

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700991

研究課題名(和文)メモリーヘルパーT細胞の新規マスター遺伝子の単離と解析に基づく癌免疫療法の応用

研究課題名(英文)Development of a novel cancer immunotherapy based on efficient induction of memory T cells.

研究代表者

藤木 文博(Fujiki, Fumihito)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：40456926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：癌免疫療法の成功には、『質』の良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。これまでに我々は、T細胞のメモリーおよびエフェクターT細胞への分化を制御すると推測される遺伝子Aを同定し、T細胞特異的にこの遺伝子Aを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。本研究では、リステリア感染症モデルを用いて、このマウスのメモリーT細胞形成を評価した。その結果、遺伝子Aを欠損するT細胞は、野生型のT細胞と比較して、メモリーT細胞マーカーであるCD127およびCD62Lを高発現するとともに、二次免疫応答を強く示した。以上より、遺伝子AはメモリーT細胞を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The induction of tumor-associated antigens (TAAs)-specific memory T cell and its maintenance are essential for ideal cancer immunotherapy. However, mechanism of memory T cell development remains unclear. In this study, we investigated the role of gene A in a murine *Listeria monocytogenes* infection model. As expected, gene A-deficient T cells exhibited high level of CD127 and CD62L expression after infection, leading to enhanced memory T cell formation. In addition, gene A-deficient memory T cells showed enhanced proliferative response after secondary infection.

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：メモリーT細胞 癌免疫療法 WT1 CTL ヘルパーT細胞

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難いのが現状である。この現状を打開するための戦略のひとつとして、メモリーT細胞の増大がある。一般にT細胞は、メモリーT細胞とエフェクターT細胞に大別される。メモリーT細胞は長期間にわたって体内で維持され、再び抗原が暴露するとエフェクターT細胞に分化し癌細胞などを攻撃する。興味深いことに、T細胞移入療法の研究で、メモリーT細胞は直接癌細胞を攻撃するエフェクターT細胞よりも癌拒絶効果が強いことが報告されている。現在、世界中で実施されている癌免疫療法の多くは、メモリーT細胞よりもエフェクターT細胞の誘導に重点をおいているために、不安定で弱い癌拒絶効果にとどまっていると考えられる。したがって、癌免疫療法によって腫瘍細胞を攻撃しうるメモリーT細胞を誘導し、抗腫瘍免疫応答の『質』を改善することが求められる。しかしながら、メモリーT細胞の形成に関与する分子メカニズムは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が、これまでに同定したメモリーT細胞制御遺伝子と推測される遺伝子A(特許申請のため、仮名)に着目する。この遺伝子AのT細胞における機能を解析・理解することにより、メモリーT細胞の効率的な誘導方法を探索し、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ことを目的とする。

3. 研究の方法

エフェクターT細胞に高発現する遺伝子Aは酵素として働くことが知られている。我々は、この遺伝子A酵素によって生成される物質BをヒトT細胞培養系に添加することで、T細胞をエフェ

クターT細胞に分化させることを見出した。反対に、物質Bに対する阻害剤を添加することで、メモリーT細胞が効率的に誘導された。また、期待通りに、この方法で誘導されたメモリーT細胞は、アポトーシス抵抗性や高い自己複製能・多分化能、そして免疫不全マウスにおける強い免疫再構築能を示した。一方、エフェクターT細胞は、これらの機能が低下していた。以上の結果は、遺伝子AがT細胞の分化運命決定(つまりエフェクターT細胞もしくはメモリーT細胞になるかどうか)を制御しうることを示唆する。この遺伝子Aの働きがin vitroの特殊な環境だけでなく生理的なin vivoにおいても観察できるか遺伝子改変マウスを作製し解析を行った。

4. 研究成果

(1) T細胞特異的遺伝子Aノックアウト(A-CKO)マウスの解析

これまで、遺伝子Aノックアウトマウスは胎生致死となるため、T細胞における遺伝子Aの詳細な働きは不明であった。そこで、CD4-Creマウスを用いてT細胞特異的に遺伝子Aを欠損するA-CKOマウスを作製し、T細胞の表現型を解析した。A-CKOにおけるT細胞の発生は、胸腺細胞の解析により正常に起こることが明らかになった。次に、メモリーT細胞に高発現し、メモリーT細胞のマーカーとして用いられるCD62LおよびCD127の発現を解析したところ、期待した通りに、A-CKOマウスのT細胞において、これらの分子の発現が増強していることが明らかとなった。特に、CD62Lの発現増強は顕著であり、この発現増強がT細胞の機能に影響を及ぼすか検討した。その結果、CD62Lの発現増強によってA-CKO由来T細胞のリンパ節へのホーミング能が亢進していた。以上の結果は、遺伝子A欠損T細胞はメモリーT細胞を形成しやすいことを示唆した。

