

令和元年6月18日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19617

研究課題名(和文)慢性感染症の克服を目指した疲弊抵抗性CAR-T細胞の開発

研究課題名(英文)Development of exhaustion-resistant CAR-T cells for chronic infectious disease

研究代表者

布矢 純一(Nunoya, Jun-ichi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：40466842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、疲弊抵抗性CAR-T細胞の開発を試み、代表的な慢性感染症であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症をモデルとして、その有用性を検討した。異なる共刺激シグナルドメイン(CSSD)を有するHIV特異的CAR-T細胞の機能および性状解析から、CAR-T細胞の創出におけるCSSDとして現在広く利用されているCD28や4-1BBと比べ、HVEMを有するCAR-T細胞は機能的・性状的に優れていた。さらに、疲弊化したCAR-T細胞の割合が少なく、疲弊抵抗的な性状を示していることが分かった。これらの結果から、CAR-T細胞の創出において、HVEM由来CSSDが有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、進行期造血器腫瘍で高い奏効率を示しているCAR-T細胞療法を、HIV感染症を代表とする慢性感染症に応用するための基盤となる成果である。また、HVEM由来CSSDを用いることで疲弊抵抗的なCAR-T細胞を創出できる可能性が示唆された。これは、固形腫瘍で見られるCAR-T細胞の疲弊化による不応答性の改善に役立てられると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have tried to develop HIV-specific CAR-T cells which are relatively resistant to exhaustion, and tested its usefulness as a model system. To achieve this goal, we have generated and analyzed HIV-specific CAR-T cells harboring different co-stimulatory signal domain (CSSD). Comparing to the CAR-T cells with a CD28- or 4-1-BB-derived CSSD, which are currently used for CAR-T cell development, we found that the CAR-T cells with a herpes virus entry mediator (HVEM)-derived CSSD exhibited enhanced effector functions and efficient and balanced differentiation to both central and effector memory subsets, associated with an elevated energy metabolism and a reduced level of exhaustion. Thus, the HVEM-derived CSSD may be useful for developing effective CAR-T cells.

研究分野：免疫療法

キーワード：CAR-T細胞 疲弊 免疫チェックポイント 共刺激シグナル HVEM HIV

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌や慢性感染症では持続的な抗原刺激により、抗原(感染細胞)の排除に重要な細胞傷害性 T 細胞の機能異常(疲弊や老化)が見られる。B 細胞悪性腫瘍では、CD19 を標的としたキメラ抗原受容体(CAR)発現 T 細胞(CAR-T 細胞)による養子免疫治療が臨床試験において良い成績を得ている(引用文献)。一方で、多くの慢性感染症は抗菌・ウイルス薬による治療でも完治させることは難しく、薬剤耐性菌・ウイルスの出現という問題を常に抱えている。そのため、抗菌・ウイルス薬による治療とは異なる作用機序による新規治療法の開発が望まれる。癌と慢性感染症は免疫応答において多くの特徴を共有しており、CAR-T 細胞による養子免疫治療は慢性感染症に対する新規治療法として期待できる。しかし、*in vivo* で十分に機能できない CAR-T 細胞も存在し、その一因が CAR-T 細胞の早期疲弊であることが分かってきた(引用文献)。慢性感染症に対する有効な免疫治療法を開発するためには、免疫チェックポイント分子の発現を抑制し、養子免疫後の早期 T 細胞疲弊を回避できる次世代型 CAR-T 細胞の開発が重要である。本研究では、疲弊抵抗性 CAR-T 細胞を開発し、代表的な慢性感染症であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症をモデルとして、その有用性を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、疲弊抵抗性をもつ CAR-T 細胞を開発し、代表的な慢性感染症である HIV 感染症における有用性を検討するために、研究期間内に以下の 2 点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 共刺激シグナルの違いが CAR-T 細胞の疲弊に影響を与えるか。
- (2) 創出した HIV 特異的 CAR-T 細胞が、HIV の増殖を抑制できるか。

