, Iizuka Mana, Sakai Ryota, Morita Rimpei, Yoshimura Akihiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2130 ~ 2140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13648	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 -

1. 著者名 Hibino Sana, Chikuma Shunsuke, Kondo Taisuke, Ito Minako, Nakatsukasa Hiroko, Omata-Mise Setsuko, Yoshimura Akihiko	4. 巻 78
2. 論文標題 Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3027 ~ 3040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-3102	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8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 核内受容体NR4aによるT細胞寛容と疲弊のメカニズム
3. 学会等名 第一回 PHILOSOPHY (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 核内受容体NR4aによるT細胞寛容と疲弊
3. 学会等名 第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 T cell exhaustion and tolerance by NR4a transcription factors
3. 学会等名 第78回 癌学会講演(シンポジウム1) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤泰介, 吉村昭彦
2. 発表標題 ミトコンドリア制御によるメモリーT細胞のリプログラミング
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 疲弊化T細胞を制御するシグナルと転写因子
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村昭彦、近藤泰介
2. 発表標題 Generation of human induced-stem cell memory T (iTscm) cells for cancer adoptive T cell immunotherapy
3. 学会等名 77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村昭彦
2. 発表標題 メモリーT細胞の性質と抗腫瘍免疫
3. 学会等名 第5回日本移植学会スプリングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taisuke Kondo, Alkihiko Yoshimura
2. 発表標題 Metabolic reprogramming requires stem cell moery T cells phenotypes for adaptive immunothrapy
3. 学会等名 45th Naito Conference "Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy"（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 CD45RA + およびCCR7 + の細胞表面マーカーを有するT細胞の製造方法	発明者 吉村昭彦、近藤泰介、富里亘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-195206	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>がん免疫療法における重要な標的遺伝子の発見 - 疲弊した免疫を回復する新規抗がん剤の開発に期待 - https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/2/28/28-51463/</p>

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