

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22700896
 研究課題名（和文） 腫瘍免疫に必須のメモリーヘルパーT細胞の誘導を制御するマスター遺伝子の同定と解析
 研究課題名（英文） Identification of novel master gene controlling memory CD4+ T cell for improving cancer immunotherapy
 研究代表者
 藤木 文博 (FUJIKI FUMIHIRO)
 大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）
 研究者番号：40456926

研究成果の概要（和文）：

癌免疫療法の成功には、ヘルパーT細胞の誘導と『質』のいい免疫反応を起こすメモリーT細胞の形成が不可欠である。我々は single cell 由来の Th 細胞クローンに形成される機能的不均一性に着目し、そこに含まれるメモリーT細胞とエフェクターT細胞の遺伝子発現の差を網羅的に解析した結果、メモリーT細胞で特異的に高発現する遺伝子とエフェクターT細胞に高発現する遺伝子を同定した。さらに、同定したこれらの遺伝子の T細胞における働きについてこれまで報告がないため、T細胞で特異的にこれらの遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスおよび、これらの遺伝子プロモーターで LacZ が発現するノックインマウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：

The induction of tumor-associated antigens (TAAs)-specific CD4+ helper T cell (Th cell) and its maintenance are essential for ideal cancer immunotherapy. However, mechanism of memory T cell development remains unclear. In this study, we focused on heterogeneity of WT1 (one of TAAs)-specific Th clone and identified two genes, which were specifically overexpressed in memory T cell or effector T cell. Since there is no report regarding function of these genes in T cell, we generated the identified genes-knockout/knockin mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：ヘルパーT細胞、メモリーT細胞、癌免疫療法、WT1

1. 研究開始当初の背景

今日、世界中で癌に対する免疫療法が注目され、臨床試験も含め、多くの研究が盛んに行われている。確かに癌免疫療法による治療効果は認められるものの、その強さや効果が出現する頻度は十分とは言いがたいのが現状である。癌免疫療法の治療効果をより確実なものとするために癌抗原特異的ヘルパーT細胞の誘導および、誘導されたヘルパーT細胞をメモリーT細胞として長期間体内で維持すること、つまりT細胞の『質』の改善が求められていた。しかしながら、メモリーヘルパーT細胞の形成に関与する分子メカニズムは明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、上記の問題を解決し臨床応用へ向けた研究基盤を確立するため、『メモリーTh細胞のマスター遺伝子を同定し、そのマスター遺伝子のメモリーT細胞における機能を解明する』ことを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、これまでに樹立した single cell 由来の WT1 特異的な Th 細胞クローンに形成される heterogeneity に注目した。つまり、single cell 由来の WT1 特異的な Th 細胞クローンには、メモリーT細胞集団とエフェクターT細胞集団が混在しており、我々は、これらの遺伝子発現の差を網羅的に解析することで、メモリーT細胞に特異的に高発現しメモリーT細胞としての形質や機能を決定するマスター遺伝子を単離することができる考えた。実際に、Th細胞クローンから分離したメモリーT細胞およびエフェ

クターT細胞に発現する遺伝子をマイクロアレイを用いて解析し、メモリーT細胞のマスター遺伝子の候補として8種類の遺伝子を選出していた(表1)。

表 1

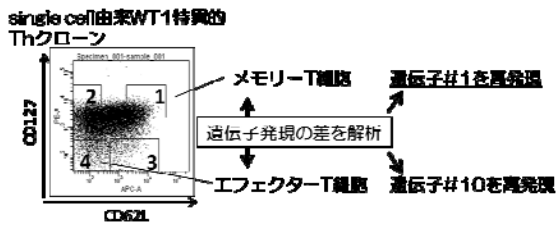
候補遺伝子	T細胞における機能	報告されている病態
1	不明	神経神経系-神経系の発生に関与
2	不明	cell cycle制御-細胞増殖や分化に特異的に発現
3	不明	免疫細胞の増殖促進
4	不明	DNAの複製や修飾に関与-成熟細胞で発現
5	不明	炎症性マクロファージで発現
6	アポトーシス抑制など	アポトーシス抑制-神経細胞で発現
7	不明	造血幹細胞で発現
8	不明	神経幹細胞で発現

我々は、まずこれらの候補遺伝子の発現を抑制する shRNA 発現ベクターを用いて、メモリーT細胞の形質・機能を制御するような遺伝子、つまりメモリーT細胞のマスター遺伝子を同定した。

4. 研究成果

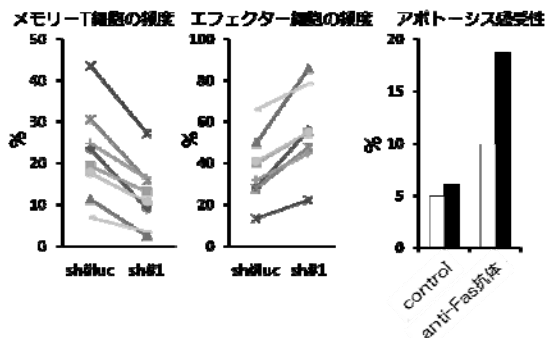
我々は、single cell 由来の WT1 特異的な Th 細胞クローンには、細胞表面分子である CD127 と CD62L の発現の有無により 4 つの細胞集団が存在することを見出し、それぞれの細胞集団の機能(サイトカイン産生能・増殖能・自己複製能・多分化能・アポトーシス抵抗性)を評価した結果、CD127+CD62L+細胞と CD127-CD62L-細胞は、それぞれメモリーT細胞とエフェクターT細胞であることを明らかにした。この結果より、我々はメモリーT細胞およびエフェクターT細胞には、その機能・形質を決定づけるマスター遺伝子が存在するのではないかと考え、興味深い 2 種類の遺伝子を同定することに成功した (図 1)。

