慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Stem Cell Memory T細胞の創出と応用
Sub Title	Generation and application of Stem Cell Memory T Cells
Author	吉村, 昭彦(Yoshimura, Akihiko) 近藤, 泰介(Kondō, Taisuke)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	最近、新規メモリーT細胞サブセットである幹細胞メモリーT (Tscm) 細胞が発見され、新たなT細胞移入療法の素材として注目されている。Tscm細胞は長命で抗原刺激に応答して急速に増殖し、多数のエフェクターT細胞を産生する。我々はヒト末梢血よりEBウイルスや腫瘍抗原特異的T細胞を増幅させたのち、ヒトNotch-ligand, hDLL1を発現するOP9細胞と共培養することにより、エフェクターT細胞をTscm様細胞 (iTscm) に転換できることを示した。iTscm細胞はヒト化マウスモデルにおいて従来の活性化T細胞よりもはるかに強い抗腫瘍能力を示した。 A novel memory T cell subset, stem cell memory T (Tscm) cell, was recently discovered and is believed to be a useful tool for new T cell transfer therapy. Since Tscm cells are long-lived, and proliferate rapidly in response to antigenic stimulation to produce large numbers of effector T cells. We amplified EB virus and tumor antigen-specific T cells from human peripheral blood and co-cultured with human Notch-ligand and OP9 cells expressing hDLL1. This procedure converted effector T cells into Tscm-like cells (iTscm). We showed that iTscm cells have shown much more potent anti-tumor activity than conventional activated T cells in a humanized mouse model.
Notes	研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2016～2018 課題番号：16K15292 研究分野：免疫学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K15292seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 １７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１５２９２

研究課題名（和文）Stem Cell Memory T細胞の創出と応用

研究課題名（英文）Generation and Application of Stem Cell Memory T Cells

研究代表者
吉村　昭彦（Yoshimura, Akihiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：９０１８２８１５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：最近、新規メモリーT細胞サブセットである幹細胞メモリーT（Tscm）細胞が発見され、新たなT細胞移入療法の素材として注目されている。Tscm細胞は長命で抗原刺激に応答して急速に増殖し、多数のエフェクターT細胞を産生する。我々はヒト末梢血よりEBウイルスや腫瘍抗原特異的T細胞を増幅させたのち、ヒトNotch-ligand, hDLL1を発現するOP9細胞と共培養することにより、エフェクターT細胞をTscm様細胞（iTscm）に転換できることを示した。iTscm細胞はヒト化マウスモデルにおいて従来の活性化T細胞よりもはるかに強い抗腫瘍能力を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
試験管内におけるTscm細胞の作製法およびがん免疫療法への応用が多数報告されている。しかしながら既報の作製法はナイーブT細胞に弱いTCR刺激やシグナル阻害剤を用いることで活性化を抑制しながら分化を誘導するものである。我々が開発したiTscm細胞は一旦活性化して疲弊化したT細胞からも作成できるところが特徴である。すなわち分化段階を一段巻き戻したものであり、このメカニズムを解明する事でいまだ十分解明されていないTscmの発生機構が明らかになると思われる。また我々の方法はがんのT細胞移入療法の効果を高めうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A novel memory T cell subset, stem cell memory T (Tscm) cell, was recently discovered and is believed to be a useful tool for new T cell transfer therapy. Since Tscm cells are long-lived, and proliferate rapidly in response to antigenic stimulation to produce large numbers of effector T cells. We amplified EB virus and tumor antigen-specific T cells from human peripheral blood and co-cultured with human Notch-ligand and OP9 cells expressing hDLL1. This procedure converted effector T cells into Tscm-like cells (iTscm). We showed that iTscm cells have shown much more potent anti-tumor activity than conventional activated T cells in a humanized mouse model.

