

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16420

研究課題名(和文) 濾胞ヘルパーT細胞生物学に着目した養子免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of Adoptive Immunotherapy Focusing on Follicular Helper T Cell Biology

研究代表者

永田 真知子 (Nagata, machiko)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70899088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍免疫応答における濾胞ヘルパーT細胞を中心として、CD4+T細胞の抗腫瘍免疫応答における役割を明らかにするための研究である。まず、大腸癌+肥満マウスでは、CD4+T細胞の減少を示すことができた。これらの減少にはIL-21産生の低下を認めることはなかったが、細胞障害性機能の著明な低下を認め、少なくともこれが肥満マウスにおける大腸癌増悪の可能性を示していることが明らかとなった。Tfhの誘導法や機能に関する成果を得たが、現在、研究は継続中であり、今後、成果を発表していきたい。同様に大腸癌組織の成果も現在、継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌では、腫瘍浸潤を示すImmunoscoreなど、免疫の状態が予後に関連する一方で、ICIの適応は限定的である。固形腫瘍におけるCAR-T療法は前述の通り、一定の効果を出すに至っていない。非B細胞系悪性腫瘍に対する効果的なCAR-T細胞療法の開発には、(1) CARタンパク工学に関連する技術開発、(2) CARまたは腫瘍特異的T細胞受容体の精度を上げる技術、(3) T細胞とTMEとの相互作用を最適化する技術である。免疫抑制、抗原逃避、および固形腫瘍への進入に対する物理的障壁などの腫瘍防御機構を克服するために、より洗練された工学的アプローチが必要である。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to clarify the role of CD4+ T cells in anti-tumor immune responses, focusing on follicular helper T cells in tumor immune responses. First, we proceeded to analyze obese mice inoculated with colon cancer and were able to show decreases in CD4+ T cells. We have obtained results on the induction and function of Tfh, but our research is ongoing, and we hope to publish our findings. Similarly, results on colon cancer tissue are currently ongoing.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 腫瘍免疫微小環境 CD4+T細胞 濾胞ヘルパーT細胞 抗腫瘍免疫応答 三次リンパ構造 レジデントメモリーT細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は診断技術、手術手技の発展に伴い他の癌種に比較して良好な成績を得たが、Stage IVの生存率は17.3%で依然良好ではない。近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) を中心としたがん免疫療法が様々な癌の治療に対して劇的な効果をあげている。しかしながら、大腸癌においても ICI の一つである抗 PD-1 抗体が 保険収載され、Stage IV の大腸癌患者においてはわずか 5%程度と限定的である。よって、ICI を応用した新たな治療法の開発が望まれており、強力なキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) 療法等の次世代型治療の導入が期待される。現在、特に注目されているのは、腫瘍内局在するレジデントメモリー様腫瘍浸潤 T 細胞の存在である。組織定着型免疫記憶 (レジデントメモリー) T 細胞は、主に粘膜組織における感染防御の第一線を担う細胞集団であることが示された。肺レジデントメモリー細胞は、インフルエンザウイルスやそのワクチンで誘導される。一方、最近になり、腫瘍内リンパ球の中にレジデントメモリー T 細胞と遺伝的背景が同等で、腫瘍内で活性を示すレジデントメモリー様腫瘍内 T (RM-like T) 細胞が存在することが報告された。この細胞は強力な予後因子であると同時に、腫瘍特異性と高い抗腫瘍活性を有する腫瘍免疫微小環境 (TIME) を形成する上で非常に重要な因子として注目されている。よって、RM-like T 細胞を効率よく増加し、TIME を改善することが大腸癌患者の予後改善のために重要であると考えられる。本研究ではこの RM-like T 細胞を腫瘍組織中の主たる指標として用いる。TIME を正確に把握するためには、CD8+T 細胞の分化状態の理解が重要で、これまでは腫瘍内 T 細胞 は一律に段階的に疲弊状態が進むと考えられてきたが、実際は、抗腫瘍活性を有する細胞集団 (終末エフェクター様 T 細胞, T_{eff}-like) と持たない集団 (終末疲弊 T 細胞, TEX) が存在し、この分化には特異的な CD4+T 細胞が関与していることが明らかになってきた。我々はこの細胞集団に注目して研究を進めることにした。IL-21 産生 CD4+T 細胞には、濾胞ヘルパー T 細胞 (T_{fh}) が含まれる。T_{fh} 細胞が ①肺癌や乳癌で RM-like T 細胞との相関性及び予後との相関が示されていること、②RM-like T 細胞を誘導する可能性が示唆されていること、及び ③RM-like T 細胞と B 細胞の相関性が認められていることなどから、T_{fh} 細胞は大腸癌の治療においても有力な治療標的となり得る。さらに、マウスモデルの移入実験では、T_{fh} 様の細胞が細胞障害性 CD8+ T 細胞以上の強力な抗腫瘍効果を示した。本研究の課題は、この T_{fh} 細胞の大腸癌に対する抗腫瘍効果とそのメカニズムを明らかにすることである。T_{fh} は三次リンパ組織様構造 (Tertiary lymphoid structure/ TLS) の誘導に必須の細胞である。TLS は、これまで感染やがんの炎症局所などで発生するとされ、リンパ節と同様、(自己)反応性 B 細胞の増殖・分化を支持する胚中心を形成する B 細胞の成熟の場で、主に CD4+T 細胞と B 細胞の集簇構造である。この多彩な機能は、転写抑制因子 Bcl-6 が分化調節の中心となり緻細な調節機構により支持されている。T_{fh} は、大腸癌に対する腫

