

令和 4 年 5 月 15 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：19K07751
研究課題名(和文)腫瘍細胞とキメラ抗原受容体T細胞のエネルギー代謝の相違に着目した次世代細胞治療

研究課題名(英文)Next generation CAR-T cell therapy considering metabolism of tumor cells and CAR-T cells

研究代表者
三輪 啓志(MIWA, Hiroshi)
三重大学・医学系研究科・産学官連携講座准教授

研究者番号：00209967
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)：新たながん免疫療法として急速に進展するCAR-T細胞療法の代謝特性を理解することにより、有効性の向上につなげる目的で本研究を行った。GITRを細胞内ドメインに持つzG CAR-T細胞は28z CAR-T細胞や4-1BBz CAR-T細胞に比べ解糖への依存が少なく、脂肪酸 酸化およびミトコンドリアでの酸化的リン酸化に強く依存している。この代謝特性が高い標的細胞傷害活性と関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、CAR-T細胞のエネルギー代謝、殊にミトコンドリアでの酸化的リン酸化が注目されている。本研究にてCARの細胞内ドメインの違いにより解糖優位、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化優位を類別化することができ、標的細胞傷害活性との関連が示唆された。CAR-T細胞治療は従来治療に不応性の難治がんへの有効性が期待されているが、費用対効果の面で問題がある。代謝特性の理解により有効性の向上に資するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to improve the efficacy of CAR-T cell therapy by understanding the energy metabolism of CAR-T cells in this study. We demonstrated that zG CAR-T cell, comprising GITR (Glucocorticoid-induced TNF-related Protein) in cytoplasmic domain had less dependency on glycolysis, and relied more on fatty acid beta oxidation and oxidative phosphorylation in mitochondria than CAR-T cells having 28z or 4-1BB. Real-time cytotoxicity assay revealed that zG CD19 CAR-T cells killed target leukemia cell line (NALM6) more efficiently than 28z or 4-1BBz CD19 CAR-T cells (gammadelta CAR-T). Superior target-specific cytotoxicity of zG CAR-T cells might be associated with OXPHOS-dominant metabolic characteristics.

研究分野：腫瘍免疫 エネルギー代謝

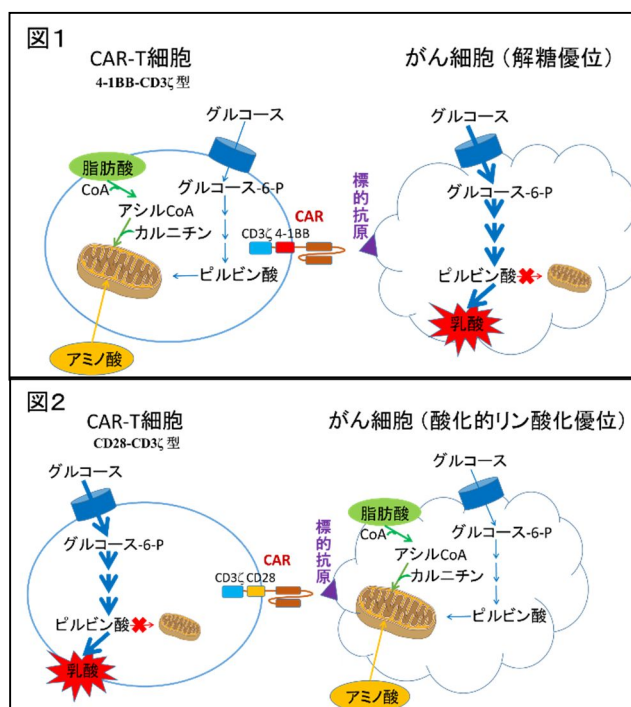
キーワード：CAR-T細胞 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

