

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22655

研究課題名（和文）難治性食道癌に有効なCAR-T療法のための最適なT細胞選択

研究課題名（英文）T cell optimization for effective CAR-T cell therapy to refractory esophageal cancer

研究代表者

影山 慎一（Kageyama, Shinichi）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：80194695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：難治性食道癌に有用なCAR-T療法を開発するために、臨床試験で細胞輸注されたTCR遺伝子導入T細胞（TCR-T）のフェノタイプ解析、免疫機能解析、トランスクリプトーム解析（糖代謝・脂肪代謝関連遺伝子発現解析を含む）を網羅的に行い、臨床試験におけるin vivo持続性、臨床効果に関連する因子を探索した。

サイトカイン放出症候群（CRS）病態にはTCR-T輸注後の宿主由来のサイトカインが関与し、輸注TCR-T（製造T細胞）の分化形質が有意に関係していた。また、輸注後のTCR-T形質（CD39, CD244）と臨床反応が関与することが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移再発食道癌に対する有効な治療手段がないのが現状であるが、近年免疫療法への期待が高い。本研究はT細胞療法の基盤研究であり、新しいCAR-T細胞療法の臨床開発のための基盤研究である。CAR-T細胞療法ではサイトカイン放出症候群を避けながら有効性を向上させることが重要であり、本研究では臨床反応に関連する因子が特定された。

研究成果の概要（英文）：To develop a CAR-T therapy for refractory esophageal cancer, we comprehensively analyzed the phenotype, immune function, and transcriptome (including gene expression analysis related to glucose and fat metabolism) of TCR-gene transduced T cells infused in clinical trials to identify factors associated with in vivo persistence and clinical efficacy. Factors associated with in vivo persistence and clinical efficacy were explored, and subpopulations selected. The CRS (cytokine release syndrome) pathogenesis involved host-derived cytokines after TCR-T infusion and was significantly related to the differentiation traits of infused TCR-T (manufactured T cells). It was also inferred that TCR-T traits (CD39, CD244) and clinical response (CRS, tumor shrinkage) were involved after infusion.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：食道癌 がん免疫療法 T細胞治療

1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変 T 細胞 (CAR-T) の臨床効果が造血器腫瘍では目覚しいが、固形癌においては有効な臨床効果の報告はほとんどない。これは造血器腫瘍とは異なり、固形癌においては輸注 T 細胞自体と体内環境による抑制メカニズムが存在すると考えられる。そこで、輸注する T 細胞自体における臨床的な効果に関連する因子の特定を最先端の手法 (網羅的フェノタイプ、トランスクリプトーム解析) を用いて解析し、有効因子を選択した T 細胞の選択を行うことで、頻度の高い固形癌 (上皮系腫瘍) に対する有効な遺伝子改変 T 細胞輸注療法が確立できる。

日本において遺伝子改変 T 細胞輸注を最も多く実施した三重大学で行うことで、迅速に研究開発が進むものである。国外では米国を中心に CAR-T 遺伝子改変と TCR 遺伝子改変 T 細胞輸注の早期臨床試験が進んでいる。そのうち、CAR-T 療法においては、輸注細胞の体内増殖、血中維持及び血清 IL-15 値が臨床効果と相関のある因子として明らかにされている。最近では、米国のペンシルベニア大の研究グループは CD19-CAR-T 療法において慢性リンパ性白血病への効果が 26% であり、有効性と輸注細胞のトランスクリプトーム解析を 41 例で行っている。その結果、メモリー T 細胞、解糖系遺伝子、T 細胞疲労遺伝子と効果に関連が強いことを見出している。なお、TCR 遺伝子改変 T 細胞輸注に関する同様の解析の報告はまだない。固形癌症例においては、これまでに解析がなされていない領域であり、三重大グループは、日本で最大級の 38 例を対象にするものであり、世界的にも新規性の高い解析である。