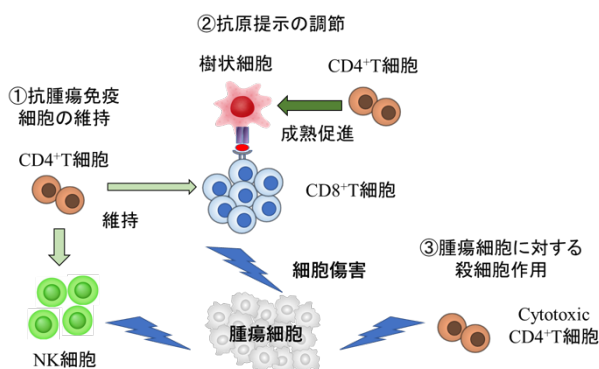


図 1. CD4⁺T 細胞の抗腫瘍免疫応答に多様な機能

- ① CD4⁺T 細胞は、NK 細胞、CD8⁺を含む抗腫瘍白血球を維持する。
- ② 隣接するリンパ系組織では、樹状細胞による抗原提示を修飾し、CD8⁺T 細胞の成熟促進に関与する。
- ③ CD4⁺T 細胞は直接的に細胞障害性を発揮する。(Daniel E et al. *Nature Cancer* 2022)

瘍反応性 T 細胞の応答に貢献しており、CXCL13、IL-21 および腫瘍浸潤免疫細胞との間に有意かつ強固な相関関係がある。さらに、T_{fh} 細胞自身の抗腫瘍効果も示唆されており、T_{fh} 細胞の抗腫瘍効果を検討することが重要である。CD4⁺T 細胞の機能の概要を示す (図 1.)

さらに、CAR-T 細胞療法は特異的キメラ抗原受容体 (CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法である (図 2.)。主要組織適合性複合体に依存しない方法で T 細胞が腫瘍関連抗原を認識することを可能にする合成受容体である。CD19 を標的とする CAR-T 細胞は、難治性 B 細胞悪性腫瘍の治療において前例のない奏効率を示し、米 FDA 承認を受ける最初の遺伝子組換え細胞ベースの治療法となり、本邦でもすでに承認されている。CAR-T 療法は血液腫瘍には高い治療効果を示す一方、悪性腫瘍の大

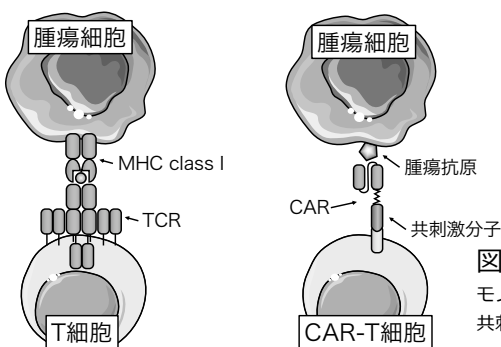


図 1. CAR-T 細胞療法の作用機序

モノクローナル抗体から作られた短鎖抗原で腫瘍抗原を特異的に認識し、共刺激分子を内蔵し、強い T 細胞応答を誘導する。

半を占める固形腫瘍に対しては効果が得られておらず、その理由に固形癌の腫瘍細胞の持つ抗原多様性と、CAR-T細胞のTIMEにおける物理的障壁による低い遊走性が懸念される。腫瘍組織への遊走性を含む、Tfh細胞生物学に基づく、次世代CAR-T療法の原型を提案したい。

