

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) 制御性 T 細胞を標的とした新規がん免疫療法の開発
(英語) Development of novel cancer immunotherapy targeting Treg cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学免疫学フロンティア研究センター
特任教授 坂口志文

所属 役職 氏名： (英語) Immunology Frontier Research Center, Osaka University
Specially Appointed Professor Shimon Sakaguchi

実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) TKI 製剤による免疫細胞への影響と Treg 減少感受性の検証
開発課題名： (英語) Effects of TKI drug on Treg cells and other immune cell subsets

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
助教 北脇年雄

所属 役職 氏名： (英語) Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University
Assistant Professor Toshio Kitawaki

分担研究 (日本語) がん組織浸潤 Treg 細胞の免疫学的解析と Treg 特異的マーカーの検証
開発課題名： (英語) Immunological analyses of tumor-infiltrating Treg cells

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学大学院医学研究科 標的治療腫瘍学講座
特定講師 祝迫恵子

所属 役職 氏名： (英語) Target Therapy Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University
Senior Lecturer Keiko Iwaisako

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究開発では、免疫自己寛容の維持に不可欠である制御性 T 細胞（Regulatory T cell、以下 Treg と略）を標的とし、がん組織での免疫抑制を解除することで、有効ながん免疫応答を惹起・強化する新しいがん免疫療法の開発を目的とし、以下の 2 項目について、研究開発を進めた。

(i) 腫瘍浸潤 Treg に特異的に発現する細胞表面分子の同定と特異的単クローン抗体の作製

がん局所浸潤 Treg の効果的な特異的マーカーを探索するために、マウス Treg の解析で見いだした候補分子を、ヒトのがん局所浸潤 Treg、T 細胞および PBMC で比較解析した。ヒトとマウスの腫瘍で共通して、がん局所浸潤 Treg に特異的な高発現が認められた表面分子を同定し、この分子の特異的マーカーとしての有効性について検証し、細胞傷害性単クローン抗体の作製を開始した。同時に、Treg 浸潤度の高いがん種の探索および担がんマウスモデルでの候補マーカー有効性の検証を進めている。

(ii) がん組織浸潤 Treg のシグナル分子を標的とした新規がん免疫療法の開発

本項目では、Treg 細胞内シグナル分子を特異的に阻害する小分子を探索し、Treg にアポトーシスを誘導することで、Treg の特異的除去による新規がん免疫療法の開発を目標とした。TKI 製剤による活性型 Treg 減少のメカニズムについて、健康人 PBMC より調整した各 Treg サブセット、CD4⁺ Tconv, CD8⁺ Tconv の TKI 製剤濃度依存性増殖動態や細胞死を分子レベルで解析した。同時に、eTreg 減少による抗腫瘍免疫応答増強効果を、がん抗原特異的 CD8⁺ CTL の誘導とサイトカイン産生により評価した。また、CML 患者 PBMC サンプルを収集し、その一部を用いて、Dasatinib 投与による eTreg の減少効果、および CMR 導入などの治療効果との相関について解析を進めた。さらに、TKI 製剤による Treg 減少感受性について、Exome 解析や SNP 解析などのゲノムワイド解析を行い、感受性にかかわる分子を探索中である。

The aim of this project is to develop a novel cancer immunotherapy by targeting regulatory T (Treg) cells, an indispensable T-cell lineage for the maintenance of immunological self-tolerance. A removal or depletion of Treg cells specifically in tumors releases immune-suppression by tumor-infiltrating Treg cells thereby effectively augments or induces anti-tumor immune responses. For this aim, we have focused our efforts on the following projects.

(i) Development of monoclonal antibodies specific for tumor-infiltrating Treg cells

To determine cell-surface markers specific for tumor infiltrating Treg cells, especially on effector Treg cell subset, we have assessed in human samples the expression patterns of candidate molecules identified from murine tumor models. These comparative analyses on T and Treg cells from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as well as tumor-infiltrating Treg cells identified surface molecules that

are specifically expressed at high levels in tumor-infiltrating Treg cells of human and mice. We are currently developing monoclonal antibodies against these molecules and assessing their efficacy as specific targets for depleting tumor-infiltrating Treg cells.

