

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K07234  
研究課題名（和文）幹細胞様CD8T細胞を起点とする腫瘍内T細胞分化の理解に基づくがん免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of cancer immunotherapy based on understanding of intratumoral T-cell differentiation originating from stem-like CD8T cells

研究代表者  
那須 亮（Nasu, Ryo）  
千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30466859  
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）：本研究は申請者らが新たに見出した標的分子であるCD69の機能に着目し、stem-like CD8T細胞の維持と分化のメカニズムを明らかにすることを目指した。腫瘍特異的CD8T細胞を対象とした1細胞RNA-seq解析の結果から、CD69欠損は転写因子TOXの発現を抑制することにより、所属リンパ節におけるstem-like CD8T細胞からterminally differentiated CD8T細胞への分化を促進していると考えられた。従って、CD69は所属リンパ節のCD8T細胞分化を制御する全く新しいタイプの治療標的であると考えられた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが新たに見出した標的分子であるCD69に着目した本研究は、国内外を通じて類似の研究がない独自で独創的な研究である。腫瘍所属リンパ節の腫瘍特異的CD8T細胞を治療標的とする免疫療法は、様々ながん種に対して有効な可能性があると考えている。今後、我々の知見からCD69を標的とした抗腫瘍効果の高いCD8T細胞分化を誘導する新規がん免疫療法が開発され、がん治療に新たな局面が拓かれることを期待している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the function of a newly identified target molecule, CD69, to elucidate the mechanisms of stem-like CD8T cell maintenance and differentiation. Single-cell RNA-seq analysis of tumor-specific CD8T cells suggested that CD69 deficiency promotes differentiation of stem-like CD8T cells into terminally differentiated CD8T cells in tumor-draining lymph nodes by suppressing the expression of the transcription factor TOX. Thus, CD69 is a novel therapeutic target that regulates CD8T cell differentiation in tumor-draining lymph nodes.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん免疫 CD69 腫瘍特異的CD8T細胞 所属リンパ節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がんは本邦における死因第一位の重大疾病である。進行症例に対しては三大療法と呼ばれる外科手術、放射線、抗がん剤を組み合わせた集学的治療が施されるが、その効果は限定的であることも多い。このような状況において、第四のがん治療として免疫療法の有効性が期待されている。しかし、免疫療法が劇的な効果を示す患者が認められる一方で、その奏効率は低いことが多く、新しいメカニズムに基づく新規がん免疫療法の開発が必須である。

最近の研究により、腫瘍内 CD8T 細胞は一様ではなく、様々な形質を示す細胞集団から構成されていることが明らかになった。さらに、転写因子 TCF1 を発現する幹細胞様 (stem-like) CD8T 細胞を頂点とする分化経路が存在することが報告された。Stem-like CD8T 細胞は細胞傷害活性を持たないが、自己複製により長期間生存することが可能である。その一方で、Granzyme B や各種サイトカインを発現する細胞傷害性の分化型 (terminally differentiated) CD8T 細胞を生成する。免疫療法の抗腫瘍効果が発揮されるためには、stem-like CD8T 細胞を起点とする腫瘍内 CD8T 細胞分化が滞りなく進行し、細胞傷害活性を持つ terminally differentiated CD8T 細胞が効率良く生成されることが重要である。従って、stem-like CD8T 細胞の維持と分化のメカニズムを明らかにすることにより、抗腫瘍効果の高い腫瘍内 CD8T 細胞分化を誘導する新規がん免疫療法の開発につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

