

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15499

研究課題名（和文）がん死細胞が放出する糖ヌクレオチドによる、T細胞の疲弊化誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Metabolite secretome of dying cancer cells contributes to T cell dysfunction

研究代表者

日比野 沙奈（Hibino, Sana）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：30836424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：固形がんの局所に浸潤しているT細胞の多くは、がんに対する攻撃力を失った“不応答性(=hyporesponsive)”状態にある。本研究にて申請者は、低酸素・低栄養といったストレス環境下で壊死を起こした癌細胞から放出される低分子代謝物スベルミジンが、エフェクターCD8+ T細胞機能のネガティブレギュレーターとして機能することを見出した。既存阻害剤による癌細胞のスベルミジン合成系の阻害や、中和抗体などで細胞外スベルミジンを直接ターゲティングできる技術を確立することは、免疫チェックポイント阻害剤に代表されるT細胞を標的とした癌免疫療法の有効性を最大限に引き出すために有望な戦略であることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織内では、血管形成の異常に伴い低酸素・低栄養といった過酷なストレス微小環境が形成されており、その結果大量の組織壊死が生じる。本研究は、死んだ癌細胞が免疫抑制性能を有する低分子代謝物であるスベルミジンを細胞外へ放出し、腫瘍進展に寄与することを明らかにした。スベルミジンに代表されるポリアミン類は、癌細胞内部に蓄積する造腫瘍性代謝物、すなわちオンコメタボライトとして働くことがよく知られているが、我々はその新たな役割として、エフェクターCD8+ T細胞機能のネガティブレギュレーターとしての機能を見出すことに成功した。“細胞外”スベルミジンは癌免疫療法における新規治療標的として期待される。

研究成果の概要（英文）：Tumor necrosis is a well-defined indicator of poor patient prognosis in many solid cancers, but its impact on intratumoral T cell responses has been poorly understood. Here, we performed secretome profiling of necrotic tumor cells and identified one of the oncometabolite spermidine as a novel negative regulator of effector CD8+ T cell function. Mechanistically, spermidine interferes with downstream T cell receptor (TCR) signal transduction by down-regulating the plasma membrane cholesterol levels and subsequently inhibiting TCR clustering. We also provide in vivo evidence that spermidine is abundantly detected in the extracellular fluid of mouse tumor tissue, and administration of the polyamine synthesis inhibitor effectively enhances CD8+ T cell-dependent anti-tumor effect. This study uncovers a tumor-derived metabolite checkpoint that restricts T cell tumoricidal activity and offers a potential novel therapeutic target for cancer immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：T細胞 腫瘍免疫 オンコメタボライト スベルミジン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは、固形癌の進展過程で生じる大規模な組織壊死（ネクローシス）が腫瘍促進性の免疫抑制性微小環境の形成に寄与している可能性を見出し、癌死細胞が放出する分子群による免疫制御メカニズムに着目して研究を行ってきた (Hangai *et al. Nat. Immunol.* 2021)。その一環として、抗腫瘍免疫応答において要となるエフェクターCD8⁺ T細胞に対する機能抑制能を指標に、癌死細胞上清を用いて新規の死細胞由来の免疫調節因子のスクリーニングを実施した。その過程で、T細胞の抑制活性が非タンパク質性の水溶性低分子分画に存在することを見出し、網羅的メタボローム解析からスペルミジンを目的分子として同定することに成功した (<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-19K16736/>)。

スペルミジンに代表されるポリアミン類は、癌細胞の内部に蓄積する造腫瘍活性を有する低分子代謝物である‘Oncometabolite (オンコメタボライト)’としてよく知られている。興味深いことに、癌患者の血清や尿、唾液といった生体試料中にも、ポリアミン類が健常個体と比べて顕著に高濃度で検出されることが報告されている(Casero *et al. Nat. Rev. Cancer.* 2018)。我々の研究からも、マウス腫瘍組織の間質液中にスペルミジンが高濃度で検出されることが明らかになっているが(未発表)、これらの“細胞外”ポリアミンが腫瘍進展において何らかの病態生理学的意義を持つかどうかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本課題では、スペルミジンによるT細胞機能抑制の分子メカニズムの解明を中心に、その癌免疫療法における新規治療標的としての可能性を検討した。

