

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07203

研究課題名(和文) 制御性T細胞除去とTGF- β 阻害剤を併用した新たながん免疫療法の開発研究課題名(英文) Development of novel cancer immunotherapy by combining regulatory T-cell elimination and TGF- β inhibitors

研究代表者

鈴木 進 (Suzuki, Susumu)

愛知医科大学・研究創出支援センター・教授

研究者番号：70518422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TGF β は、細胞傷害性T細胞(CTL)の機能を直接阻害することが*in vitro*での検討により明らかとなった。また、口腔癌組織を用いて、TGF β 1遺伝子の発現をみたところ、腫瘍浸潤先端部に発現が強く、腫瘍部周辺に浸潤するT細胞の働きを弱め、腫瘍内免疫環境を、抑制方向に向かわせていることが示唆された。TGF β 1は、新たながん免疫治療のための標的分子としての重要性が明らかとなった。一方でTGF β はCTL上CCR4の発現を増強した。このことはCCR4抗体を用いたTreg除去による新たながん治療の妨げとなるが、トラメチニブ(MEK阻害剤)が、Tregに対する選択的傷害に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプジーボ、ヤーボイなどの免疫チェックポイント阻害剤は、第4のがん治療法として、近年急速に発展した。しかしながら、治療効果は20%-30%の症例に限られることから、新たな視点でのがん免疫治療法の開発が望まれている。制御性T細胞(Treg)は、がん免疫を強力に抑制することが知られている。国内において、モガムリズマブ(CCR4抗体)を用いたTregを標的としたがん免疫治療医師主導治験が行われたが、結果は満足ではなく改善策が必要である。今回の研究成果は、TGF β のT細胞に対する直接的抑制機序や、細胞傷害性T細胞上CCR4の発現機序を明らかとし、改善のための一定のアイデアを提供するものとなった。

研究成果の概要(英文)：In vitro studies have revealed that TGF β directly inhibits the function of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Furthermore, when the expression of the TGF β 1 gene was examined using oral cancer tissue, it was found to be highly expressed at the tumor infiltration front, suggesting that it weakens the function of T cells infiltrating around the tumor site and shifts the immune environment within the tumor in a suppressive direction. This has revealed the importance of TGF β 1 as a target molecule for new cancer immunotherapy. On the other hand, TGF β enhanced the expression of CCR4 on CTLs. This hinders new cancer treatments that use CCR4 antibodies to remove Tregs, but it has been shown that trametinib (a MEK inhibitor) is useful for selectively damaging Tregs.

研究分野：がん免疫治療

キーワード：細胞傷害性T細胞 制御性T細胞 NK細胞 口腔癌 TGF β CCR4 モガムリズマブ トラメチニブ

1. 研究開始当初の背景

ニボルマブ、イピリムマブ等、免疫チェックポイント分子を標的とした抗体医薬の登場によりがん免疫療法は、新たながん治療法として一般化している。しかしながら、治療効果が得られる症例は 20%程度と限られており、新たな治療標的分子の探索、薬剤の開発が進められている。腫瘍組織内は、免疫が抑制された環境下にあることが明らかにされており、抑制環境の改善ががん治療研究の方向となっている。制御性 T 細胞 (Treg) はがん免疫を強力に抑制することが知られ、新たな免疫療法の標的として位置づけられている。ケモカイン受容体 4 (CCR4) は、Treg 上に選択的に発現することから、CCR4 モノクロナル抗体 (モガムリズマブ) を用いた Treg 除去療法の医師主導治験が行われたが、治療効果は限定的であった。しかしながら、体内で Treg が効率的に除去されることが明確に示されており、腫瘍内免疫抑制環境の改善に寄与しているものと考えられる。Treg 除去に加え、さらに免疫抑制分子の働きを阻害することで、治療効果が期待できる可能性を考えた。TGFb は以前から、免疫抑制分子の代表として知られているが、研究開発当初、我々は、TGFb が、直接細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能を阻害することを見出していた。そこで、Treg と TGFb を同時に標的にすることより強いがん免疫の活性化につながるのではないかと考え検討を行った。

