

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07233

研究課題名(和文) 抗原特異的CD8T細胞の疲弊化誘導における新規免疫チェックポイント分子の探索

研究課題名(英文) Identification of novel immune check point molecules in exhausted CD8+ T cells

研究代表者

矢島 俊樹 (Yajima, Toshiki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20346852

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)：本研究では我々が独自に開発したOT-Iマウスを用いたマウス腫瘍モデルを用いて抗原特異的疲弊化CD8T細胞を単離し、遺伝子発現の変化を網羅的解析で検討し新規免疫チェックポイント分子を探索することを目的としてきた。腫瘍接種14日目(活性化CD8T細胞)および21日目(疲弊化CD8T細胞)の脾臓におけるOT-I細胞をそれぞれセルソーターで単離し、RNAシーケンスを用いて網羅的解析を行った。疲弊化OT-I細胞で発現が上昇または低下している遺伝子をそれぞれ複数同定した。その中で疲弊化に関与する可能性があるWntシグナル関連蛋白Xに着目し解析を行い新規免疫チェックポイント分子となるか探索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで新規免疫チェックポイント分子の探索のため腫瘍モデルで抗原特異的CD8T細胞を単離し網羅的解析を行った研究はなく学術的に独自性が高い。従来、慢性感染症モデルで疲弊化CD8T細胞の解析が行われてきたため、腫瘍モデルで疲弊化の分子機構を解析することは、腫瘍免疫応答を直接解析でき意義がある。また本研究から腫瘍免疫応答における抗原特異的CD8T細胞の疲弊化誘導の分子機構の更なる解明につながるだけでなく、新規免疫チェックポイント分子を解明できる可能性があることは、臨床に直結する研究であり臨床的にも意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the novel immune check point molecules during tumor immune response, we performed the cell sorting of Antigen-specific CD8+ T cells from originally established mouse tumor model using OT-I mice for comprehensive analysis of gene expression profiling. We purified the OT-I cells from spleen in our model using FACS Aria either on day 14 or 21 after tumor inoculation, and then analyzed comprehensive gene expression profiling using RNA sequence in each OT-I cells. We found the several gene in either upregulated or downregulated RNA expression in exhausted OT-I cells. We focused the Wnt signal relating protein X upregulated in exhausted OT-I cells in those gene expression profiling and are now exploring those molecules to become novel immune check point molecules during tumor immune response.

研究分野：癌免疫療法

キーワード：疲弊化CD8T細胞 新規免疫チェックポイント分子

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍免疫応答において抗原特異的 CD8T 細胞が重要な役割を担っているが、それらは疲弊化し十分な抗腫瘍効果を示せないことが知られている。近年、PD-1/PD-L1 を含めた免疫チェックポイント分子が疲弊化誘導のメカニズムとして解明され、そのシグナルをブロックする癌免疫療法が臨床応用されている (Reck M et al. N Eng J Med 2016;375:1823-33, Borghaei H et al. N Eng J Med 2015;373:1627-39, Brahmer J et al. N Eng J Med 2015;373:13-35)。しかしながら、その効果は一部の症例に限定され、一時的で十分でなく、その制御には更なる疲弊化誘導メカニズムの解明が必要となる。

近年、新規免疫チェックポイント分子として、LAG-3、TIM-3、TIGIT などが報告され (Huang CT et al. Immunity 2004; 21:503-513, Johnston RJ et al. Cancer Cell 2014; 26:923-937, Dougall WC et al. Immunol Rev 2017; 276:112-120)、それらと抗 PD-1 抗体の併用療法がマウス腫瘍モデルで試みられているが (Hung AL et al. Oncoimmunology 2018;7:e1466769, Sakuishi K et al. J Exp Med 2010; 207:2187-94)、抗腫瘍効果は十分でなく、いまだ未知の免疫チェックポイント分子が存在することが想定される。

これらを解明するためには、抗原特異的 CD8T 細胞の疲弊化誘導メカニズムを詳細に解析することが必要であるが、腫瘍免疫応答では、十分な数の抗原特異的 CD8T 細胞が誘導されず解析が困難である。卵白アルブミン等のモデル抗原を用いてもその数が CD8T 細胞の 0.5-2.0% と限られ、これでも解析が難しく (Yajima T et al. Mol Immunol 2019; 107:97-105) 新規モデルを確立し解析する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が独自に確立したマウス腫瘍モデルで抗原特異的疲弊化 CD8T 細胞を誘導し、それを単離しその細胞で発現する新規免疫チェックポイント分子を探索することにある。これまで感染免疫で OT-I マウスを用いたモデルで抗原特異的 CD8T 細胞の産生、維持の分子機構の解析を行い、いくつかの研究成果をあげてきてきた (Yajima T et al. J Immunol 2006; 176:507-15, Yajima T et al. J Immunol 2005; 174:3590-7)。これらの系を応用し腫瘍モデルで抗原特異的疲弊化 CD8T 細胞を通常の 10-50 倍誘導することを確認している。

