

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2021～2022
 課題番号：21K20922
 研究課題名（和文）腸管上皮細胞-上皮間リンパ球細胞間接触を標的とした新規腸管腫瘍免疫療法の開発

 研究課題名（英文）Development of novel immunotherapy for intestinal tumor targeting cell to cell contact between intestinal epithelial cell and intraepithelial lymphocyte

 研究代表者
 森川 亮（Morikawa, Ryo）

 東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・医員

 研究者番号：60910122
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：CD8⁺/TLシグナルの抗腫瘍免疫における重要性を検討する目的でDPE-GFPマウスに複数のクローンで抗CD8⁺抗体を投与したところIELの配置に変化はなく、少なくとも今回使用したクローンの中和抗体ではIEL-上皮細胞間接触を阻害できないことが分かった。CD103/E-cadherinシグナルを増強させる抗腫瘍免疫療法の有用性を検討する目的で、E-cadherinの発現を上昇させると考えられているセレコキシブをCD103^{-/-} x APCminマウスおよびコントロールマウスに投与した。後者では腫瘍の減少が確認されたが前者でも腫瘍の減少傾向が見られ、抗腫瘍効果は完全にはキャンセルされなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 我々はこれまでに、IELによる抗腫瘍活性はCD103及び細胞接触依存的である事、及びIEL特異的に発現するCD8⁺がIELの高い運動能と上皮細胞間への配置に重要な役割を有する事を示してきた。今回これらの研究を進展させ、CD103/E-cadherin及びCD8⁺/TLシグナルを介したIEL-上皮細胞間相互作用を標的とした新規の腫瘍治療法の可能性を検討したが、今回の結果からはIEL-上皮細胞間接触を特異的に増強/阻害する系は特にin vivoでは困難と考えられた。今後はIEL-オルガノイド培養系を主軸に、EMT阻害剤等より特異性の高い薬剤のスクリーニングを検討し、新規標的の可能性を検討する。

研究成果の概要（英文）：In order to evaluate importance of CD8⁺/TL signal in anti-tumor immunity, we applied anti-CD8⁺ antibody derived from several clones to DPE-GFP mice, but there was no significant change in deposition of IEL. This result suggested that we can't inhibit cell to cell contact between IEL-epithelial cell at least by neutralizing antibody we used in this experiment. In order to examine usefulness of anti-tumor therapy by enhancing CD103/E-cadherin signal, we applied celecoxib which is thought to increase E-cadherin expression, to CD103^{-/-} x APCmin and control mice. Tumor is decreased in the latter. However, there was trend that tumor is decreased also in the former, and anti-tumor effect was not fully canceled.

研究分野：消化器内科

キーワード：CD8 TL CD103 E-cadherin 細胞間接触 腫瘍

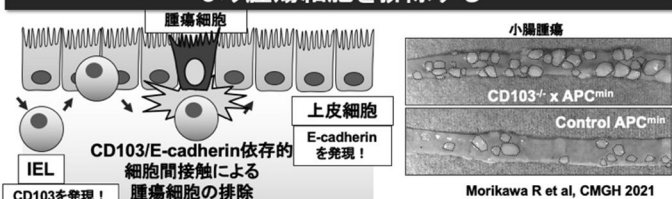
1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤はその有効性から様々な癌種に適応が広がり、癌治療を大きく変えている(Tang J et al, *Nat Rev Drug Discov* 2018)。これらの薬剤の有効性から元来生体には T 細胞によって腫瘍を取り除く機能が備わっていることが示唆されるが、その一方で腫瘍微小環境においては様々な免疫回避システムが存在していることが知られている(Chen DS et al, *Immunity* 2018)。そこで免疫回避システムの詳細を明らかにし、免疫細胞が抗腫瘍効果を十分に発揮することのできる条件を整えることが有効な癌免疫療法の発展において重要であることが考えられる。小腸癌は希少癌として知られており、実際米国においては小腸癌の発症率は大腸癌の3%程度であると報告されている(Schottenfeld D et al, *Ann Epidemiol* 2009)。そこで我々は、この悪性腫瘍の発生率が低い、小腸という臓器の免疫系に注目した。小腸には多様な免疫細胞が存在することが知られているが、小腸腫瘍の発生源である上皮細胞の間には、Intraepithelial lymphocyte: IEL と呼ばれる大半が T 細胞で構成される細胞集団が存在することが知られている(Cheroutre H et al, *Nat Rev Immunol* 2011)。これらは上皮細胞に頻回に接触し、高い細胞傷害活性を有する分画を豊富に含むことが知られている。そこで我々は、IEL が上皮細胞を監視し、細胞間接触を介して悪性腫瘍の発生を抑制しているという仮説を立て、小腸腫瘍の intravital microscopy、及び IEL-腸管腫瘍由来オルガノイドの共培養システムを世界で初めて独自に開発し、腫瘍微小環境における T 細胞の動態および IEL-腫瘍細胞間相互作用の可視化と、腫瘍免疫におけるその意義を検討した。

