

## 免疫細胞障害による新たな細胞死から組織を守る癌治療法の確立

藤原英晃

岡山大学病院 血液腫瘍内科

## 【研究の背景】

免疫チェックポイント阻害療法 (ICI) はその抗腫瘍効果が期待される一方で、免疫の過剰反応が組織傷害を発生し、治療中止を余儀なくされる。一旦発症すると、高齢者は体力的負担が著しく回復困難となる。ICI 治療における組織障害の機序は不明でありフェロトーシスやパイロトーシスという新たな細胞死の観点から、従来のアポトーシスとは異なる組織傷害メカニズムを解明・介入することで免疫細胞による細胞傷害への抵抗性を向上させる安全かつ効果的ながん治療法を確立させることを目的とする。

申請者はこれまで、同種造血幹細胞移植の主な免疫性合併症である移植片対宿主病 (以下 GVHD) をテーマに、GVHD 発症に関わる T 細胞などの免疫担当細胞と、障害をうける組織のそれぞれの観点から研究を行ってきた<sup>1-10)</sup>。生体の恒常性維持を担う腸内細菌叢が乱れること (以下 dysbiosis) が、GVHD の発症に関連し、dysbiosis により減少する腸内細菌由来代謝物の短鎖脂肪酸が、腸管上皮細胞の恒常性を維持し GVHD の発症・重篤化を防止する事を同定した<sup>9,10)</sup>。さらに、腸管上皮細胞内の分子複合体インフラマソームが腸管上皮細胞の恒常性を維持する事を報告した<sup>6)</sup>。

しかしながら、dysbiosis が GVHD 発症させる根本的な機序は依然不明であり、これまでの見解である1) dysbiosis により腸上皮細胞の栄養源である短鎖脂肪酸が低下する、2) dysbiosis は正常偏性嫌気性菌から通性嫌気性菌への腸内細菌叢の変化を特徴とする、3) 腸上皮細胞のアポトーシスが GVHD を調節する、ことに着目し、GVHD の発症に腸上皮細胞の酸素・エネルギー代謝が大きく関与していることを明らかにしている<sup>1)</sup>。腸管上皮細胞の代謝・エネルギー解析から、GVHD では、腸上皮細胞のミトコンドリアによる酸素消費量の低下のため腸管内及び細胞内酸素濃度が上昇していること、metabolome 解析により Succinate が特異的に蓄積していることが判明し、ミトコンドリア機能不全、特に細胞内エネルギー代謝チェックポイントであるミトコンドリア複合体 II (以下 MCII) 障害による腸上皮細胞代謝機能不全を伴う組織脆弱性を発症していることを明らかにした<sup>1)</sup>。これら腸内細菌—代謝物—腸管上皮細胞エネルギー代謝のクロストークを明らかにし、「免疫細胞に対する組織寛容性」という概念を確立させている (図1)。

