

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501284

研究課題名(和文)末梢におけるFOXP3陽性制御性T細胞への分化メカニズム解析とがん治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of differentiation mechanism of peripherally induced Foxp3 positive T cells for application to cancer treatment

研究代表者

宮原 慶裕 (Miyahara, Yoshihiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10582083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが独自に作製した誘導 Tregs(iTreg)細胞培養方法(ナイーブT細胞をJak3阻害剤存在下で3日間培養を行いiTreg前駆細胞に分化させ、その後IL-2を添加し3日間培養を続けることによりFoxp3陽性iTreg細胞に分化増殖)を用い、どのような因子が影響を与えるか解析を行った。Jak3阻害剤の標的が主にIL-2であることを見出し、また、Foxp3陰性iTreg前駆細胞からFoxp3陽性iTreg細胞への分化段階においてはIL-4が最も強く阻害すること等を含めて明らかにした。得られた結果は、制御性T細胞の機能を抑制することによって効果的な癌治療を開発する基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously established a 2-step culture method for differentiating Foxp3-naive CD4+ T cells to Foxp3+ induced-regulatory T cells (iTregs). Firstly, we stimulate naive CD4+ T cells by anti-CD3 mAb and anti-CD28 mAb in the presence of Jak3 inhibitor for 3 days (conditioning stage). Secondly, we keep culturing Foxp3- iTregs precursor T cells to differentiate these cells to Foxp3+ iTregs in the presence of IL-2 for 3 days (differentiation stage). We analyzed what kind of factors could affect this protocol. In this study, we have identified that IL-2 signaling pathway was the main target of Jak3 inhibitor, and IL-4 was the strongest inhibiting cytokine in the differentiation stage from Foxp3- iTregs precursor cells to Foxp3+ iTregs. We also confirmed that STAT6, a downstream molecule of IL-4 signaling pathway, was an important molecule. These results obtained in this study are important for developing effective cancer treatment by regulating the differentiation into iTregs.

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：免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

長年にわたるがん免疫研究により、CD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞(Tregs)が抗腫瘍免疫応答に抑制的に働くという事実は広く認知されるようになってきている。腫瘍局所にTregsの存在が高頻度で認められ、エフェクター細胞による抗腫瘍免疫応答を減弱させていること、腫瘍浸潤T細胞におけるTregs/エフェクターT細胞の高い比率が予後不良因子となり得ること、さらにマウスモデルではTregs機能を抑制することによってがん免疫を増強できることが報告されている。ヒトにおいても制御性T細胞機能を抑制することによるがん免疫応答の増強が試みられているが、効果はまだ満足できるものとは言えない。治療標的となる末梢に存在するFoxp3陽性Tregsは主に胸腺由来であると考えられているが、低刺激条件(suboptimal)により末梢においてもナイーブT細胞(成熟未感作T細胞)からFoxp3陽性induced Tregs(iTregs)に分化し得ることが示されている(von Boehmer H et al. Nat Immunol 6,1219-1227,2005)。担癌状態においては、腫瘍自体から産生されるTGF-betaによりiTregが誘導され抗腫瘍免疫を減弱させていることが報告されている(VC Liu et al. J Immunol 178, 2883-2892,2007)。末梢において誘導されたiTregsが腫瘍免疫においてどの程度の免疫抑制、すなわち腫瘍の進展に関わるかはまだ明確ではないが、どのような分子メカニズムがiTregsへの分化を制御しているのかを詳細に解析することが、より効果的な治療法につながる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは出生早期のマウス胸腺CD4シングルポジティブT細胞(CD4SP)がTGF-betaを添加しない条件下でTCRのみの刺激により、約50%細胞がFoxp3陽性抑制性Tregsに分化することを示し、この現象はマウスの週齢に伴い消失していくことを報告した(Wang G, Miyahara Y et al. J Immunol 185, 71-78, 2010)。出生早期のマウス胸腺細胞は成熟マウスの胸腺細胞と比較しIL-2, IL-4, IFN-g等のサイトカイン産生が低下している事が報告されており、TCR刺激により成熟マウス胸腺CD4SPより産生されるサイトカイン等の因子がTregsへの分化を抑制している可能性が考えられるが、まだ明確ではない。しかしながら、申請者らが報告した「出生早期のマウス胸腺細胞はTregsに分化しやすい性質を持つ」および「末梢でのiTregsへの分化には低刺激、すなわちサイトカイン産生が少なくと予想される環境下が有利な可能性がある」ことの2点から、「サイトカイン欠乏状態でのTCR刺激によりナイーブT細胞はiTregs前駆細胞に分化誘導されやすくなる」との着想を得た。この仮説を実証するため、in vitroにおいてJak3(Janus kinase3)阻害剤を使用した。Jak3阻害剤はcommon gamma