### 3. 研究の方法

#### (1) HIV 特異的 CAR-T 細胞の創出

293FT 細胞を用いて 3 種類の異なる共刺激シグナルドメイン(CSSD)(CD28、4-1BB、HVEM 由来)を有する HIV Env 特異的 CAR 発現レンチウイルスベクター(図 1)を調整した。セルソーティングで得たヒト CD8 陽性 T 細胞を抗 CD3/CD28 ビーズで刺激した後、上記ウイルスベクターを感染させて遺伝子導入を行った。すべてのウイルスベクターは GFP を共発現し、以降の実験には GFP のみを発現するウイルスベクターをコントロールとして用いた。

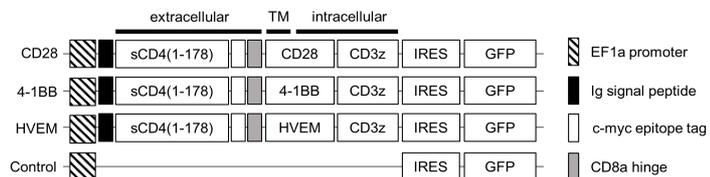


図 1. CAR 発現レンチウイルスベクターの構造

#### (2) CAR-T 細胞の機能解析

創出した CAR-T 細胞と HIV Env および GFP 共発現細胞(標的細胞)を共培養し、CAR-T 細胞を抗原で刺激した。抗原刺激に伴う、培養上清へのサイトカインの産生(TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$ )を ELISA で測定した。CAR-T 細胞による細胞傷害で培養上清に放出される乳酸脱水素酵素を定量することにより細胞傷害活性を解析した。

#### (3) CAR-T 細胞の性状解析

CAR-T 細胞のメモリー表現型(CD45RO および CCR7 の発現)、免疫チェックポイント分子(PD-1、LAG-3)の発現をフローサイトメトリーにより解析した。GFP の発現を指標にしたセルソーティングにより純化した CAR-T 細胞を用いて、細胞外フラックスアナライザー Xfp でエネルギー代謝の解析を行った。

#### (4) CAR-T 細胞による HIV 増殖抑制能の解析

HIV プロウイルスプラスミド(pNL4-3)を 293FT 細胞に導入し、組換え HIV(NL4-3 株)を得た。感染力価は、MAGI アッセイにより測定した。抗 CD3/CD28 ビーズで活性化させた CD4 T 細胞に組換え HIV を感染させた。感染 24 時間後に培養上清を除き、創出した HIV 特異的 CAR-T 細胞と 3 日間共培養を行った。抗 CD8 および抗 HIV p24 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、共培養後の感染細胞の割合を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は強力なエフェクター機能を示す。

CAR-T 細胞の創出には、CD28 あるいは 4-1BB 由来 CSSD が広く用いられてきた(引用文献)が、HVEM 由来 CSSD の有用性については検討されていなかった。そこで、それぞれの CSSD を有する CAR-T 細胞を創出し、その機能解析を行った。CAR の発現をフローサイトメトリーおよびウェスタンブロットで解析したところ、HVEM を有する CAR-T 細胞で発現量が一番高かった(図 2.A-C)。細胞傷害活性およびサイトカイン産生も同様の傾向を示し、HVEM を有する CAR-T 細胞が一番高いエフェクター活性を示した(図 2.D および E)。そこで、CAR 発現量とエフェクター活性の相関関係を調べたところ、正の相関が見られた(図 2.F)。以上の結果から、HVEM 由来 CSSD

を有する CAR-T 細胞は強力なエフェクター機能を示すことが分かった。

(2) HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞はセントラルおよびエフェクターメモリー亜集団にバランスよく分化する。