2. 研究の目的

濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)は、未だ詳細な機能については不明な点が多い。本研究における目的は①Tfh細胞の腫瘍免疫微小環境での機能解析、②Tfh細胞移植による抗腫瘍活性の評価とそのメカニズム、およびTIMEの変化の検討を目的とする。

Tfhを中心として、抗腫瘍免疫応答にお

3. 研究の方法

実験1 Tfh細胞の条件検討と抗腫瘍効果の検証モデル抗原 卵白アルブミン(OVA)を導入した大腸癌細胞株MC38(MC38-OVA)の皮下接種モデルに対し、Tfh細胞と想定される細胞(CD4+CXCR5+PD-1+)を投与し、抗腫瘍効果と腫瘍内の変化を検討する。モデルとしてOVA抗原(ova323-329ペプチド)特異的なT細胞受容体(OT-II)CD4+T細胞とova323-329、IL-6、IL-21を共培養し分化させたT細胞を作成する。Tfhとしての機能評価を*in vitro*で行う。

実験2 肥満大腸癌マウスモデルを利用したCD4+T細胞の機能解析 CD4+T細胞が減少するメカニズムを検討する(肥満+大腸癌マウスモデル)。肥満/肥満+大腸癌マウスにて減少したCD4+T細胞のサブタイプの解明と減少の原因究明を行いながら、Tfh細胞へと機能解析を集約する。

CD4+T細胞のヘルパー機能や細胞障害性を有するサブタイプへの影響を明らかにするために、臓器別(腫瘍、末梢血、脾臓、リンパ節など)にT細胞の変動を明らかにし、その機能評価を行う。

CD4欠失試験では、CD4+T細胞の腫瘍増殖に関する貢献度を検証し、同時にTIMEに与える影響を評価する。また、脂肪酸のCD4+T細胞および腫瘍進展に与える影響を検討する。

大腸癌細胞株MC38を接種したマウスに脂肪酸(特にリノール酸)を経口投与し、これがCD4+T細胞や腫瘍進展に与える影響を明らかにする。また、*in vitro*でもリノール酸のCD4+T細胞の増殖とサイトカイン産生に与える影響を明らかにする。実際にはTfhと脂肪酸との反応性も検討するものである。

実験3 大腸癌患者における腫瘍中CD4+T細胞の細胞学的解析

腫瘍内のCD4+T細胞の分布、他の免疫細胞や腫瘍細胞との細胞間距離を計測することで、細胞間相互作用とその予後への影響について客観的に評価する。また、大腸癌患腫瘍組織切片から腫瘍内CD4+Tfh細胞、これに関連する構造(三次リンパ組織: TLS、胚中心: GC)の形成に関して、予後への影響について解析する(図4)。CD4+Tfh細胞は、そのマスター遺伝子とされるBcl6を、制御性T細胞については、FoxP3を用いて同定可能な状態であり、細胞定量のみならず、動態解析を行う。

4. 研究成果

大腸癌腫瘍マウスモデルにおけるTfhの機能解析を行った。まず、実験2に関しては、研究解析の過程において、肥満マウスにおけるCD4+T細胞の腫瘍内での減少を認めため、肥満大腸癌マウスをモデルとして、CD4機能評価を行った。45%高脂肪食(HFD)を与え、その後、大腸がん細胞株MC38を接種することにより、腫瘍を有する肥満マウスモデルを確立した。腫瘍の成長は、対照食を与えたマウスと比較して、有意に加速された。腫瘍CD4+T細胞は、その数が有意に減少し、programmed death-1(PD-1)の発現が増加し、CD107aの発現やIFN- γ 、TNF- α などのサイトカイン産生が減少し、機能不全を示した。さらに、CD4+T細胞枯渇HFD食モデルマウスを作製したところ、腫瘍浸潤の減少、CD8+T細胞におけるPD-1発現の増加、CD4+T細胞依存的な肥満による腫瘍増殖の加速が確認された。これらの研究結果は、肥満がCD4+T細胞の数の減少と機能不全を引き起こし、CD4+T細胞とCD8+T細胞の両方の抗腫瘍反応の低下を招き、最終的に大腸がんの進行を加速させることを示唆している。さらに、肥満に伴う大腸がんの予後不良の病態を解明する可能性があることを示唆した。この際、Tfhの機能として、IL-21産生能力と細胞障害性を検討したが、IL-21産生能は著変が認められなかったが、細胞障害性に関連するサイトカインは低下していた。一方、グランザイムBは低下を認めていなかった。このためヘルパー機能として、CD8+T細胞の活性化に貢献している可能性が高いことが示され、Tfhの関与の可能性が示された。追加的にCD4+T細胞の移入実験及び欠失実験を行った。肥満環境においては、CD4+T細胞を移入しても、腫瘍増殖には大きな影響を与えない一方で、通常のマウスでは、抗腫瘍効果を示した。欠失においては、肥満マウスでも通常マウスでも腫瘍増殖を促進する結果となった。これはCD4+T細胞の重要性を強調するものであった。

