

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03543

研究課題名(和文) 遺伝子修飾による抗腫瘍T細胞の長期生存化と養子免疫療法への応用

研究課題名(英文) Generation of long-surviving antitumor T cells by genetic modification for optimal adoptive immunotherapy

研究代表者

籠谷 勇紀 (Kagoya, Yuki)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫応答研究分野・客員研究員

研究者番号：70706960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん抗原を認識するT細胞を体外で準備して患者に輸注する養子免疫療法の治療効果を高めることを目的として、T細胞での特定の遺伝子改変を通じてその長期生存能を高めること、及びその分子機序解明を進めた。広範な探索を通じてT細胞の自己複製能亢進に関わる複数の転写制御因子を同定したが、特にBlimp1をコードするPRDM1遺伝子の欠失がT細胞の長期生存能亢進に寄与することを見出した。マウス腫瘍モデルで、Blimp1欠失抗腫瘍T細胞が持続的な抗腫瘍効果を誘導できることを確認した。また、機能低下を来した疲弊T細胞の解析を通じて、CD83分子が前駆疲弊T細胞を同定する有用な指標となることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、がんに対する養子免疫療法、例えば現在血液腫瘍に対して実臨床で用いられているキメラ抗原受容体(CAR)導入T細胞療法などの治療効果を高めることへの応用性を持つ。CAR-T細胞は一過性には治療効果が高いが、その後の再発などで持続的な治療効果が得られる症例は限定的であることから、輸注されたT細胞の長期生存能を高めることで、治癒を目指した治療法開発が可能となる。また免疫チェックポイント阻害剤をはじめとするがん免疫療法では、治療効果を予測するバイオマーカー探索が重要であり、長期生存能に優れた前駆疲弊分画をマークするCD83分子に関する知見は有効性予測に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The overarching goal of this study is to enhance therapeutic efficacy of adoptive cancer immunotherapy, in which tumor antigen-specific T cells are prepared in vitro and infused back into the patient. We aimed to improve long-surviving capacity of antitumor T cells through genetic engineering. We further addressed molecular mechanisms of how modification of the identified target(s) affects T cell longevity.

We identified multiple targets associated with self-renewal proliferation of T cells. Especially, genetic ablation of the transcription factor PRDM1, which encodes Blimp1, significantly improved persistence of antitumor T cells. We confirmed that Blimp1-deficient T cells can induce durable antitumor response using multiple mouse tumor models. In addition to these findings, we analyzed molecular profiles of exhausted T cells in detail and identified that the expression of CD83 marks precursor exhausted T cells, which will be useful to finely dissect dysfunctional T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：養子免疫療法 悪性腫瘍 メモリーT細胞 キメラ抗原受容体 エピジェネティック因子 転写制御因子 T細胞疲弊

1. 研究開始当初の背景

養子免疫療法は、腫瘍抗原を認識する T 細胞を体外で準備・増殖させて患者に輸注する治療法で、CD19 に対するキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) を導入した T 細胞療法が再発 B 細胞性腫瘍に対して著効したことから我が国でも保険適応が承認され (Maude et al. New Engl J Med 2018)、次いで BCMA (B-cell maturation antigen) に対する CAR-T 細胞療法も、同じく造血器腫瘍である多発性骨髄腫に対して有望な報告がなされている。しかし、固形がんに対する同治療法は多くの症例で一過性の反応にとどまり、治癒には至らない。持続的な抗腫瘍効果が阻害される要因として、T 細胞の慢性抗原刺激に伴う機能低下(疲弊)が以前から指摘されており、疲弊誘導に関わる分子メカニズムに対する理解が進んできた (Chen et al. Nature 2019)。しかし疲弊誘導機構 (例えば PD-1、TOX など) を抑制された T 細胞は一過性のエフェクター機能は亢進するものの早期に終末分化に至り、長期生存はできない。従って、疲弊の抑制のみでは必ずしも抗腫瘍 T 細胞の治療効果改善につながるとは限らないこともわかってきており、同時に長期生存能を高めるための T 細胞の修飾が不可欠である。