chain(gc)をその受容体レセプターの一部として共有するgc-cytokine family(IL-2,4,7,9,15及び21)の細胞内シグナリングを抑制する。この阻害剤存在下で野生型成熟マウス脾臓由来CD4+CD25-T細胞腫瘍局所にTCR刺激を加え6日間培養を行った。培養3日後の時点では細胞にFoxp3の発現は認められないが、IL-2を加えさらに3日間培養を続けると約40%の細胞がFoxp3陽性細胞に分化増殖することを示した。すなわち、gc-cytokinesの欠乏状態におけるTCR刺激により末梢未感作T細胞はFoxp3陰性iTregs前駆細胞に分化し(conditioning phase)、その後、十分なIL-2の存在下でFoxp3陽性iTregsに最終分化した(induction phase)と推察された。In vitroにおいてCD4+CD25-T細胞からFoxp3陽性iTregsを誘導する手法としてサイトカイン(TGF-beta, IL-2)を添加しTCR刺激を加える手法が主に行われているが、この方法で誘導されたTregsは再刺激に際しFoxp3の発現が消失しやすくと共に、抑制性活性を失う事が報告されている(Bluestone JA et al. Nat Immunol 10, 1000-1007, 2009)。しかしながら、申請者らが独自に開発した、Jak3阻害剤を用いて成熟マウス末梢CD4+CD25-T細胞から誘導したFoxp3陽性iTregsは再刺激を加えても安定したFoxp3の発現が維持された。また、CD4+CD45RBhigh細胞をRagノックアウトマウスに移入し大腸炎を惹起するマウス大腸炎モデルにおいても、Jak3阻害剤を使用し作製したiTregsを併せて移入することにより、ex vivo Foxp3陽性Tregs(natural occurring Tregs)を併せて移入した場合と同程度に大腸炎の発症を抑制できることを確認している。さらに、「natural occurring Tregs(nTregs)前駆細胞」の概念が胸腺において提唱されている。CD4シングルポジティブT細胞はTCR刺激にてCD25(IL-2 receptor alpha)を発現し、それらの細胞はIL-2あるいはIL-15のシグナルによりnTregsに分化する(Two-step process)と提唱されているが(Hsieh CS et al. Immunity 28,100-111,2008)、末梢でのiTregs前駆細胞の存在に関してはまだ明確な答えは出ていない。以上から、申請者らが独自に作製したiTregsは生体内に存在するnatural occurring Tregsと極めて近似した特徴を併せ持つ可能性が示唆される。従って、このような生体内のTregsに近い特徴を有した細胞と、その前駆細胞を対象とし研究することは学術的に非常に有用であると考えられた。このような背景から、この培養系を用い、どのような因子がナイーブT細胞からiTregs前駆細胞への分化、及びiTregs前駆細胞からiTregs細胞への分化を促進あるいは抑制を行っているかを解析し、将来のより有効な癌治療への基盤研究を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)申請者らが独自に開発した Jak3 阻害剤を使用した培養システムを用い、培養 3 日後に Foxp3 陰性の iTregs 前駆細胞を誘導することに成功し、6 日後に約 40% の細胞が Foxp3 陽性細胞に分化増殖することを示している。前駆細胞を経由し iTregs に分化する過程を詳細に解析し、一連の分化過程に起こる分子メカニズムの探索を行う。同時に未熟 T 細胞から iTregs 前駆細胞への分化、及び前駆細胞から iTregs への分化を阻害する因子(サイトカイン・抗体等)を同定する。