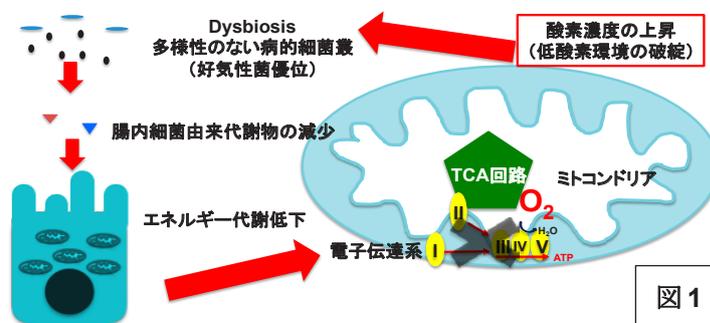


図 1

## 【目 的】

腸管上皮細胞は GVHD 標的臓器の中で、同種反応性 T 細胞により細胞死が発生し、致命的な組織傷害を生じる。先行研究では、GVHD によるミトコンドリア傷害が代謝異常・エネルギー不足による腸上皮細胞のアポトーシス・ネクローシスを引き起こす<sup>1)</sup>。しかしながら、傷害されたミトコンドリアには金属と思われる沈着物による構造変化を認め、通常の細胞死とは異なる状態が疑われた(図 2)。免疫細胞によって障害を受けた“標的細胞側 (腸管上皮細胞)”は、従来、最終的にアポトーシスとネクローシスという 2 つの細胞死形態を呈すると考えられてきた。しかし、近年、これらと異なる特徴を有する新規細胞死 (フェロトーシス、パイロトーシス、ネクロトーシス等) の概念が提唱されている。この「新規細胞死」は、悪性腫瘍の領域では新規治療法の開発や病態解明に寄与しているが (Tang R, J Hematol Oncol. 2020)、免疫関連有害事象において新規細胞死がどのように関与しているかは、ほとんど明らかとなっていない。本研究ではこれら新規細胞死と免疫細胞性組織障害の関連を明らかにし、免疫性細胞障害における各種細胞死の病態生理を明らかにし治療標的として検討する。

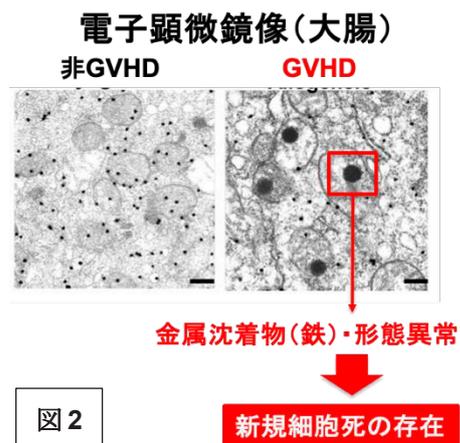


図 2

## 【方 法】

本研究では活躍する免疫細胞が異なる急性期及び慢性期 GVHD マウスモデルを用いて各種臓器におけるフェロトーシス、パイロトーシス、ネクロトーシスの関与を免疫染色、単一細胞レベルマルチオミクス解析を行い組織障害との関連性を明らかにし、治療介入により癌治療法の有効性改善を検討する。

## 【結 果】

①ICI における新規細胞死(マルチトーシス)の検討: 基礎データとして ICI 副作用モデルマウスにおけるフェロトーシス、パイロトーシス、ネクロトーシスの影響を検討した。免疫染色を用いた検討では、急性期ではフェロトーシスが、慢性期ではパイロトーシスとネクロトーシスのマーカーが大きく変動していることが判明した(図 3)。骨髄移植モデルで得られたデータを元に現在、免疫性細胞障害における各種細胞死の存在を検討している。

②GVHD と ICI 障害組織における空間マルチオミクス解析: GVHD と ICI 副作用モデルにおける新規細胞死を単一細胞レベルで検討し、共通点及び相違点を見出すために、まず単一細胞マルチオミクス解析を行った。GVHD の有無・急性期・慢性期別に置いて、GVHD の有無により大きく遺伝子発現が異なることが明らかとなった (unpublished data)。また急性期と慢性期では種々の細胞死に関連する遺伝子発現変化が異なっており①で認められた免疫染色の結果と一致するものであった。このデータから得られた標的遺伝子を中心に、各マウスモデルから得られた病理切片を用いて GeoMX<sup>®</sup>解析を行い空間的な関連性を同定する。この過程により、①で確認された遺伝子発現を有する細胞の位置情報と空間情報を確認し、GVHD で新規細胞死が起きている領域や構造、周辺の免疫細胞を同定する。これにより、GeoMx で確認した新規細胞死が起きている上皮細胞やその周囲の免疫細胞の蛋白の発現の有無や染色性の強弱を確認し、新規細胞死を中心とした免疫細胞性組織障害を明らかにしていく予定である。

③Chemical および Genetical モデルを用いた preclinical 解析: フェロトーシス、パイロトーシスおよびネクロトーシスを阻害・促進する薬剤を用いて GVHD マウスモデルにおける影響を検討した。フェロトーシス阻害により GVHD による細胞障害の改