(ii) Development of a novel cancer immunotherapy targeting signaling molecules in tumor-infiltrating Treg cells

In this project, we attempt to develop a novel cancer immunotherapy by identifying a small molecule which can specifically inhibit signaling molecules in Treg cells and induce apoptosis. To elucidate the mechanism for effector Treg reduction by several kinase inhibitors, we have analyzed dose dependency of proliferation kinetics and apoptosis of each Treg subsets as well as CD4⁺ and CD8⁺ conventional T cells isolated from PBMCs of healthy volunteers. We have also assessed augmentations of anti-tumor immune responses as well as induction of tumor antigen-specific CD8⁺ CTL and their cytokine productions upon effector Treg reduction. Furthermore, we have determined sensitivity differences in effector Treg reduction upon kinase inhibitor treatments among PBMCs of healthy donors and cancer patients. We attempt to elucidate a potential factor responsible for the sensitivity difference by genome-wide SNP and Exome analyses.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 17 件）

1. Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandebon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18:173-183, 2017.
2. Carrascosa CL, Klein M, Kitagawa Y, Lückel C, Marini F, König A, Guralnik A, Raifer H, Hagner S, Raedler D, Böck A, Kang C, Lohoff M, Garn H, Schaub B, Berberich-Siebelt F, Sakaguchi S, Bopp T, Huber M. Reciprocal regulation of the *I19* locus by counteracting activities of transcription factors IRF1 and IRF4. *Nat. Commun.* In press.
3. Glatman Zaretsky A, Konradt C, Dépis F, Wing JB, Goenka R, Atria DG, Silver JS, Cho S, Wolf AI, Quinn WJ, Engiles JB, Brown DC, Beiting D, Erikson J, Allman D, Cancro MP, Sakaguchi S, Lu LF, Benoist CO, Hunter CA. T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep.* 18:1906-1916, 2017.
4. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 27:109-118, 2017.
5. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y, Sakaguchi S. Two FOXP3⁺CD4⁺ T-cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Med.* 22: 679-684, 2016.
6. Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, Takiguchi S, Nishikawa H, Sato E, Sakaguchi S, Mori M, Doki Y, Wada H. ICOS⁺ Foxp3⁺ TILs in gastric cancer are

- prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 140: 686-695, 2017.
7. Okubo K, Wada H, Tanaka A, Eguchi H, Hamaguchi M, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Nagano H, Sakaguchi N, Nishikawa H, Doki Y, Mori M, Sakaguchi S. Identification of Novel and Noninvasive Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation by Protein Microarray. *Transplant Direct*. 2016 Nov 18;2(12):e118.
 8. Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Fukunaga A, Yamaguchi T, Emoto T, Yodoi K, Matsumoto T, Nakajima K, Kita T, Takeda M, Mizoguchi T, Hayashi T, Sasaki Y, Hatakeyama M, Taguchi K, Washio K, Sakaguchi S, Malissen B, Nishigori C, Hirata KI. UVB Exposure Prevents Atherosclerosis by Regulating Immunoinflammatory Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 37:66-74, 2017.
 9. Morita T, Shima Y, Wing JB, Sakaguchi S, Ogata A, Kumanogoh A. The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Sep 13;11(9):e0162306. doi: 10.1371/journal.pone.0162306.
 10. Miyara M, Chader D, Burlion A, Goldstein J, Sterlin D, Norol F, Trebeden-Nègre H, Claër L, Sakaguchi S, Marodon G, Amoura Z, Gorochov G. Combination of IL-2, rapamycin, DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors for the expansion of human regulatory T cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 28. doi: 10.18632/oncotarget.10914. [Epub ahead of print]
 11. Haseda F, Imagawa A, Nishikawa H, Mitsui S, Tsutsumi C, Fujisawa R, Sano H, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Sakaguchi S, Hanafusa T. Antibody to CMRF35-like molecule 2, CD300e: a novel biomarker detected in patients with fulminant type 1 diabetes. *PLOS ONE*. e0160576, 2016.
 12. Sood S, Brownlie RJ, Garcia C, Cowan G, Salmond RJ, Sakaguchi S, Zamoyska R. Loss of the Protein Tyrosine Phosphatase PTPN22 Reduces Mannan-Induced Autoimmune Arthritis in SKG Mice. *J Immunol*. 197:429-40, 2016.
 13. Ureshino H, Shindo T, Nishikawa H, Watanabe N, Watanabe E, Satoh N, Kitaura K, Kitamura H, Doi K, Nagase K, Kimura H, Samukawa M, Kusunoki S, Miyahara M, Shin-I T, Suzuki R, Sakaguchi S, Kimura S. Effector regulatory T cells reflect the equilibrium between antitumor immunity and autoimmunity in adult T cell leukemia. *Cancer Immunol Res*. 4:644-649, 2016.
 14. Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol*. 68:2646-2661, 2016.
 15. Vandenbon A, Dinh VH, Mikami N, Kitagawa Y, Teraguchi S, Ohkura N, Sakaguchi S. Immuno-Navigator: a co-expression database for cell type-specific network inference in the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(17):E2393-402, 2016.
 16. Klocke K, Sakaguchi S, Holmdahl R, Wing K. Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(17):E2383-92, 2016.
 17. Nafady-Hego H, Li Y, Ohe H, Elgendy H, Zhao X, Sakaguchi S, Bishop GA, Koshiba T. Utility of CD127 combined with FOXP3 for identification of operational tolerance after liver transplantation. *Transp Immunol*. 36:1-8, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 廣田圭司、伊藤能永、近藤玄、田中淳、坂口教子、坂口志文 : SKG マウスの関節炎に関わる ILCs サブセット Kyoto T Cell Conference (2016.5.20-21.京都), 口頭
2. 田中淳、西川博嘉、野口晋佐、高橋直人、坂口教子、坂口志文 : Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule. Kyoto T Cell Conference (2016.5.20-21.京都), 口頭
3. Atsushi Tanaka, Shimon Sakaguchi : Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
4. Keiji Hirota, Shimon Sakaguchi : Inflammatory circuit of Th17 cells, fibroblast-like synoviocytes, and ILCs in the development of autoimmune arthritis. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
5. Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Yujiro Kidani, Shimon Sakaguchi : Epigenetic control of regulatory T cell identity and its assortment with autoimmune diseases in human. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
6. James Badger Wing, Hannah Hume, Michela Locci, Yohko Kitagawa, Christopher Tay, Kyoko Matsuda, Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki, Shane Crotty, Cevayir Coban, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : A distinct subset of CD25 negative T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
7. Motono Osaki, Shimon Sakaguchi Soluble form of CTLA-4 produced by regulatory T cells facilitates M2 macrophage differentiation in auto-inflammatory condition. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
8. Yujiro Kidani, Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : Specific transcriptional regulation of tumor infiltrating regulatory T cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
9. Murat Tekguc, James Badger Wing, Motono Osaki, Shimon Sakaguchi : Role of CTLA-4 in controlling expression of costimulatory molecules by antigen-presenting cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), ポスター
10. Daniel Y. Hu, Stephen R. Daley, Christopher C. Goodnow, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : Regulatory T cell precursors develop from negative selected CCR7⁺ Helios⁺ medullary thymocytes. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Controlling Immune Responses. Transplantation Science Symposium(TSS) Asian Regional Meeting : Keynote Lecture (2016. 4. 8-9. Tokyo), 口頭
2. 坂口志文 : 免疫制御とがん治療 第116回日本外科学会定期学術集会 (2016.4.14-16. 大阪), 口頭

3. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Controlling Immune Responses. II Seville Molecular Medicine Workshop: Cell Therapy, Molecular Mechanisms and Clinical Translation (2016. 5. 9-10. Seville Spain), 口頭
4. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. The Distinguished Ludwig Lecturer Series in Cancer Research (2016. 5. 12. Lausanne, Switzerland), 口頭
5. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 37 回日本炎症・再生医学会 (2016.6.16-17. 京都), 口頭
6. 坂口志文: 制御性 T 細胞と癌免疫 第 10 回横断的腫瘍フォーラム (2016.6.28. 大阪), 口頭
7. 坂口志文: 免疫制御とがん治療 第 4 回がんと代謝研究会 (2016.7.7-8. 鹿児島), 口頭
8. 坂口志文: 制御性 T 細胞の発生と機能 第 18 回免疫サマースクール 2016 (2016. 7. 11-7.14 北海道), 口頭
9. 坂口志文: Control of Immune Responses by Regulatory T cells. Bone Biology Forum (2016.8.19-20. 幕張), 口頭
10. Shimon Sakaguchi: Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
11. Shimon Sakaguchi: Targeting regulatory T cells for controlling immune responses. 16th International Congress of Immunology (2016. 8. 21-26. Melbourne, Australia), 口頭
12. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 31 回日本乾癬学会 (2016.9.2-3. 宇都宮), 口頭
13. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. From the Laboratory to the Clinic: Getting closer to a Cure? (2016. 9. 7-9. Oxford, England), 口頭
14. Shimon Sakaguchi: Targeting regulatory T cells for cancer immunotherapy. The 2016 International Cancer Immunotherapy Conference: Translating Science into Survival (2016. 9. 25-28. New York, U.S.A.), 口頭
15. Shimon Sakaguchi: Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development. 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology (2016. 9. 27-30. Hamburg, Germany), 口頭
16. Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Cold Spring Harbor Asia (2016. 10. 3-6. 淡路島), 口頭
17. 坂口志文: 制御性 T 細胞を標的とした癌免疫療法 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016.10.6-8. 横浜), 口頭
18. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 53 回日本小児アレルギー学会 (2016.10.8-9. 前橋), 口頭
19. Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (2016. 10. 11-13. 京都), 口頭
20. Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. The 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (2016. 10. 11-15. 京都), 口頭

21. 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 日本リウマチ学会第 3 回ベーシックリサーチカンファレンス (2016.10.14-15. 東京), 口頭
22. 坂口志文 : 制御性 T 細胞を標的とした癌免疫療法の可能性 第 16 回別府癌治療懇話会 (2016.10.17. 別府), 口頭
23. 坂口志文: 制御性 T 細胞とがん免疫療法 レギュラトリーサイエンス エキスパート研修会 がん治療の新たな選択肢 (2016.10.18. 東京), 口頭
24. Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. International Symposium on Advanced Immunology (2016. 11. 1-2. 大阪), 口頭
25. 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 (2016.11.5-6. 東京), 口頭
26. Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Frontiers in Cancer Science 2016 (2016. 11. 7-9. Singapore), 口頭
27. 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫疾患の制御に向けて 富山大学医学部創立 40 周年記念講演会 (2016.11.25. 富山), 口頭
28. 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 大阪大学産婦人科学講座セミナー(2016.11.28. 大阪), 口頭
29. 坂口志文 : Transcriptional and epigenetic basis of regulatory T cell development. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016. 11. 30-12.2. 横浜), 口頭
30. 坂口志文 : Tolerance and Immune Regulation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会(2016. 12. 5-7. 沖縄), 口頭
31. 坂口志文 : 免疫を制御する細胞とは? - 自己と非自己の免疫学 WPI 10 周年記念講演会 (2016.12.17. 東京), 口頭

(4) 特許出願

該当なし