(2)これら同定されたメカニズムを制御する因子を利用した、マウス In vivo での効果を確認し、将来の癌治療のための基盤的な研究を行う。

4. 研究成果

野生型成熟マウス CD4+CD25+Foxp3-脾細胞を用い、各種の gc-family サイトカイン存在下で培養することにより、他のサイトカインと比較し IL-2 が有意に Foxp3 発現を誘導することを見出した。また、Conditioning phase に Jak3 inhibitor の代替として IL-2 中和抗体あるいは STAT5 inhibitor を用いることにより、その後の Foxp3 陽性細胞頻度を有意に上昇させる現象を見出している。得られた結果から Jak3 inhibitor の主要な標的は IL-2-STAT5 シグナル経路であることが明確となった。従って、IL-2 の作用には多面的な側面がある。すなわち、今研究において、ナイーブ細胞から iTreg 前駆細胞への分化には IL-2 シグナリングを抑制することが重要であり、前駆細胞から Foxp3 陽性細胞への分化には IL-2 シグナリングの活性化が重要であることを見出している。一方、Induction phase での IL-4 添加が著明に前駆細胞から Foxp3 陽性 iTreg 細胞への分化を抑制することを見出した。STAT6 ノックアウトマウスを用いた検討においても、野生型マウス細胞と比較しより iTreg 細胞を誘導可能であることを見出している。また、従来の iTreg 誘導のために使用される TGF-beta に関しても TGF-beta signal inhibitor を用いた検討により、conditioning phase において培養液中の TGF-beta が重要な働きをしていることを見出している。

野生型マウスの脾臓 CD4+細胞を用い、T 細胞膜上に発現され得る様々な分子に対する抗体を添加することで培養系に与える検討により、anti-TCRbeta mAb(H57-597)を添加することで最終的に得られる Foxp3 陽性 Treg 細胞の頻度が高くなる現象を見出した。In vivo への投与においても、腹腔内投与後数日で Foxp3 陽性細胞の比率が著明に上昇する現象を見出した。Anti-CD3mAb については以前より In vivo 投与により Foxp3 陽性細胞比率を上昇させることが報告されているが、同種移植モデルを用いた検討により、anti-TCRmAb 投与が anti-CD3mAb よりも有意に移植片の生着を延長させることを明らかにした。これらの結果から、iTreg 細胞への

分化を制御することで免疫応答を制御できる可能性が示されたと考えている。

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 6 件)

Khattar M, Miyahara Y, Schroder PM, Xie A, Chen W, Stepkowski SM. 2014. Interleukin-21 is a critical regulator of CD4 and CD8 T cell survival during priming under Interleukin-2 deprivation conditions. PLoS One. Jan 9;9(1):e85882. 査読有
Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, Doki Y, Shiku H. 2013. Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. J Transl Med. Oct 5;11:246. 査読有

Guo Z, Khattar M, Schroder PM, Miyahara Y, Wang G, He X, Chen W, Stepkowski SM. 2013. A dynamic dual role of IL-2 signaling in the two-step differentiation process of adaptive regulatory T cells. J Immunol. Apr 1;190(7):3153-62. 査読有

Iwamura K, Kato T, Miyahara Y, Naota H, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. 2012. siRNA-mediated silencing of PD-1 ligands enhances tumor-specific human T-cell effector functions. Gene Ther. Oct;19(10):959-966. 査読有

Miyahara Y, Khattar M, Schroder PM, Mierzejewska B, Deng R, Han R, Hancock WW, Chen W, Stepkowski SM. 2012. Anti-TCR mAb induces long-term allograft survival by reducing antigen-reactive T cells and sparing regulatory T cells. Am J Transplant. Jun;12(6):1409-1418. 査読有

