

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09195

研究課題名(和文) プライマリーCD4T同時輸注によるCEAを標的としたCAR-T療法の増強と機序

研究課題名(英文) Augmentation and mechanism of CAR-T cell therapy by naive CD4+ T cell help

研究代表者

王立楠 (WANG, LINAN)

三重大学・医学系研究科・産学官連携講座助教

研究者番号：00589484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年 CD19を標的とした造血器腫瘍の治療において、顕著な治療効果が認められた上に、臨床応用が行われている。しかしながら、固形がんに対してCAR-T細胞療法は有効性と安全性は不明である。我々は重度免疫不全マウスを用いて、がん抗原特異的キメラ抗原受容体遺伝子を導入したT細胞を用いたがんに対するT細胞輸注療法によりヒトがん細胞株の治療効果が評価可能となる。本申請研究ではこのNOGマウスの系を用いて特にがん特異的T CD8+ CAR-T細胞と自己非特異性primaryCD4+T細胞の相互作用に注目して行い、有効で安全な遺伝子改変T細胞輸注療法の開発に貢献することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、CD3zに加えてCD28あるいはGITR由来のシグナル伝達ドメインを搭載したCEA特異的28z型CARとzG型CAR-Tを作製し、CEA陽性腫瘍担癌7日目にリンパ球減少性の前処置を施したマウスに輸注する治療モデル系において、未加工のCD4T(primary CD4T)の同時輸注にて、CD4Tは自己抗原ペプチドと結合したMHCClassIIにより増殖・活性化しIFN-gやIL-2などのサイトカインを産生することにより特異性を付与しなくとも輸注CD4Tの活性化とヘルパー機能が誘導された。抗腫瘍効果が顕著に増強されることを認められた。

研究成果の概要(英文)：Recent clinical trials of adoptive therapy with CAR-T cells targeting CD19 have shown an impressive efficacy in patients with hematologic malignancies and were for the use by the US FDA. However, wider application of this approach for the treatment of solid tumors has faced a number of challenges including poor expansion and persistence in vivo, insufficient trafficking to tumors, and impaired function due to immunosuppressive mechanisms operating in tumor microenvironment. CD4+ T cells have been shown to play a critical role in orchestrating antitumor immune responses directly and indirectly facilitating CTL activities. However, utilization of CD4+ cells in CAR-T cell therapy has rarely practiced and yet not fully appreciated. In the present study, we addressed whether co-transfer of CD4+ T cells might improve effectiveness of CAR-T cell therapy.

研究分野：遺伝子免疫細胞治療学

キーワード：CAR-T細胞療法 固形がん primaryCD4+T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

日本における癌患者の罹患率と死亡率は年々増加傾向にあり、有効な新規治療法として、人為的に腫瘍特異性を付与したT細胞をがん患者に移入する遺伝子改変T細胞輸注療法に期待が高まっている。最近、腫瘍細胞表面上に発現されるがん抗原（TAA）を認識するモノクローナル抗体を単鎖抗体化（scFv）し、T細胞受容体（TCR）と副刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加したキメラ抗原受容体（CAR）を導入したT細胞（CAR-T）を用いた細胞輸注療法は、造血器腫瘍に対する臨床試験において驚くべき治療効果を発揮した。このことから、CAR-T輸注療法の固形がんへの拡大適応が期待されている。CAR-TはTCR導入T細胞（TCR-T）とは異なり、主要組織適合性抗原（MHC）非依存的にがん抗原を認識・破壊でき、より広範囲の患者を対象にできる。また、固形がんに頻出するMHC欠落腫瘍細胞にも対応可能であること、CAR-Tは抗原提示細胞上の副刺激分子非依存的に活性化されるため、直接標的腫瘍によって強く活性化されるなどの長所を持つ。しかし、造血器腫瘍とは異なり固形がんにおいては、on-target/off-tumor toxicityによる重篤な副作用に加えて、低浸潤性と浸潤したとしてもがん微小環境における免疫機能抑制が大きな障害になる。そこで、Tandem CARあるいはSyn-Notch CARを用いたAND-gate法やiCARを用いたNOT-gate法による腫瘍特異性の増強、がん微小環境に高濃度に存在するケモカイン（CCL2）に対する受容体（CCR2）やHeparaseを導入することで浸潤能を高めたTrafficking CAR、がん微小環境における免疫抑制を打破するためにCARの活性化を維持増強するためのサイトカインを導入したり、PD-1の細胞内シグナル伝達ドメインをCD28シグナルドメインに置き換えChimeric inhibitory CARを導入する方法などが報告されている（Front Immunol 2018;9:1740, Cell Death Dis 2018;9:282, Front Immunol 2018;9:1104）。また、CD40Lを導入することで、おそらくはミエロイド系細胞の活性化を介してCAR-Tの活性化増強・維持が誘導されることも示されている（Mol Ther 2015;23:769）。全く異なったアプローチとして、近年RiddellらはCARを導入したCD4とCD8（CAR-CD4TとCAR-CD8T）を1：1で輸注することで、極めて高い抗腫瘍効果が得られることを報告している（Leukemia 2016;30:492, J Clin Invest 2016;126:2123）。