各種がんに対し、従来の標準治療（外科手術、化学療法、放射線治療）に加え第4の治療法である免疫療法として、免疫チェックポイント阻害薬とともに CAR-T 細胞療法が導入されている。現時点では B 細胞性リンパ腫・白血病に対する CD19 を標的とする CAR-T 細胞療法、および多発性骨髄腫に対する BCMA を標的とする CAR-T 細胞療法がおこなわれている。治療成績の改善は認められるものの難治、再発例は依然として多くさらなる治療法の改善が望まれている。また固形がんに対する CAR-T 細胞治療が期待されているが、開発は遅れている。その理由として、細胞表面に発現する固形がん特異的な抗原が少ないこと以外に固形がんでは血液腫瘍に比し腫瘍微小環境の影響を強く受けることがあげられる。低酸素、腫瘍間質、MDSC/Treg 等の免疫抑制細胞の存在とともにがん細胞に特徴的な解糖優位の代謝（Warburg 効果）による腫瘍局所の乳酸濃度の高まりが T 細胞による抗腫瘍効果を減弱すると考えられている（Cell Metabol 27, 977-987, 2018）。しかしながら、がん細胞の代謝は Warburg が想定したほど均一なものではなく、腫瘍内でも部分的には酸化的リン酸化優位などところがあるなど多様性（J Clin Invest 118, 3930-3942, 2008）があり、がん種（遺伝子変異）によっては脂肪酸の酸化が重要な腫瘍もある（Cell Metabol 25, 358-373, 2017）。

CAR-T 細胞治療において、これまでの CAR の細胞内ドメインは CD28 あるいは 4-1BB と CD3 ζ で構成されており、CD28-CD3 ζ CAR-T 細胞は解糖系優位、4-1BB-CD3 ζ CAR-T 細胞は脂肪酸酸化による酸化的リン酸化優位のエネルギー代謝様式であるとの報告がある（Immunity 44, 380-390, 2016）。

CAR-T 細胞治療、特に今後の固形がんに対する CAR-T 細胞治療の開発にあたり、がん細胞の代謝と CAR の細胞内ドメインの違いにより代謝を適切に組み合わせることにより治療成績の向上を目指す。すなわち、解糖系優位のがんに対しては酸化的リン酸化優位の 4-1BB-CD3 ζ CAR-T 細胞を（図1）、逆に脂肪酸酸化等による酸化的リン酸化優位のがんに対しては解糖系優位の CD28-CD3 ζ CAR-T 細胞を（図2）組み合わせると必要な栄養素を競合しないので、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を高められるのではないかという仮説のもとに本研究を開始した。



2. 研究の目的

がん種特異的なエネルギー代謝に上述の細胞内ドメイン特異的な代謝様式の CAR-T 細胞を組み合わせるといった試みはこれまで報告がなく、固形がんなどに対する CAR-T 細胞を開発するにあたり有効性を高めることを目的とする。

3. 研究の方法

- 細胞内ドメインとして CD28、4-1BB あるいは GITR (Glucocorticoid-induced TNF-related Protein: 我々の研究室が独自に開発) を持つ CD19 CAR-T 細胞を作成し、その代謝プロファイルを検討する。すなわち CD19 CAR-T 細胞をプレートコートした CD19 抗原上で培養し経時的に培養上清中のグルコース、乳酸を定量する。また、解糖阻害薬（2-deoxyglucose 等）、酸化的リン酸化阻害薬（oligomycin 等）あるいは脂肪酸酸化阻害薬（etomoxir）を添加培養し細胞増殖抑制効果を検討する。グルコースを多く消費、乳酸を多く産生し、2-deoxyglucose 感受性の解糖系優位なのか、グルコース消費、乳酸産生が少なく oligomycin 感受性のミトコンドリアでの酸化的リン酸化優位なのかで類別する。さらに etomoxir 感受性であれば、脂肪酸酸化が重要であると考えられる。
- 急性リンパ性白血病細胞株についても、同様に代謝プロファイルを検討する。
- CD19 CAR-T 細胞（細胞内ドメインとして CD28、4-1BB あるいは GITR）を ALL 細胞株（NALM6 等）と共培養し細胞傷害活性の検討、およびサイトカインの産生・分泌を上清の ELISA あるいは細胞内染色にて検討する。共培養に際し、糖代謝阻害薬（2-deoxyglucose など）あるいは酸化的リン酸化阻害薬（oligomycin 等）添加の影響も検討する。例えば解糖優位の腫瘍細胞と酸化的リン酸化優位の CAR-T 細胞を共培養する場合、解糖阻害薬を添加すれば腫瘍細胞