CAR-T 細胞におけるメモリー亜集団の構成は *in vivo* におけるエフェクター機能の発現や細胞の安定性に影響を与えていることが示唆されている(引用文献 および )。そこで、CD45RO および CCR7 の発現パターンを指標として、CAR-T 細胞におけるメモリー亜集団の構成を解析した(図 3.A)。コントロール T 細胞は、エフェクターメモリー T 細胞 ( $T_{EM}$ , CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) が優位であったが、CAR-T 細胞ではコントロール T 細胞と比べて多くの割合のセントラルメモリー T 細胞 ( $T_{CM}$ , CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) が存在していた。異なる CSSD を有する CAR-T 細胞を比較すると、CD28 や 4-1BB 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は、それぞれ  $T_{EM}$  および  $T_{CM}$  が優位に存在していた。興味深いことに、HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は、同程度の  $T_{CM}$  および  $T_{EM}$  が存在していた(図 3.B)。以上の結果から、HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞では  $T_{CM}$  および  $T_{EM}$  がバランスよく誘導されることが分かった。

(3) HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は T 細胞疲弊を回避する。

CAR-T 細胞の疲弊誘導における CSSD の役割を調べるため、異なる CSSD を有する CAR-T 細胞における免疫チェックポイント分子(PD-1 および LAG-3) の発現パターンを解析した(図 4.A および B)。CAR 導入後 9 日目および 16 日目における疲弊細胞の割合は、CD28 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞では比較的高かったが、4-1BB 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞では顕著に低かった。また、HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞では、CAR 導入後 9 日目で疲弊細胞が少し増加したが、16 日目における疲弊細胞の割合は最も低かった(図 4.C および D)。従って、HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は T 細胞疲弊を回避していると考えられた。

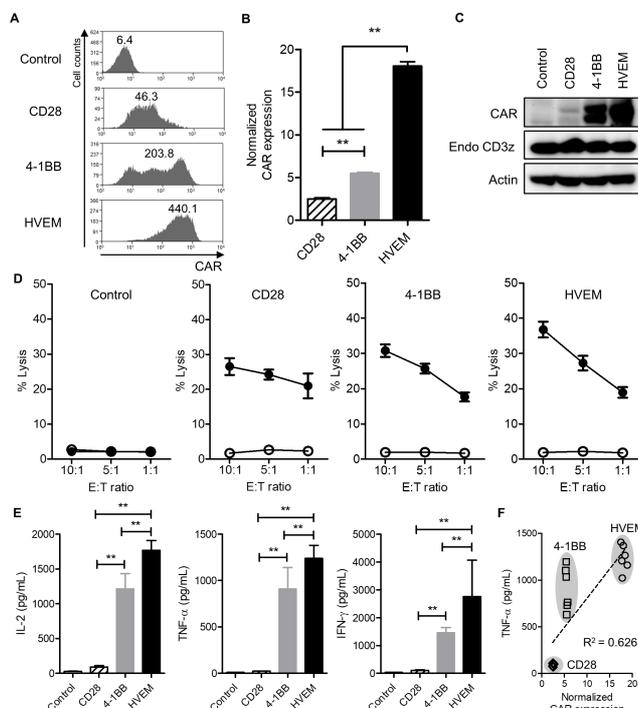


図 2. HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は強力なエフェクター機能を示す。

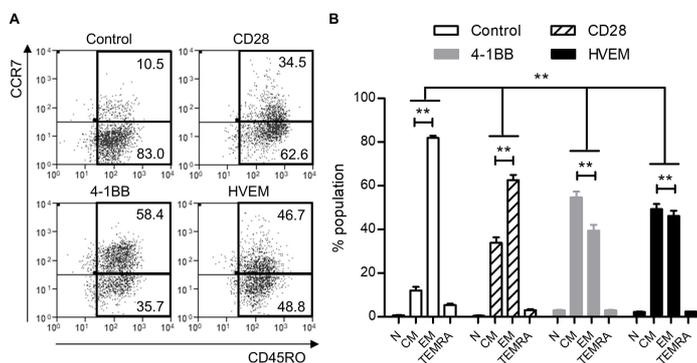


図 3. HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は  $T_{CM}$  および  $T_{EM}$  にバランスよく分化する。