2. 研究の目的

CAR-T 細胞をはじめとする養子免疫療法は、体外で細胞を準備する工程を含むことから、培養中の遺伝子レベルでの細胞改変が容易である。そこで本研究では、T 細胞の生存に深く関わる遺伝子を修飾することで、長期生存能を人工的に高め、そのことが治療効果の改善に寄与するという仮説を立てた。長期生存能に関わる遺伝子として、T 細胞性リンパ腫細胞で変異が報告されている遺伝子群に着目した。T 細胞性リンパ腫細胞は単クローン性の T 細胞が自己複製を繰り返しながら長期間にわたり維持・増生を行うことから、通常の T 細胞と比較して長期生存能に優れていると考えられる。これらのことを踏まえて、以下の研究を遂行することとした。

(1) T 細胞性リンパ腫で認められる変異・発現レベルの異常を来たす遺伝子群に着目して、CAR-T 細胞の長期生存能・持続的抗腫瘍効果に関わる標的遺伝子候補を同定する。

(2) 同定した遺伝子(群)の修飾により T 細胞の機能がどのように変化するかを、遺伝子発現・エピジェネティックプロファイルなどに着目して分子レベルで明らかにする。

(3) 遺伝子改変を加えた抗腫瘍 T 細胞が複数の in vivo マウス腫瘍モデルにおいて優れた治療効果を有することを示す。

本研究で得られた成果は抗腫瘍 T 細胞の標的抗原の種類によらないため、将来的にはあらゆる養子免疫療法においてその抗腫瘍効果を高めるために応用することを目指した。

3. 研究の方法

上記仮説の有効性を見積もるために、代表的な T 細胞性リンパ腫と関連する遺伝子を健常人由来末梢血 T 細胞において修飾して、機能解析を行った(表 1)。長期生存能の指標として、未分化メモリー T 細胞の表面抗原形質、及び多種類のサイトカイン産生能を解析することが有用であることから、これらの解析を通じて有望な標的探索を進めた (Kagoya et al. J Clin Invest 2016)。

PTCL-NOS			ALK ⁺ Anaplastic large cell lymphoma		
Genes	Freq (%)	Function	Genes	Freq (%)	Function
TET2	46-49	Loss	JAK1	15	Active
DNMT3A	27-36	Loss	STAT3	10	Active
RHOA	8-18	Complex	TET2	33	Loss
CDKN2A/2B	9	Deletion	DNMT3A	16	Loss
VAV1	11	Active	DUSP22	30	Downregulated
Extranodal NK/T cell lymphoma			PRDM1		
TP53	18-24	Loss	56	Deletion	
JAK3	35	Active	Angioimmunoblastic T cell lymphoma		
DDX3X	20	Loss	TET2	76-83	Loss
STAT3	6	Active	DNMT3A	26-38	Loss
STAT5B	6	Active	RHOA	50-71	Loss
			IDH2	20-45	Complex

表 1. T 細胞性腫瘍で報告されている主な遺伝子変異。

4. 研究成果

上記の候補因子のうち、特に Blimp1 をコードする転写因子・エピジェネティック因子である PRDM1 をノックアウトすることで、T 細胞の未分化性が顕著に亢進することを見出した (図 1)。同遺伝子はノックアウトすることによりメモリー T 細胞の形成能が高まることが以前に報告されており、この知見とも合致するデータであった (Kallies et al. Immunity 2009)。そこで以後は PRDM1 に着目して、さらに詳細な機能解析を進めた。なお、ノックアウトは CRISPR/Cas9 のエレクトロポレーションによる一過性導入により、常時 60-90% 程度の高効率で行うことが可能