にだけ増殖抑制効果を付加することが想定される。もちろん代謝優位性は相対的なものであるから阻害薬が高濃度であれば CAR-T 細胞にも影響を与えることになるであろうから、至適な阻害薬濃度を探索する。

- ・ NOG マウスに ALL 細胞 (NALM6 等) を移植する。生着後 CD19 CAR-T 細胞 (細胞内ドメインとして CD28、4-1BB あるいは GITR) を経静脈的に投与し、末梢血中の白血病細胞の推移を観察する。末梢血中の T リンパ球の FACS 解析 (サイトカインの細胞内染色等) も平行して行う。一定期間後、マウスを sacrifice し、解剖して、骨髄、脾臓、肝臓など臓器への白血病細胞、CAR-T 細胞の浸潤を細胞、組織学的に検討する。

4. 研究成果

1. 3 種類の細胞内ドメインを持つ CD19 CAR T 細胞 ($\alpha\beta$ -T 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞) はいずれも CAR の発現、NALM6 との共培養による γ -IFN の産生を認めた。
2. 1) リアルタイム細胞傷害活性の検討で、CD19 28z CAR $\gamma\delta$ -T 細胞は NALM6 に対し、迅速な細胞傷害を示したが、その効果は持続的ではなかった。
2) CD19 4-1BBz CAR $\gamma\delta$ -T 細胞の NALM6 に対する細胞傷害は緩徐に始まるが、持続的であった。
3) CD19 zG CAR $\gamma\delta$ -T 細胞は他のコンストラクトに比し、迅速性、持続性、強度において最も優れた細胞傷害活性を示した。
4) CD19 zG CAR $\alpha\beta$ -T 細胞は、CD19 28z CAR ab-T 細胞と同等の細胞傷害活性を示した。
3. 免疫不全マウス (NOG) に移植したルシフェラーゼ遺伝子導入 NALM6 に対する治療モデルの検討では、コントロール (PBS、non-gene modified $\alpha\beta$ -T 細胞) 治療群はいずれも 4 週以内に腫瘍死したが、CD19 28z CAR $\alpha\beta$ -T 細胞、CD19 zG CAR $\alpha\beta$ -T 細胞治療群ではいずれも速やかに白血病細胞は駆逐された。今回の検討では細胞内ドメインによる差は明らかではなかった。
4. CD19 zG CAR $\alpha\beta$ -T 細胞は、CD45RA⁺/CD62L⁺分画 (T memory stem cell の可能性) が最も豊富に認められた。
5. CD19 CAR-T 細胞をプレートコートした CD19 抗原上で培養し経時的に培養上清中のグルコース、乳酸を定量した。 $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞では、28z がグルコース消費、乳酸産生ともに最大で、次いで 4-1BBz、zG は最少であった (細胞数あたり)。 $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞では、グルコース消費、乳酸産生ともに 4-1BBz が最大、28z、zG の順であった。
6. 3 種類の細胞内ドメインを持つ CD19 CAR T 細胞 ($\alpha\beta$ -T 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞) をプレートコート CD19Fc 上で培養する際に各種代謝阻害薬を添加することによる γ -IFN 産生への影響を検討した。まず、解糖阻害薬 (2-deoxyglucose) 添加時には、 $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞は 2-deoxyglucose の濃度依存的 (2mM, 5mM) に γ -IFN 産生が抑制された。一方、 $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞では 2-deoxyglucose による γ -IFN 産生抑制効果はあまり認められなかった。特に低濃度 (2mM) の 2-deoxyglucose 添加では逆に γ -IFN 産生の亢進が認められた。
酸化的リン酸化阻害薬 (oligomycin) 添加では、 $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞、 $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞ともに濃度依存的に γ -IFN 産生は抑制された。
脂肪酸 β 酸化阻害薬 (etomoxir) 添加による γ -IFN 産生への影響の検討では、 $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞、 $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞ともに zG が最も強く抑制された。
7. CD19 CAR-T 細胞をプレートコートした CD19 抗原上で培養した後、extracellular flux analyzer (seahorse) でミトコンドリアでのエネルギー代謝の指標である oxygen consumption rate (OCR) や spare respiratory capacity (SRC) を測定した。 $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞では、4-1BBz が最も高い SRC を示し、次いで zG であった。28z は最も低い SRC を示した。