申請者らは stem-like CD8T 細胞に発現する新たな標的分子を探索している過程で、C 型レクチンファミリーに属する II 型膜貫通型タンパク質である CD69 を見出した (Koyama-Nasu et al, *Int. Immunol.* 2022)。申請者らはこれまでに CD69 欠損マウスの抗腫瘍免疫応答が増強されていることを明らかにしたが (Mita et al, *Int. Immunol.* 2018; Kimura et al, *Semin. Immunopathol.* 2019)、その腫瘍内 CD8T 細胞の解析を進めた結果、stem-like CD8T 細胞から terminally differentiated CD8T 細胞への分化が促進されていた。さらに、担がんマウスに対する抗 CD69 抗体投与の効果調べた結果、腫瘍内において Granzyme B を発現する腫瘍特異的 CD8T 細胞が増えていることを見出した。従って抗 CD69 抗体投与も、stem-like CD8T 細胞を標的から terminally differentiated CD8T 細胞への分化が促進することにより、抗腫瘍効果を発揮していると考えられた。このような背景から、本研究は CD69 の機能に着目し、stem-like CD8T 細胞の維持と分化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、抗腫瘍 CD8T 細胞応答の始まりの場である所属リンパ節の解析を行い、CD8T 細胞分化の総合的理解に基づく新規がん免疫療法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

これまでの実験結果を踏まえて、CD69 欠損担がんマウスおよび各種抗体を投与した担がんマウスにおける腫瘍組織および所属リンパ節の腫瘍特異的 CD8T 細胞の 1 細胞 RNA-seq 解析を行い、抗腫瘍効果を担う腫瘍内 CD8T 細胞の分化過程を明らかにした。内在性がん抗原特異的 CD8T 細胞を解析するために、MHC テトラマーで検出可能な AH1 がん抗原を発現するマウス大腸がん細胞株 CT26 を実験に用いた。

実験 (1) CD8T 細胞分化制御における CD69 の役割の解析

CD69 野生型および CD69 欠損担がんマウスの腫瘍組織および所属リンパ節から AH1 が

ん抗原特異的 CD8T 細胞 10,000 細胞を分取し、10x Genomics 社 Chromium システムを用いて、1 細胞毎の遺伝子発現プロファイルを取得した。各細胞の特性を明らかにして細胞集団のクラスタリングを行った。クラスタリングされた細胞集団の遺伝子発現プロファイル、既得の stem-like CD8T 細胞および terminally differentiated CD8T 細胞の遺伝子発現プロファイルと比較し、各クラスタの細胞種を同定した。CD69 野生型と CD69 欠損マウスにおける各クラスタ構成比を比較し、CD69 欠損によって差異が生じる細胞種を同定した。

実験 (2) CD8T 細胞分化の擬似時系列解析

遺伝子発現プロファイルの類似性に基づいて擬似時間軸を定義し、細胞分化の軌跡を描出した。まず擬似時間軸上で発現が変動する遺伝子を抽出し、CD8T 細胞分化に伴う *Cd69* 遺伝子の発現変動を評価した。続いて実験 (1) において見出された CD69 欠損により差異が生じる細胞種の細胞分化の軌跡上の位置を特定し、CD8T 細胞分化における CD69 の役割を明らかにした。

実験 (3) CD8T 細胞分化制御における CD69 抗体投与の効果の解析

CT26 担がんマウスに対して、抗 CD69 抗体、抗 PD-1 抗体および両者の併用投与を行った。実験 (1, 2) と同様の解析を行い、各種抗体投与により差異が生じるクラスタの細胞種を同定した。差異が生じる細胞種の細胞分化の軌跡上の位置を特定し、CD8T 細胞分化における抗 CD69 抗体、抗 PD-1 抗体および両者の併用投与の効果を明らかにした。

