

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15018

研究課題名（和文）イヌのキメラ抗原受容体発現T細胞の疲弊誘導因子の同定及び疲弊メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of exhaustion-inducing factors and the mechanisms of exhaustion in canine chimeric antigen receptor T cells

研究代表者

吉本 翔 (Yoshimoto, Sho)

麻布大学・獣医学部・学振研究員

研究者番号：70909168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CAR-T細胞の治療効果を減弱させる要因であるCAR-T細胞の疲弊という現象を解明するために、イヌCAR-T細胞に繰り返し抗原刺激を与えて疲弊を誘導し、疲弊に至るまでの過程を評価した。実験の結果、イヌCAR-T細胞上に疲弊に関連するマーカーが発現し、CAR-T細胞の増殖能や細胞傷害能も徐々に低下し、最終的に機能不全に陥ることが明らかになった。また、PD-L1発現細胞がイヌCAR-T細胞の機能不全に関連することやPD-1シグナル阻害がPD-L1によるCAR-T細胞の機能抑制を緩和することも明らかとなった。以上より、イヌCAR-T細胞の疲弊という現象の一部を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、イヌCAR-T細胞の疲弊の誘導に成功し、免疫チェックポイント分子の発現変化や機能不全に至るまでの過程を明らかにしたことである。また、PD-1シグナル阻害がイヌCAR-T細胞の機能不全や疲弊に与える影響についても明らかにできた。これらは、CAR-T細胞療法の改善策を検討するための重要な知見である。社会的意義としては、CAR-T細胞の疲弊を防ぐ新たな戦略を提示したことで、イヌおよびヒトのがん患者に対するCAR-T細胞の治療効果の向上が期待されることである。特に、難治性がんの治療において、CAR-T細胞療法の適用範囲を拡大し、治療効果を最大化するための手がかりとなる研究である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the mechanisms of CAR-T cell exhaustion, which reduces the therapeutic efficacy of CAR-T cell therapy. To induce CAR-T cell exhaustion, canine CAR-T cells were repeatedly stimulated with target antigens, and the process leading to exhaustion was evaluated. Our study revealed that canine CAR-T cells expressed exhaustion-related markers, accompanied by a gradual decline in their proliferation and cytotoxic abilities, ultimately resulting in functional impairment. Additionally, it was found that PD-L1-expressing cells contribute to the dysfunction of canine CAR-T cells and that PD-1 signal inhibition alleviates the suppression of CAR-T cell function caused by PD-L1. These findings provide insights into the mechanisms of canine CAR-T cell exhaustion.

研究分野：がん免疫

キーワード：CAR-T細胞 T細胞の疲弊 免疫チェックポイント分子 PD-1/PD-L1 がん免疫 がん イヌ

1. 研究開始当初の背景

がんはイヌとヒトの死亡原因の第一位であり、進行がん患者に対する有効な治療法が限られていることは、獣医療及びヒト医療共通の課題である。この課題を克服しうる治療法として、キメラ抗原受容体発現 T (CAR-T)細胞療法が近年注目されている。CAR-T 細胞は抗体の抗原結合部位、共刺激ドメイン及び T 細胞受容体の CD3 ζ 鎖をキメラ化した受容体(CAR)を発現する遺伝子改変 T 細胞である。CAR が標的抗原を認識すると、共刺激ドメインと CD3 ζ 鎖から活性化シグナルが送られ、CAR-T 細胞は活性化し抗原特異的にがん細胞を攻撃できる。CD19 を標的とした CAR-T 細胞は、難治性の白血病患者で劇的な治療効果を示し、2017 年に米国食品医薬品局の承認を獲得し、2019 年に国内でも承認された(Schuster et al. N Engl J Med., 2017)。白血病に対する CAR-T 細胞療法の成功を機に、他のがん種への応用が強く期待されている。しかし、他のがん種では白血病ほどの顕著な治療効果はみられず、適応となるがん種は限定的である。