2. 研究の目的

固形癌、特に難治性食道癌に有用な CAR-T 療法を開発するために、臨床試験で細胞輸注された TCR 遺伝子導入 T 細胞のフェノタイプ解析、免疫機能解析、トランスクリプトーム解析 (糖代謝・脂肪代謝関連遺伝子発現を含む) を網羅的に行い、臨床試験における in vivo 持続性、臨床効果に関連する因子を探索し、有効予測因子から CAR-T 遺伝子導入細胞作製にあたっての選択サブ集団を特定する。

有効予測因子をもつ選択サブ集団とした MAGE-A4・CAR-T 郡 (selective CAR-T) を作製し、免疫不全マウスによる食道癌治療モデルを用いて、その有効性 POC を確立する。

3. 研究の方法

本研究は、難治性食道癌に有用な CAR-T 療法を開発するために、既に臨床試験で細胞輸注された TCR 遺伝子導入 T 細胞のフェノタイプ解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析を網羅的に行い、臨床試験における in vivo 持続性、臨床効果に関連する因子を探索し、有効予測因子から遺伝子導入細胞作製にあたっての選択サブ集団を特定する。

臨床用作製済遺伝子改変 T 細胞の解析

1) フェノタイプ解析

リンパ球表面形質 (活性、分化、疲労マーカーパネル)

2) 免疫機能解析

細胞性免疫応答能 (抗原特異的サイトカイン産生能、ELISPOT)

3) トランスクリプトーム解析 全 RNA を抽出し、HiSeq を用いた whole transcriptome 解析 (mRNA シークエンス) を行い、遺伝子発現状況のデータマイニング解析を、臨床的背景をそろえた有効例 6 例と無効例 12 例で解析。有効例 6 例、無効例 12 例の遺伝子転写パターンの解析、異なる遺伝子特定

4) 糖代謝・脂肪代謝関連遺伝子発現解析

有効例 6 例、無効例 12 例の解糖系酵素、遺伝子転写パターンの解析、異なる因子特定

の研究成果から抽出した有効予測因子をもつ選択サブ集団とした MAGE-A4・CAR-T 郡 (selective CAR-T) を作製し、免疫不全マウスによる食道癌治療モデルを用いて、有効性 POC を確立。さらに、代謝調整薬との併用を用いた複合免疫細胞療法モデルを確立する。

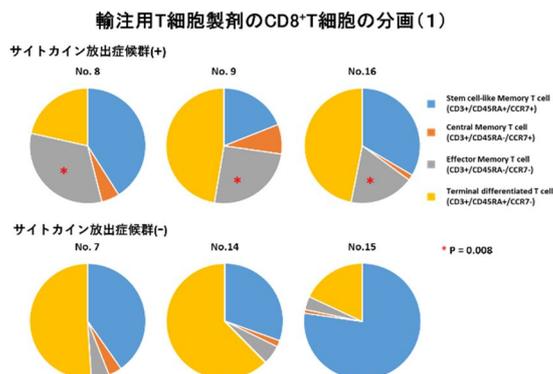
・方法 MAGE-A4/CAR-T 導入 T 細胞から抽出因子でソートされた細胞群を輸注する。メタボローム解析で得られた結果に基づき、糖代謝改善剤と併用する。(非選択細胞投与をコントロール、腫瘍サイズ、生存期間を計測する)

以上から、固形腫瘍 (食道癌) に有効な MAGE-A4 新規 CAR-T 療法に用いる T 細胞の最適な調製法、選択法、複合的治療 (T 細胞の代謝改善薬との併用) のための rationale 構築を取得する。

4. 研究成果

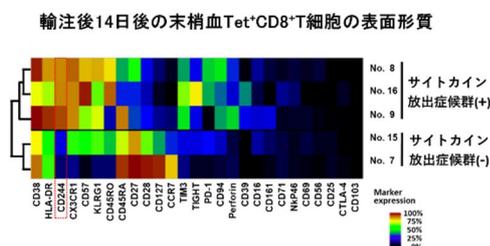
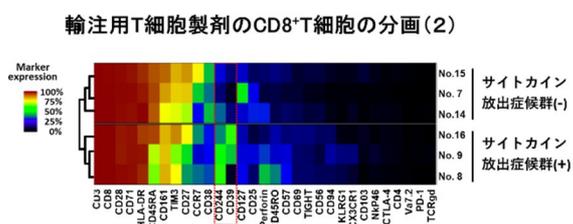
本研究は、難治性食道癌に有用な CAR-T 療法を開発するために、既に臨床試験で細胞輸注された TCR 遺伝子導入 T 細胞のフェノタイプ解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析を網羅的に行い、臨床試験における in vivo 持続性、臨床効果に関連する因子を探索し有効予測因子から遺伝子導入細胞作製にあたっての選択サブ集団を特定するものである。

