

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07272

研究課題名(和文) 疲弊型CAR-T細胞の創出と解析：疲弊回避型CAR-T細胞の創出を目指して

研究課題名(英文) Generation and analysis of exhausted CAR-T cell : For developing un-exhausted CAR-T cell

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、CD28由来共刺激シグナルドメイン(CSSD)を有するCAR-T細胞(CD28-CAR-T細胞)がCAR-T細胞の疲弊化するのに対して、HVEM由来CSSDを有するCAR-T細胞が疲弊抵抗的な性状を示すことを明らかにした。また、これらのCAR-T細胞の解析から、CAR-T細胞の早期疲弊状態がCAR-T細胞の増殖性に影響を与えること、疲弊型であるCD28-CAR-T細胞では、CAR分子がクラスターを形成および持続的なトニックシグナルが発生していることが分かった。さらに、疲弊型を示すCD28-CAR-T細胞をモデル系として、疲弊回避を達成できる因子を明らかにできた。

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、固形腫瘍に応用するための基盤となる成果である。疲弊CAR-T細胞の性状解析と疲弊CAR-T細胞を用いたスクリーニングから、CAR-T細胞の疲弊回避の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を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 found that CAR-T cell with a CD28-derived co-stimulatory signal domain (CSSD) exhibited exhausted phenotype whereas the one with a herpes virus entry mediator-derived CSSD exhibited exhaustion-resistant phenotype. We also found that early exhaustion status of the CAR-T cell could affect responsiveness of the CAR-T cells. Phenotypic analysis of the CAR-T cells also showed that early CAR-T cell exhaustion is associated with CAR-mediated tonic signaling due to CAR clustering. In addition, we explored the factors for avoiding CAR-T cell exhaustion using CD28-CAR-T cell as a model system of exhausted CAR-T cell.

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

## 1. 研究開始当初の背景

がんや慢性感染症では、抗原の排除に重要な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が持続的な抗原刺激により疲弊 (機能異常) することが知られている。減弱した CTL 応答を補う免疫療法として、CAR-T 細胞療法が開発されてきた。CAR は一本鎖抗体 (scFv) などに由来する抗原認識ドメインと共刺激シグナルドメイン (CSSD) および CD3ζ鎖由来の細胞内シグナル伝達ドメインからなるキメラ分子である。CAR-T 細胞は特異的で強力な細胞傷害活性を發揮し、B 細胞悪性腫瘍に対する臨床試験で高い奏効率を示している (引用文献①)。一方、固形腫瘍に対しては十分な抗腫瘍活性を發揮できていない (引用文献②、③)。腫瘍細胞における PD-L1 などの抑制性分子の発現や制御性 T 細胞 (Treg) の浸潤、CAR-T 細胞への疲弊誘導といったことが原因として考えられる。CAR-T 細胞療法を固形腫瘍や慢性感染症など幅広い疾患に有効な治療法に発展させるためには、いかに CAR-T 細胞を疲弊から回避させるかが重要な課題の 1 つである。しかし、疲弊 CAR-T 細胞の性状や CAR-T 細胞の疲弊回避方策は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これまで多くの CAR-T 細胞が創出され、そのエフェクター機能はよく解析されてきたが、その性状はほとんど解析されていない。特に、疲弊 CAR-T 細胞の性状は明らかになっていない。

本研究では、(1) 疲弊型 CAR-T 細胞の創出系を構築し、(2) 創出した疲弊型 CAR-T 細胞の性状および機能解析から、その関係性を明らかにする。また、(3) 構築した疲弊型 CAR-T 細胞の創出系を用いて、疲弊回避型 CAR-T 細胞の創出を試みる。

## 3. 研究の方法

- (1) **CAR-T 細胞の作製**： 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、異なる CSSD (CD28、4-1BB、HVEM 由来) を有する HIV 特異的 CAR 発現ウイルスベクター (図 1) を感染させて遺伝子導入を行った。