実験1の手がかりとして、同様に放射線治療マウスモデルでは、我々の成果では、CD8+T細胞が

増強し、強力な誘導効果を示すことを検討している。しかし、少なくとも同モデルにおいては、IL-21産生及びCXCR5+PD-1+CD4+T細胞の増強を見出すことはできなかった。実験3に関しては、大腸癌組織に関する研究であるが、深層学習アルゴリズムを基盤としたイメージサイトメトリーを用いた解析を行

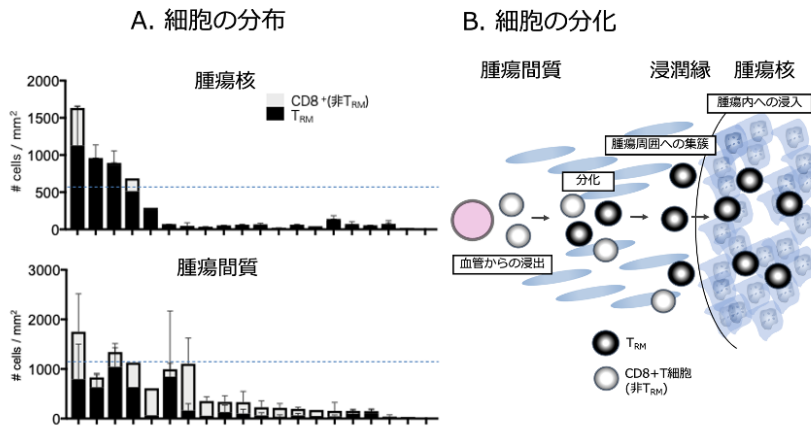


図1.レジデントメモリー T細胞の腫瘍組織内での分化過程

- A. 腫瘍組織内での CD8⁺T細胞 (非 T_{RM}) 及び T_{RM} に関する細胞分布データをグラフで示す。腫瘍内に侵入する場合はほとんどが T_{RM} の形質を獲得している。一方で、腫瘍間質で、CD8⁺T細胞 (非 T_{RM}) とのばらつきが多い。
- B. Aの結果から、血管から浸出した CD8⁺T細胞 (非 T_{RM}) が T_{RM} へ分化し、腫瘍周囲・腫瘍深部へ浸入するという動態が予測される。

っている。大腸癌の三次リンパ構造や、胚中心組織の検出、濾胞ヘルパーT細胞、組織レジデントメモリーT細胞に関連して、検出条件は既に確定している。また、免疫染色は終了し、現在データ解析を行っている段階である。一部の解析では、組織滞在型レジデントメモリーT細胞の数や分布に関して、単純に TLS の有無や面積に関して、直接的な関連性を示すことはできなかった。分化に関しは、TLS に直接関連する因子は明らかでなく、相関性も示すことができなかった。これに関しては、むしろ、T_{RM} が腫瘍内に集簇した症例が一般的に予後良好であることが判明している。浸潤の模式図と細胞分布の程度の一部を示す。腫瘍組織における TRM の動態の全容は未解明である。我々は TRM を CD103+CD8+T細胞として同定し、TRM の分化過程の一端を明らかにしつつある (図 1A, B)。特に TRM の腫瘍実質への侵入部位では、その近傍の間質に TRM と CD103⁻CD8+T細胞の混在部位 (TRM 分化部位) が存在することを発見し、これを Differentiation site (DS) と命名した。また、DS とは異なる、がん細胞が壊死し腫瘍胞巣が崩壊しかかっている周囲にも TRM と CD103⁻CD8+T細胞の混在部位が存在することを発見し、Remodeling site (RS) と命名した。この分化部位は他癌種でも確認され、固形癌に広くある共通の特徴である可能性が示唆された (図 4C; 投稿準備中)。TRM の分化部位 (DS/RS) における TRM 細胞密度や浸潤の程度 (浸潤縁の細胞密度) の詳細を評価し分化の知見とする。

