

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08314

研究課題名（和文）悪性黒色腫の腫瘍特異的疲弊T細胞に発現する新規接着因子の機能解析と臨床応用

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel cell adhesion molecule expressed in the exhausted T cells infiltrated to melanoma

研究代表者

盛永 敬郎（Morinaga, Takao）

千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ 細胞治療開発研究部・研究員

研究者番号：30757000

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）：メラノーマ患者さんから得た腫瘍組織に浸潤している免疫細胞を一細胞シークエンス法で調べ、抗腫瘍活性が高いと思われるT細胞に特に高発現する分子としてVCAM1を同定して、その機能や発現に関わる分子機構を解析しました。その結果、VCAM1はT細胞免疫が活性化するとT細胞上に発現上昇し、細胞表面のCD3と結合することで免疫応答を抑制する機能があることが明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍に反応するT細胞でも免疫応答が抑制される現象がみられ、このような状況を改善できれば高い治療効果が期待できます。我々の見いだしたVCAM1はT細胞免疫に反応して発現しT細胞免疫シグナルを抑制する機能が見られることから、腫瘍免疫応答の抑制に深く関わっているものと考えられます。実際に、T細胞のVCAM1をノックアウトすると腫瘍の増殖が抑えられ、既存の免疫チェックポイント阻害薬との併用効果も見られました。この研究により、VCAM1を標的とした新たな抗腫瘍免疫療法の可能性が示唆されました。

研究成果の概要（英文）：We examined melanoma specimens by scRNAseq and identified VCAM1 as a molecule that was highly expressed in the tumor infiltrated T cells reactive to the tumor cells. We further scrutinized the function of VCAM1 and uncovered that VCAM1 arose when the T cell was activated and bound to CD3 to suppress the immune signals.

研究分野：Cell biology

キーワード：Cancer immunology Melanoma Cell adhesion

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は全世界的に新規患者数が増加しており予後不良である(Dimitriou et al., *Curr Oncol Rep*, 2020)。当該腫瘍は一般に免疫原性が高いため、腫瘍特異的 T 細胞を疲弊状態から再活性化する免疫チェックポイント阻害薬(ICB)は重要な治療法となっている。しかしながら、本邦患者で多く見られる末端黒子型や粘膜型などでは、白人種で多い表在拡大型に比べて ICB の効果は劣る (Yamazaki et al., *Cancer Sci*, 2019)。近年、悪性黒色腫などの腫瘍特異的 T 細胞には「前疲弊状態」や「末期の疲弊状態(*terminal exhausted*)」などの異なる疲弊状態が含まれており、既存の ICB は疲弊状態の一部に対しては効果が見られないことが示唆されている(Miller et al., *Nat Immunol*, 2019)。従って、悪性黒色腫に浸潤する疲弊 T 細胞の観点から効果予測バイオマーカーや、新たな治療標的分子を見いだす必要がある。

2. 研究の目的

我々は悪性黒色腫患者検体の腫瘍浸潤 T 細胞のシングルセルシーケンス(scRNA-seq)から、腫瘍特異的 T 細胞に既知の免疫チェックポイント分子以上に高発現する分子として、VCAM1 を見いだした。そこで腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞において疲弊状態と VCAM1 発現との関係性を明らかにするため、CD8 陽性 T 細胞が VCAM1 を高発現する機序を明らかにする。さらに、VCAM1 の発現が CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍活性に与える機能的影響とその分子機構を明らかにして、新規治療標的となり得るか否かを示す。そのうえで 実際の臨床検体で VCAM1 の発現と ICB 治療効果との関係について検討することで、臨床病理学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

健常ヒト末梢血単核球(PBMC)に疑似 TCR 刺激である抗 CD3 抗体を加えてフローサイトメトリー(FCM)で VCAM1 の発現を解析する。また、一般的に VCAM1 は TNF 刺激による p38MAPK や NF- κ B の活性化を介して発現が上昇するとされており、これらの阻害剤を CD3 刺激に併用することで、接着因子発現が抑制されるか否かを FCM で解析する。

悪性黒色腫に浸潤した T 細胞の scRNA-seq から腫瘍抗原に反応する TCR を同定し、その TCR を Jurkat 細胞株に導入して、当該患者の腫瘍株に反応する NFAT(TCR 下流の転写因子)レポーター細胞を作製した。このレポーター細胞に VCAM1 を過剰発現させ、レポーターの反応を解析する。また、CD8 陽性 T 細胞特異的な VCAM1 ノックアウトマウスで担癌モデルを作製し、抗腫瘍免疫応答を評価する。さらに同モデルで抗 PD-1 抗体の治療効果も検討する。

ICB 使用例を含む悪性黒色腫の病理検体について VCAM1 陽性 T 細胞浸潤を免疫染色法で解析し、予後や治療効果などの臨床病理学的な関係を評価する。

4. 研究成果

PBMC を CD3 抗体で刺激すると CD8 陽性 T 細胞の表面に発現する VCAM1 が増加した。一方、CD4 陽性 T 細胞では発現上昇が見られず、抗体濃度や刺激時間により発現レベルは変化しているようであった。疲弊状態の T 細胞に発現する他のマーカー分子、PD1、TIM3、TIGIT 等が陽性の細胞では、VCAM1 がより高いレベルで発現していた。また、この VCAM1 の発現上昇は TNF 拮抗抗体では抑制できないが、NF- κ B の阻害薬により抑制されたことから、VCAM1 は NF- κ B の経路を介して発現することが明らかになった。