以上より本研究では、CD19 CAR-T 細胞において細胞内ドメインによって、また $\alpha\beta$ T 細胞か $\gamma\delta$ CAR T 細胞かによってエネルギー代謝が異なることが明らかになった。既に 28z は解糖系優位、4-1BBz はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化優位のエネルギー代謝を示すことが報告されているが、今回の検討でも $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞では同様の結果であった。一方、 $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞では 4-1BBz が最も解糖 (グルコース消費、乳酸産生) が旺盛であった。我々の研究室で開発した細胞内ドメイン zG は $\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞においても $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞においても解糖が最も低レベルであった。代謝阻害薬添加による γ -IFN 産生への影響の検討では、zG が脂肪酸 β 酸化阻害薬 (etomoxir) により最も強く抑制された。ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の指標である SRC は 4-1BBz と 28z の中間であった ($\alpha\beta$ CD19 CAR T 細胞)。リアルタイム細胞傷害活性の検討では、 $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞の NALM6 に対する細胞傷害は zG が最強であった。エネルギー代謝特性と CAR-T 細胞の標的細胞傷害活性の関連を考察するうえで興味深い結果が得られた。すなわち解糖が低レベルで、脂肪酸 β 酸化-ミトコンドリアエネルギー代謝に依存する zG が最も強い標的細胞傷害活性を示したことである。

CD19 CAR T 細胞 ($\alpha\beta$ -T 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞) をプレートコート CD19Fc 上で培養する際に、低濃度の解糖阻害薬 (2-deoxyglucose) を添加すると、特に $\gamma\delta$ CD19 CAR T 細胞では逆に γ -IFN 産生の

亢進が認められたことについて今後、代謝改変による CAR-T 細胞の機能向上という課題で 2022 年から新たな科研費のもと研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三輪啓志、藤原 弘、赤堀 泰、王 立楠、奥村悟志、田中義正、加藤琢磨、宮原慶裕、珠玖洋
2. 発表標題 Accession of GITRL improves anti-leukemia functionality of CD19 CAR-T cells via metabolic behavior
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三輪啓志、藤原 弘、赤堀 泰、王 立楠、奥村悟志、田中義正、加藤琢磨、宮原慶裕、珠玖洋
2. 発表標題 グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体リガンド（GITRL）付加による CD19 CAR-T細胞療法有効性向上の試み
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三輪啓志、藤原 弘、赤堀 泰、王 立楠、奥村悟司、田中義正、加藤琢磨、宮原慶裕、珠玖 洋
2. 発表標題 有効性向上を目指したB細胞腫瘍に対する新たなCD19 CAR-T細胞療法の開発研究
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪啓志、藤原 弘、赤堀 泰、王 立楠、奥村悟司、田中義正、加藤琢磨、宮原慶裕、珠玖 洋
2. 発表標題 Development of novel CD19 CAR-T cell therapy with enhanced antitumor efficacy against B cell malignancies
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪啓志、藤原 弘、赤堀 泰、王 立楠、奥村悟司、田中義正、加藤琢磨、宮原慶裕、珠玖 洋
2. 発表標題 Development of novel CD19 CAR-T cell therapy for B cell malignancies to improve its efficacy
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------