

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19422

研究課題名（和文）抗体医薬と免疫細胞療法の融合による有効ながん治療システムの開発

研究課題名（英文）Development of a combinatorial approach of antibody therapeutics and adoptive immunotherapy for cancer

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、難治がんに対する治療法として期待されるキメラ抗原受容体（CAR）導入T細胞療法の治療効果をさらに高めるために、免疫チェックポイント阻害剤などの抗体医薬品をT細胞に遺伝子レベルで導入し、がん組織局所で分泌させるシステムを開発し、その有効性、安全性を検証することを目的とした。抗体の分泌量、T細胞自身への毒性などを指標に遺伝子構造の最適化を行い、がん細胞に対して客観的な細胞傷害活性を誘導できることを確認した。また持続的な分泌を担うT細胞機能の改良にも取り組み、遺伝子ノックアウトにより長期生存能を付与する改変方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キメラ抗原受容体（CAR）導入T細胞療法は、一部の血液腫瘍に対して高い治療効果を示すものの、固形がんを中心とする他の多くのがんでは持続的な効果が得られていない。輸注されたT細胞が、持続的に抗原刺激を受けることに伴い徐々に細胞傷害活性を失う疲弊と、終末分化状態に陥り細胞分裂能を失うことが課題である。本研究成果はT細胞が疲弊状態に陥った際に、CARによる抗腫瘍効果とは独立した機序で治療効果を維持できるシステム、及びCAR-T細胞が体内で長期間生存するための遺伝子改変方法に関する研究開発であり、上記の問題解決に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop chimeric antigen receptor-engineered T cells that secrete antibody drugs such as immune checkpoint inhibitors to enhance its therapeutic efficacy. We designed the mAb drugs at genetic levels and examined their efficacy and safety when ectopically expressed in CAR-T cells. We optimized the mAb sequences based on the secretion efficiency as well as toxicity to the T cells. We confirmed that the mAb-engineered T cells can induce objective antitumor response in vitro. In addition to this, we also aimed to improve functions of antitumor T cells so that they can maintain efficient drug secretion. We identified that T cells can acquire long-lived potential by ablating specific epigenetic genes.

研究分野：免疫学

キーワード：キメラ抗原受容体 免疫細胞療法 T細胞疲弊 抗体医薬 免疫チェックポイント阻害剤 エピジェネティック因子 メモリーT細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんに対する免疫療法は、一部の腫瘍において客観的な治療効果が証明されている。このうちがん抗原を認識する T 細胞を体外で準備して輸注する養子免疫療法では、CD19 を標的とするキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) 導入 T 細胞療法が B 細胞性腫瘍に対して著効したことから特に注目されている。しかし固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法では、腫瘍局所での持続的な抗原刺激に伴い T 細胞が機能低下 (疲弊) をきたし、十分な抗腫瘍効果が誘導されない。治療不応となった腫瘍組織では、機能低下に陥った CAR-T 細胞は消失することなく、腫瘍局所で残存していることが報告されている (Cherkassky et al. 2016)。また臨床試験における解析でも、腫瘍局所への CAR-T 細胞の集積が確認されている (O'Rourke et al. 2017)。すなわち、疲弊 CAR-T 細胞は治療効果が不十分ながら、腫瘍局所で存続する。

一方、細胞を用いない抗体医薬品は以前から開発が進んでいる。例えば抗体に細胞傷害作用のある化合物を融合させた抗体-薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate: ADC) は、がん細胞特異的に細胞傷害物質を送り込む手法として既に複数の薬剤が保険承認されている。また、免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体は、持続的抗原刺激を受けた T 細胞が陥る疲弊状態を一部解除し、がん細胞に対するエフェクター機能を回復させる機能を持つ。これらの抗体医薬品に対する耐性機序の 1 つとして、固形腫瘍では薬剤の腫瘍局所への送達の非効率性ゆえに十分な局所濃度が得られないことがわかっており (Bhutani et al. 2013)、この点からの改良が求められている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて本研究では、治療に用いられる抗体医薬品を CAR-T 細胞に遺伝子レベルで導入して輸注することで、抗体医薬品の腫瘍組織局所への効率的な薬剤送達・持続的供給を可能にし、難治性がんに対して有効な抗腫瘍効果を誘導することを目指して、以下の研究を進めることとした。

(i) 抗体遺伝子を導入した T 細胞が、腫瘍細胞特異的な細胞傷害活性を誘導できることを示す。
(ii) 抗体薬物搭載 CAR-T 細胞の持続的効果を高める目的で、T 細胞に長期生存能を付与する遺伝子改変方法を開発する。

本研究の遂行により、CAR-T 細胞と抗体医薬の融合による有効な治療法開発につなげることを将来的な目標とした。

3. 研究の方法

B 細胞性抗原 CD19 を標的として、これに対する抗体製剤を T 細胞に分泌させることとした。CAR でも用いられている抗 CD19 抗体 (クローン FMC63) に対する単鎖可変領域 (single chain variable fragment: scFv) の N 末端にシグナルペプチドを付加して、細胞外に分泌させた。また、様々な固形がんを標的となる EGFR も標的抗原モデルとして、複数の抗原結合分子を試験した。腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は、腫瘍細胞側に EGFP 遺伝子を導入しておき、一定時間経過後に生存している EGFP 陽性細胞数をフローサイトメトリーにより定量することで計測した。