2. 研究の目的

免疫抑制細胞である Treg と、代表的な免疫抑制因子である TGFb を同時に標的にすることにより、抗腫瘍免疫の相加的、あるいは相乗的活性化効果がえられるかどうか検討すること。

3. 研究の方法

(1) TGFb の CTL 機能への直接的阻害効果

がん抗原に対する CTL を十分量用意することは困難なため、サイトメガロウイルス pp65 抗原 (pp65) を疑似がん抗原として用いた。口腔癌由来細胞株 HSC-2, HSC3, HSC4 にレンチウイルスベクターを用いて pp65 抗原を蛍光蛋白 Tomoto との融合蛋白のかたちで強制発現させた HSC-2pp65, HSC-3pp65 又は HSC-4pp65 と HLA-A2 または HLA-A24 拘束性 pp65 エピトープペプチド刺激により誘導した pp65-CTL を TGFb 存在下に共培養し、pp65-CTL の機能 (増殖, サイトカイン産生, 細胞傷害活性) に対する TGFb の影響について検討した。

(2) TGFb 受容体阻害剤による CTL 機能の回復

上記 3-(1) の共培養系に、TGFbR 阻害剤 (SB525334) を添加し、TGFb の pp65-CTL 機能に対する影響が抑制されるかどうか検討した。

(3) 口腔癌組織内免疫抑制環境の解析

口腔癌組織内 Treg, CD8+T 細胞の浸潤及び局在と TGFb の発現を明らかにするためパラフィン包埋切片を用い、組織学的解析を行った。Treg の検出には CD3/CD8/FOXP3 の多重免疫染色を行い、CD3+CD8-FOXP3+細胞を、Treg として計測した。TGFb 発現解析は、RNAscope を利用した in situ hybridization にて実施した。

(4) CTL 上に発現する CCR4 の発現

本研究途中、TGFb 存在下活性化 CTL 上に CCR4 が高発現することが見出された。またモガムリズマブが Treg 除去と同時に活性化 CTL も傷害してしまうことが示されたため上記 3-(1) の共培養系に、TGFb など代表的なサイトカインや各種阻害剤を加え、CTL 上 CCR4 の発現に関わるサイトカイン、シグナル伝達経路について解析し、活性化 CTL 上の CCR4 の発現を選択的に阻害する阻害剤の探索を試みた。

4. 研究成果

(1) TGFb の CTL 機能に与える影響と TGFb 阻害剤による抑制効果

i) 細胞傷害活性; 96well plate で pp65-CTL と HSC3pp65 の比 (E/T 比) を変えて 5 日間共培養した後、WST-1 アッセイにより、HSC3pp65 の生存率を測定したところ、E/T 比依存的に、HSC3pp65 生存率が低下した。このことは、pp65-CTL が、HSC3pp65 を抗原特異的に傷害するためであることを表している。この共培養系に TGFb1 を 10ng/mL の濃度で加えたところ、いずれの E/T 比でも HSC3pp65 の生存率が上昇した。さらに、TGFb1 存在下、TGFbR 阻害剤 (SB525334) を加えると、その生存率は低下した。このことから、TGFb1 は、直接 CTL の細胞傷害活性を抑制することが明らかとなった (図 1A)。TGFb1 非存在下であっても、SB525334 を添加すると生存率の低下がみられたが (図 1B)、これは、HSC3 が、TGFb1 を産生しており (1.5 ng/ml)、HSC3 から供給される TGFb1 による細胞傷害抑制を解除したためであると考えられる。