NY-ESO-1/TCR-T 細胞輸注を実施した 6 例におけるサイトカイン放出症候群 (CRS) 発症、腫瘍縮小の臨床反応と輸注 TCR-T 製品、輸注後の末梢血 TCR-T の免疫細胞学的解析を行った。6 例の輸注前 TCR-T 製品 (tetramer(+)細胞) の表面形質では、CRS 発症 3 例は非発症 3 例に比べ、CD45RA(+), CCR7(-)の effector memory T-cell (TEM) subset が有意に多かった (p=0.008) (下図)



Mass cytometry 解析では、CRS 発症 3 例において NY-ESO-1-tetramer+ /CD8⁺T 細胞は CRS 非発現例に比べて CD244 と CD39 が高発現であった。(下図左)

輸注 14 日後 PBMC では、CRS 2 例では tetramer+/CD8⁺T 細胞は CD67(+), CD244(+), KLRG1(+)-cluster (differentiated T-cell subset) に分布していた。(下図右)



以上より、CRS 病態には TCR-T 輸注後の宿主由来のサイトカインが関与するが、輸注 TCR-T (製造 T 細胞) の分化形質が有意に関与していた。また、輸注後の TCR-T 形質変化と臨床反応 (CRS、腫瘍縮小) が関与することが推察された。

これらより T 細胞製造において CD39 と CD244 と最小化する製造プロトコルを確立することにより CRS をきたしにくい T 細胞を製造することにより臨床的に安全でより有効性が期待できる食道癌に対する CAR-T 細胞を作製が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa T, Kageyama S, Miyahara Y, Okayama T, Kokura S, Wang L, Sato E, Yagita H, Itoh Y, Shiku H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Safety and antibody immune response of CHP-NY-ESO-1 vaccine combined with poly-ICLC in advanced or recurrent esophageal cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 3081-3091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-02892-w	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 Ishihara M, Kageyama S, Miyahara Y, Ishikawa T, Ueda S, Soga N, Naota H, Mukai K, Harada N, Ikeda H, Shiku H.	4. 巻 20
2. 論文標題 MAGE-A4, NY-ESO-1 and SAGE mRNA expression rates and co-expression relationships in solid tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-07098-4	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 Ishihara M, Tono Y, Miyahara Y, Muraoka D, Harada N, Kageyama S, Sasaki T, Hori Y, Soga N, Uchida K, Shiraishi T, Sato E, Kanda H, Mizuno T, Webster GA, Ikeda H, Katayama N, Sugimura Y, Shiku H.	4. 巻 69
2. 論文標題 First-in-human phase I clinical trial of the NY-ESO-1 protein cancer vaccine with NOD2 and TLR9 stimulants in patients with NY-ESO-1-expressing refractory solid tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 663-675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02483-1	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 Kakimoto T, Matsumine A, Kageyama S, Asanuma K, Matsubara T, Nakamura T, Iino T, Ikeda H, Shiku H, Sudo A	4. 巻 17
2. 論文標題 Immunohistochemical expression and clinicopathological assessment of the cancer testis antigens NY-ESO-1 and MAGE-A4 in high-grade soft-tissue sarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 3937-3943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.10044.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 影山慎一
2. 発表標題 TCR gene-transduced T-cell therapy for sarcoma
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会（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
研究分担者	宮原 慶裕 (Miyahara Yoshihiro) (10582083)	三重大学・医学系研究科・産学官連携講座教授 (14101)	
研究分担者	加藤 琢磨 (Kato Takuma) (60224515)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	

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
---------	---------