

学位論文の要約  
(研究成果のまとめ)

氏名 名部 彰悟

学位論文名 グルタミン代謝抑制による CD8<sup>+</sup> T 細胞の抗腫瘍活性の増強

-----  
学位論文の要約

【背景】近年、キメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CART) など腫瘍特異的 T 細胞を用いた養子免疫療法の研究が進み、徐々に臨床応用されつつある。しかしながら、体外で活性化培養された T 細胞はしばしば「疲弊」と呼ばれる機能不全に陥り、治療効果を十分発揮できない状況にある。そこで我々は、T 細胞の疲弊が細胞内の過剰なエネルギー代謝と関連していることから、CD8<sup>+</sup> T 細胞のグルタミン代謝を抑制して培養して解析したところ、高い抗腫瘍効果が得られることを見出した。さらに我々は、このグルタミン代謝抑制による CD8<sup>+</sup> T 細胞の抗腫瘍活性の増強メカニズムについて解析した。

【方法】グルタミン代謝を抑制した CD8<sup>+</sup> T 細胞の抗腫瘍活性の解析を、担癌マウスモデルを用いて行った。疑似腫瘍抗原として卵白アルブミン (OVA) を発現する胸腺腫瘍細胞 E. G7 を接種した担癌マウスを使用し、活性化培養した OVA 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞をマウスに移入することで抗腫瘍活性の測定を行った。その際、CD8<sup>+</sup> T 細胞のグルタミン代謝を抑制する手段として、活性化培養する際の培地中のグルタミン濃度を減量する方法、および細胞内のグルタミン代謝を阻害する薬剤を培地に添加する方法を用いた。さらに、グルタミン代謝を抑制した CD8<sup>+</sup> T 細胞が抗腫瘍活性を発揮する機序を解析するため、通常条件およびグルタミン代謝抑制条件で活性化培養した CD8<sup>+</sup> T 細胞を同数ずつ混合して担癌マウスに移入し、後日腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) を回収してそれぞれの細胞数、および抑制性受容体 PD-1 等の発現から細胞疲弊の解析を行った。グルタミン代謝抑制が CD8<sup>+</sup> T 細胞のエフェクター機能に与える影響を調べるために、*in vitro* での腫瘍細胞傷害アッセイを行った。また CD8<sup>+</sup> T 細胞のメモリー機能を解析するために、OVA 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞を移入して腫瘍が完全に消失したマウスに、OVA を発現するリステリアを感染させ、recall response を解析した。通常培養および低グルタミン培養した CD8<sup>+</sup> T 細胞のエネルギー代謝状態を明らかにするため、フラックスアナライザーを用いて解析し、さらにエネルギー代謝酵素の遺伝子発現についても定量 PCR を用いて解析した。また、グルタミン代謝産物である  $\alpha$  ケトグルタル酸処理した場合の抗腫瘍活性への影響についても解析した。