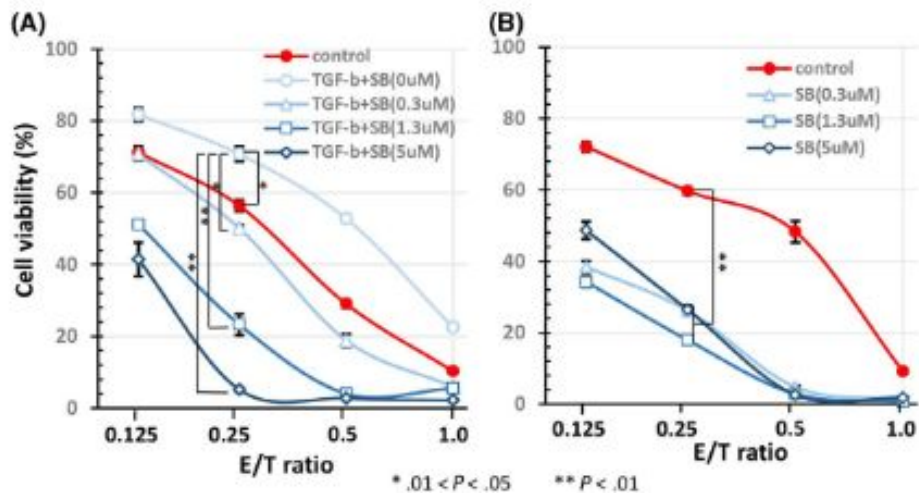


図1 TGFβ の CTL 細胞傷害活性に対する直接的抑制効果 (Cancer Science. 2021;112:4037 FIGURE 4 抜粋)

ii) サイトカイン産生 ; pp65-CTL と HSC-3pp65 を共培養後産生される IFN- γ , TNF- α を測定したところ TGFβ により直接抑制されることがわかった (Cancer Sci.. 2021;112:4037 FIGURE 4 参照)。

iii) 増殖 ; pp65-CTL と HSC-3pp65 を共培養後、CTL の増殖について検討したところ、TGFβ により直接抑制されることがわかった(Cancer Sci.. 2021;112:4037 FIGURE 5 参照)。

(2) 口腔癌免疫抑制環境の組織学的解析

25 症例について検討したところ *TGFBI* の発現は正常上皮、間質部に比べ腫瘍組織の浸潤末端部位に強く見られた。CD8+T 細胞、Treg の浸潤は、*TGFBI* の発現と、それぞれ逆相関、正相関の関係にあった。また、CD8+T 細胞/Treg 比とは逆相関の関係にあった。さらに Ki67+CD8+T 細胞は、胞巣に近接した部位に局在し、Ki67 陽性率は、*TGFBI* 発現と逆相関の関係にあった (Cancer Sci.. 2021;112:4037 FIGURE 9 参照)。

(3) 腫瘍内免疫抑制環境形成における TGFβ1 の役割

4-(1), 4-(2)の成果から、口腔癌組織内において TGFβ1 は腫瘍浸潤先端部から主に産生され、浸潤 CD8+T 細胞の機能(細胞傷害活性, サイトカイン産生能, 増殖能)を抑制すること、また CD8+T 細胞/Treg の比を低下させることが推測された。

TGFβ1 は Treg を標的としたがん免疫治療の併用標的分子として有用である可能性がある。

(4) CTL における CCR4 の発現誘導とその阻害

pp65-CTL と HSC3pp65 を 2 日間共培養すると、pp65 抗原刺激特異的に CCR4 の発現が見られた。また、CD3 モノクローナル抗体(OKT3) を感作した 24 穴プレート上で pp65-CTL を 2 日間培養しても、CCR4 が発現した。ただし、OKT3 は、pp65-CTL 以外の T 細胞(pp65-tetramer 陰性)に対しても発現を促した(図 5a)。次に様々なサイトカイン存在下に pp65-CTL と HSC3pp65 を 2 日間共培養すると、IL-2, 12, 15, TGFβ1 は、CCR4 の発現を亢進した。特に、TGFβ1 において顕著であった。IL-4, 6, 7, 10, 21, TNF- α , IFN- γ においては、発現亢進は見られなかった (Sci Rep. 2022 12;21678 Figure 1 参照)。