であった。

NSG マウスに CD19 陽性白血病細胞株 NALM-6 を輸注した後、CD19 に対する CAR-T 細胞で治療する腫瘍モデルを用いて、遺伝子改変による治療効果の改善を評価した。図 2B に示すように、PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞はコントロールと比較して優れた抗腫瘍効果を示し、さらにその背景として、CAR-T 細胞の長期生存能獲得があることが末梢血中の T 細胞の経時的解析から示唆された (図 2C)。さらに PRDM1 ノックアウトによる T 細胞機能改変機序を探索するため、RNA シークエンスにより網羅的な遺伝子発現プロファイル解析したところ、図 3 に示すように後半な遺伝子発現変化が観察された。具体的な遺伝子としてはメモリー T 細胞で高発現する CCR7、IL7R などの抗原に加えて、メモリー形成に重要な転写因子 TCF7、LEF1 などの発現上昇が確認され、上記データと合致する所見であった。PRDM1 は様々なエピジェネティック因子と共役してクロマチン構造の改変に関わることから、同遺伝子の欠失により、ゲノムワイドな転写ネットワーク変化が起こることを確認した。

CD19 CAR-T 細胞 (day 21)

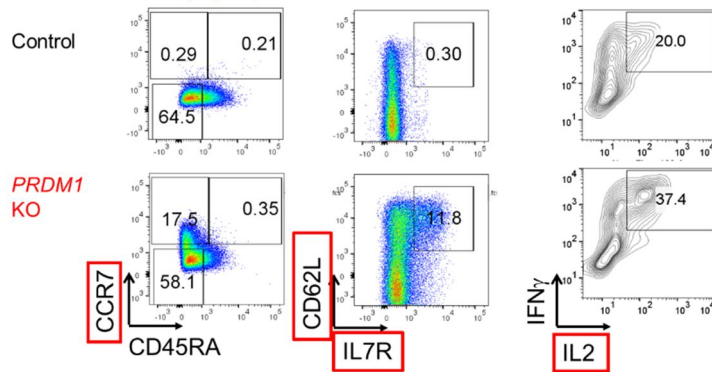


図 1. PRDM1 遺伝子を CD19 に対する CAR-T 細胞においてノックアウトした後、標的抗原による再刺激を行いながら 3 週間培養した。通常この培養期間を経ると T 細胞はメモリー形質をほとんど失うが、PRDM1 ノックアウトにより CCR7、IL7R などの未分化形質が保持されており、かつ若いメモリー T 細胞の指標である IL-2 の分泌も亢進していた。

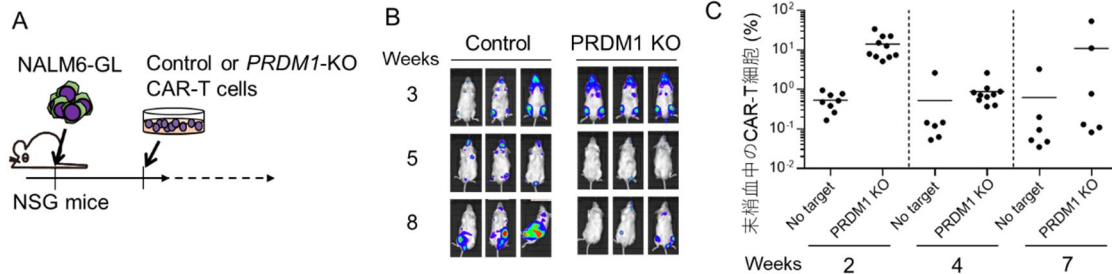


図 2. (A) PRDM1 遺伝子を CD19 に対する CAR-T 細胞においてノックアウトした後、NALM-6 移植免疫不全マウスに輸注する腫瘍治療モデル。(B) NALM-6 にルシフェラーゼ遺伝子を導入することで、腫瘍量を経時的に観察。PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞による治療群で有意に腫瘍の進行が抑えられた。(C) 末梢血中のヒト T 細胞割合を経時的に解析すると、PRDM1 ノックアウトにより持続性が顕著に向上することが確認された。

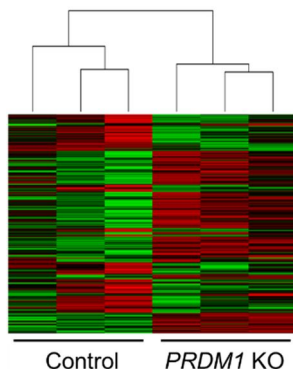


図 3. Control, PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞を抗原刺激を繰り返しながら培養した後、CD8T 細胞の遺伝子発現プロファイル RNA シークエンスにより解析した。両群を比較して FDR<0.05 を満たす遺伝子が 2000 以上同定され、これらの遺伝子をもとにクラスタリングを行ったところ、ドナーの違いによらず、2 群が明確に異なるクラスターに分かれた。