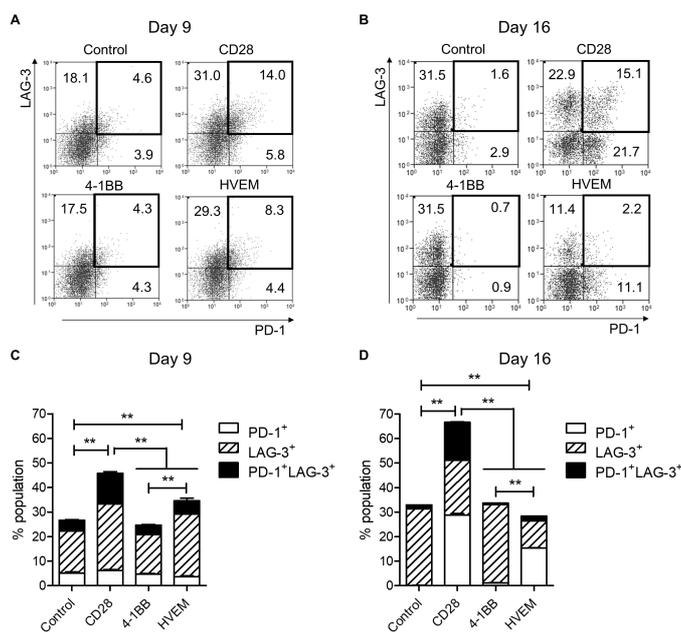


図 4. HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は T 細胞疲弊を回避する。

(4) HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は再プログラム化されたエネルギー代謝を有する。

最新の研究報告から、T 細胞疲労はエネルギー代謝の欠乏に伴って起こることが分かってきた(引用文献 および )。そこで、細胞外フラックスアナライザーを用いて、異なる CSSD を有する CAR-T 細胞のエネルギー代謝の解析を行った。細胞外フラックスアナライザーは、半閉鎖的な微小細胞培養環境における酸素消費速度(OCR)および細胞外酸化速度(ECAR)を計測することで、培養細胞のミトコンドリア呼吸および解糖系を解析できる。この装置を用いて、定常状態および電子伝達系を阻害した場合の OCR を測定することで、細胞におけるエネルギー産生にミトコンドリア呼吸がどの程度寄与しているかを解析した(図 5.A)。その結果、CD28 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞はミトコンドリア呼吸および ATP 産生能が低下しており、エネルギー状態の低い細胞であることが分かった。一方、4-1BB 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞はミトコンドリア呼吸の有意な亢進が見られた。HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞では、ミトコンドリア呼吸の亢進に加えて解糖系も亢進しており、エネルギー状態の高い細胞であることが分かった(図 5.B-E)。これらの結果から、HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は再プログラム化されたエネルギー代謝を有していると考えられた。

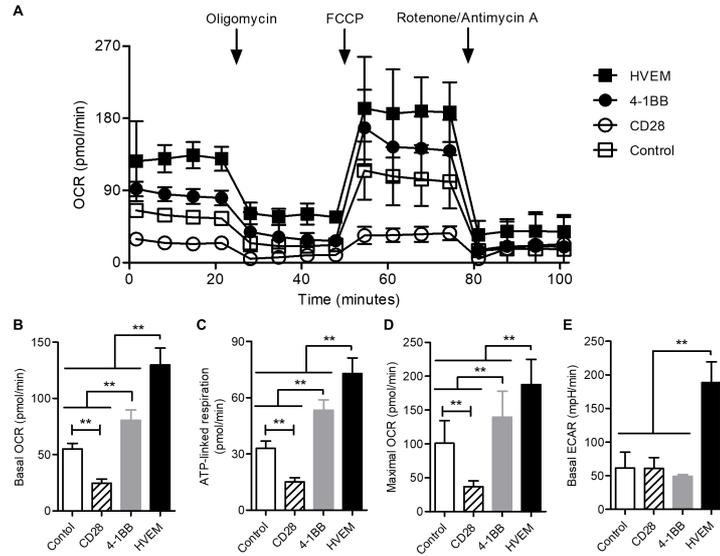


図 5. HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は再プログラム化されたエネルギー代謝を有する。