(5) ترامチニブによる活性化 CTL 上 CCR4 発現の選択的抑制

健常人 5 例(HD1-5), 口腔がん患者 2 例(Pt1,2) 由来 pp65-CTL と HSC-3pp65 を 2 日間共培養した後、CCR4 の発現をフローサイトメトリーにて測定した(図 2a)。TGFβ1 添加、未添加いずれにおいても単独培養(non-stim)に比べて共培養(stim)において CCR4 の発現は上昇した。TGFβ1 添加においては未添加に比べて発現が亢進した。これら CCR4 の発現は、trametinib の添加 (1μM) により阻害された。この傾向は、OKT3 で刺激をかけた場合にもほぼ同様に観察された(図 2b)。

(6) Trametinib の CTL 機能に及ぼす影響 (Sci Rep. 2022 12;21678 Figure 4 参照)

i) 細胞傷害活性に対する影響

pp65-CTL と HSC-3pp65 を trametinib (0-200ngM) 存在下 18 時間培養後、CD8-Tomato+分画 (HSC-3pp65) の annexin V 陽性率をフローサイトメトリーで測定し、pp65-CTL の細胞傷害活性を評価した。ドナーが異なる 3 種類の pp65-CTL いずれも細胞傷害活性の低下は trametinib の濃度 200nM まで全くみられなかった。また、同じ実験系で CD8+Tomato-分画 (CTL) の annexin V 陽性率を測定し、CTL 自身にアポトーシスが生じるかどうか検討したが、trametinib の濃度 200nM

においてもほぼ、アポトーシスは起こらなかった。

ii) 増殖に対する影響

pp65-CTL と HSC-3pp65 を 10uM BrdU, trametinib (0-200ngM) 存在下 2 日間培養後、CD8+Tomato-分画(HSC-3pp65)の BrdU 陽性率をフローサイトメトリーで測定し、pp65-CTL の増殖を評価した(図 7e,f)。3 例の異なるドナー由来 pp65-CTL のうち 1 例(HD1) は trametinib 濃度依存的に BrdU の取り込みが低下する傾向にあったが、残り 2 例についてはほぼ低下はみられなかった。HSC2, HSC3, HSC4 を単独で 10uM BrdU, trametinib (0-200ngM) 存在下 2 日間培養後、BrdU の陽性率を測定すると、いずれの細胞株においても、trametinib 濃度依存的に BrdU の取り込みが低下した。

iii) IFN- γ , TNF- α の産生

pp65-CTL と HSC-3pp65 を trametinib (0-200ngM) 存在下 4 時間培養後、を細胞内染色し、pp65-CTL の IFN- γ と TNF- α をフローサイトメトリーで測定した。HD1 由来 pp65-CTL については trametinib 濃度依存的に明らかな産生低下がみられた。HD4, HD5 においても低下傾向にあった。

