

奨励金No.1503

臓器固有腫瘍浸潤リンパ球の cell fate を決定づける因子の同定

熊谷 尚悟

国立がん研究センター 免疫TR分野 特任研究員

Identification of factors determining cell fate of organ-specific tumor-infiltrating lymphocytes

Shogo Kumagai,

Division of cancer immunology, National cancer center, Project researcher



腫瘍免疫において、制御性 T (Treg) 細胞は、CD8 陽性 T 細胞を含むエフェクター T 細胞を抑制する。これまで Treg 細胞上の PD-1 発現が免疫チェックポイント阻害治療抵抗性を生み出すことが知られていた。本研究により、我々は転移性肝病変において、乳酸代謝が Treg 細胞上の PD-1 発現に強くかかわり、新規治療標的になりえることを示した。これは肝臓特有の腫瘍浸潤リンパ球の cell fate を決定づける機構の解明につながるものである。

In tumor microenvironment, regulatory T (Treg) cells suppress effector T cells, including CD8-positive T cells. It has been known that PD-1 expression on Treg cells causes resistance to immune checkpoint inhibitory therapy. In this study, we show that lactate metabolism is strongly involved in PD-1 expression on Treg cells in metastatic liver lesions and may be a novel therapeutic target. This leads to the elucidation of the mechanisms that determine the cell fate of tumor-infiltrating lymphocytes specific to the liver.

1. 研究内容

[1. 背景]

制御性 T (Treg) 細胞は、免疫系の過剰活性化および異常活性化の制御を介して免疫恒常性の維持に不可欠である¹⁻³。腫瘍免疫において、Treg 細胞は、がん細胞を殺すために重要な役割を果たす CD8 陽性 T 細胞を含むエフェクター T 細胞を抑制する^{4,5}。したがって、腫瘍局所における CD8 陽性 T 細胞と Treg 細胞のバランスは、様々な種類のがんの予後にとって重要である⁶⁻⁸。

近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICB) に代表されるがん免疫療法の進歩は、複数のがん種においてがん治療のパラダイムシフトをもたらした⁹⁻¹¹。しかし、ICB による治療を受けた患者の半数以上が奏効しないことから、奏効者を選別するためのバイオマーカーを定義し、より有効ながん免疫療法を開発することが必要とされている。

我々は最近、TME におけるエフェクター T 細胞と活性化 Treg 細胞であるエフェクター Treg (eTreg) 細胞の PD-1 発現バランスが PD-1 遮断療法の有望な予測バイオマーカーとなることを報告した¹²。さらに、PD-1 陽性 eTreg 細胞は特定の患者において PD-1 遮断後の病勢亢進に寄与する可能性があり¹³、治療現場においてもエフェクター T 細胞と Treg 細胞のバランスが重要であることが示された。我々の報告と同様に、いくつかの研究において ICB の臨床効果が異なる転移部位、特に肝転移病巣で異なることが実証されている。それらの検討では全身性免疫寛容を引き起こし、原発病巣と比較して ICB に対する反応が低くなる可能性があることが示唆されている¹⁴⁻¹⁷。さらに、腫瘍細胞における特異的な遺伝子変化や発がん性シグナル伝達経路の異常が免疫逃避に寄与し、がん免疫療法への抵抗性につながる¹⁸。

腫瘍は主にグルコースを利用し、生存のために好氣的解糖を促進する（Warburg 効果）。低グルコース（高乳酸）および低酸素環境は、エフェクターT細胞の生存および機能に適しておらず、抗腫瘍免疫の衰退につながる¹⁹。それにもかかわらず、Treg細胞が過酷なTMEに豊富に浸潤し、免疫抑制機能を発揮できることを考えると、エフェクターT細胞とTreg細胞の異なる代謝プロファイルの関与が示唆される²⁰。

本検討においては、PD-1を発現するエフェクターT細胞とTreg細胞のバランスがTMEでどのように展開されるのかを、代謝プロファイルの観点から取り上げた。Treg細胞が主に発現している monocarboxylate transporter 1 (MCT1) による乳酸の取り込みは、NFAT1の核内移行を促進し、PD-1の発現を能動的に誘導することが判明した。我々は、乳酸がTreg細胞の代謝チェックポイントとして働き、TMEにおける免疫応答を制御していることを提案する。