(5) HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は高い抗 HIV 活性を有する。

これまでの HIV 特異的 CAR-T 細胞の機能および性状解析から、HVEM 由来 CSSD を有する HIV 特異的 CAR-T 細胞が高い抗 HIV 活性を有すると予想された。そこで、HIV 感染 CD4 T 細胞と HIV 特異的 CAR-T 細胞の共培養系を確立し、HIV 特異的 CAR-T 細胞の抗 HIV 活性を検討した。確立した評価系では、HIV 特異的 CAR-T 細胞との共培養により有意な HIV 感染細胞の減少が見られ(図 6.A)、HIV 特異的 CAR-T 細胞が HIV 感染細胞に特異的な細胞傷害を引き起こすことにより、HIV の増殖を抑制していることが示唆された。また、創出した全ての HIV 特異的 CAR-T 細胞が HIV 増殖抑制能を示していたが、それらの中でも HVEM を有する CAR-T 細胞が最も高い HIV 増殖抑制能を示していることが分かった(図 5.B)。これらのことから、HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は高い抗 HIV 活性を有すると考えられた。

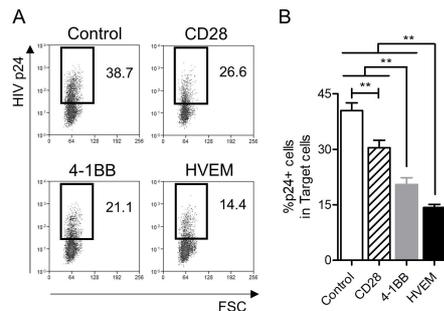


図 6. HVEM 由来 CSSD を有する CAR-T 細胞は高い抗 HIV 活性を有する

これらの研究成果により、これまであまり明確ではなかった CSSD と CAR-T 細胞の機能および性状の関係性の一端を解明することができた。また、HVEM 由来 CSSD の CAR-T 細胞創出における有用性を見出すことができた。今後、HVEM を利用することにより、優れた機能や性質を持った CAR-T 細胞を創出できるかもしれない。また、本研究で明らかとなった性状を標的とすることで、これまでと異なる方策で CAR-T 細胞を改善できるかもしれない。

#### < 引用文献 >

- Maude SL, Teachey DT, Porter DL, and Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2015, 125: 4017-4023
- Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, Kaplan RN, Patterson GH, Fry TJ, Orentas RJ and Mackall CL. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*, 2015, 21: 581-590
- Miller BC and Maus MV. CD19-Targeted CAR T Cells: A New Tool in the Fight against B Cell Malignancies. *Oncol Res Treat*, 2015, 38: 683-690
- Sommermeier D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, Riddell

SR, Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo, *Leukemia*, 2016, 30: 492-500.  
Busch DH, Fraessle SP, Sommermeyer D, Buchholz VR and Riddell SR, Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy, *Semin Immunol*, 2016, 28: 28-34.

Fiscaro P, Barili V, Montanini B, Acerbi G, Ferracin M, Guerrieri F, Salerno D, Boni C, Massari M, Cavallo MC, Grossi G, Giuberti T, Lampertico P, Missale G, Levrero M, Ottonello S, Ferrari C, Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B, *Nat Med*, 2017, 23: 327-336

Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, Stelekati E, McLane LM, Paley MA, Delgoffe GM, Wherry EJ, Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion, *Immunity*, 2016, 45: 358-73

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計1件)

Jun-ichi Nunoya, Michiaki Masuda, Chaobaihui Ye, Lishan Su, Chimeric Antigen Receptor T cell Bearing Herpes Virus Entry Mediator Co-stimulatory Signal Domain Exhibits High Functional Potency, *Molecular Therapy - Oncolytics*, 査読有, Vol. 14, 2019, pp.27-37  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.002>

### [学会発表](計2件)

Jun-ichi Nunoya, Lishan Su, Michiaki Masuda, Functional analysis and characterization of HIV-specific Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T cells, *The Japanese Society for Virology*, 2018

Jun-ichi Nunoya, Lishan Su, Michiaki Masuda, Generation and characterization of HIV-specific Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T cells, *The Japanese Society for Virology*, 2017

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。