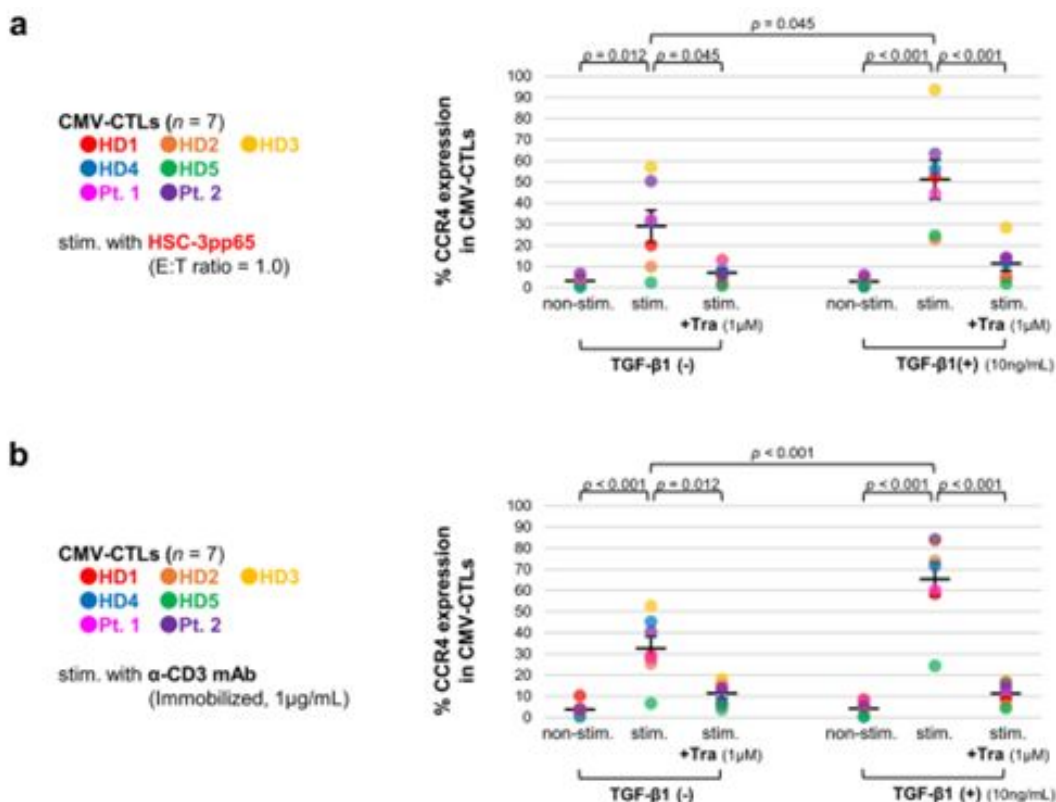


図 2 抗原刺激に伴う CTL 上 CCR4 の発現と trametinib による発現阻害 (Scientific Reports. 2022 12;21678 Figure 2 抜粋)

以上の結果から、trametinib は、CTL の細胞傷害活性に対する影響はないものの、症例によっては、増殖、IFN- γ と TNF- α の産生に負の影響を与えることが示された。

(7) 抗 CCR4 抗体(KM2760)の活性化 CTL に対する細胞傷害と、trametinib による回避

抗原刺激により、CTL 上に CCR4 が発現するので、モガムリズマブ (抗 CCR4 抗体) によって、活性化 CTL が傷害を受ける可能性が高い。Treg 除去時に活性化 CTL も除去してしまえば免疫治療できないので、CTL 上 CCR4 の発現を trametinib により阻害し、モガムリズマブによる活性化 CTL に対する負の影響が防げるかどうか検討した。NK 細胞を含む pp65-CTL (HD1 由来) を、KM2760 (CCR4 ヒトキメラ抗体でモガムリズマブと同様の ADCC 活性をもつ) (0.1ug/ml), trametinib (0-200nM) 存在下、HSC-3pp65 と 5 日間共培養し、pp65-CTL 数 (pp65-tetramer 陽性細胞数) を計測した (図 3)。KM2760 添加により CCR4+CTL の減少がみられたが、trametinib 添加により回復が観察された。Trametinib の添加により、ADCC による活性化 CTL の細胞傷害が限定的ではあるが軽減された。

(8) 抗 CCR4 抗体 ADCC による Treg 細胞傷害における Trametinib の影響

健常人由来 PBMC 3 例、口腔がん患者由来 PBMC 2 例について、抗 CCR4 抗体 KM2760 (0.1ug/ml), trametinib (0-200ng/ml) を含む培地で、5 日間培養し、抗 CCR4 抗体 ADCC による Treg 傷害に対

する trametinib の影響を検討した (図 4)。いずれの trametinib 濃度においても、抗 CCR4 抗体によりエフェクター Treg 分画 (CD45RA-FOXP3++) がほぼ完全に除去された。従って trametinib の影響はほとんど受けないことが明らかとなった。

CTL は、活性化に伴い CCR4 が発現し、抗 CCR4 抗体と NK 細胞により ADCC による傷害を受けた。Trametinib はこの傷害を抑制した。エフェクター Treg 上 CCR4 の発現は、trametinib により低下せず、trametinib 存在下でも、抗 CCR4 抗体と NK 細胞による ADCC で傷害を受けた。抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) による Treg を標的とした免疫治療の際、trametinib との併用は、活性化 CTL に対する、モガムリズマブの傷害を抑制し、Treg に対する選択的な傷害効果をもたらすことが期待される。