研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍免疫　メモリーT細胞　疲弊化　Notch　分化制御　細胞移入療法　幹細胞メモリーT細胞

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

免疫記憶は獲得免疫機構の根幹をなす機能である。その中心的役割を担うメモリーT細胞には、細胞表面マーカーにより CD62L^{low} CD44^{high} を示す **Effector memory (エフェクターメモリー) T 細胞 (T_{EM})**と CD62L^{high} CD44^{high} を示す **Central memory (セントラルメモリー) T 細胞 (T_{CM})** の 2 つの集団が存在することが知られていた。
近年ヒトおよび霊長類において、新規メモリーT 細胞集団である「**Stem cell memory (ステムセルメモリー) T 細胞 (T_{SCM})**」が提唱されている(Gattinoni, L. *et al. Nat Med.* 2011, 17(10):1290-7)。T_{SCM} は未分化 T 細胞である naive T 細胞と同様の細胞表面マーカーパターンを示し、他のメモリーT 細胞に比べて、長命で自己増殖をするという特徴を有する(図 1)。そのために **T_{SCM} 細胞は強力な抗腫瘍活性を持つ細胞として期待されている。そこで試験管内で T_{SCM} 細胞を作成する方法が模索されてきた。これまで発表された方法のすべては naiveT 細胞から作成するものであった。**ヒトでは naiveT 細胞に TCR 刺激する際に Wnt シグナル活性化剤(GSK3β 阻害剤)を添加することで **T_{SCM}** が誘導できるとされている(Gattinoni, L *et al. Nat Med.* 2009; **15**: 808-13.)。**しかし**一旦活性化されたエフェクターT 細胞やメモリーT 細胞を T_{SCM} に転換する方法は開発されていない。

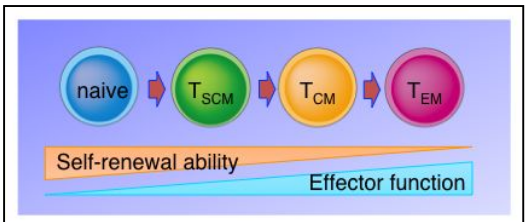

図1 Stem cell memory T (T_{SCM})細胞とは、ナイーブT細胞マーカー (マウスではCD44^{low} CD62L^{high} ヒトではCCR7^{high}CD45RA^{high}) を発現するメモリーT細胞のサブセットで他のメモリーT細胞よりも長寿でかつ抗原刺激によって大量のエフェクター T細胞を供給する。ナイーブT細胞とセントラルメモリーT細胞の中間に位置すると考えられている。

２．研究の目的
一旦活性化されたエフェクターT 細胞やメモリーT 細胞を T_{SCM} に転換する方法を確立し、抗腫瘍免疫効果を実証する。さらにこの方法論の確立によって免疫記憶の新しいメカニズムの解明を行うとともに、T_{SCM} の発生機構の理解に貢献する。

３．研究の方法
マウスの場合、脾臓より naiveCD4+T 細胞や CD8+T 細胞を単離し、試験管内で抗 CD3 抗体によって活性化した後に Notch リガンドを発現する OP9 細胞(OP9-DL1)との共培養を行うと T 細胞は増殖し、CD44^{low}CD62L^{high} の naive 分画に細胞集団が出現する。この細胞を誘導性 T_{SCM}(i T_{SCM})と名付け、ソーテングして性格づけを行なう。また担癌マウスに移入して抗腫瘍活性を検証する。抗原特異的ヒト T_{SCM} の場合、ヒト末梢血からメモリーT 細胞分画を単離し、EB ウイルスを感染させた B 細胞と共培養し増幅させた後に CCR7^{low} CD45RA^{low} CD45RO^{high} のエフェクターT 細胞分画を OP9-hLDL1(ヒト DLL1 を発現する OP9 細胞と共培養を行なった。CD45RA^{high} CCR7^{high} の naive 分画に現れる細胞を iT_{SCM} として単離した。

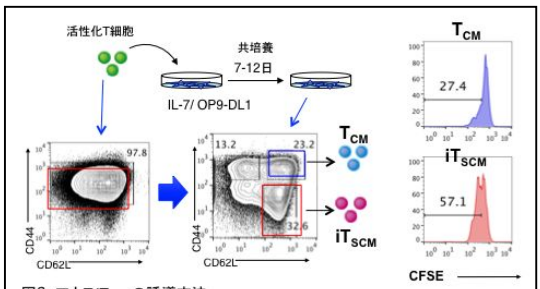

図2 マウスiT_{SCM}の誘導方法
分化した活性化T細胞をIL-7存在下で7～12日間O9-DL1と共培養を行う。その後FACSを行い、CD44^{lo}CD62L^{hi}のナイーブ分画に出現する細胞をFACSで単離しiT_{SCM}と名付けた。iT_{SCM}はT_{CM}やナイーブT細胞よりも二次TCR刺激に対してすばやく増殖した(CSFE^{low}の分画が増加している)。