Tsuda K, Yamanaka K, Linan W, Miyahara Y, Akeda T, Nakanishi T, Kitagawa H, Kakeda M, Kurokawa I, Shiku H, Gabazza EC, Mizutani. 2011. H. Intratumoral injection of Propionibacterium acnes suppresses malignant melanoma by enhancing Th1 immune responses. PLoS One. 6(12):e29020. 査読有

[学会発表](計 19 件)

Y Miyahara, S Kageyama, H Ikeda, M Ishihara, N Katayama, D Tomura, I

Nukaya, J Mineno, K Takesako, H Shiku. Adoptive transfer of TCR gene-transduced lymphocytes targeting MAGE-A4 for refractory esophageal cancer. ITOC-1 Immunotherapy of Cancer Conference. 2014, March 12, Munich, Germany.

S Kageyama, H Ikeda, N Imai, M Ishihara, Y Miyahara, S Ueda, T Ishikawa, H Naota, K Ohishi, T Shiraishi, N Inoue, M Tanabe, T Kidokoro, H Yoshioka, D Tomura, I Nukaya, J Mineno, K Takesako, N Katayama, H Shiku. Adoptive transfer of wild-type TCR-gene transduced T lymphocytes targeting MAGE-A4 antigen to patients with refractory esophageal cancer. American Association for Cancer Research Annual meeting, April 5, 2014, San Diego, CA, USA.

H Ikeda, S Kageyama, N Imai, Y Miyahara, M Ishihara, N Katayama, H Yoshioka, D Tomura, I Nukaya, J Mineno, K Takesako, H Shiku. Clinical application of TCR gene-transduced lymphocytes for patients with epithelial cancer and other types of malignancy: In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes with anti-tumor reactivity in patients. 2013 European society of gene & cell therapy (ESGCT) and SETGyC Collaborative Congress, October 25, Madrid, Spain.

片平智行、坂本英至、関行雄、三村三喜男、吉岡洋、都築豊徳、二村舞子、金田次弘、宮原慶裕、珠玖洋。化療・放射線療法後、胃全摘、膈尾部切除、脾摘、右腎摘、横行結腸部分切除、脳転移2回、肺転移で活性化リンパ輸注療法を続けている QOL 良好な長期生存例。2013 年 12 月 5 日。盛岡。

H Ikeda, S Kageyama, N Imai, Y Miyahara, M Ishihara, N Katayama, H Yoshioka, D Tomura, I Nukaya, J Mineno, K Takesako, H Shiku. 2013, 28th Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer. November 7, National Harbor, MD, USA.

H Ikeda, S Kageyama, N Imai, Y Miyahara, M Ishihara, A Kawamura, M Yamane, D Tomura, S Okamoto, I Nukaya, J Mineno, K Takesako, N Katayama, H Shiku. ANTIGEN RECEPTOR GENE-MODIFIED LYMPHOCYTES: HARNESSING T CELLS FOR EFFECTIVE CANCER TREATMENT WITH NOVEL VECTORS AND MANIPULATIONS. American Association for Cancer Research Annual meeting, April 5, 2013, Washington, DC, USA.

宮原慶裕、杉野早穂子、王立楠、葛島清

隆、藤田知信、河上裕、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、珠玖洋。HLA-A0206+NY-ESO-1+tumor cell lines can be recognized by HLA-A0201 restricted-NY-ESO-1(p157-165) specific TCRs. 第 72 回日本癌学会総会。2013 年 10 月 3 日。横浜。

影山慎一、池田裕明、今井奈緒子、上田修吾、石川剛、直田浩明、宮原慶裕、吉岡広文、戸村大助、糠谷育衛、峰野純一、片山直之、珠玖洋。MAGE-A4 発現食道癌における抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後の in vivo 血中持続。第 72 回日本癌学会総会。2013 年 10 月 3 日。横浜。

杉野早穂子、宮原慶裕、上田修吾、石川剛、古倉聡、池田裕明、影山慎一、糠谷育衛、戸村大助、吉岡広文、峰野純一、珠玖洋。MAGE-A4 特異的 T 細胞受容体を用いた遺伝子免疫治療における免疫モニタリング。第 72 回日本癌学会総会。2013 年 10 月 3 日。横浜。