病理組織標本を用いた腫瘍免疫微小環境の空間的構造情報の解析として、大腸癌の腫瘍組織は、腫瘍細胞、免疫細胞/間質細胞の複雑な相互作用により特徴付けられ、腫瘍免疫微小環境 (Tumor immune microenvironment: TIME) 下の、腫瘍内 CD8+T細胞の高浸潤例が、治療効果や長期予後 (無再発生存) に関連するが、これらはバイオマーカーとして臨床的な有用性を示すに至っていないのが現状であり、さらなる検討が必要であろう。近年の人工知能等の台頭により、大量の情報を迅速かつ客観的に獲得することが可能となり、この TIME を病理組織標本上で、細胞分布や位置関係として捉える空間的構造情報として取得し、患者転帰や ICI の治療効果に関連するバイオマーカー資源として応用する試みが散見される「空間的構造」情報 (図 2) の解析を行っている状況で、成果を明らかにするために、現在進行中である。

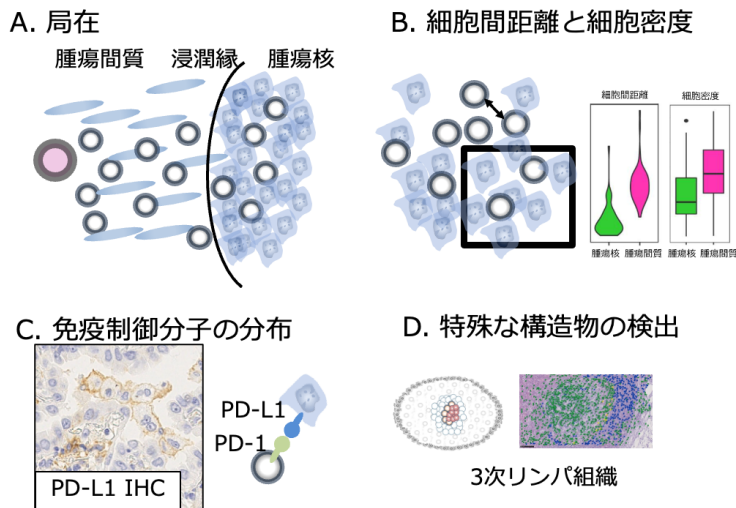


図 2. 病理組織標本の空間的構造情報の解析

病理組織切片より取得できる腫瘍微小環境 (TIME)に関する空間的情報を示す。

(A) 該当細胞が腫瘍組織内のどの領域に分布するかを識別する。

(B) 細胞-細胞間の距離や細胞密度の測定を行う。

(C) 免疫制御分子の分布の高精度でスコア化する。

(D) 特殊な構造物の特徴を捉え、面積や特定の細胞密度データ化する。

深層学習プログラムの構築により、これらの情報をデータとして取得可能となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Kota, Saito Masafumi, Ando Masayuki, Abe Tomoki, Mukoyama Tomosuke, Agawa Kyosuke, Watanabe Akihiro, Takamura Shiki, Fujita Mitsugu, Urakawa Naoki, Hasegawa Hiroshi, Kanaji Shingo, Matsuda Takeru, Oshikiri Taro, Kakeji Yoshihiro, Yamashita Kimihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Reduced Number and Immune Dysfunction of CD4+ T Cells in Obesity Accelerate Colorectal Cancer Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 86 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010086	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 Saito Masafumi, Fujinami Yoshihisa, Ono Yuko, Ohyama Shohei, Fujioka Kazumichi, Yamashita Kimihiro, Inoue Shigeaki, Kotani Joji	4. 巻 92
2. 論文標題 Infiltrated regulatory T cells and Th2 cells in the brain contribute to attenuation of sepsis-associated encephalopathy and alleviation of mental impairments in mice with polymicrobial sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 25 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2020.11.010	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0件

〔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
---------	---------