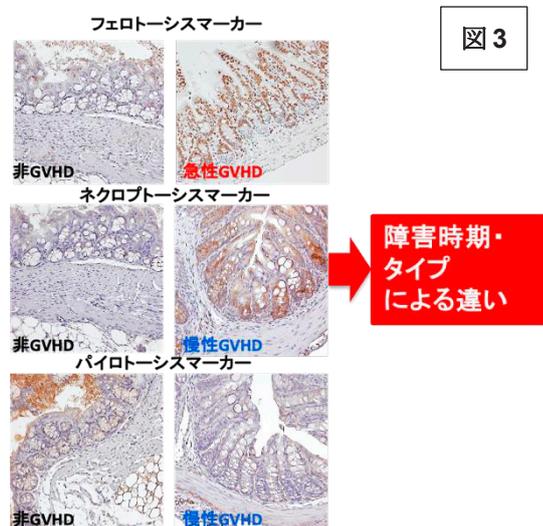


図 3

善・生存率の改善を確認した。一方で、フェロトーシス促進により GVHD の悪化・生存率の悪化を確認しフェロトーシスの重要性が認められた。また、パイロトーシス・ネクロトーシスでも同様の結果が得られ、新規細胞死への介入による組織障害の低減が確認できた。今後は ICI モデルでも同様の検討を今後行う。また、薬剤により off target 効果が否定できないため、今後は各新規細胞死欠損・過剰マウスを用いてこれらの関与を明らかにする。しかしながら、遺伝子改変マウスは胎性致死となりうるため注意が必要である。

**④ヒト GVHD および ICI 組織障害検体における空間マルチオミクス解析:** 上記①—③により GVHD 及び ICI 障害組織は新規細胞死が関連した病態であることがマウスモデルで確認している。今後はヒト病理標本検体を用いてヒト病態における再現性を確認する。ヒト病態において新たな細胞死の関与が確認された場合、将来的には臨床応用に向けて検討を行う。

## 【考 察】

従来報告されていたアポトーシスやネクロトーシスが免疫性細胞障害の結果として発生することは広く知られているが、新規細胞死の直接の発生様式・機序に関しては明らかにされていない。腫瘍細胞においては、活性化 T 細胞によるインターフェロニン $\gamma$  がフェロトーシスを増進させ抗腫瘍効果を向上させること、ICI 療法ではパイロトーシス誘導薬剤の併用により抗腫瘍効果の増強が得られること、キメラ抗原受容体導入 T (CAR-T) 細胞療法ではパイロトーシスにより過剰な炎症反応を惹起するサイトカイン放出症候群などの副作用が報告されている。一方で、正常組織における影響は不明であり、現時点では免疫反応による自己正常細胞における細胞死では、アポトーシスやネクロトーシスと比較してフェロトーシスやパイロトーシスに関しては国内外においてもほとんど明らかにされていないのが現状である。

本研究により新規細胞死が GVHD による免疫細胞性組織障害へ関与していることが示唆された。今後は新規細胞死が発生する病態生理を明らかにし、免疫反応性 (=抗腫瘍効果) を維持しながらも組織障害を低減させる治療標的 (直接的・間接的) を同定し治療応用を検討すること、新規細胞死を早期に検出可能とするバイオマーカーの開発を試みる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

上記一連の解析から、GVHD や ICI による免疫性細胞障害において、標的細胞の新規細胞死が「組織脆弱性」を引き起こすこと、新規細胞死を阻害することで細胞・組織が免疫性細胞障害抵抗性を獲得し、従来の免疫療法の安全性有効性を向上させる治療となりうる。さらには、今後の治療応用が期待される固形腫瘍に対するキメラ抗原受容体 T 細胞療法においても副作用の低減及び治療効果の向上にもつながり、複数の分野に応用できると考える。上記の観点から、全患者に適応可能であり安全かつ効果的ながん治療・移植療法に対する社会的ニーズに答えるものである。

## 【参考・引用文献】

- 1 **Fujiwara Hideaki**, Seike Keisuke, Brooks Dame, Mathew Anna, Pal Anupama, Lee Ho-Joon, Peltier Daniel, Kim Stephanie, Liu Chen, Oravec-Wilson Katherine, Li Lu, Sun Yaping, Byun Jaeman, Maeda Yoshinobu, Wicha Max, Saunders Thomas, Rehmulla Alnawaz, Lyssiotis Costas, Pennathur Subramaniam, Reddy Pavan. Mitochondrial Complex II In Intestinal Epithelial Cells Regulates T-cell Mediated Immunopathology. *Nature Immunol.* 2021;22:1440-1451.
- 2 **Fujiwara Hideaki**. Crosstalk between intestinal microbiota derived metabolites and tissues in Allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Front in Immunol.* 2021;12:703298.
- 3 Peltier Daniel, Radosevich Molly, Ravikumar Visweswaran, Pitchiaya Sethuramasundaram, Decoville Thomas, Wood Sherri, Hou Gougong, Zajac Cynthia, Oravec-Wilson Katherine, Sokol David, Henig Israel, Wu Julia, Kim Stephanie, Taylor Austin, **Fujiwara Hideaki**, Sun Yaping, Rao Arvind, Chinnaiyan Arul, Goldstein Daniel, Reddy Pavan. RNA-seq of human T cells after hematopoietic stem cell transplantation identifies *Linc00402* as a regulator of T cell alloimmunity. *Sci Transl Med.* 2021;13:eaa0316.