以上のことから、PRDM1 遺伝子のノックアウトは CAR-T 細胞をはじめとする養子免疫療法の持続的な治療効果を高める上で有用な戦略であることが示された (Yoshikawa et al. Blood 2022)。同知見は標的抗原によらないことから、CAR-T 細胞、TCR 導入 T 細胞、腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) 療法などに対して広い応用可能性を持つ。

これらの研究を遂行する過程で、疲弊 T 細胞においても T 細胞の分化階層構造が認められ、未分化形質を保持した前駆疲弊 T 細胞が、免疫チェックポイント阻害剤に対するエフェクター機能回復能が高く、治療を考える上で重要な分画であることが相次いで報告された (Kallies et

al. Nat Rev Immunol 2020)。そこで前駆疲弊 T 細胞をマークする抗原形質を同定することで、同細胞の機能解析をさらに進められると考えた。主にマウスモデルの解析で、前駆疲弊 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを探索した既存データをもとに、同分画に特徴的な表面抗原をコードする遺伝子を抽出し、それらの発現様式をヒト T 細胞において解析した。図 4 に示すように、NSG マウスに腫瘍細胞を移植した後、メソテリンに対する CAR-T 細胞で治療するモデルを用いて、腫瘍に浸潤する CAR-T 細胞の形質を調べた。予想通り、腫瘍に浸潤する CAR-T 細胞の多くは PD1 を高発現しており、そのうちの一部はメモリー形質 CCR7 の発現を維持しており、これが前駆疲弊 T 細胞分画を含むと考えられた。探索した分子のうち、CD83 の発現が CCR7^{high} の T 細胞分画で選択的に高く、CD83 発現を指標に前駆疲弊 T 細胞の頻度を見積もれることを新規に見出した。

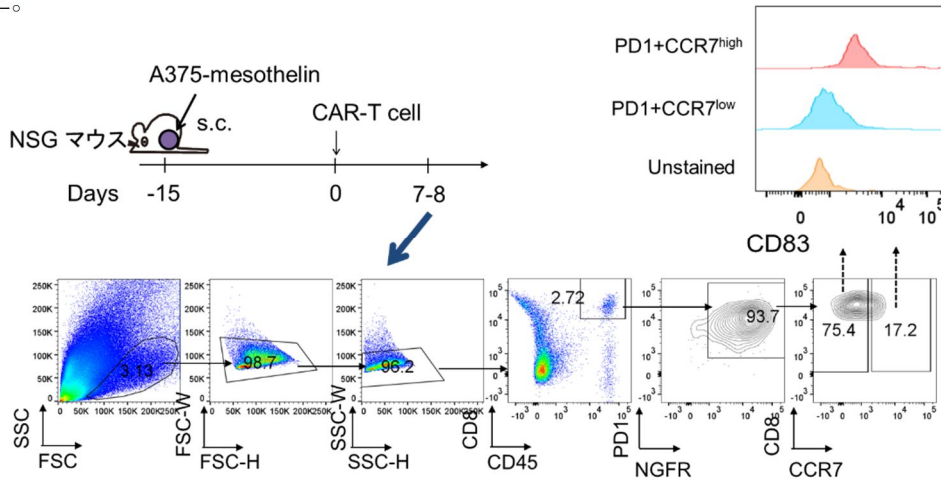


図 4. 固形がんを CAR-T 細胞で治療するモデルを用いて、腫瘍に浸潤するヒト疲弊 T 細胞の解析を行った。CD83 分子は CCR7 発現を維持する CAR-T 細胞で選択的に高発現しており、前駆疲弊 T 細胞に特徴的な抗原形質であることが示唆された。