４．研究成果
TCR 刺激によって T 細胞を活性化した後に様々な条件での培養を試みたところ、Notch リガンドを発現する OP9 細胞(OP9-DL1)との共培養を行うと CD44^{low}CD62L^{high} の naive 分画に細胞集団が出現することを見出した(図 2)。この実験系で誘導される naive 様 T

細胞は、サイズが naiveT 細胞のように小さく CCR7 陽性にも関わらず、活性化 T 細胞でみられるようなサイトカイン受容体、および共刺激分子を発現していた。また *in vitro* においてこの naive 様 T 細胞は本来の naive T 細胞に比べて TCR 刺激に早い応答性を示し、高いサイトカイン産生能を有していた。その一方で naive 様 T 細胞をマウスに移入したところ naiveT 細胞や T_{CM} に比べて長寿であることが明らかになった。また Sca1 や Bcl2 などの T_{SCM} の特徴的とされる遺伝子の発現レベルも高かった。よってこの細胞を誘導性 T_{SCM}(i T_{SCM})と名付けた(図３)。

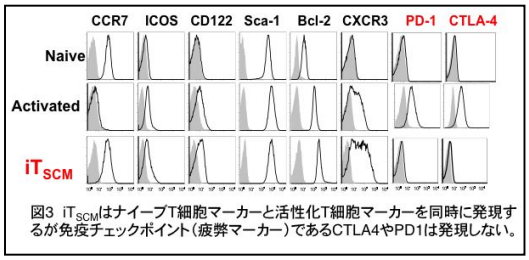

図3 iT_{SCM}はナイーブT細胞マーカーと活性化T細胞マーカーを同時に発現するが免疫チェックポイント(疲弊マーカー)であるCTLA4やPD1は発現しない。

i T_{SCM} の解析を行ったところ以下の点があきらかとなった。①OP9-DL1 との共培養によって細胞数が 4～5 倍に増加する。②i T_{SCM} は TCR 刺激によって急速に増殖する。③TCR 刺激で expand した i T_{SCM} 細胞は体内で抗原刺激後 expand して長期に生存する。④実際に CD8，CD4 両者の i T_{SCM} を担がんマウスに移入したところ顕著な抗腫瘍効果が見られた(図 4)　この成果は ***Nature Commun.*** (2017；8:15338)に報告した。

次にヒト活性化 T 細胞から i T_{SCM} を誘導する方法の確立を行なった(図５）。　EB ウイスルに対しては健常人のほとんどが感染している。ヒト末梢血のメモリーT 細胞分画(この場合は CD8 陽性 T 細胞)と、EB ウイルスを感染させた B 細胞を共培養し増幅させた後に $CCR7^{low}$ $CD45RA^{low}$ $CD45RO^{high}$ のエフェクター分画を OP9-hDL1 と共培養を行なった(図 5A)。$CD45RA^{high}$ $CD45RO^{high}$ の naive 分画に現れる細胞ヒト EB 抗原特異的 i T_{SCM} として単離することができた(図５B)。ヒト i T_{SCM} 細胞は、エフェクターメモリーT 細胞よりもセントラルメモリーT 細胞からより効率的に誘導された。また IL-7 および IL-15 は i T_{SCM} 細胞を効率的に産生することができたが、IL-2 や IL-21 は効果がなかった。EB-特異的 i T_{SCM} 細胞は分裂能、生存能および EBV 感染細胞の殺細胞効果いずれも通常のメモリーT 細胞よりも勝っていた。実際に超免疫不全(NGS)マウスにヒト腫瘍細胞を移植する系において、EB 特異的 i T_{SCM} 細胞は OP9-hDL1 と共培養しなかった T 細胞よりも強力に腫瘍の増殖を抑制できた（図 5C)。したがって、iTscm による養子 T 細胞療法は、癌免疫療法のための有望な治療戦略を提供することが示された。これらの成果は ***Cancer Sci.*** (2018；109：2130-2140)に発表した。