- 4 Kim Stephanie, Khoriaty Rami, Li Lu, McClune Madison, Kalfa Theodosia, Wu Julia, Peltier Daniel, **Fujiwara Hideaki**, Sun Yaping, Oravec-Wilson Katherine, King Richard, Ginsburg David, Reddy Pavan. ER-to-Golgi transport and SEC23-dependent COPII vesicles regulate T cell alloimmunity. *J Clin Invest.* 2021;131:e136574.
- 5 Oravec-Wilson Katherine, Rossi Corinne, Zajac Cynthia, Sun Yaping, Li Lu, Decoville Thomas, **Fujiwara Hideaki**, Kim Stephanie, Peltier Daniel, Reddy Pavan. ATG5-dependent autophagy uncouples T cell proliferative and effector functions and separates graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia. *Cancer Res.* 2021;81:1063-1075.
- 6 Toubai Tomomi, **Fujiwara Hideaki (TT and HF are equal 1st authors)**, Rossi Corinne, Riwes Mary, Tamaki Hiroya, Zajac Cynthia, Liu Chen, Mathew Anna, Byun Jaeman, Oravec-Wilson Katherine, Matsuda Isao, Sun Yaping, Peltier Daniel, Wu Julia, Chen Jiachen, Seregin Sergey, Henig Israel, Kim Stephanie, Brabbs Stuart, Pennathur Subramaniam, Chen Grace, Reddy Pavan. Host NLRP6 exacerbates graft-versus-host disease independent of gut microbial composition. *Nat Microbiol.* 2019;4:800-812.
- 7 Sun Yaping, Oravec-Wilson Katherine, Bridges Sydney, McEachin Richard, Wu Julia, Kim Stephanie, Taylor Austin, Zajac Cynthia, **Fujiwara Hideaki**, Peltier Daniel, Saunders Thomas, Reddy Pavan. miR-142 controls metabolic reprogramming that regulates dendritic cell activation. *J Clin Invest.* 2019;129:2029-2042.
- 8 Toubai Tomomi, Tamaki Hiroya, Peltier Daniel, Rossi Corinne, Oravec-Wilson Katherine, Liu Chen, Zajac Cynthia, Wu Julia, Sun Yaping, **Fujiwara Hideaki**, Henig Israel, Kim Stephanie, Lombard David, Reddy Pavan. Mitochondrial Deacetylase SIRT3 Plays an Important Role in Donor T Cell Responses after Experimental Allogeneic Hematopoietic Transplantation. *J Immunol.* 2018;201:3443-3455.
- 9 **Fujiwara Hideaki**, Docampo Melissa, Riwes Mary, Peltier Daniel, Toubai Tomomi, Henig Israel, Wu Julia, Kim Stephanie, Taylor Austin, Brabbs Stuart, Liu Chen, Zajac Cynthia, Oravec-Wilson Katherine, Sun Yaping, Núñez Gabriel, Levine John, van den Brink Marcel, Ferrara James, Reddy Pavan. Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun.* 2018;9:3674.
- 10 Mathewson Nathan, Jenq Robert, Mathew Anna, Koenigsnecht Mark, Hanash Alan, Toubai Tomomi, Oravec-Wilson Katherine, Wu Julia, Sun Yaping, Rossi Corinne, **Fujiwara Hideaki**, Byun Jaeman, Shono Yusuke, Lindemans Caroline, Calafiore Marco, Schmidt Thomas, Honda Kenya, Young Vincent, Pennathur Subramaniam, van den Brink Marcel, Reddy Pavan. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 2016;17:505-513.