T 細胞への長期生存能付与については、転写制御因子を CRISPR/Cas9 によりノックアウトする方法を試みた。Cas9 タンパク質と、ガイド RNA の複合体を *in vitro* で形成させた後、電気穿孔法により T 細胞に導入した。T 細胞の長期生存能の指標として、未分化なメモリー T 細胞で見られる表面抗原形質 (CD62L, CCR7, CD27, CD28, IL7R) の維持能を指標とした。また、未分化メモリーに特徴的なプロファイルが獲得されているかについては、RNA シークエンス及び ATAC シークエンスにより検証した。

4. 研究成果

抗体遺伝子の N 末端に付加するシグナルペプチドを、これまでに申請者が CAR-T 細胞の作成で検討してきた結果に基づき 2 種類について比較検討した。図 1 に示すように、シグナルペプチド C を付加することで、抗体遺伝子による細胞傷害活性が顕著に高まることが示されたことから、以後同ペプチド配列を組みこむこととした。

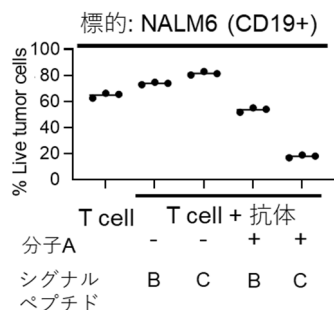


図 1. 抗 CD19 抗体分泌型 T 細胞と、CD19 陽性細胞株 NALM-6 を共培養して、生存する NALM-6 の割合を定量した。シグナルペプチド C を N 末端につけることで、CD19 に対する scFv、及び細胞傷害作用を持つ分子 A による細胞傷害能が向上した。

次に、EGFR を標的抗原として用いて、これに対する抗原結合ドメインとして、scFv 以外の分子を検討した。ラクダ科の重鎖抗体由来の抗原結合ドメイン (VHH, Nanobody) に加えて、元々のリガンドである EGF などを検討した。T 細胞と EGFR 陽性細胞を共培養した後、腫瘍細胞上の EGFR の表面発現をフローサイトメトリーにより測定した。分泌抗体がより多く受容体と結合していれば内在化によって表面発現が減少することから、これを指標として効率的な分泌及び標的受容体への結合を評価した。図 2 に示すように、分子 F をドメインとして用いることで、最も標的への結合効率が高まることがわかった。

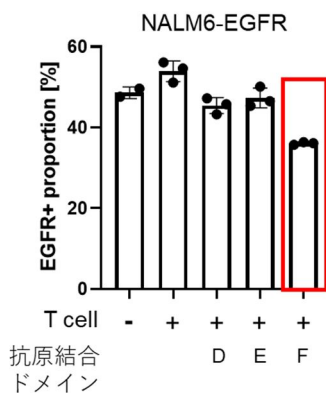


図 2. T 細胞から分泌させる EGFR に対する結合リガンドを scFv 以外にも複数試験し、分子 F が分泌効率、結合能の点から総合的に優れていることを確認した。

これらをもとに in vivo での治療効果を今後評価する目的で、特に薬剤送達が難しい脳腫瘍モデルを検討した。Iwami らが報告した、postglenoid foramen に腫瘍細胞を輸注するプロトコルを用いて、U251MG 細胞を免疫不全マウス (NSG マウス) に移植した。腫瘍細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入しておき、in vivo imaging system (IVIS) により腫瘍量を定量した。図 3 に示すように、輸注された腫瘍細胞は脳内で局所的に増殖し、治療効果を評価するのに適したモデルであることを確認できた。

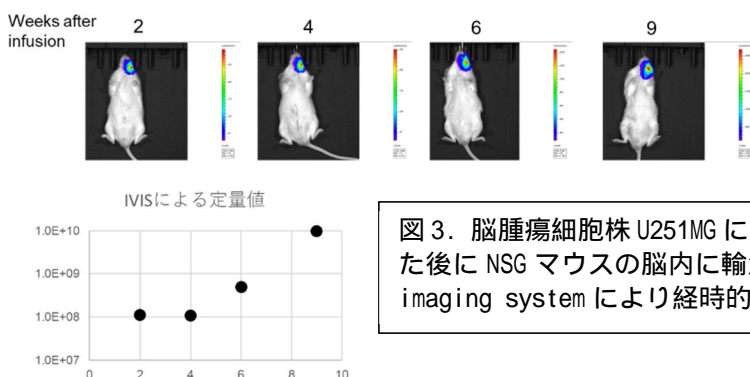


図 3. 脳腫瘍細胞株 U251MG にルシフェラーゼ遺伝子を導入した後、NSG マウスの脳内に輸注し、腫瘍量の変化を in vivo imaging system により経時的に測定した。