図 1



まず 1 つ目の遺伝子はメモリーT 細胞に特異的に高発現する遺伝子#1 (特許申請中のため仮名) である。メモリーT 細胞における遺伝子#1 の発現を shRNA を用いて抑制すると、メモリーT 細胞分画である CD127+CD62L+細胞が減少しエフェクターT 細胞分画の CD127-CD62L-細胞が増加した。さらに、アポトーシス抑制に関与する Bel-2 の発現低下も観察されアポトーシス感受性が増加した (図 2)。

図 2



2 つ目の遺伝子は、遺伝子#1 とは逆にエフェクターT 細胞に特異的に高発現する遺伝子#10 (特許申請中のため仮名) である。遺伝子#10 は酵素であり、ある物質 A を細胞内で物質 B に変換する際に働き、物質 B が結合する核内レセプターの持つ様々な生理活性を正に制御することが知られている(図 3)。大変興味深いことに、我々は、この物質 B を添加しメモリーT 細胞を培養するとエフェクターT 細胞への分化が促進され、反対に物質 B の阻害剤(核内レセプターのアンタゴニスト)を添加するとメモリーT 細胞が維持される

ことを発見した(図 4)。

図 3

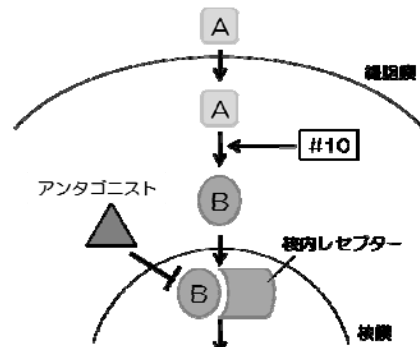
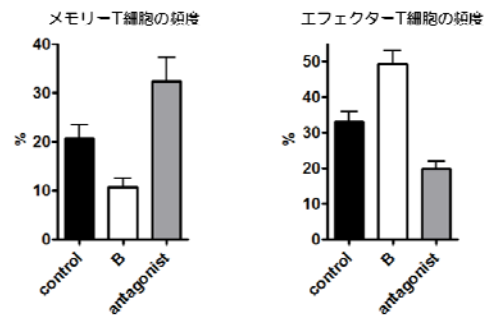


図 4



さらに我々はこれらの研究成果より、我々が同定した遺伝子#1 および遺伝子#10 がメモリーT 細胞の形成、もしくはエフェクターT 細胞への分化に重要な役割を果たしていることが予想された。これを証明するために我々はこれらの遺伝子改変マウス、つまり遺伝子#1 もしくは#10 を T 細胞で特異的に欠損したコンディショナルノックアウトマウス、さらにはこれらの遺伝子のプロモーター下で LacZ を発現するノックインマウスを作製した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Nakajima H, Oka Y, Tsuboi A, Tatsumi N, Yamamoto Y, Fujiki E, et al. (他 10 名、6 番目) Enhanced tumor

immunity of WT1 peptide vaccination by interferon- β administration. *Vaccine*, 30: 722-729, 2012. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.074>

- ② Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Tanaka Y, Fujiki F, et al. (他 16 名、5 番目) Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8+ T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Sci*, 103: 408-414, 2012. 査読有
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02163.x
- ③ Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, et al. (他 22 名、1 番目) A clear correlation between WT1-specific Th response and clinical response in WT1 CTL epitope vaccination. *Anticancer Res*, 30: 2247-2254, 2010. 査読有
- ④ Murao A, Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, Tanaka-Harada Y, Fujiki F, et al. (他 15 名、6 番目) High frequencies of less differentiated and more proliferative WT1-specific CD8+ T cells in bone marrow in tumor-bearing patients: an important role of bone marrow as a secondary lymphoid organ. *Cancer Sci*, 101: 848-854, 2010. 査読有
DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01468.x
- ⑤ Tanaka-Harada Y, Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Katagiri T, Elisseeva OA, Nishida S, Shirakata T, Hosen N, Fujiki F, et al. (他 6 名、10 番目) Biased usage of BV gene

families of T-cell receptors of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8+ T cells in patients with myeloid malignancies. *Cancer Sci*, 101: 594-600, 2010. 査読有
DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01453.x

[学会発表] (計 3 件)

- ① Tachino Sho、腫瘍抗原 WT1 特異的ヒト Th17 細胞クローンの樹立と機能解析、第 40 回日本免疫学会総会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉)
- ② Hara Kazuma、CD45RA⁺CCR7⁺ memory WT1-CTLs predicts the favorable clinical outcome; the WT1 cancer vaccine combined with gemcitabine in the pancreatic cancer patients、第 15 回日本がん免疫学会総会、2011 年 6 月 30 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- ③ 岡 芳弘、担癌患者の骨髄中には末梢血に比較して癌抗原 WT1 特異的 CD8+T 細胞がより高頻度かつ未熟な状態で存在する、第 14 回日本がん免疫学会総会、2010 年 7 月 22 日、KKR ホテル熊本 (熊本)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤木 文博 (HUIKI HUMHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教 (常勤)

研究者番号 : 40456926