

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22552

研究課題名(和文) がんに対する養子免疫療法においてT細胞の疲弊誘導を抑制する人工キメラ分子の開発

研究課題名(英文) Development of a chimeric synthetic receptor to suppress T cell exhaustion for use in adoptive cancer 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・分野長

研究者番号：70706960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍抗原を認識するT細胞を体外で準備・増殖後、患者に輸注して腫瘍細胞を攻撃させる養子免疫療法の治療効果を高めるために、抗腫瘍T細胞に疲弊回避と長期生存能を付与するための遺伝子改変方法を探索した。疲弊シグナル解除は細胞内ドメインを欠くPD1分子を過剰発現することにより、長期生存能付与はサイトカインシグナルの活性化によりそれぞれ達成することとし、両機能を有する人工受容体分子を開発した。同人工受容体分子を発現させたキメラ抗原受容体導入T細胞は細胞増殖能・サイトカイン分泌能などの指標で優れた機能を獲得したことから、開発した人工遺伝子が目的とする機能をT細胞に付与できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞を特異的に攻撃するT細胞を体外で準備して患者に輸注する養子免疫療法は、近年一部の血液がんでは優れた効果が実証されたCAR-T細胞療法に代表されるように、難治性がんに対する有望な治療法であるが、多くのがんに対しては未だ治療効果が証明されていない。本研究開発の知見によりT細胞機能を高めることで、養子免疫療法の治療効果、適応がん疾患を拡大させられる可能性がある。

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 into a patient. To suppress T cell exhaustion and provide long-lived potential in antitumor T cells, we developed an artificial receptor that blocks PD1 signaling as well as activates cytokine signaling. The artificial receptor-expressing chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells showed increased STAT5 phosphorylation and accomplished superior proliferation upon antigen stimulation. Moreover, the artificial receptor-transduced CAR-T cells produced more cytokines when cultured with PDL1-positive tumor cells. These results demonstrate that the newly developed receptor provides T cells with resistance to exhaustion and long-surviving capacity.

研究分野：免疫学

キーワード：養子免疫療法 キメラ抗原受容体 T細胞疲弊 サイトカイン メモリーT細胞

1. 研究開始当初の背景

がん抗原を認識する T 細胞を体外で準備・増殖後、患者に輸注して腫瘍細胞を攻撃させる養子免疫療法は、CD19 に対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注目されているが、固形腫瘍における同治療法は一過性の反応にとどまるのが現状である。持続的な治療効果が阻害される要因として、腫瘍組織内で慢性的な抗原刺激を受ける T 細胞に疲弊 (exhaustion) が誘導され、抗腫瘍効果が減弱することが知られている。疲弊誘導には PD-1 などの免疫チェックポイント分子が関与しており、特にがん細胞は T 細胞のサイトカイン分泌に伴いそのリガンド (PD-L1) の発現を上昇させ、PD-1 による抑制シグナルを亢進させる (O' Rourke et al. Sci Trans Med 2017)。免疫チェックポイント分子阻害剤の腫瘍免疫における有効性は既に確立されており、養子免疫療法においても同治療法の併用が有効に働くことは容易に予想される。しかし一方で、PD-1 シグナルの阻害のみでは疲弊 T 細胞のエピジェネティック・レベルでのリモデリングは起こらないことがわかってきており (Pauken et al. Science 2016, Ghoneim et al. Cell 2016)、免疫チェックポイント分子阻害剤投与のみでは T 細胞疲弊を根本的に解除することはできないと考えられる。また疲弊シグナルの解除により T 細胞の増殖が過度に活性化された場合、終末分化状態に早期に至り、T 細胞の長期生存能が損なわれることが指摘されており、一過性エフェクター機能と長期生存能のバランスを考慮する必要がある (Odorizzi et al. J Exp Med 2015)。

T 細胞の長期生存能に関わるシグナルとして、例えばサイトカインシグナルの重要性が以前から知られている。より具体的にはサイトカイン受容体へのサイトカイン分子の結合に伴い活性化される JAK-STAT シグナルが、T 細胞の長期生存・エフェクター機能促進を担うが、これにはエピジェネティック変化を含めた広範な遺伝子発現変化が関わることがわかってきた (Vahedi et al. Cell 2012)。適切なサイトカインシグナルの付与により疲弊 T 細胞の性質をエピジェネティクス・レベルで修飾できる可能性があるが、サイトカインの全身投与は非特異的な免疫活性化に伴う副作用が大きいいため、抗腫瘍 T 細胞にのみシグナルを付与する仕組みが必要である。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では疲弊シグナルの抑制と、サイトカインシグナルの付与を同時に行うために、以下の開発を進めた。

(1) PD1 シグナルの阻害とサイトカインシグナルの付与を同時に行う人工システム(受容体)を開発する。

(2) 人工受容体を遺伝子レベルで導入した抗腫瘍 T 細胞が、疲弊シグナルを回避しながら優れた抗腫瘍効果を誘導できることを示す。

3. 研究の方法

抗腫瘍 T 細胞として、健常人由来の末梢血単核球に CD28 のシグナルドメインを有する CD19 に対する第二世代 CAR 遺伝子をレトロウイルスにより安定導入した細胞を用いた (Kagoya et al. J Clin Invest 2016)。各レトロウイルスプラスミドは PG13 パッケージング細胞に安定導入して、同細胞由来のウイルス液を T 細胞への遺伝子導入に用いた。健常人由来末梢血単核球を、抗 CD3 抗体 (クローン OKT3)、及び共刺激分子 CD80 を細胞表面に導入した K562 細胞と共培養することにより刺激を加えることで、T 細胞を増殖させた。遺伝子導入は培養開始 2 日後にレトロネクチンを用いて行った。