Jurkat 細胞を元にして作成したレポーター細胞は患者由来の腫瘍株と共培養することでルシフェラーゼを発現する。この細胞株に VCAM1 を発現させたところ、生物発光は有意に抑制された。さらに、この細胞株では CD3 の細胞全体での発現レベルは低下していないのに対して、細胞表面の CD3 発現レベルが有意に低下していることを見いだした。VCAM1 を免疫沈降したところ CD3 が共沈降したことから両者は物理的に相互作用することが分かった。また、CD8Cre 依存的に VCAM1 をノックアウトした B6 マウスに MC38 細胞を移植して腫瘍を作成し、浸潤 T 細胞を調べたところ、VCAM1 をノックアウトした CD8 陽性 T 細胞で CD3 の発現レベルが上昇し、エフェクター機能が高まることが明らかとなった。実際に、腫瘍の増殖は VCAM1 ノックアウトマウスで有意に抑制され、抗 PD1 抗体を使用すると腫瘍径が非常に小さくなった。

ICB を使用した 144 例のメラノーマ患者の FFPE を抗 CD8 抗体及び抗 VCAM1 抗体で染色した。このうち、CD8 と VCAM1 がリンパ球に高発現する患者群では、他の群に比べて PFS 及び OS が有意に延長していた。

以上の結果により、我々は活性化した CD8 陽性 T 細胞では VCAM1 が発現してその T 細胞シグナルを抑制していることを明らかにした。今回の研究では VCAM1 による抑制に拮抗する薬剤等は探索していないが、このような薬剤が見いだされれば新たな ICB 治療に繋がる可能性がある。

ICB 治療はすでに様々ながん腫に適用が拡大しているが、全ての症例で効果が見られるわけではない。ICB 治療抵抗性の機序として、腫瘍のネオ抗原欠失や抗原提示能低下、免疫抑制細胞浸潤、T 細胞の高度な疲弊等が研究されている。特に末期疲弊状態で発現する免疫チェックポイント分子の阻害は、既存の ICB との併用効果が期待されている(Kallies et al., *Nat Rev Immunol*, 2020)。我々が注目した悪性黒色腫患者から得た腫瘍浸潤 T 細胞のクラスターも、PD-1、Tim-3、LAG3 などが高発現する高度な疲弊状態と考えられ、このクラスター特異的に高発現する

VCAM1 は、血管内皮細胞やがん細胞での TNF 依存的な発現上昇がリウマチや喘息といった免疫疾患やがん転移に関わる多機能分子である一方で、T 細胞においてはその発現がほとんど報告されていなかった。したがって、VCAM1 の疲弊 T 細胞における発現や機能解析を行った本研究は、疲弊状態の分子機構解明、新規治療法、バイオマーカー開発に向けて重要なものとなるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Y. Naoi, T. Morinaga, T. Inozume, Y. Togashi et al. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 CD106 in tumor-specific exhausted CD8+ T cells mediates immunosuppression by inhibiting TCR signaling | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Research | 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） 10.1158/0008-5472.CAN-23-0453 | 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 T. Morinaga, T. Inozume, Y. Togashi et al. | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Mixed Response to Cancer Immunotherapy is Driven by Intratumor Heterogeneity and Differential Interlesion Immune Infiltration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Research Communications | 6. 最初と最後の頁 739 ~ 753 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2767-9764.CRC-22-0050 | 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 Nagasaki Joji, Inozume Takashi, Morinaga Takao, Togashi Yosuke, et al. | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T?cell clonotypes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 110331 ~ 110331 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110331 | 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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 盛永 敬郎、リン ジェイソン、河津 正人 |
| 2. 発表標題 乳癌におけるTNS3バリエント発現差の同定と解析 |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 リン ジェイソン、盛永 敬郎、河津 正人 |
| 2. 発表標題 次世代・第3世代シーケンス技術によるがんの悪性化に関わる転写スプライスバリエントの探索手法：MuSTA |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 河津 正人、盛永 敬郎、リン ジェイソン |
| 2. 発表標題 ロングリードシーケンサーを用いた腫瘍免疫応答に関する転写バリエントの探索 |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 盛永敬郎、田川雅敏 |
| 2. 発表標題 A drug targeting the G2/M phases enhances replications and cytotoxicity of oncolytic adenoviruses in p53-deficient cells. |
| 3. 学会等名 International oncolytic virus conference 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 盛永 敬郎、リン ジェイソン、河津 正人 |
| 2. 発表標題 乳癌におけるTNS3バリエントの発現制御 |
| 3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉県がんセンター研究所ホームページ
<https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html>
千葉県がんセンター研究所Facebook
https://www.facebook.com/CCCR1.chiba.gan.kenkyujo/?locale=ja_JP

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 | 猪爪 隆史 (Inozume Takashi) (80334853) | 千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501) | |
| 研究分担者 | 富樫 庸介 (Togashi Yosuke) (80758326) | 千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ 細胞治療開発研究部・客員研究員 (82504) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|