CD83 分子の機能については未知の点が多く残されているが、同分子を高発現した CAR-T 細胞は抗原刺激に対する増殖能が減弱し、またグランザイム B などのエフェクター分子の発現も低下することがわかり、T 細胞のエフェクター機能を抑えることで、前駆疲弊状態を維持することに働いている可能性が示唆された。前駆疲弊 T 細胞は未分化性を保持しており、終末分化状態にある疲弊 T 細胞と異なり、疲弊シグナルの解除によりエフェクター機能を回復させられることから、以上の知見は免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測に応用できる可能性がある (Wuet al. Commun Biol 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshikawa Toshiaki, Wu Zhiwen, Inoue Satoshi, Kasuya Hitomi, Matsushita Hirokazu, Takahashi Yusuke, Kuroda Hiroaki, Hosoda Waki, Suzuki Shiro, Kagoya Yuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2156 ~ 2172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021012714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kagoya Yuki, Guo Tingxi, Yeung Brian, Saso Kayoko, Anczurowski Mark, Wang Chung-Hsi, Murata Kenji, Sugata Kenji, Saijo Hiroshi, Matsunaga Yukiko, Ohashi Yota, Butler Marcus O., Hirano Naoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic Ablation of HLA Class I, Class II, and the T-cell Receptor Enables Allogeneic T Cells to Be Used for Adoptive T-cell Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 926 ~ 936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-18-0508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wu Zhiwen, Yoshikawa Toshiaki, Inoue Satoshi, Ito Yusuke, Kasuya Hitomi, Nakashima Takahiro, Zhang Haosong, Kotaka Saki, Hosoda Waki, Suzuki Shiro, Kagoya Yuki	4. 巻 6
2. 論文標題 CD83 expression characterizes precursor exhausted T cell population	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04631-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 17件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 エピジェネティクス修飾によるCAR-T細胞の改良
3. 学会等名 第3回東京理科大学総合研究院合成生物学研究部門シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Kagoya
2. 発表標題 Genetic modification of antitumor T cells for optimal adoptive cancer immunotherapy
3. 学会等名 Franco-Japanese immuno-oncology webinars series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Kagoya
2. 発表標題 Memory Response of Gene Therapy Product; in View of Biodistribution
3. 学会等名 6th DIA Cell and Gene Therapy Products Symposium in Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kagoya
2. 発表標題 Future perspectives of CAR-T cell therapy for cancer
3. 学会等名 The 25th JFCR-ISCC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 Redefining T cell exhaustion - Understanding T cell states at molecular levels
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 転写ネットワーク修飾による T細胞機能の改変
3. 学会等名 第94回日本生化学大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 次世代CAR-T細胞療法の開発動向
3. 学会等名 BioJapan 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kagoya
2. 発表標題 Epigenetic and metabolic modification of CAR-T cells for optimal adoptive immunotherapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 聡明, 吳 智聞, 松下 博和, 細田 和貴, 鈴木 史朗, 籠谷 勇紀
2. 発表標題 Epigenetic modification of antitumor T cells for optimal adoptive immunotherapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kagoya
2. 発表標題 Epigenetic insights into T cell longevity for optimal adoptive immunotherapy
3. 学会等名 JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 聡明, 呉 智聞, 松下 博和, 細田 和貴, 鈴木 史朗, 籠谷 勇紀
2. 発表標題 Epigenetic modification of antitumor T cells to induce durable clinical response in adoptive immunotherapy
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 合成生物学による免疫細胞療法の改良
3. 学会等名 日本輸血・細胞治療学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 免疫工学によるCAR-T細胞の改良開発
3. 学会等名 血液疾患免疫療法学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 Epigenetic modification of CAR-T cells for optimal adoptive immunotherapy,
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 抗腫瘍T細胞の機能評価を行う上でのポイント
3. 学会等名 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 エピジェネティック機構の制御による抗腫瘍T細胞の改変
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 次世代型CAR-T細胞療法の開発
3. 学会等名 第6回バイオ医薬EXPO（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 CAR-T 細胞療法の適用拡大に 向けた研究開発
3. 学会等名 第7回日本がんサポーターブケア学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 エビジェネティクス改変による長期生存型CAR-T細胞の製造
3. 学会等名 第14回 日本血液疾患免疫療法学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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

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