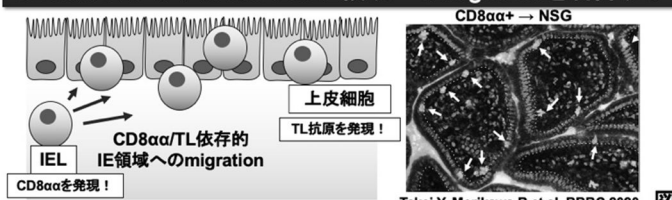
まず、T 細胞が GFP を発現する DPE-GFP マウスと腸管腫瘍を自然発症する APC^{min/+}マウスを交配し、独自の intravital microscopy 技術を用いて小腸腫瘍の微小環境を描出したところ、腫瘍微小環境において T 細胞は血管周囲に存在し、上皮細胞との接触が低下していることを証明した。次に APC^{min/+}マウスにおいては E-cadherin の発現が低下していることが確認されたことから、腫瘍は CD103/E-cadherin シグナルの低下によって、IEL との接触を回避していると考えた。そこで APC^{min/+}マウスに CD103^{-/-}マウスを交配したところ、腫瘍の総面積及び個数が増加した。次に CD103 が欠損することによる IEL 数の減少や、IEL 以外の細胞による影響を排除するために、APC^{min/+}マウス腫瘍由来オルガノイド/IEL 共培養系を構築し、IEL と腫瘍細胞の細胞間接触が腫瘍の増減に与える影響を in vitro で直接的に解析する方針とした。IEL と腫瘍オルガノイドを共培養したところ、IEL の増殖及び TNF- α 、IFN- γ の産生が見られ、オルガノイドの生存率が低下していた。CD103^{-/-}マウス由来の IEL 及びトランスウェルを用いた検討を追加することで、この抗腫瘍活性は細胞間接触及び CD103 依存的であることを証明した(Morikawa R et al, *CMGH* 2021)。以上の結果より、我々は、CD103/E-cadherin シグナルが新規の腫瘍治療の標的になるのではないかと考えた。

また他の研究において我々は、これまでに機能が不明であった IEL 特異的に発現する CD8 α が IEL の高い運動能と上皮細胞間への配置に重要な役割を有することを示している(Takei Y et al, *bbrc* 2020)。他方、腫瘍免疫における CD8 α /TL シグナルの重要性は未だ検討されていない。そこで CD8 α と、その対応抗原である TL を介したシグナルに関しても、腫瘍治療の標的になる可能性があるのではないかと考え

IELはCD103/E-cadherinシグナルを介した細胞間接触により腫瘍細胞を排除する



CD8 α /TLシグナルはIELのIE領域へのmigrationを制御する



Takei Y, Morikawa R et al, *BBRC* 2020 図1

2. 研究の目的

そこで今回我々はこれらの研究を更に発展させ、CD103/E-cadherin を介した IEL と上皮細胞の接触および CD8 α /TL シグナルを介した IEL 上皮細胞間配置を標的とした、家族性ポリポーシスなど高リスク群に対する新規の予防的腫瘍治療法の可能性を検討した。世界屈指の In vivo live-imaging 技術を用いることで、薬剤の使用に伴う生体内での細胞間接触の変化の詳細な評価が可能であると考えられる。また、我々が立ち上げた新規 IEL-腫瘍オルガノイド共培養システムを用いることで薬剤が IEL-上皮細胞間の接触に与える直接的影響を評価することができると考えられる。