上田修吾、影山慎一、宮原慶裕、珠玖洋。進行・再発固形癌に対する CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法第 1 相臨床試験。第 72 回日本癌学会総会。2013 年 10 月 3 日。横浜。

影山慎一、池田裕明、今井奈緒子、石原幹也、斉藤佳菜子、上田修吾、石川剛、古倉聡、直田浩明、宮原慶裕、城所知秀、井上直樹、田辺雅茂、吉岡広文、戸村大助、糠谷育衛、岡本幸子、峰野純一、白石泰三、大石晃嗣、片山直之、珠玖洋。食道癌を対象にした MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注における輸注細胞の体内動態と臨床評価。第 17 回日本がん免疫学会総会。2013 年 7 月 3 日。宇部。

堀早穂子、宮原慶裕、影山慎一、池田裕明、藤田知信、河上裕、上田修吾、宮本正樹、土川貴裕、平野聡、川上和孝、五島直樹、珠玖洋。Serological analysis of “antigen spreading” induced by cholesteryl pullulan (CHP)-MAGEA4 vaccination. 第 71 回日本癌学会総会。2013 年 9 月 19 日。札幌。

影山慎一、池田裕明、宮原慶裕、今井奈緒子、石原幹也、斉藤佳菜子、片山直之、上田修吾、戸村大助、糠谷育衛、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋。食道癌を対象にした TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法における輸注細胞の血中動態。第 71 回日本癌学会総会。2013 年 9 月 19 日。札幌。

片平智行、長谷川正規、金田次弘、二村舞子、原田智子、細井延行、倉内修、藤田興一、青田泰博、宮原慶裕、珠玖洋。子宮平滑筋肉腫長期生存例における活性化リンパ球輸注療法の効果。第 71 回日本癌学会総会。2013 年 9 月 19 日。札幌。

池田裕明、影山慎一、宮原慶裕、今井奈緒子、石原幹也、岡本幸子、糠谷育衛、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋. 遺伝子改変 T 細胞の臨床応用 2012 年 7 月 26 日 第 16 回日本癌免疫学会総会. 札幌
影山慎一、池田裕明、宮原慶裕、堀早穂子、斉藤佳菜子、今井奈緒子、岡本幸子、戸村大助、糠谷育衛、峰野純一、竹迫一任、片山直之、珠玖洋. 食道癌症例を対象にした TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後の血中細胞動態. 第 70 回日本癌学会総会. 2011 年 10 月 3 日. 名古屋
宮原慶裕、堀早穂子、山本明美、白倉和子、前田優香、西川博嘉、上田修吾、宮本正樹、川上和孝、五島直樹、村岡大輔、原田直純、藤田知信、河上裕、池田裕明、影山慎一、珠玖洋. Protein array-based serological analysis of immune responses induced by cholesteryl pullulan (CHP)-MAGEA4 vaccination. 第 70 回日本癌学会総会. 2011 年 10 月 3 日. 名古屋
岩村康一、加藤琢磨、宮原慶裕、直田浩明、峰野純一郎、池田浩明、竹迫一任、珠玖洋. ヒト腫瘍抗原特異的 T 細胞への PD-L1/PD-L2 siRNA 導入による T 細胞機能の増強. 第 70 回日本癌学会総会. 2011 年 10 月 3 日. 名古屋
岩村康一、加藤琢磨、宮原慶裕、直田浩明、峰野純一郎、池田浩明、竹迫一任、珠玖洋. ヒト腫瘍抗原特異的 T 細胞への PD-L1/PD-L2 siRNA 導入による T 細胞機能の増強. 第 15 回日本がん免疫学会総会. 2011 年 6 月 30-7 月 1 日. 大阪.

〔図書〕(計 1 件)

宮原慶裕、珠玖洋. 抗 CTLA-4 抗体による免疫制御機構の解除. 臨床免疫・アレルギー科 特集 I ; 腫瘍の免疫回避機構 2011 年 7 月 vol.56:38-43.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.shikuken.jp/about/history/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮原 慶裕 (MIYAHARA Yoshihiro)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 10582083