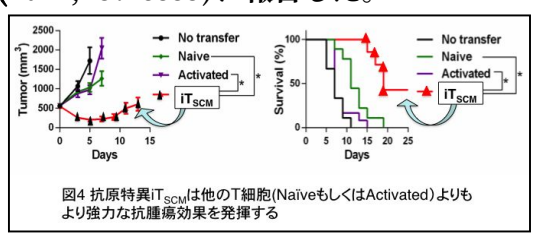

図4 抗原特異iT_{SCM}は他のT細胞(NaïveもしくはActivated)よりもより強力な抗腫瘍効果を発揮する

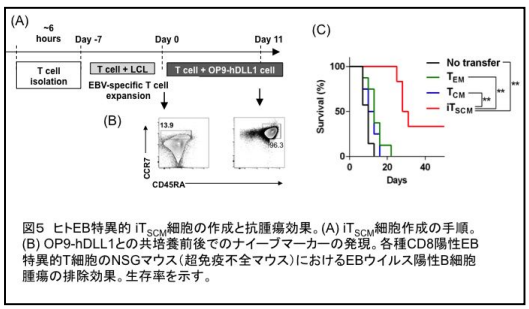

図5 ヒトEB特異的 iT_{SCM}細胞の作成と抗腫瘍効果。(A) iT_{SCM}細胞作成の手順。(B) OP9-hDLL1との共培養前後でのナイーブマーカーの発現。各種CD8陽性EB特異的T細胞のNSGマウス(超免疫不全マウス)におけるEBウイルス陽性B細胞腫瘍の排除効果。生存率を示す。

このように本研究において従来にない新しい方法でエフェクターT 細胞から一段分化が後戻りした形の長寿命の幹細胞様の T 細胞を作製できることを見出した。この i T_{SCM} 細胞は生体内での T_{SCM} 細胞の機能解析を行う上で貴重なツールとなるであろう。特に試験管内で大量に作製できるため i T_{SCM} 細胞を用いた細胞移入療法に応用可能である。実際に腫瘍抗原特異的 i T_{SCM} 細胞を移入した場合、強い腫瘍の萎縮効果が認められた。i T_{SCM} 細胞の性質は Notch シグナルによって付与される。このメカニズムを明らかに出来ればさらに他の細胞でも「分化を一段戻す」手法が確立出来るかもしれない。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　2　件）

1. Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Mise S, Ando M, Akanuma T, Iizuka M, Sakai R, Morita, R, Yoshimura A. Generation and application of human induced-stem cell memory T (iTSCM) cells for adoptive immunotherapy
Cancer Sci. 2018; 109(7):2130-2140. doi: 10.1111/cas.13648.

2. Kondo T, Morita R, Okuzono Y, Nakatsukasa H, Sekiya T, Chikuma S, Shichita T, Kanamori M, Kubo M, Koga K, Miyazaki T, Kassai Y, Yoshimura A Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy ***Nature Commun.*** 2017; 8:15338. doi: 10.1038/ncomms15338.

〔学会発表〕（計　7　件）

1. 吉村昭彦 メモリーT 細胞の性質と抗腫瘍免疫　　第 5 回日本移植学会スプリングセミナー　2019 年

2．吉村昭彦　「幹細胞様メモリーT 細胞(iTscm)誘導による効果的がん細胞療法の開発」 日本臨床免疫学会シンポジウム 2「腫瘍免疫」2018 年

3．近藤泰介、森田林平、吉村昭彦　「ミトコンドリア制御によるステムセルメモリー T 細胞の誘導と細胞移入療法への応用 」第 22 回日本がん免疫学会総会 2018 年

4．Akihiko Yoshimura "Generation of human induced-stem cell memory T (iTscm) cells for cancer adoptive T cell immunotherapy"　Core Symposia:03. Regulation of tumor immunity and evolution of cancer treatments"**「免疫細胞のエピジェネティックプログラミング」モーニングレクチャー 17 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年**

5．近藤泰介，吉村昭彦 『ミトコンドリア制御によるメモリーT 細胞のリプログラミング』 第 39 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 2018 年

6．Taisuke Kondo and Akihiko Yoshimura "Metabolic reprogramming requires stem cell moery T cells phenotypes for adaptive immunothrapy"
45th Naito Conference "Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy" 2018

7．吉村昭彦「T 細胞リプログラミングによる新たな免疫チェックポイント克服法」第 26 回泌尿器科分子・細胞研究会　2017 年

〔図書〕（計　1　件）

1．近藤 泰介，吉村 昭彦　医歯薬出版株式会社　T 細胞を若返らせる技術とがん免疫療法への応用(解説)　医学のあゆみ（0039-2359)265 巻 6 号 Page517-519（2018）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

○取得状況（計 0　件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：近藤　泰介
ローマ字氏名：KONDO, Taisuke

※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、研究者個人に帰属されます。