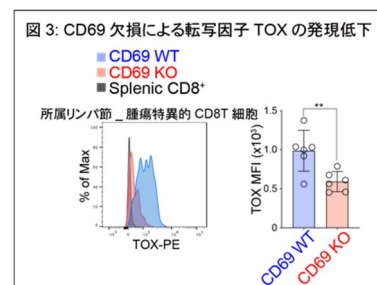
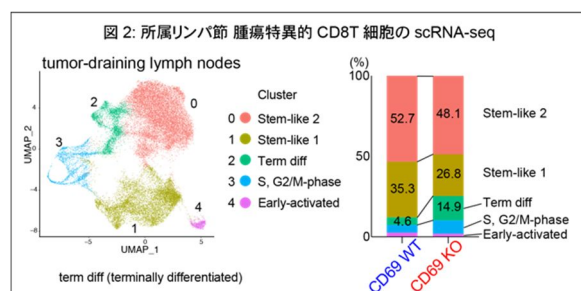
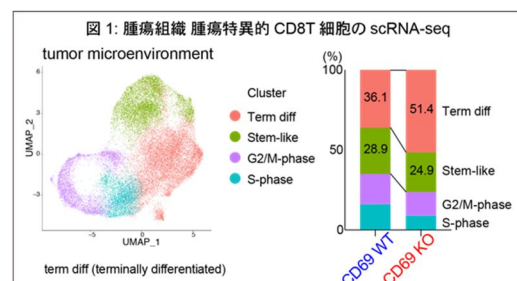
以上のデータを統合することにより、所属リンパ節と腫瘍組織に跨る腫瘍特異的 CD8T 細胞分化の多面的理解を深めた。

#### 4. 研究成果

腫瘍特異的 CD8T 細胞の 1 細胞 RNA-seq 解析を行った結果、CD69 欠損マウスでは腫瘍組織に細胞傷害性の terminally differentiated CD8T 細胞が多く存在することで抗腫瘍免疫応答を亢進していると考えられた (図 1) (Koyama-Nasu et al, *Cancer Immunol. Res.* 2023)。一方、抗腫瘍免疫応答の起点となるのは腫瘍所属リンパ節である。近年、stem-like CD8T 細胞は所属リンパ節で生成され、腫瘍組織に流入後に terminally differentiated CD8T 細胞に分化することが明らかにされた (Connolly et al, *Sci. Immunol.* 2021; Schenkel et al, *Immunity* 2021)。興味深いことに、CD69 欠損マウス

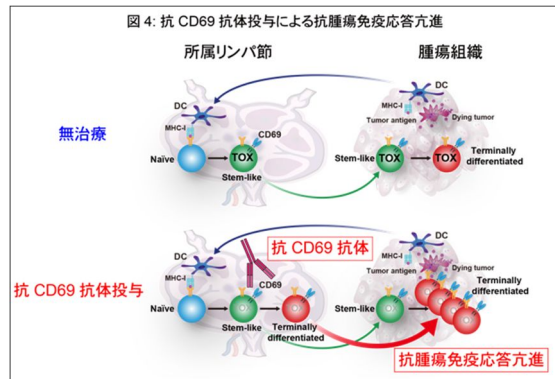
の所属リンパ節で既に terminally differentiated CD8T 細胞の増加が認められた (図 2)。従って、CD8T 細胞分化制御における CD69 の作用点は所属リンパ節であると考えられた。

このような現象を誘導する分子機構として、CD69 欠損マウスの所属リンパ節に存在する腫瘍特異的 CD8T 細胞では、転写因子 TOX の発現が低下していることを見出した (図 3)。TOX は抗腫瘍 CD8T 細胞応答のマスター転写因子であり、継続的な腫瘍抗原からの抗原刺激により誘導され、主に stem-like CD8T 細胞の維持に寄与していることが報告されてい



る。従って、CD69欠損はTOXの発現を抑制することにより、所属リンパ節におけるstem-like CD8T細胞からterminally differentiated CD8T細胞への分化を促進していると考えられた。