3. 研究の方法

In vitro のT細胞アッセイにおいては、C57BL/6マウスの脾臓及びリンパ節より単離したCD8⁺T細胞を、抗CD3/CD28モノクローナル抗体を表面に結合した磁気ビーズ及びIL-2の存在下で培養した。スペルミジンは通常の細胞培養時に使用するFBS (Fetal Bovine Serum) 中に含まれる酸化酵素の作用を受け、アンモニアや過酸化水素、アクロレインといった細胞毒性を有する副産物を生成することから(Holbert *et al. J. Biol. Chem.* 2020)、スペルミジンの添加時はFBSを含有しないT細胞用培地 (TexMACS Medium; Miltenyi Biotec)を用いて培養を行なった。T細胞機能については、エフェクターサイトカインの産生(IFN- γ , IL-2, TNF- α)、及びTCR (T cell receptor)下流のシグナル伝達分子のリン酸化 (total tyrosine, CD3 など)を指標に、フローサイトメトリー (FACS)により評価した。*In vivo* におけるT細胞の活性化は、抗CD3 (2C11)・抗CD28 (37-51) 抗体をC57BL/6マウスのfootpadに投与することで誘導し、18時間後に安楽死させたマウスより所属リンパ節を回収し、解析に用いた。T細胞の網羅的遺伝子発現解析には、Mouse ClariomS Array を利用した。*In vivo* のマウス腫瘍モデルについては、マウスメラノーマ細胞株B16F10の同種移植の系を用いて実験を行った。定期的に腫瘍径を測定することで、腫瘍増殖のモニタリングを行った。一定期間後、安楽死させた担癌マウスから単離した腫瘍組織よりsingle cell suspension を調製し、FACSにより腫瘍浸潤T細胞のimmunophenotype解析を実施した。

4. 研究成果

1) スペルミジンはT細胞のエフェクター活性を負に制御する

マウス CD8⁺ T 細胞の培養系にスペルミジンを添加したところ、IFN- γ や IL-2、TNF- α といったエフェクターサイトカインの産生が大きく減少した。Ki-67 陽性の増殖中の細胞の割合についても有意な減少が確認できた。また、スペルミジンの腹腔内投与を行った C57BL/6 マウスでも、抗 CD3 (2C11)・抗 CD28 (37-51) 抗体の投与により誘導される T 細胞のサイトカイン産生及び増殖が顕著に抑制された。以上より、スペルミジンが *in vitro* 及び *in vivo* で T 細胞機能に対する抑制作用を示すことが明らかになった。

2) スペルミジンは TCR 下流近傍のシグナル伝達を阻害する

(1)の結果を踏まえ、TCR 下流のシグナル伝達分子の挙動に着目した。*In vitro* 培養 CD8⁺ T 細胞では、TCR (CD3/CD28) 刺激により CD3 や Zap70、PLC γ 、Akt といった CD3・CD28 の下流近傍に位置する分子のリン酸化に加え、total のタンパク質チロシンリン酸化レベルが亢進するが、これらはいずれもスペルミジン投与により顕著に抑制された。PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)及び ionomycin により誘導される T 細胞の活性化はスペルミジンによる抑制を受けなかったことを併せて考慮すると、スペルミジンは TCR の下流近傍のシグナル伝達を選択的に阻害しうることが示唆される。

3) スペルミジンは細胞膜コレステロールのダウンレギュレーションを介してエフェクターT細胞応答を抑制する

スペルミジンによる T 細胞機能の抑制メカニズムの詳細を明らかにするべく、コントロールおよびスペルミジン処置を行った *in vitro* 培養 CD8⁺ T 細胞について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を実施した。発現変動遺伝子群について GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)により機能的アノテーションの付加を行ったところ、細胞内コレステロール合成系を制御する遺伝子群の発現がスペルミジンにより有意に低下することを見出した。コレステロールを認識するプローブである Filipin で染色を行ったところ、スペルミジン投与により CD8⁺ T 細胞の細胞膜上のコレステロール量が顕著に減少することが確認できた。注目すべきことに、スペルミジンによる T 細胞の機能抑制は、培養系にコレステロールを添加するとほぼ完全に打ち消された。コレステロールはシグナル伝達の足場構造を構成する細胞膜上脂質ラフトの主要な構成成分であり、TCR の正常なクラスタリングに必須であることが知られているが、スペルミジン処置はこのプロセスを阻害し、その結果、TCR 下流のシグナル伝達および T 細胞のエフェクター化が妨げられることが明らかになった。コレステロールのエステル化酵素 ACAT1 の阻害により CD8⁺ T 細胞膜上のコレステロールレベルを上昇させることで強力な抗腫瘍免疫応答を誘導できることが報告されており(Yang *et al. Nature*. 2016)、我々の見出した癌死細胞由来のスペルミジンを介した一連のメカニズムが、実際に腫瘍局所における T 細胞の機能抑制に関与している可能性は高いと考えられる。