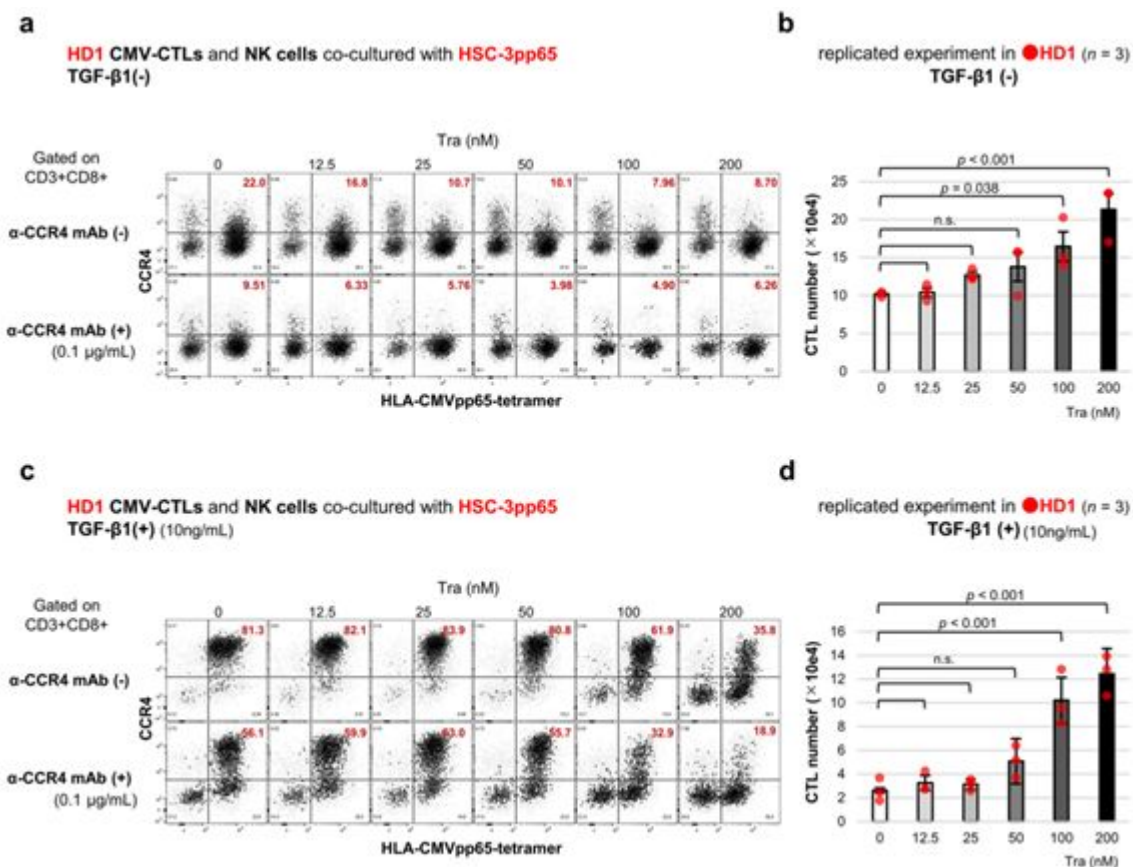


図 3 Trametinib による活性化 CTL に対する抗 CCR4 抗体 ADCC の軽減効果 (Scientific Reports. 2022 12;21678 Figure 5 引用)