CD19 に対する CAR-T 細胞の抗原刺激に伴う細胞増殖の評価には、CD19 陽性の B 細胞性腫瘍細胞株である NALM6 を CAR-T 細胞と 1:1 で共培養することで行った。サイトカイン産生は、CAR-T 細胞を NALM6 細胞と 1:1 で共培養した上で、2 時間後に Brefeldin A を投与して細胞外への分泌を抑制した上でさらに 4 時間培養を行い、細胞内のサイトカイン発現をフローサイトメトリーにより検出した。

4. 研究成果

サイトカインシグナルの T 細胞機能への影響を詳細に調べるため、まずは同シグナルの下流分子である STAT3、STAT5 を個別に活性化させた時の T 細胞機能変化を解析した。STAT3 を単独で活性化させると、抗原刺激に伴う細胞増殖能、細胞傷害活性が高まるものの、その後の細胞死が促進した。一方で STAT5 の恒常的活性化では細胞傷害活性は変化しないものの、サイトカイン非依存性の長期的な細胞増殖能が上昇した。このことから T 細胞への長期生存能付与の観点からは、STAT5 シグナルがより重要であることが示唆された。そこで STAT5 を活性化できるように、サイトカイン受容体 A の膜貫通・細胞質ドメインを選択した。

PD1 シグナルの阻害については、細胞内ドメインを欠いた細胞外ドメインのみの PD1 を過剰発現させることで、ドミナント・ネガティブに働き、内在性の PD1 シグナルを抑制できることが報告されている (Cherkassky et al. J Clin Invest 2016)。そこで PD1 細胞外ドメインと、上記

のサイトカイン受容体 A のシグナルドメインを連結した人工受容体を開発した。まず同分子を発現させた T 細胞において、STAT5 のリン酸化が亢進していることを *in vitro* で確認した (図 1)。さらに、同キメラ分子を共発現させた CAR-T 細胞は、PDL1 陽性腫瘍細胞との共培養下で、コントロールと比較して増殖能、サイトカイン分泌能に優れており、目的とした機能を誘導できることを確認した (図 2、図 3)。

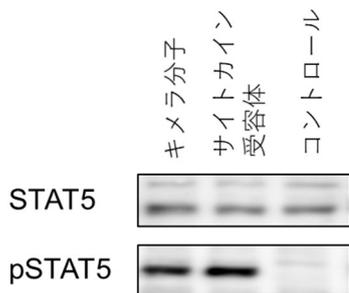


図 1. 人工受容体 (キメラ分子) を導入した T 細胞における、STAT5 のリン酸化亢進を確認した。

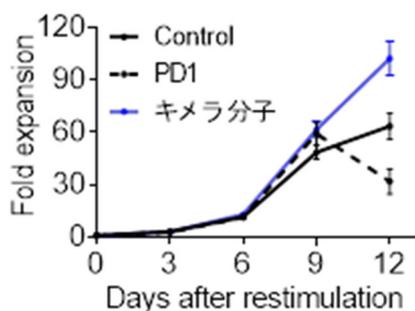


図 2. CD19 に対する CAR-T 細胞に PD1 分子そのもの、あるいは開発したキメラ分子を導入した上で CD19 陽性・PDL1 陽性の腫瘍細胞と共培養して、T 細胞増殖能を評価した。

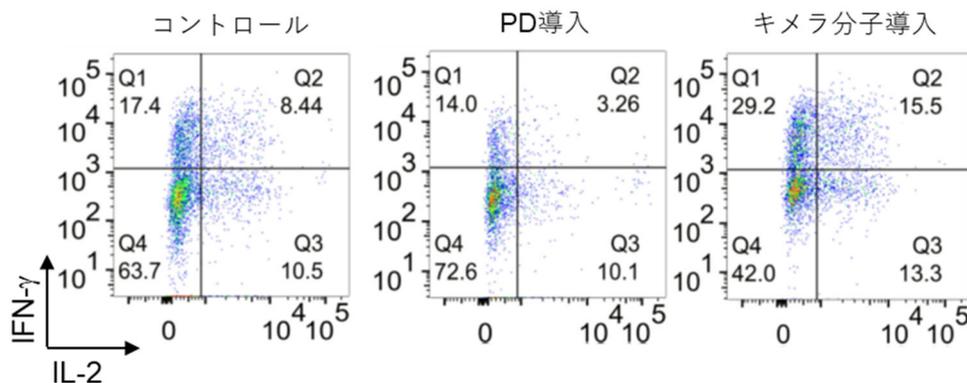


図 3. CD19 に対する CAR-T 細胞に PD1 分子そのもの、あるいは開発したキメラ分子を導入した上で CD19 陽性・PDL1 陽性の腫瘍細胞と共培養して、T 細胞によるサイトカイン分泌を解析した。キメラ分子導入により、サイトカイン分泌が上昇することが確認された。

一方、T 細胞疲弊の本態に関する報告が本研究課題進行中にも相次いで報告された。これらの知見からは、終末分化状態に至った疲弊 T 細胞は、PD1 阻害のみでは回復できない不可逆的な機能低下を来していることが示唆される (Miller et al. Nat Immunol 2019; Chen et al. Immunity 2019)。そこで今後は PD1 シグナルの阻害に限定せず、どのようなシグナルを付与、あるいは阻害することが免疫抑制環境下における T 細胞機能の維持にとって重要であるかという観点から、本研究をさらに発展させる計画である。

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 0件）

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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuki Kagoya
2. 発表標題 Genetic manipulation of antitumor T cells to elicit durable clinical response in adoptive immunotherapy
3. 学会等名 SITC 2019 World Immunotherapy Council's 3rd Young Investigator Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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

〔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