CAR-T 細胞の治療効果を減弱する要因の一つに、がんによってもたらされる T 細胞の疲弊が挙げられる。T 細胞の疲弊は、慢性ウイルス感染症でよく知られる現象である(Wherry et al. Nat Rev Immunol., 2015)。T 細胞が持続的な抗原刺激により絶えず活性化すると、T 細胞上に共抑制分子が発現し始め機能抑制を受け、さらに慢性炎症下に存在する種々の細胞から免疫抑制を受けることで、T 細胞は最終的に機能不全に陥る。近年、がん患者においても T 細胞の疲弊という現象が報告されており、慢性ウイルス感染症による T 細胞の疲弊とは異なる性質を持つと考えられている(Wherry et al. Nat Rev Immunol., 2015)。しかし、未だがんによる T 細胞の疲弊についての全貌は明らかとなっておらず、特に遺伝子改変技術を用いて人工的に作製された CAR-T 細胞においては、その疲弊メカニズムや性状に関してほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CAR-T 細胞療法の治療効果を減弱させる要因として考えられる CAR-T 細胞の疲弊という問題を攻略するために、CAR-T 細胞の疲弊を誘導する因子を同定し、その因子が CAR-T 細胞の疲弊に与える影響を明らかにすることとする。

3. 研究の方法

実験 1) イヌ CAR-T 細胞に疲弊を誘導するために、イヌの CD20 抗原を標的とする CD20-CAR-T 細胞に CD20 を発現するがん細胞株により繰り返し抗原刺激を与えた。抗原刺激後、免疫チェック分子(PD-1)の発現、細胞増殖能、細胞障害能、及びサイトカイン産生能 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) を経時的に評価し、イヌ CAR-T 細胞が機能不全・疲弊に陥る過程を評価した。

実験 2) イヌ CAR-T 細胞の疲弊を促進もしくは抑制する因子を明らかにするために、標的となるがん細胞、CAR コンストラクト内の共刺激分子、及び培養下に特定の因子を加えるなど、異なる条件下でイヌ CAR-T 細胞に繰り返し抗原刺激を行い、実験 1) と同様にイヌ CAR-T 細胞が機能不全・疲弊に陥る過程を評価した。

実験 3) PD-L1 がイヌ CAR-T 細胞の機能抑制/疲弊状態に与える影響を評価するために、PD-L1 を強制発現させた細胞株によりイヌ CD20-CAR-T 細胞を刺激し続け、増殖能とエフェクター機能(細胞傷害能、サイトカイン産生能、及びメモリーサブセット)を評価した。

実験 4) PD-1 シグナル阻害によりイヌ CAR-T 細胞の機能不全を緩和できるかを *in vitro* で評価した。なお、PD-1 の細胞内シグナルを欠損させた PD-1 dominant negative receptor (PD-1 DNR)を CD20-CAR-T 細胞を発現させる方法、もしくは抗 PD-1 抗体を用いる方法の 2 通りで行った。イヌ CAR-T 細胞を PD-L1 発現細胞で繰り返し刺激し、増殖能やエフェクター機能を評価した。

実験5) *in vivo* におけるイヌ CAR-T 細胞の抗腫瘍効果及び挙動を評価するために、PD-L1 を発現するがん細胞株を移植したマウスモデルにイヌ CAR-T 細胞を投与した。生物発光イメージングにより腫瘍の大きさの変化をモニタリングした。また、定期的に採血を行い、フローサイトメトリーにより血中の CAR-T 細胞の存在を検出した。エンドポイント時には、がん組織、血液、骨髄、及び脾臓を採取し、CAR-T 細胞の存在やフェノタイプを評価した。

4. 研究成果

結果1) イヌ CAR-T 細胞 に抗原刺激を与えると免疫チェックポイント分子である PD-1 の発現が誘導された (図1)。抗原刺激に伴い、イヌ CAR-T 細胞の増殖能や細胞傷害能は徐々に低下し始め、最終的に機能不全となり、疲弊と考えられる状態に陥った。