モデル抗原ではあるが、今まで腫瘍モデルで抗原特異的 CD8T 細胞を解析した報告は皆無であり、独自性が高い。腫瘍モデルで疲弊化の分子機構を解析することは、腫瘍に対する免疫応答を直接解析できるため、研究としてより意義があると考えられる。

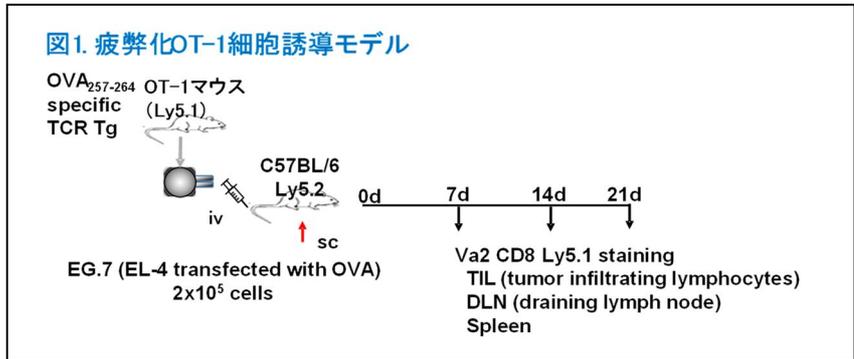
### 3. 研究の方法

本研究では、抗原特異的疲弊化 CD8T 細胞を誘導するモデルを用いて、この細胞における疲弊化に關与する新規免疫チェックポイント分子の探索を行う。誘導した疲弊化 OT-I 細胞を単離し、遺伝子発現の変化をマイクロアレーで解析する。また、疲弊化 OT-I 細胞をラットに免疫しモノクローナル抗体を作成し、その中で疲弊化細胞を再活性化する抗体を同定する。レトログレードに、その抗体が認識する蛋白を同定し、新規免疫チェックポイント分子を解明する。

OVA<sub>257-264</sub> 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニック (Tg) マウスである OT-I マウスと Ly5.1 マウスを交配した、OT-I Ly5.1 マウスの脾臓細胞から、ナイーブ CD8T 細胞を AutoMACS でネガティブセレクションにて単離し、正常マウス (C57BL/6 マウス、Ly5.2) に移入する (図 1)。翌日移入したマウスに卵白アルブミン産生 EL-4 細胞 (EG.7) を皮下接種し、腫瘍接種後経時的に脾臓細胞における抗原特異的 CD8T 細胞を OVA<sub>257-264</sub> ペプチド MHC テトラマーまたは V<sub>2</sub> 抗体と

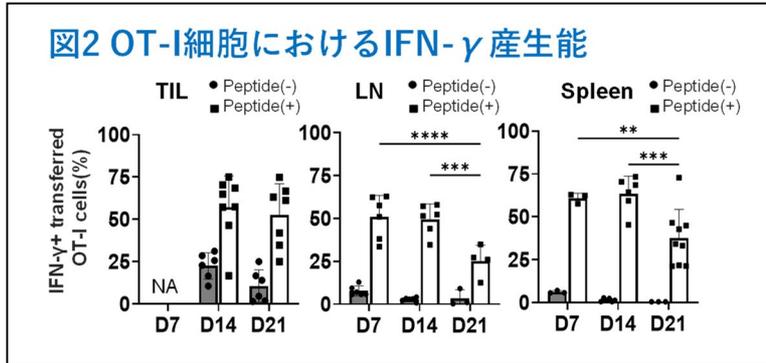
CD45.1 (Ly5.1) 抗体で検出する。経時的にそれらの細胞の機能をペプチド刺激後の IFN- $\gamma$  産生能で評価して疲弊化について検討する。

腫瘍接種 14 日目および 21 日目に脾臓細胞における移入した OT-1 細胞をセルソーター (FACS Aria) で単離する。投与前の Naive OT-1 細胞もソーティングして、疲弊化 OT-1 細胞における遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイで比較検討する。疲弊化 OT-1 細胞で発現が上昇した遺伝子を調べ、新規免疫チェックポイント分子の可能性を探る。