膜タンパク質であるCD69は、特異的抗体による機能障害が可能である。担がんマウスに対して抗CD69抗体投与を投与すると、terminally differentiated CD8T細胞の増加と抗腫瘍効果の増強が認められた。従って、CD69は所属リンパ節のCD8T細胞分化を制御する全く新しいタイプの治療標的であると考えられた(図4)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Koyama-Nasu Ryo, Kimura Motoko Y., Kiuchi Masahiro, Aoki Ami, Wang Yangsong, Mita Yukiyo, Hasegawa Ichita, Endo Yukihiro, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Motohashi Shinichiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 CD69 Imposes Tumor-Specific CD8+ T-cell Fate in Tumor-Draining Lymph Nodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-22-0406	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 Shibamiya A, Miyamoto-Nagai Y, Koide S, Oshima M, Rizq O, Aoyama K, Nakajima-Takagi Y, Kato R, Kayamori K, Isshiki Y, Oshima-Hasegawa N, Muto T, Tsukamoto S, Takeda Y, Koyama-Nasu R, Chiba T, Honda H, Yokote K, Iwama A, Sakaida E, Mimura N	4. 巻 72
2. 論文標題 The pathogenetic significance of exhausted T cells in a mouse model of mature B cell neoplasms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2635 ~ 2648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Koyama-Nasu Ryo, Wang Yangsong, Hasegawa Ichita, Endo Yukihiro, Nakayama Toshinori, Kimura Motoko Y	4. 巻 34
2. 論文標題 The cellular and molecular basis of CD69 function in anti-tumor immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 555 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac024	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 Sarkar Murshed H., Yagi Ryoji, Endo Yukihiro, Koyama-Nasu Ryo, Wang Yangsong, Hasegawa Ichita, Ito Toshihiro, Junttila Ilkka S., Zhu Jinfang, Kimura Motoko Y., Nakayama Toshinori	4. 巻 16
2. 論文標題 IFN suppresses the expression of GF11 and thereby inhibits Th2 cell proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260204	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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryo Nasu, Yangsong Wang, Yukihiro Endo, Ichita Hasegawa, Atsushi Onodera, Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama, Motoko Y. Kimura
2. 発表標題 CD69 regulates anti-tumor CD8T cell responses
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 那須 亮, Wang Yangsong, 長谷川 一太, 遠藤 将大, 中山 俊憲, 木村 元子.
2. 発表標題 腫瘍特異的CD8T細胞の分化運命決定機構
3. 学会等名 KTCC第31回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimura M., Nasu R., Mita Y., Wang Y., Endo Y., Hasegawa I., Motohashi S., Nakayama T.
2. 発表標題 CD69 regulates anti-tumor immunity
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村元子, 横山将也, 小林弘信, 林崎浩史, 遠藤将大, Wang Yangsong, 長谷川一太, 那須亮, 中山俊憲
2. 発表標題 CD69-My19システムと炎症制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Nasu, Yangsong Wang, Yukihiro Endo, Ichita Hasegawa, Yuki Yoshi Mita, Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama, Motoko Y. Kimura.
2. 発表標題 CD69 regulates tumor-specific CD8 T cell differentiation in tumor-draining lymph nodes.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Nasu, Yangsong Wang, Yukihiro Endo, Ichita Hasegawa, Yuki Yoshi Mita, Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama, Motoko Y. Kimura.
2. 発表標題 CD69 controls differentiation of tumor-specific CD8T cells in tumor-draining lymph nodes.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yukihiro Endo, Tatsuya Ueno, Ichita Hasegawa, Yangsong Wang, Ryo Nasu & Motoko Y. Kimura.
2. 発表標題 Role of CD69 on thymic regulatory T cell development.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yangsong Wang, Ryo Nasu, Shunka Kanou, Yukihiro Endo, Ichita Hasegawa & Motoko Y. Kimura.
2. 発表標題 The essential role of central tolerance in tumor progression.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 将大, 上野 達矢, 長谷川 一太, Wang Yangsong, 那須 亮, 木村 元子.
2. 発表標題 腺内制御性T細胞分化におけるCD69の役割.
3. 学会等名 KTCC第31回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 将大, 上野 達矢, 那須 亮, 長谷川 一太, Wang Yangsong, 木村 元子, 中山 俊憲.
2. 発表標題 制御性T細胞の胸腺内分化・機能・生体恒常性の維持におけるCD69分子の役割の解明.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那須 亮, 木村 元子, 中山 俊憲.
2. 発表標題 腫瘍特異的CD8T細胞の分化制御におけるCD69の役割
3. 学会等名 KTCC第30回学術集会
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	岩立 康男  (Iwadate Yasuo)  (70272309)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	



6. 研究組織（つづき）

	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	本橋 新一郎  (Motohashi Shinichiro)  (60345022)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	

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