3. 研究の方法

A. CD103/E-cadherin シグナルを標的とした腸管腫瘍免疫療法の開発

1. IEL/腫瘍オルガノイド 共培養系における E-cadherin 発現上昇効果の検討

一部の NSAIDs や新たな化学療法戦略として注目される EMT 阻害剤には E-cadherin の発現上昇効果があることが示唆されている。そこで複数の EMT 阻害薬および NSAIDs を GFP マウス由来 IEL と APC^{min/+}マウス小腸腫瘍由来オルガノイド共培養系に添加し、IEL/腫瘍細胞間接触と腫瘍抑制能の定量化を行い、コントロール群と比較する。解析後の腫瘍オルガノイドにおける E-cadherin の発現を免疫染色で確認する。

2. 小腸腫瘍ニッチにおける T 細胞動態における E-cadherin 発現上昇効果の検討

1 において最も IEL/細胞間接触増加効果の高かった薬剤を DPE-GFP x APC^{min/+}マウスに短期間投与し、腫瘍部の in vivo live imaging を行い、IEL/腫瘍細胞間接触の定量化を行い、コントロール群と比較する。

3. 小腸腫瘍の発生における E-cadherin 発現上昇効果の検討

1 において最も IEL/細胞間接触増加効果の高かった薬剤を APC^{min/+}マウスに長期間投与し、総腫瘍面積の定量化を行い、コントロール群と比較する。解析後の腫瘍部の E-cadherin の発現を免疫染色で確認する。

B. CD8 /TL シグナルを標的とした腸管腫瘍免疫療法の開発

1. IEL/腫瘍オルガノイド 共培養系における

CD8 /TL シグナルの重要性の検討

抗 CD8 抗体を GFP マウス由来 IEL と APC^{min/+}マウス小腸腫瘍由来オルガノイド 共培養系に添加し、腫瘍オルガノイド 内の IEL 数と腫瘍抑制能の定量化を行いコントロール群と比較する。

2. 小腸腫瘍ニッチにおける T 細胞動態にお

ける CD8 /TL シグナルの重要性の検討

DPE-GFP x APC^{min/+}マウスに抗 CD8 抗体を投与し、腫瘍部の in vivo live imaging を行い、腫瘍内の IEL 数、総腫瘍面積の定量化を行い、コントロール群と比較する。

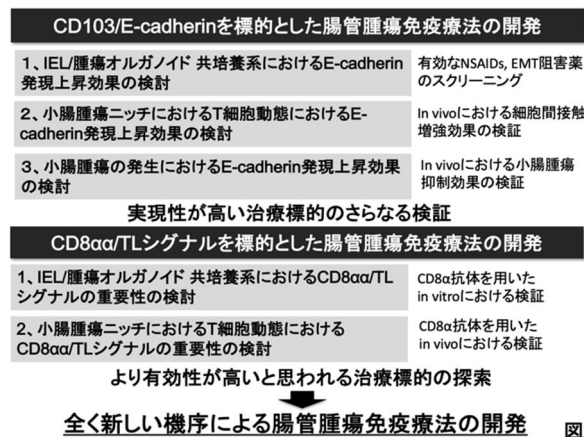


図2

4. 研究成果

A. CD103/E-cadherin シグナルを標的とした腸管腫瘍免疫療法の開発

免疫染色による検討によって APC^{min/+}マウスにおいては上皮細胞の E-cadherin の蛋白レベルでの発現低下が確認されている一方で、IEL における CD103 の発現は恒常的であることもフローサイトメトリーによって確認されている。(Morikawa R et al, *CMGH* 2021)。この事実によって CD103/E-cadherin シグナルを標的とした腸管腫瘍免疫療法の治療標的としたは上皮細胞における E-cadherin が適切であると考えられた。

これまでに CD103/E-cadherin シグナルに関わる分子の発現を変化させる薬剤としては、NSAIDs が知られている。APC^{min/+}マウスに NSAIDs を投与したところ、上皮細胞における E-cadherin の発現が増加したことが報告されている(Carothers AM et al, *Exp Cell Res* 2006)。その一方で APC^{min/+}マウスに NSAIDs を投与したところ腫瘍が減少したことも報告されている(Swamy et al, *Cancer Res* 2006)。しかしながらいずれの報告においても IEL との関連性に関しては注目されていない。そこで我々は、NSAIDs により上皮細胞における E-cadherin の発現が増加し、IEL との細胞間接触が増加することで、APC^{min/+}マウスにおける腫瘍が減少したという仮説を立てた。