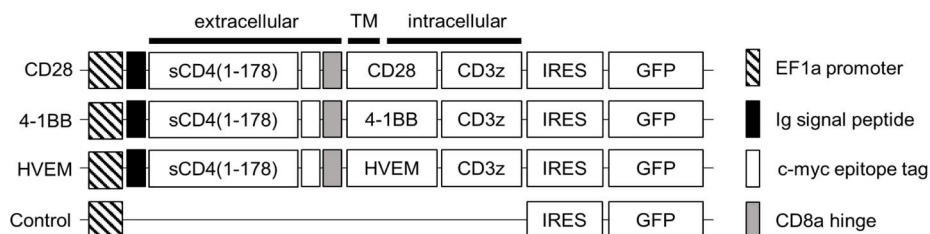


図 1. CAR 発現レンチウイルスベクターの構造

- (2) **疲弊状態の解析**： 疲弊マーカー (PD-1、LAG-3) の発現を指標として、フローサイトメトリーにより CAR-T 細胞の疲弊度を解析した。
- (3) **抗原刺激に対する増殖度の解析**： マイトマイシン C 処理で増殖を停止させた細胞を用いて作製した CAR-T 細胞を刺激し、増殖度をフローサイトメトリーで解析した。
- (4) **CAR 分子局在の解析**： CAR-T 細胞における早期疲弊の誘導機序を明らかにするため、作製した CAR-T 細胞を蛍光顕微鏡で観察し、CAR の局在を解析した。
- (5) **CAR 分子リン酸化の解析**： CAR-T 細胞の早期疲弊誘導に関与すると報告されている CAR 依存的トニックシグナルの強度を調べるため、リン酸化 CD3ζ に特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーにより CAR 分子のリン酸化を解析した。
- (6) **CAR-T 細胞の早期疲弊誘導に対するサイトカイン添加や転写因子 X 共発現の影響**： (1) と同様の方法を用いて、サイトカイン添加や転写因子 X を共発現させた条件で、疲弊型を示す CD28-CAR-T 細胞を作製した。作製した CAR-T 細胞の疲弊度を解析するために、疲弊マーカー (PD-1、LAG-3、Tim-3) の発現パターンを指標として比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) CD28-CAR-T 細胞は疲弊細胞を高頻度を含むが、HVEM-CAR-T 細胞では低頻度である。

疲弊マーカー(PD-1、LAG-3)の発現を指標として、フローサイトメトリーにより CAR-T 細胞の疲弊度を解析したところ、CD28-CAR-T 細胞は疲弊細胞を高頻度に認めたのに対し、HVEM-CAR-T 細胞では有意に低頻度であった(図 2)。

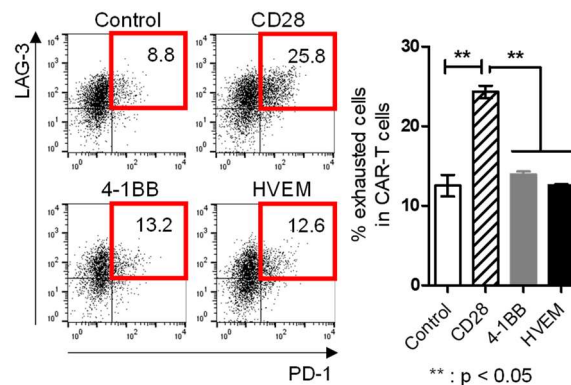


図 2. CD28-CAR-T 細胞は疲弊細胞を高頻度を含むが、HVEM-CAR-T 細胞では低頻度である

- (2) CAR-T 細胞の早期疲弊状態は、CAR-T 細胞の増殖性に影響を与える。

Env gp120 発現細胞を用いた抗原刺激を行った際の CAR-T 細胞の増殖度は HVEM > 4-1BB > CD28 の順であった(図 3、●)。さらに、Env gp120 と PD-L1 とを共発現する細胞を用いて刺激した場合、CD28-CAR-T 細胞では強い増殖抑制がかかったのに対し、HVEM-CAR-T 細胞では増殖抑制が有意に弱かった(図 3、●)。これらにより、CD28-CAR-T 細胞は HVEM-CAR-T 細胞に比べて早期疲弊状態になりやすいことが示唆された。