4) 細胞外スペルミジンは抗腫瘍 T 細胞応答を抑制する

細胞外スペルミジンが *in vivo* における抗腫瘍 T 細胞応答に対しても影響を与えるか否か、担癌モデルマウスを用いて検討した。ポリアミン合成阻害剤である eflornithine を投与したとこ

る、CD8⁺ T 細胞依存的な腫瘍増殖の抑制が確認できた。腫瘍浸潤免疫細胞の解析を行なったところ、eflornithine 投与により、CD8⁺ T 細胞の割合、特に Ki-67 陽性細胞やエフェクターサイトカイン産生細胞の割合が顕著に増加することが確認できた。興味深いことに、スペルミジンの投与を同時に行った場合、eflornithine 投与による CD8⁺ T 細胞応答の活性化はコントロール群と同程度にまでキャンセルされた。これらの結果は、癌細胞のポリアミン合成を阻害することで抗腫瘍 T 細胞応答を活性化できること、そしてその効果が少なくとも部分的には細胞外スペルミジンに対する作用に依存していることを示唆している。

続いて、免疫チェックポイント阻害剤とポリアミン合成阻害剤の併用療法を試みた。本研究で用いた B16F10 細胞の皮下移植モデルは抗 PD-1 抗体の単独療法に対しては抵抗性を示すことがよく知られているが、eflornithine と併用することで、それぞれの単剤投与時と比較しても有意な腫瘍増殖の抑制効果を発揮することがわかった。

以上に示した通り、本研究では、スペルミジンが癌細胞内因性の増殖因子としての既知の機能に加え、エフェクター T 細胞応答を抑制する免疫チェックポイントとして機能することで腫瘍進展に寄与している可能性を見出すことができた。TCGA(The Cancer Genome Atlas)の遺伝子発現データに基づく gene signature 解析からも、肺癌をはじめとした複数のヒト癌種において、エフェクター T 細胞応答とポリアミン合成系の gene signature の間に有意な負の相関が確認され、我々の細胞・マウスレベルでの検証結果を支持する知見を得られている。既存のポリアミン合成阻害剤による癌細胞のスペルミジン合成系の阻害や、中和抗体などで細胞外スペルミジンを直接ターゲティングできる技術を確立することは、免疫チェックポイント阻害剤に代表される T 細胞を標的とした癌免疫療法の有効性を最大限に引き出すために有望な戦略であることが期待される。

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 Hangai Sho, Kawamura Takeshi, Kimura Yoshitaka, Chang Ching-Yun, Hibino Sana, Yamamoto Daisuke, Nakai Yousuke, Tateishi Ryosuke, Oshima Masanobu, Oshima Hiroko, Kodama Tatsuhiko, Moriya Kyoji, Koike Kazuhiko, Yanai Hideyuki, Taniguchi Tadatsugu	4. 巻 22
2. 論文標題 Orchestration of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by ubiquitous cellular protein TCTP released by tumor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 947 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00967-5	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 Hibino Sana, Kawazoe Tetsuro, Kasahara Hidenori, Itoh Shinji, Ishimoto Takatsugu, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Taniguchi Koji	4. 巻 22
2. 論文標題 Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5421 ~ 5421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115421	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 Sana Hibino, Shotaro Eto, Sho Hangai, Keiko Endo, Sanae Ashitani, Maki Sugaya, Tsuyoshi Osawa, Tomoyoshi Soga, Tadatsugu Taniguchi, Hideyuki Yanai	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor cell-derived spermidine is an oncometabolite that suppress TCR clustering for intratumoral CD8+ T cell activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)	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) なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日比野沙奈、柳井秀元
2. 発表標題 Metabolite secretome of necrotic tumor cells contributes to T cell dysfunction in cancer
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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