【結果と考察】低グルタミン培養や、機序の異なる複数のグルタミン代謝阻害剤(AOA:aminooxy- $\gamma$ -acetic acid hemihydrochloride, L-DON:6-diazo-5-oxo-L-norleucine, EGCG:epigallocatechin gallate)により細胞内グルタミン代謝を抑制した CD8<sup>+</sup> T 細胞では、通常培養に比べて腫瘍縮小効果、マウス生存率の双方で成績の改善が見られた。また、グルタミン代謝抑制により、活性化培養した CD8<sup>+</sup> T 細胞における PD-1 の発現低下が観察された。通常培養およびグルタミン代謝抑制培養された CD8<sup>+</sup> T 細胞を混合して担癌マウスに移入する解析では、コンジェニックマーカーで識別された移入 T 細胞はグルタミン代謝抑制培養されたものの方が通常培養 T 細胞と比較して腫瘍内での細胞数が多く、また PD-1 の発現も低下しており、腫瘍内で生存し疲弊も抑制されていた。腫瘍細胞傷害アッセイでは、通常条件とグルタミン代謝抑制条件で CD8<sup>+</sup> T 細胞の傷害活性に差はみられず、グルタミン代謝阻害による抗腫瘍活性の増強は T 細胞の疲弊の抑制と生存率の向上によるものと推測された。Recall response の解析では、グルタミン代謝阻害された CD8<sup>+</sup> T 細胞の移入マウスの解析では、リステリア感染後の移入 T 細胞の増加が著明であり、グルタミン代謝阻害によって CD8<sup>+</sup> T 細胞におけるメモリー機能の向上を示す結果であった。フラックスアナライザーの解析から、低グルタミン培養により解糖能およびミトコンドリア呼吸能が上昇することが明らかとなった。この結果と相関して、解糖系およびミトコンドリア呼吸系に関連するエネルギー代謝酵素の遺伝子発現の増加が認められた。また、 $\alpha$ ケトグルタル酸処理により、CD8<sup>+</sup> T 細胞の抗腫瘍活性低下が認められたことから、グルタミン代謝産物の蓄積が、T 細胞疲弊の原因であると推測された。これらの結果をまとめると、グルタミン代謝抑制された活性化 CD8<sup>+</sup> T 細胞では疲弊が起こりにくく、抗腫瘍活性が増強することが示唆された。本研究より、T 細胞疲弊のメカニズムにおいて、細胞内グルタミン代謝が重要な役割を担っていることが示され、CD8<sup>+</sup> T 細胞内グルタミン代謝を制御することで、養子免疫療法の治療成績が改善できると期待される。

#### 【承認された倫理審査機関】

本研究は、愛媛大学医学部医学系研究科の遺伝子組み換え実験安全委員会、動物実験委員会により承認されている。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Nabe S, Yamada T, Suzuki J, Toriyama K, Yasuoka T, Kuwahara M, Shiraishi A, Takenaka K, Yasukawa M, Yamashita M: Reinforce the antitumor activity of CD8<sup>+</sup> T cells via glutamine restriction. *Cancer Science* 2018 Dec;109(12):3737-3750.

DOI: 10.1111/cas.13827. Epub 2018 Nov 2.

参考論文 : Yamada T, Nabe S, Toriyama K, Suzuki J, Inoue K, Imai Y, Shiraishi A, Takenaka K, Yasukawa M, Yamashita M: Histone H3K27 Demethylase Negatively Controls the Memory Formation of Antigen-Stimulated CD8<sup>+</sup> T Cells. *Journal of Immunology*. 2019 Feb 15;202(4):1088-1098. DOI: 10.4049/jimmunol.1801083. Epub 2019 Jan 9.

Suzuki J, Yamada T, Inoue K, Nabe S, Kuwahara M, Takemori N, Takemori A, Matsuda S, Kanoh M, Imai Y, Yasukawa M, Yamashita M: The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T-cell dysfunction by targeting mTORC1-dependent metabolic activation. *Nature Communication*. 2018 Aug 17;9(1):3296.

DOI: 10.1038/s41467-018-05854-6.

Yamada T, Nabe S, Toriyama K, Suzuki J, Inoue K, Imai Y, Shiraishi A, Takenaka K, Yasukawa M, Yamashita M: Histone H3K27 Demethylase Negatively Controls the Memory Formation of Antigen-Stimulated CD8<sup>+</sup> T Cells. *Journal of Immunology*. 2019 Feb 15;202(4):1088-1098. DOI: 10.4049/jimmunol.1801083. Epub 2019 Jan 9.

Yamada T, Kanoh M, Nabe S, Yasuoka T, Suzuki J, Matsumoto A, Kuwahara M, Maruyama S, Fujimoto T, Sakisuka R, Yasukawa M, Yamashita M. Menin Plays a Critical Role in the Regulation of the Antigen-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Response upon *Listeria* Infection. *J Immunol*. 2016 Nov 15;197(10):4079-4089. Epub 2016 Oct 19.