【2. 方法 3. 結果】

国立がん研究センター東病院において外科的手術により切除された肺がんもしくは胃がん検体から腫瘍浸潤リンパ球を抽出し、フローサイトメト

リーを用いて解析した。また、同時に次世代シーケンサーを用いてがん組織での遺伝子発現の網羅的解析を実施した。腫瘍浸潤制御性T細胞のPD-1発現が高い腫瘍と低い腫瘍とを比較したところ、腫瘍浸潤制御性T細胞のPD-1発現が高い腫瘍で解糖系に関わる遺伝子発現が高いことが明らかとなった。解糖系が高まる病態として肝転移病変が知られていることから、肺がん原発病変と肝転移病変の両方の検体を用いて多重免疫染色を実施した。肝転移病変では原発病変と比較して制御性T細胞のPD-1発現が高く、網羅的遺伝子発現解析で得られたデータが確認された（図1）。

次に解糖系が高まっている腫瘍においてなぜ腫瘍浸潤制御性T細胞においてPD-1発現が高まるのかを検討するため、腫瘍浸潤リンパ球の網羅的遺伝子発現解析を実施して比較検討した。腫瘍浸潤PD-1陽性制御性T細胞では他のリンパ球と比較して乳酸トランスポーターであるMCT1（遺伝子名SLC16A1）の発現が高まっていることを見出し、腫瘍の解糖系の最終代謝産物である乳酸を制御性T細胞が取り込むことでPD-1発現を高めている可能性が示唆された。乳酸が制御性T細胞上のPD-1発現を誘導する機序を検討するため、低糖環境下で乳酸濃度を漸増させ様々なT細胞を刺

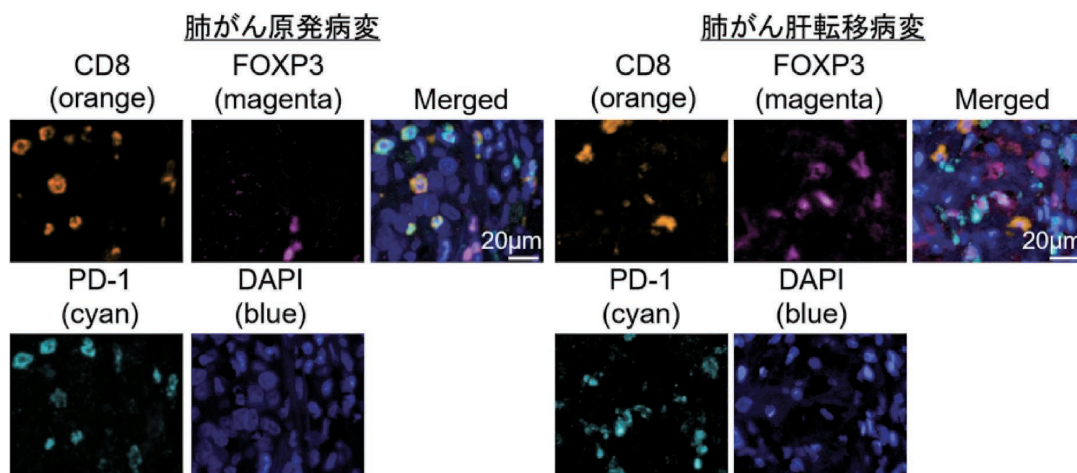


図1. 多重免疫染色を用いた原発病変と肝転移病変における免疫応答
肺がん原発病変と肝転移病変の検体が取得された患者を対象に多重免疫染色を実施した。肝転移病変では原発病変と比較して腫瘍浸潤制御性T細胞にPD-1が高発現していた。