既報により、腸管腫瘍に対して抗腫瘍効果を有することが報告されている薬剤を複数検討し、プレリミナリーな実験によって本検討に最適な薬剤として NSAIDs であるセレコキシブを選択し、更に APC^{min/+}マウスにおいて腸管腫瘍を減少させる最適な投与量を決定した。

本実験として CD103 をノックアウトした CD103^{-/-} x APC^{min/+}マウス及びコントロール APC^{min/+}マウスにそれぞれセレコキシブを 1500ppm の濃度で混入したエサあるいは混入していないエサを摂取させ、40 日後に腫瘍量を解析した。プレリミナリーな検討の結果と同様にコントロール APC^{min/+}においてはセレコキシブ投与群において腫瘍量が有意に減少した。一方で CD103^{-/-} x APC^{min/+}マウスにおいても腫瘍量は減少傾向であり、抗腫瘍効果は完全にはキャンセルされなかった。以上の結果からセレコキシブには E-cadherin 発現上昇効果意外の経路でも抗腫瘍効果を有する可能性が示唆された。

腫瘍オルガノイドと IEL の共培養系の実験ではセレコキシブ以外に抗腫瘍効果を有する薬剤を複数検討中である。今後最も抗腫瘍効果および上皮細胞における E-cadherin 発現上昇効果の高い薬剤を選定するためにスクリーニングを継続する方針である。

B. CD8 /TL シグナルを標的とした腸管腫瘍免疫療法の開発

本経路を特異的に阻害する治療標的として CD8 および TL の可能性を検討した。
フローサイトメトリーによる検討によって、IEL における CD8 の発現には可塑性がある一方で、基本的には加齢に伴って発現が上昇することが確認された。

しかしながら現在 CD8 ホモダイマーを特異的に認識するモノクローナル抗体は入手が困難である一方で、抗 CD8 抗体は CD8 も認識してしまうためにオフターゲット効果が懸念された。

一方で TL 抗原に関しては、現在モノクローナル抗体が入手困難であり、また TL^{-/-}マウスにおいても IEL の細胞数は減少しないことがわかった。この理由として、近年 TL 以外にも CD8 のリガンドが同定されており、TL を標的とした治療戦略は困難であることがわかった。

そこで、今回の検討では本シグナルを標的とした治療戦略として抗 CD8 抗体を選定した。プレリミナリーな実験として、DPE-GFP マウスに複数種のクローンの抗 CD8 抗体を iv もしくは ip の経路で投与し、24 時間後、48 時間後の IEL の配置を解析したが、いずれの抗体によっても IEL の配置変化は認められなかった。少なくとも今回使用したクローンの中和抗体 / 投与方法では IEL-上皮細胞間接触を阻害できないことがわかった。

今後は IEL に対して有効なドラッグデリバリー経路の検討と、CD8 ホモダイマーを特異的に認識する抗体の開発などを目指して検討を続ける予定である。

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 1件）

1. 発表者名 森川亮、米本有輝、根本泰宏、岡本隆一
2. 発表標題 腸管上皮間リンパ球はCD103/E-cadherin を介して上皮細胞を監視し、腫瘍細胞を排除する
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Morikawa, Yasuhiro Nemoto, Yuki Yonemoto, Mamoru Watanabe, Ryuichi Okamoto
2. 発表標題 Visualization of the interaction between intraepithelial lymphocytes and the intestinal tumor cells both in vivo and in vitro.
3. 学会等名 digestive disease week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川亮、米本有輝、根本泰宏、永石宇司、大島茂、岡本隆一、渡辺守
2. 発表標題 腸管上皮細胞間リンパ球はCD103/E-cadherinシグナルを介した細胞間接触により腫瘍細胞を抑制する
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川亮、根本泰宏、岡本隆一、渡辺守
2. 発表標題 In vitro/in vivo ライブイメージングによる腸管腫瘍ニッチにおけるT細胞動態の可視化-上皮間リンパ球はCD103/E-cadherinシグナルを介した細胞間接触により腫瘍細胞を排除する
3. 学会等名 第101回日本消化器病学会総会
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
---------	---------