一方、薬剤を搭載する T 細胞は、腫瘍内で持続的に生存することが望ましい。T 細胞は本来メモリー T 細胞として体内に長期間とどまる性質を有するが、CAR-T 細胞のように腫瘍抗原に反応して強いエフェクター反応を繰り返し誘導する場合、終末分化を来して細胞増殖能を徐々に失う。そこで持続的な薬剤分泌に適した長期生存型の CAR-T 細胞を作製することを試みた。我々はこれまでに転写制御因子を中心とした様々な標的分子を遺伝子レベルで T 細胞において改変することで、その長期生存能を高められることを示している。特に PRDM1 ノックアウトにより、メモリー形質が長期間維持されることを確認していたことから同知見が固形がんに対する CAR-T 細胞においても再現されるか確認した。GD2 に対する CAR-T 細胞は、自発的なシグナル (tonic signaling) の誘導により、早期に終末分化を来することが知られている (Long et al. Nat Med 2015)。同 CAR-T 細胞に PRDM1 遺伝子ノックアウトを行ったところ、図 4 に示すように、1 週間培養後のメモリー形質がコントロールと比較して顕著に維持されることを確認した。そこで、PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞の治療効果を評価するため、NALM-6 に GD2 synthase, GD3 synthase を遺伝子導入することで、GD2 を安定発現させたクローンを取得した。これを免疫不全マウスに移植した後、GD2 に対する CAR-T 細胞で治療するモデルを用いて、PRDM1 ノックアウトの長期治療効果を評価した。

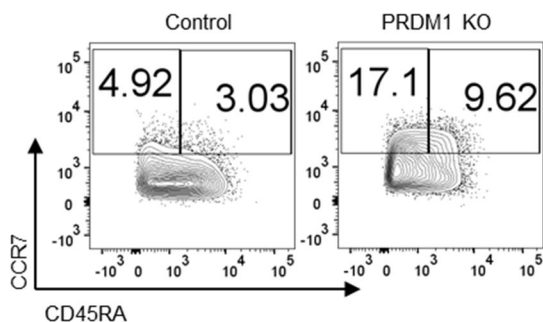


図 4. GD2 に対する CAR-T 細胞において PRDM1 をノックアウトした後、メモリー形質をフローサイトメトリーにより解析した。幹細胞様メモリー (CD45RA+CCR7+)、セントラルメモリー (CD45RA-CCR7+) の分画が PRDM1 ノックアウト T 細胞では有意に維持されていた。

図5に示すように、PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞は各時点でコントロールと比較して、末梢血中に有意に存続しており、このことが治療効果の増強につながることを確認した。以上のことより、固形がんに対する CAR-T 細胞においても PRDM1 ノックアウトにより持続的な生存能を獲得させられることを示した。本研究で開発する抗体分泌型 CAR-T 細胞においても、PRDM1 ノックアウトを併用することで、持続的な薬剤分泌が可能となることが示唆された。

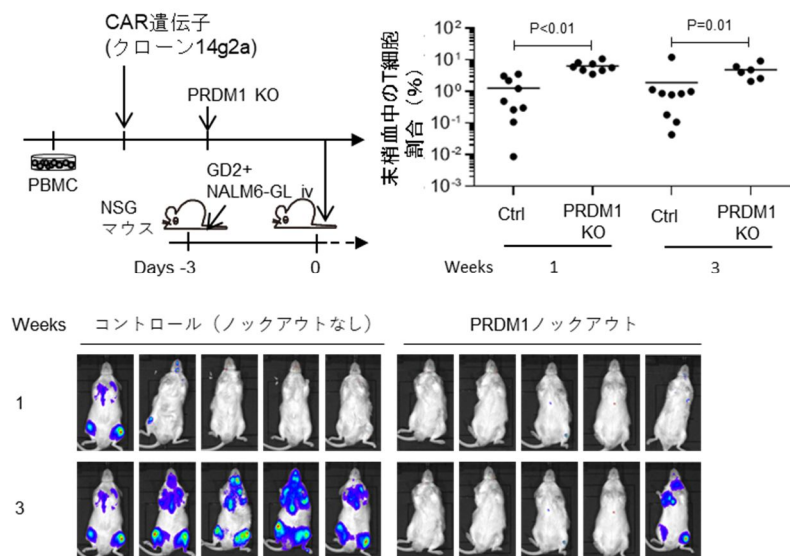


図5. GD2 陽性 NALM-6 細胞を NSG マウスに輸注した後、GD2 に対する CAR-T 細胞を静脈注射して、治療効果を評価した。NALM-6 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入することで、腫瘍量を経時的に評価したところ、PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞治療群で、有意に治療効果の持続性が高まった。その原因として、末梢血中の CAR-T 細胞が長期間生存することが示唆された(右上グラフ)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0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 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6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 Epigenetic regulation of antitumor T cell functions
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 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 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 エピ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

1. 発表者名 籠谷 勇紀
2. 発表標題 Synthetic immunology to enhance safety and efficacy in adoptive cancer immunotherapy
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会（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
---------	---------