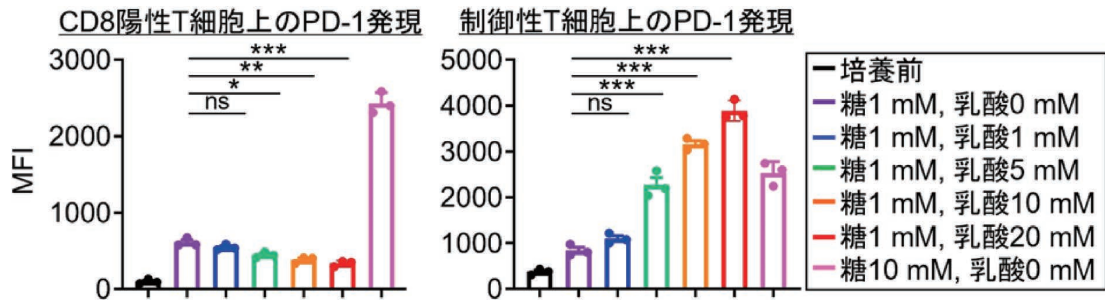


図2. 各リンパ球のPD-1発現と乳酸の関係

低糖環境下(1 mM)で乳酸濃度を漸増させリンパ球を刺激すると、CD8陽性T細胞ではPD-1発現は低下したが、制御性T細胞ではPD-1発現が高まった。

激した(図2)。

エフェクターT細胞(CD8陽性T細胞)では低糖環境下で乳酸濃度の上昇に伴いPD-1発現は低下したのに対して、制御性T細胞ではPD-1発現が高まった。つまり、制御性T細胞ではCD8陽性T細胞とは異なり乳酸を介した特異的なPD-1発現機構を有していることを発見した。さらに、肝転移病変において解糖系が亢進し乳酸濃度が高まっているかを、マウスモデルを用いて検討した。野生型マウスに皮下、胸腔内、肝臓内にマウス消化器がん細胞株であるMC38を接種した。皮下腫瘍、胸腔内腫瘍に比較して、肝臓内腫瘍ではHIF1 α 発現上昇を介して解糖系関連分子発現が高まり、それに伴いその他の腫瘍と比較して乳酸濃

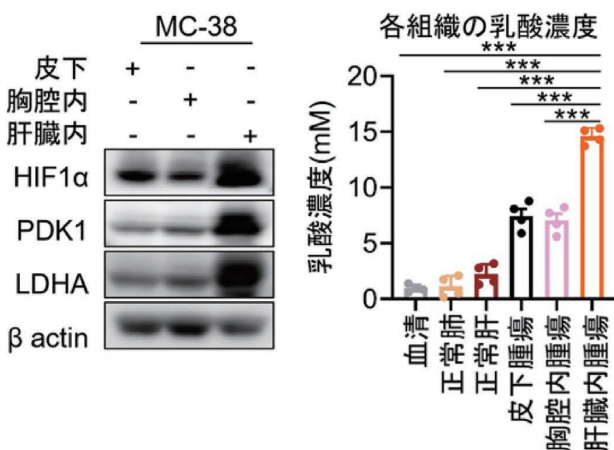


図3. 各臓器における乳酸含有量

野生型マウスの皮下、胸腔内、肝臓内に腫瘍細胞を接種し、解糖系関連分子発現や乳酸含有量を検討した。肝臓内腫瘍において最も乳酸含有量が高いことが判明した。

度が上昇していた(図3)。

また、肝臓内腫瘍では腫瘍浸潤エフェクターT細胞(CD8陽性T細胞)のPD-1発現は低下している一方で、制御性T細胞のPD-1発現が高まり、抗PD-1抗体治療に抵抗性を示すとともに、hyper progressionに繋がっていると考えられ、本機序の重要性が示された(図4)。

国立がん研究センター中央病院、東病院にて進行胃がんもしくは肺がんがあり、抗PD-1抗体治療を受けた患者さんのデータを後方視的に解析したところ、肝転移病変があると抗PD-1抗体治療の無増悪生存期間が有意に短くなることが示され

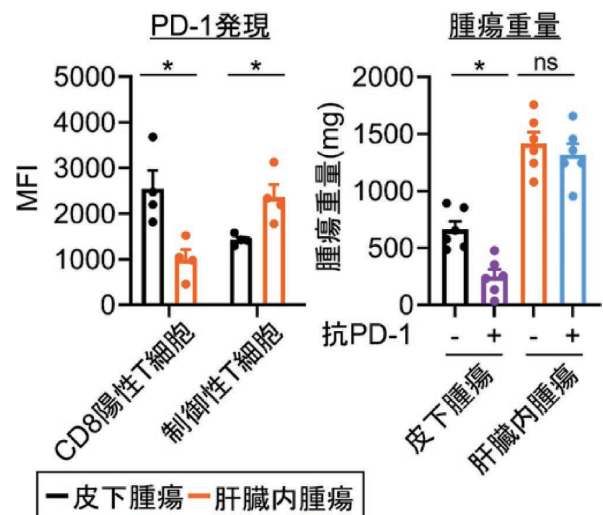


図4. 各臓器における抗PD-1抗体治療効果

野生型マウスの皮下、肝臓内に腫瘍細胞を接種し、浸潤リンパ球の表現型や抗PD-1抗体治療効果を検討した。肝臓腫瘍では腫瘍浸潤制御性T細胞のPD-1発現が高く、抗PD-1抗体治療に奏功しないことが明らかになった。