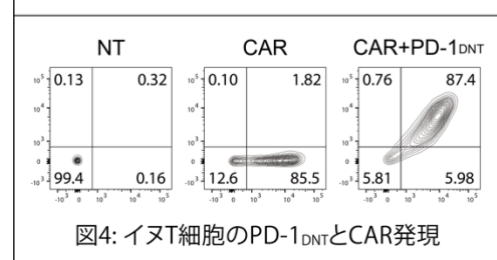
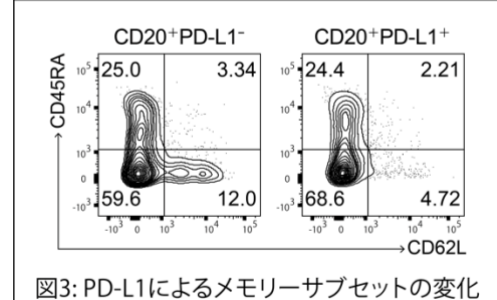
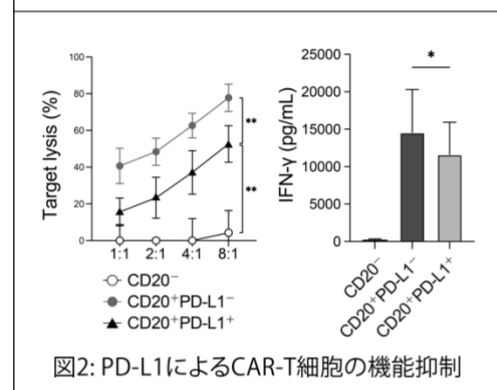
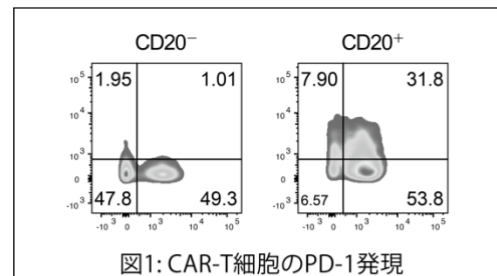
結果2) 細胞株や CAR 内の共刺激分子の種類によって、PD-1 の発現変化や増殖能・エフェクター機能の低下など、イヌ CAR-T 細胞が機能不全に陥るまでの過程が異なることが明らかとなった。また培養時に特定の因子を加えることにより、イヌ CAR-T 細胞が機能不全に陥りにくくなることも明らかとなった。

結果3) PD-L1 を強制発現させたがん細胞株は、PD-L1 を発現しないコントロールの細胞株と比較し、イヌ CD20-CAR-T 細胞の増殖能、細胞傷害能及びサイトカイン産性能を低下させることが明らかとなった (図2)。また、PD-L1 発現細胞はステムセルメモリーやセントラルメモリーの性質を有するイヌ CAR-T 細胞を減らすことも明らかとなった (図3)。

結果4) PD-1 DNR を発現するイヌ CD20-CAR-T 細胞の作製に成功した (図4)。PD-1 DNR を発現させる方法、及び抗 PD-1 抗体との併用のいずれも PD-L1 による機能抑制を緩和したものの、抗原の繰り返し刺激後の細胞増殖能やエフェクター機能に顕著な違いはみられなかった。

結果5) 本マウスモデルにおいて、投与直後ではがん組織内や血中でイヌ CAR-T 細胞を検出できたものの、時間経過とともに CAR-T 細胞数は減少し、がんもコントロールできなかったことから、投与されたイヌ CAR-T 細胞が疲弊した可能性が考えられた。また、共抑制分子の発現に関わるシグナルが誘導されたイヌ CAR-T 細胞、及び通常のイヌ CAR-T 細胞で抗腫瘍効果を比較したところ、両者の間に顕著な違いは確認できなかった。

本研究を通し、当初の仮説とは異なる所見も確認はされたものの、イヌ CAR-T 細胞の疲弊過程に関し興味深い現象が多く確認され、イヌ CAR-T 細胞の疲弊という現象の一部を明らかにすることができた。また、イヌ CAR-T 細胞の疲弊を防ぐ治療戦略の可能性についても検討することができ、今後本研究を通して明らかになった知見をふまえて新たな治療戦略を模索していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshimoto Sho, Chester Nicholas, Xiong Ailian, Radaelli Enrico, Wang Hong, Brillantes Marc, Gulendran Gayathri, Glassman Patrick, Siegel Don L., Mason Nicola J.	4. 巻 15
2. 論文標題 Development and pharmacokinetic assessment of a fully canine anti-PD-1 monoclonal antibody for comparative translational research in dogs with spontaneous tumors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mAbs	6. 最初と最後の頁 2287250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420862.2023.2287250	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshimoto S, Kasper B, Rotolo A, Nakagawa T, Takagi S, Mason NJ
2. 発表標題 Developing and evaluating CAR-T cells for use in canine cancer patients to inform human clinical translation
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshimoto S, Rotoro A, Foos K, Olnenick L, Takagi S, Mason NJ
2. 発表標題 A PD-1/CD28 chimeric switch receptor augments canine chimeric antigen receptor T cell function against PD-L1 expressing target cells
3. 学会等名 World Veterinary Cancer Congress 2024（国際学会）
4. 発表年 2024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			
米国	ペンシルバニア大学			