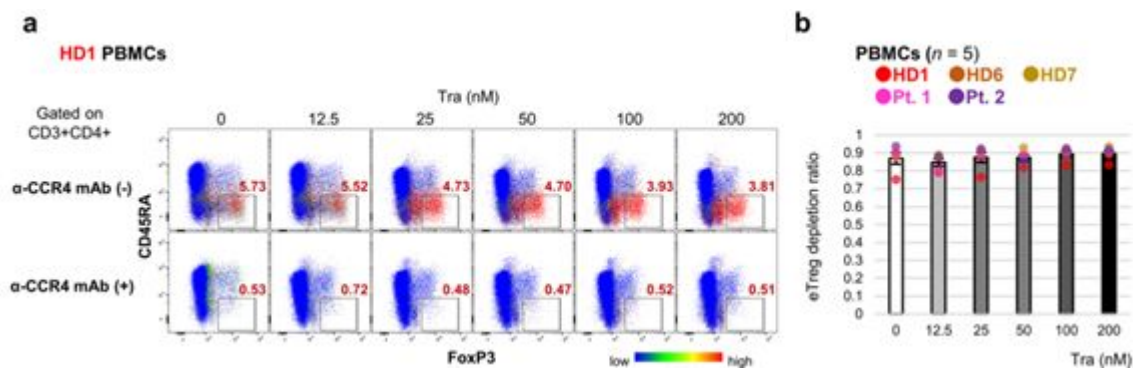


図 4 抗 CCR4 抗体 ADCC による Treg 細胞傷害における Trametinib の影響 (Scientific Reports. 2022 12;21678 Figure 6 引用)

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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ono S, Suzuki S, Kondo Y, Okubo I, Goto M, Ogawa T, Kato H, Ito H, Takahara T, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Nagao T, Ueda R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Trametinib improves Treg selectivity of anti-CCR4 antibody by regulating CCR4 expression in CTLs in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22773-1.	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 Y, Suzuki S, Ono S, Goto M, Miyabe S, Ogawa T, Tsuchida H, Ito H, Takahara T, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Ueda R, Nagao T.	4. 巻 23
2. 論文標題 In Situ PD-L1 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Induced by Heterogeneous Mechanisms among Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 4077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23084077.	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 Sakuma K, Kii T, Takahashi H, Suzuki S, Yoshikawa K, Ogawa T, Tanaka A.	4. 巻 42
2. 論文標題 An In Vivo Study of Local Administration of Low-dose Anti-PD-1 Antibody Using an Oral Cancer Cell Line.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ainticancer Research	6. 最初と最後の頁 4293-4303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15929.	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 Yamanaka S, Suzuki S, Ito H, Sivasundaram K, Hanamura I, Okubo I, Yoshikawa K, Ono S, Takahara T, Satou A, Tsuzuki T, Ueda R, Ogawa T, Fujimoto Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Establishment of Mucoepidermoid Carcinoma Cell Lines from Surgical and Recurrence Biopsy Specimens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 1722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24021722	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 Y, Suzuki S, Takahara T, Ono S, Goto M, Miyabe S, Sugita Y, Ogawa T, Ito H, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Ueda R, Nagao T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Improving function of cytotoxic T-lymphocytes by transforming growth factor- inhibitor in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4037-4049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15081	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 Y, Suzuki S, Ono S, Goto M, Miyabe S, Ogawa T, Tsuchida H, Ito H, Takahara T, Satou A, Tsuzuki T,	4. 巻 23
2. 論文標題 In Situ PD-L1 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Induced by Heterogeneous Mechanisms among Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 4077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23084077.	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ono S, Suzuki S, Kondo Y, Okubo I, Goto M, Ogawa T, Kato H, Ito H, Takahara T, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Nagao T, Ueda R.
2. 発表標題 Trametinib improves Treg selectivity of anti-CCR4 mAb by regulating CCR4 expression in CTLs induced via TCR/TGF- signaling
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kondo Y, Suzuki S, Takahara T, Ono S, Goto M, Miyabe S, Sugita Y, Ogawa T, Ito H, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Ueda R, Nagao T.
2. 発表標題 Transforming growth factor- inhibitor is a candidate drug for immunotherapy of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	シバスダラン カルナン (Karnan Sivasundaram) (30557096)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究 分担者	小川 徹也 (Ogawa Tetsuya) (40334940)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究 分担者	土本 純 (Tsuchimoto Jun) (70632868)	愛知医科大学・分子医科学研究所・助教 (33920)	

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