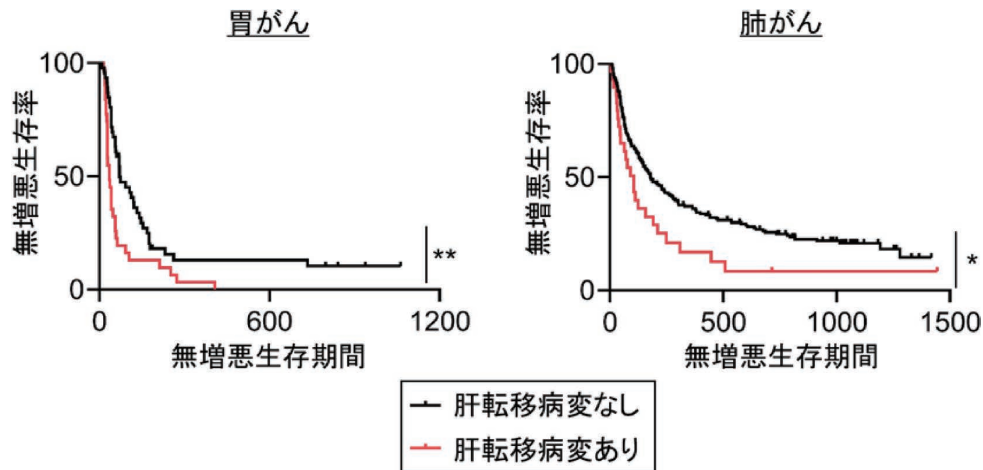


図5. 肝転移病変と抗 PD-1 抗体治療効果の関係
肝転移病変を有する胃がん、肺がん症例では抗 PD-1 抗体の治療効果が低下した。

た(図5)。

肝臓に MC38 腫瘍を接種したマウスに MCT1 阻害薬を投与したところ、腫瘍浸潤エフェクター T 細胞 (CD8 陽性 T 細胞) の PD-1 発現は上昇する一方で、制御性 T 細胞の PD-1 発現は減弱した(図6)。

MCT1 阻害薬を抗 PD-1 抗体と併用することで、肝臓腫瘍において抗 PD-1 抗体治療に対する抵抗

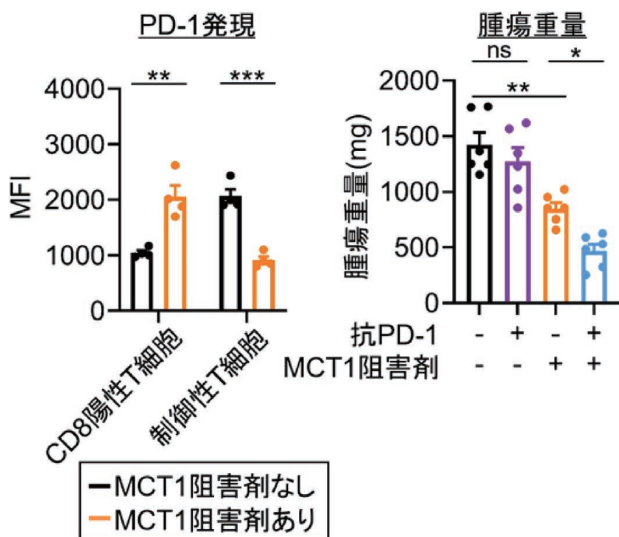


図6. 各臓器における MCT1 阻害治療効果
野生型マウスの肝臓内に腫瘍細胞を接種し、MCT1 阻害剤を用いて治療しました。浸潤リンパ球の表現型を評価し、抗 PD-1 抗体との併用効果を検討した。MCT1 阻害剤を用いることで制御性 T 細胞の PD-1 発現は弱まり、抗 PD-1 抗体治療の効果が改善された。