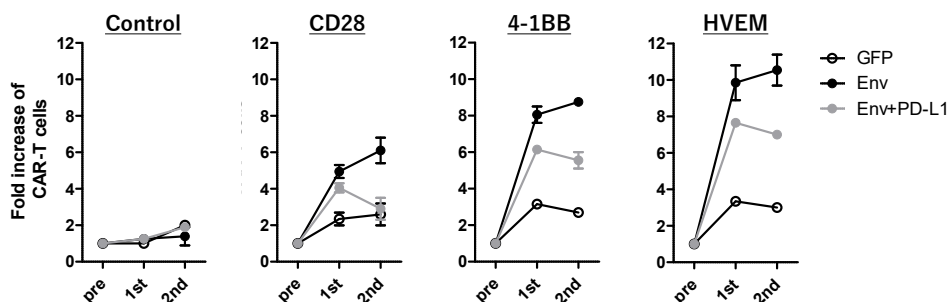


図 3. CAR-T 細胞の早期疲弊状態は、CAR-T 細胞の増殖性に影響を与える。

- (3) 疲弊型である CD28-CAR-T 細胞は、CAR 分子がクラスターを形成している。

CAR-T 細胞における早期疲弊の誘導機序を明らかにするため、作製した CAR-T 細胞を蛍光顕微鏡で観察し、CAR の局在を解析した。CD28-CAR-T 細胞ではクラスターを形成していたのに対し、HVEM-CAR-T 細胞では一様に分布していた(図 4)。

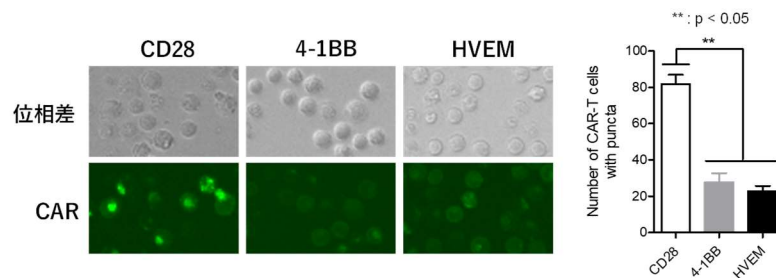


図 4. 疲弊型である CD28-CAR-T 細胞は、CAR 分子がクラスターを形成している

- (4) 疲弊型である CD28-CAR-T 細胞では、持続的なトニックシグナルが発生している。

CAR-T 細胞の早期疲弊誘導に関与すると報告されている CAR 依存的トニックシグナルの強度を調べるため、リン酸化 CD3 $\zeta$  に特異的な抗体を用いたフローサイトメトリー

により CAR 分子のリン酸化を解析した。CD28-CAR-T 細胞では疲弊を誘導するトニックシグナルが CAR 依存的に強く持続していたのに対し、HVEM-CAR-T 細胞では有意に弱く (図 5)、クラスター形成の有無と合致していた。

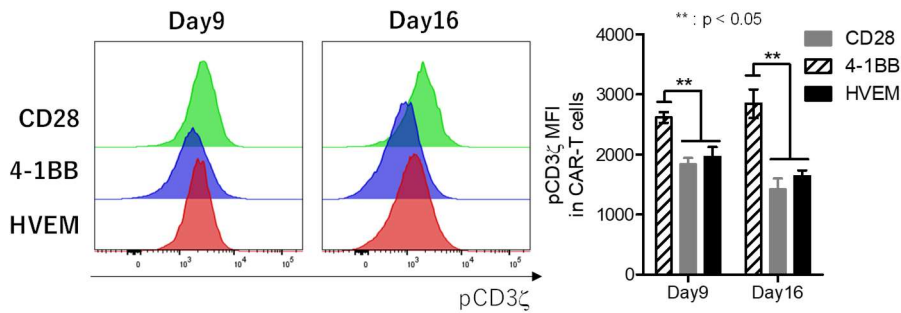


図 5. 疲弊型である CD28-CAR-T 細胞では、持続的なトニックシグナルが発生している

以上の結果から、HVEM-CAR-T 細胞は疲弊抵抗的な性状を示すことが明らかとなった。また、CD28-CAR-T 細胞が CAR-T 細胞の疲弊モデルに利用できることが示唆された。

### (5) サイトカイン添加および転写因子 X 共発現による疲弊回避

サイトカインとして IL-2、IL-7 および IL-15 の添加、転写因子 X (論文公表前のため因子名は X とした) の共発現が、CD28-CAR-T 細胞の早期疲弊を回避できるかを検討した。PD-1<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>の疲弊細胞集団の割合は、転写因子 X の共発現により約 50%減少した。また、サイトカイン IL-7 および IL-15 の添加条件でも IL-2 添加条件に比べ、疲弊細胞集団の割合は約 50%減少した。さらに、IL-7 および IL-15 添加条件において転写因子 X を共発現させると、疲弊細胞集団の割合は IL-2 添加条件に比べ約 80%減少した (図 6A)。しかし、IL-7 および IL-15 添加条件では細胞の増殖が非常に悪く、十分な細胞数を得ることが難しかった。また、これらの細胞について、CD45RO および CCR7 の発現パターンを指標としてメモリー表現型の解析を行ったところ、IL-2 添加条件で転写因子 X を共発現させると、ナイーブ様 (CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) やセントラルメモリー型 (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) の細胞集団が優位に増加していた (図 6B)。