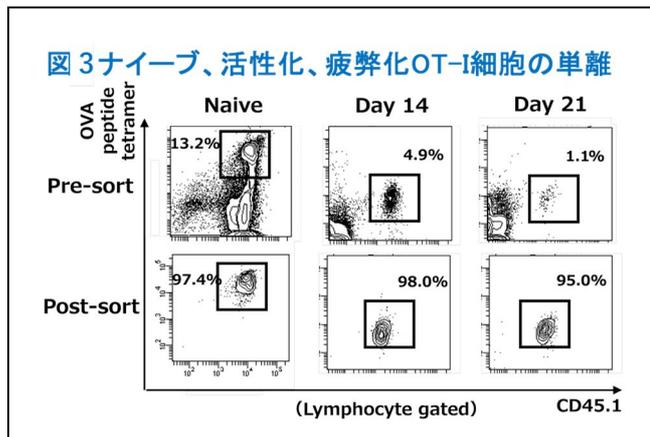
#### 4. 研究成果

新規免疫チェックポイント分子の探索のためには、生体内の 10~50 倍程度まで抗原特異的 CD8T 細胞を誘導可能なマウス腫瘍モデルを確立した。同モデルで腫瘍接種後 7, 14, 21 日目の脾臓における OT-1 細胞の動態、その機能および疲弊化マーカーをフローサイトメータで解析し、その細胞の疲弊化を評価した。腫瘍皮下接種後、脾臓で誘導される OT-1 細胞は、14 日目でピークを迎え以後減少した。OT-1 細胞における IFN- $\gamma$  の産生を、14 日目と 21 日目でそれぞれ比較すると 70%と 35%であった(図2)。PD-1 発現は 80%と 70%と横ばいであった。これらの結果より、14 日目では活性化 CD8T 細胞、21 日目では疲弊化細胞であると判断した。



続いてナイーブ OT-1 細胞、腫瘍接種 14 日目 (活性化 CD8T 細胞)、21 日目 (疲弊化 CD8T 細胞) の脾臓における OT-1 細胞をそれぞれセルソーターで単離した(図3)。6 乗オーダーの解析に十分な数の細胞が単離できたが、RIN 値が高く、解析には至らなかった。死細胞を可能な限り少なくするため、単離の条件設定を変更し繰り返し行ったが、CAGE を行うための RIN 値が低い分量な RNA 量が取れなかった。そのため網羅的解析を CAGE で行うことは困難と判断した。そこで RNA シークエンスを用いた網羅的解析は可能であったため同方法で行うこととした。RNA シークエンスを行うための RNA の収量と RIN 値が保たれていたため網羅的解析に提出した。得られたデータで、活性化 OT-1 細胞と疲弊化 OT-1 細胞を比較し、発現上昇している遺伝子と発現低下している遺伝子をそれぞれ複数同定できた。

その中で疲弊化に關与する可能性がある Wnt シグナル関連蛋白 X に着目し解析を行うこととし現在解析中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	村主遼、矢島俊樹、星野弘毅、栗山健吾、塚越真梨子、山中崇弘、萩原慶、石井範洋、渡辺亮、新木健一郎、播本憲史、調 憲
2. 発表標題	抗原特異的CD8T細胞の疲弊化誘導における各免疫チェックポイント分子の役割
3. 学会等名	第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	星野弘毅、矢島俊樹、播本憲史、村主遼、萩原慶、山中崇弘、石井範洋、塚越真梨子、渡辺亮、新木健一郎、調 憲
2. 発表標題	抗原特異的CD8T細胞誘導マウス腫瘍モデルを用いた動態解析
3. 学会等名	第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	村主遼、矢島俊樹、星野弘毅、山中崇弘、萩原慶、塚越真梨子、石井範洋、渡辺亮、新木健一郎、播本憲史、調 憲
2. 発表標題	抗原特異的CD8T細胞の疲弊化誘導における各免疫チェックポイント分子の役割
3. 学会等名	第122回日本外科学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	矢島俊樹、村主遼、星野弘毅、吉川良平、大瀧容一、尾林海、中澤世識、河谷菜津子、矢澤友弘、塚越真梨子、調 憲
2. 発表標題	抗PD-1抗体耐性メカニズムにおける疲弊化CD8T細胞の各免疫チェックポイント分子の役割
3. 学会等名	第122回日本外科学会学術集会
4. 発表年	2022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	大瀧 容一 (Ohtaki Yoichi) (00625402)	群馬大学・医学部附属病院・助教  (12301)	
研究分担者	塚越 真梨子 (Tsukagoshi Mariko) (60781317)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教  (12301)	
研究分担者	中澤 世識 (Nakazawa Seshiru) (60791978)	群馬大学・医学部附属病院・助教  (12301)	
研究分担者	調 憲 (Shirabe Ken) (70264025)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授  (12301)	

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