性を改善でき、新たな治療標的として臨床開発につながる可能性が示唆された。

【4. 考察】

解糖系の亢進した腫瘍は、グルコースを奪い、PD-1 の発現と Treg 細胞の抑制活性を増強する乳酸を過剰に放出し、これが PD-1 遮断療法の効果が上がらない一因となっている。このような Treg 細胞特有の代謝チェックポイントを介した乳酸による活発な免疫抑制機構は、がん免疫療法として乳酸に対する分子標的治療法を開発するための新しい窓を開くものである。本研究は Cancer Cell 誌に発表された (DOI : 10.1016/j.ccell.2022.01.001)。

【5. 文献】

1. Dominguez-Villar, M., and Hafler, D.A. (2018). Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* 19, 665-673. 10.1038/s41590-018-0120-4.
2. Li, M.O., and Rudensky, A.Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 16, 220-233. 10.1038/nri.2016.26.
3. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-

- tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* *155*, 1151-1164.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* *15*, 486-499. 10.1038/nri3862.
 - Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* *25*, 171-192. 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548.
 - Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* *10*, 942-949. 10.1038/nm1093.
 - Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* *12*, 298-306. 10.1038/nrc3245.
 - Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18538-18543. 10.1073/pnas.0509182102.
 - Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* *8*, 793-800. 10.1038/nm730.
 - Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* *12*, 252-264. 10.1038/nrc3239.
 - Zou, W., Wolchok, J.D., and Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* *8*, 328rv324. 10.1126/scitranslmed.aad7118.
 - Kumagai, S., Togashi, Y., Kamada, T., Sugiyama, E., Nishinakamura, H., Takeuchi, Y., Vitaly, K., Itahashi, K., Maeda, Y., Matsui, S., et al. (2020). The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol* *21*, 1346-1358. 10.1038/s41590-020-0769-3.
 - Kamada, T., Togashi, Y., Tay, C., Ha, D., Sasaki, A., Nakamura, Y., Sato, E., Fukuoka, S., Tada, Y., Tanaka, A., et al. (2019). PD-1(+) regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 9999-10008. 10.1073/pnas.1822001116.
 - Lee, J.C., Mehdizadeh, S., Smith, J., Young, A., Mufazalov, I.A., Mowery, C.T., Daud, A., and Bluestone, J.A. (2020). Regulatory T cell control of systemic immunity and immunotherapy response in liver metastasis. *Sci Immunol* *5*. 10.1126/sciimmunol.aba0759.
 - Sasaki, A., Nakamura, Y., Mishima, S., Kawazoe, A., Kuboki, Y., Bando, H., Kojima, T., Doi, T., Ohtsu, A., Yoshino, T., et al. (2019). Predictive factors for hyperprogressive disease during nivolumab as anti-PD1 treatment in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* *22*, 793-802. 10.1007/s10120-018-

00922-8.

16. Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., et al. (2019). Five-Year Survival and Correlates Among Patients With Advanced Melanoma, Renal Cell Carcinoma, or Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Nivolumab. *JAMA Oncol* 5, 1411-1420. 10.1001/jamaoncol.2019.2187.
17. Yu, J., Green, M.D., Li, S., Sun, Y., Journey, S.N., Choi, J.E., Rizvi, S.M., Qin, A., Waninger, J.J., Lang, X., et al. (2021). Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination. *Nat Med* 27, 152-164. 10.1038/s41591-020-1131-x.
18. Spranger, S., and Gajewski, T.F. (2018). Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat Rev Cancer* 18, 139-147. 10.1038/nrc.2017.117.
19. Brand, A., Singer, K., Koehl, G.E., Kolitzus, M., Schoenhammer, G., Thiel, A., Matos, C., Bruss, C., Klobuch, S., Peter, K., et al. (2016). LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* 24, 657-671. 10.1016/j.cmet.2016.08.011.
20. Angelin, A., Gil-de-Gómez, L., Dahiya, S., Jiao, J., Guo, L., Levine, M.H., Wang, Z., Quinn, W.J., 3rd, Kopinski, P.K., Wang, L., et al. (2017). Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab* 25, 1282-1293. e1287. 10.1016/j.cmet.2016.12.018.

2. 発表（研究成果の発表）

Kumagai S et al. Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. *Cancer Cell*. 2022 Feb 14; 40(2): 201-218.