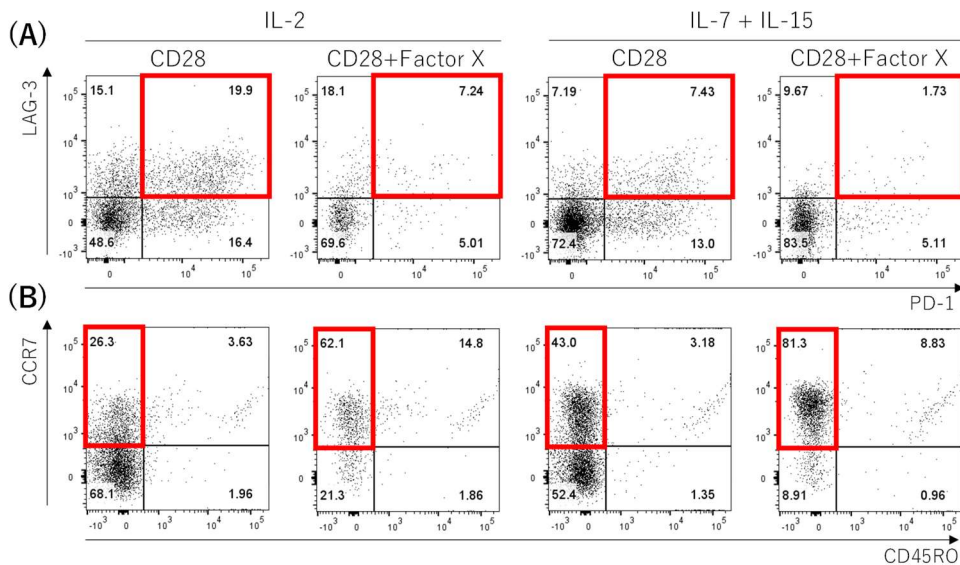


図 6. サイトカイン添加および転写因子 X 共発現による疲弊回避  
(A) 疲弊状態 (LAG-3, PD-1)、(B) メモリー表現型 (CCR7, CD45RO)

以上の結果から、IL-2 添加条件で転写因子 X を共発現させることで、疲弊細胞集団の割合が少なく、メモリー型優位な CAR-T 細胞を作製できると考えられた。今後、さらに詳細な機能および性状の解析を行い、その特性を明らかにしていくことで、「CAR-T 細胞疲弊化の回避方策」を確立していきたい。

<引用文献>

- ① Maude SL et al, Blood, 2015
- ② Kershaw MH et al, Clin Cancer Res, 2006
- ③ Lamers CH et al, J Clin Oncol, 2006

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nunoya Jun-ichi, Masuda Michiaki, Ye Chaobaihui, Su Lishan	4. 巻 14
2. 論文標題 Chimeric Antigen Receptor T Cell Bearing Herpes Virus Entry Mediator Co-stimulatory Signal Domain Exhibits High Functional Potency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 27～37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2019.03.002	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

1. 著者名 Nunoya Jun-ichi, Teramura Eijiro, Masuda Michiaki, Su Lishan	4. 巻 1
2. 論文標題 Arrangement of VL and VH domains in VRC01-Based chimeric antigen receptor (CAR) affects functions and exhaustion status of CAR-T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Re:GEN Open	6. 最初と最後の頁 26-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/regen.2021.0005	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 布矢純一, 伊牟田凧砂, 増田道明, Lishan Su
2. 発表標題 Herpes virus entry mediator由来共刺激シグナル配列を有するキメラ抗原受容体発現T細胞(CAR-T細胞)は疲弊抵抗的な性状を示す
3. 学会等名 日本免疫治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 布矢純一, 寺村英次郎, 増田道明, Lishan Su
2. 発表標題 キメラ抗原受容体(CAR)におけるVLおよびVH領域の配置はCAR-T細胞の機能だけでなく疲弊状態に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本免疫治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun-ichi Nunoya, Eijiro Teramura, Michiaki Masuda
2. 発表標題 Arrangement of the VH and VL domains in Chimeric Antigen Receptor (CAR) affects the effector functions of HIV-targeted CAR-T cells
3. 学会等名 The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun-ichi Nunoya, Lishan Su, Michiaki Masuda
2. 発表標題 Functional analysis and characterization of HIV-specific Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T cells
3. 学会等名 The Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018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