2. 研究の目的

造血器腫瘍に対して著効を発揮したキメラ抗原受容体導入T細胞（CAR-T）輸注療法の固形がんに対する適用拡大が期待されている。しかし、造血器腫瘍には存在しない固形がんに特徴的ながん微小環境では免疫抑制機構が発達しており、その様な環境下でも優れた抗腫瘍活性が維持できるCAR-T輸注法を樹立する必要がある。本研究では、がん微小環境における免疫抑制に大きく寄与する制御性T細胞とPD-L1に対して抵抗性を付与するGITR副刺激分子のシグナル伝達ドメインを搭載するzG型CAR-Tを用いた輸注療法において、未加工のCD4陽性T細胞（primary CD4T）の同時輸注によるCD4Tのヘルパー機能を利用した抗腫瘍機能増強効果とその機序について明らかにする。本研究課題の核心をなす学術的な「問い」として、従来報告されているものとは全く異なるprimary CD4T同時輸注によるCAR-T輸注療法の増強法を開発し、

それがどのようにしてCAR-Tの抗腫瘍機能を増強しているのかを問う。

3. 研究の方法

CAR-CD8Tの抗腫瘍機能増強に必要な未加工のprimary CD4Tのフェノタイプの同定（研究代表者・王）

C57BL/6（CD45.1）マウス脾臓からセルソーターを用いてCD8T細胞を精製し、定法に従ってCEA特異的zG型CARをレトロウイルスベクターを用いて導入、10から14日間拡大培養してCEA特異的zG型CAR-CD8Tを調整する。CD45.2CEA導入マウス腫瘍株（MC32a, 2×10^6 個）担癌したC57BL/6（CD45.2）マウスに担癌4と5日目にフルダラビン（Flu, 2.5 mg）、5日目にシクロフォスファミド（CY, 2.5 mg）を腹腔内投与し、リンパ球減少性の前処置を施す。担癌7日目にCEA特異的zG型CAR-CD8T（ 1×10^6 個）を輸注する。同数の精製した新鮮で未加工の全CD4T、ナイーブ（CD44^{low}CD62L^{high}）CD4Tとメモリー（CD44^{high}CD62L^{low}）CD4Tを同時に輸注、腫瘍径を経時的に測定する。

CD4Tに由来する増強作用を発揮する責任分子の同定（研究代表者・王、研究分担者・加藤）

-1 ①で明らかにしたフェノタイプを持つCD4Tを同時輸注した担癌マウスから経時的に血清と、CD45.1とCD4を指標に末梢血と腫瘍に浸潤した同時輸注CD4Tを回収する。

cytokinebeads array法やsingle cell transcriptome法を用いてCAR-CD8Tの機能・生存性昂進に寄与するサイトカインや細胞表面分子を、非同時輸注の血清や新鮮CD4Tとの比較により絞り込む。