また、重要なことに、CAGG-CreERマウスとの交配によって得られたタモキシフェン誘導性コンディショナルノックアウトマ

ウスにタモキシフェンを投与すると、T細胞におけるCD62Lの発現が上昇した。一方、その他の臓器では異常は認められず、マウスの体重も変化は認められなかった。

(2) リステリア感染症モデルを用いたA-CKOマウスにおけるメモリーT細胞形成能の評価

上記の結果より、遺伝子A欠損T細胞はメモリーT細胞形成能が亢進していることが考えられた。これを確認するために、遺伝子A^{eff}, CD4-Cre^{+/+}, OT-I^{+/+}, Rag1^{-/-}, CD45.1⁺, CD45.2⁺マウス、およびコントロールとして、遺伝子A^{eff}, CD4-Cre^{-/-}, OT-I^{+/+}, Rag1^{-/-}, CD45.1⁺, CD45.2⁻マウスを作製し、これらのマウスよりCD8⁺T細胞を分離し1:1の割合で混合した後、野生型マウス(CD45.1⁺, CD45.2⁺)に移入した。その後、OVAタンパクを発現する組換えリステリアモノサイトゲネス(LM-OVA)を尾静脈より感染させ、経時的に移入したT細胞の割合の変化を観察した。遺伝子A欠損T細胞は、コントロールT細胞に比べて、effector phaseであるday 7で有意にその頻度が低下していた。しかしながら、contraction phaseであるday 14では逆に、遺伝子A欠損T細胞の頻度が有意に増加しており、この現象はmemory phaseであるday 87においても観察された。さらに、遺伝子A欠損T細胞は、CD62LおよびCD127の発現がコントロールT細胞に比べて有意に高く、セントラルメモリーT細胞であるCD62L⁺CD127⁺分画の細胞頻度が上昇していた。また、CD127⁺KLRG1⁻で定義されるメモリーT細胞の前駆細胞であるmemory precursor effector cell (MPEC)が遺伝子A欠損T細胞で有意に多く、逆にメモリーT細胞にはならないCD127⁺KLRG1⁺のshort lived effector cells (SLEC)が減少していた。

以上の結果より、遺伝子A欠損T細胞はメ

モリーT細胞を形成し易いことが明らかとなった。

(3) T細胞受容体(TCR)遺伝子導入による癌抗原特異的T細胞の作製

本研究課題の最終目標は、メモリーT細胞を軸とした新規癌免疫療法を開発することである。したがって、マウスなどの動物実験で得られた結果を迅速に臨床応用するための研究基盤を確立する必要がある。そこで、新規癌免疫療法を評価するためのプラットフォームとしてT細胞受容体(TCR)遺伝子導入による癌抗原特異的ヒトT細胞の作製を行った。

我々は、これまでに癌抗原であるWT1特異的ヘルパーT細胞クローンやキラーT細胞クローンを得ている。これらのT細胞クローンよりTCR遺伝子を単離し、ヒトCD4⁺T細胞もしくはCD8⁺T細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。TCR導入CD4⁺T細胞は期待通りに、WT1特異的にTh1タイプサイトカインを大量に産生した。さらに、このCD4⁺T細胞はヘルパー活性のみならずWT1を発現する白血病細胞に対して細胞傷害活性を示した。また、キラーT細胞クローン由来TCRを導入されたCD8⁺T細胞も、期待通りに、WT1を発現する癌細胞を傷害した。

このTCR遺伝子導入による癌抗原特異的T細胞の作製技術は、新規癌免疫療法の戦略評価に貢献するプラットフォームになると期待される。

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 9件)すべて査読有り

1. Yatsuda J, Irie A, Harada K, Michibata Y, Tsukamoto H, Senju S, Tomita Y, Yuno A, Hirayama M, Abu Sayem M,

- Takeda N, Shibuya I, Sogo S, Fujiki F, Sugiyama H, Eto M, Nishimura Y. Establishment of HLA-DR4 transgenic mice for the identification of CD4+ T cell epitopes of tumor-associated antigens. PLoS One. 2013 30;8:e84908. doi: 10.1371/journal.pone.0084908.
2. Lin Y, Fujiki F, et al. HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4+ T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. J Immunother. 2013, 36:159-70. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182873581.
 3. Tachino S, Fujiki F, et al. Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. Cancer Immunol Immunother. 2013, 62:801-10. doi: 10.1007/s00262-012-1385-3
 4. Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, et al. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor. Anticancer Res. 2012, 32:5201-9.
<http://ar.iiarjournals.org/content/32/12/5201>.
 5. Anguille S*, Fujiki F*, et al. Identification of a Wilms' tumor 1-derived immunogenic CD4(+) T-cell epitope that is recognized in the context of common Caucasian HLA-DR haplotypes. Leukemia. 2013 27:748-50. doi: 10.1038/leu.2012.248.
 6. [学会発表] (計 10 件) すべて査読有り
 1. Fujiki F et al. HLA class II-restricted WT1-specific TCR-transduced CD4+ T cells display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a

cytotoxicity against leukemia cells. The 4th JSH International Symposium 2013. 2013 年 5 月 24 日、YAMATOTA-HONTEN, Ehime

2. 藤木文博 等、HLA-DPB1*05:01 拘束性 WT1 特異的 TCR を導入された CD4+T 細胞はヘルパー活性と細胞傷害活性を有する。第 17 回日本がん免疫学会総会、2013 年、7 月 4 日、ANA クラウンプラザホテル宇部
3. 藤木文博 等、HLA class II 拘束性 WT1 特異的 T Cell Receptor 遺伝子導入によるヘルパー活性とキラー活性を有する CD4+T 細胞の作製、第 41 回日本臨床免疫学会総会(招待)、2013 年 11 月 28 日、海峡メッセ下関

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称：抗原特異的ヘルパーT 細胞レセプター遺伝子
 発明者：杉山治夫、藤木文博
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：PCT//JP2013/74748
 出願年月日：2013.09.12
 国内外の別：外国

6. 研究組織

(1)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
 研究者番号：40456926