-2 絞り込んだサイトカイン・細胞表面分子に対する抗体、さらにそれらをCRISPR-Cas9を用いてノックアウトしたCD4Tを同時輸注し、責任分子を同定する。

輸注CAR-CD8Tの質的（浸潤能、機能昂進、代謝リプログラミング）・量的（生存性、メモリー形質の獲得）変化（研究代表者・王、研究分担者・加藤）C57BL/6CD45.1とCD8を指標に末梢血と腫瘍に浸潤した輸注CAR-CD8Tを回収する。single cell transcriptome法を用いて腫瘍浸潤能や抗腫瘍機能に寄与する遺伝子発現を解析する。さらにIn vitroで抗原特異的刺激を加えた後の代謝変化をグルコースの取り込み、乳酸の排出、細胞内NADPとNADPH濃度を測定する。非CD4T同時輸注群から回収したCAR-CD8Tとの比較よりこれらの質的变化を明らかにする。また、細胞表面染色により疲弊マーカー（KLG9, Tim-3, LAG-3, PD-1）や長期性生存性マーカー（CD62L, CCR7）の発現状態を明らかにする。

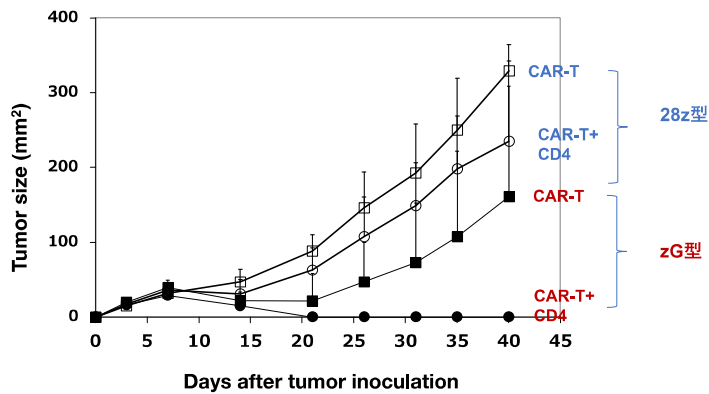
CEA特異的zG型CAR導入ヒト末梢血CD8Tと未加工ヒト末梢血CD4Tを用いた検証（研究代表者・王）

細胞内シグナル伝達ドメインをヒト遺伝子配列に置換したCAR遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてCEA特異的zG型ヒト末梢血CD8Tを調整する。重度免疫不全NOGマウスにヒトCEA陽性腫瘍株を担癌させ、担癌7日目にCEA特異的zG型ヒト末梢血CD8Tと共にヒト末梢血から精製した新鮮CD4Tを輸注する。マウスT細胞で得られた所見が、ヒトT細胞においても再現できることを確認する。

4. 研究成果

近年固形がんに対してCAR-T細胞療法は有効性と安全性は不明であり、固形がんに対する適用拡大が期待されている。本研究では輸注したCAR-T細胞抗腫瘍機能とCD4T細胞同時輸注による増加する事を確認した。(図1)。

図1 zG CAR-T細胞抗腫瘍機能とCD4T細胞同時輸注による増強する



未加工のprimary CD4T併用すると、CAR-CD8Tの抗腫瘍機能増強機能のメカニズムを明らかにした。我々は実験結果により：

- 1) In vitroにおける (A) CD4Tに由来する増強作用を発揮するサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、CD107a)産生が高発現を確認した。(B) CAR-CD8T + primaryCD4はCAR-CD8Tのみより疲弊マーカー (Tim、PD-1、LAG-3)の発現低下変化を明らかにした。長期性生存性マーカー (CD62L、CCR7)の発現状態を確認した。
- 2) In vivoにおける眼窩採血し、後総合機能解析を行なった。結果により、末梢血に輸注したCAR-T細胞はprimaryCD4+T細胞存在下に長期間が増殖、維持した。腫瘍局所には強いCD8+細胞浸潤を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 琢磨 (kato takuma) (60224515)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関