

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07674

研究課題名（和文）免疫抑制回避機構を有するoff-the-shelf型CAR導入 T細胞

研究課題名（英文）Off-the-shelf immunotherapy with CAR-gamma delta T cells

研究代表者

加藤 琢磨（Kato, Takuma）

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60224515

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）：本研究では 型T細胞のアロ未反応性を利用したoff-the-shelf化を介して固形がんに対するCAR-T細胞療法のPOCを確立する目的で、細胞内にCD28とCD3zetaのシグナル伝達ドメインを含むCEA特異的CARならびにGITRLを同時に発現する 型T細胞（それぞれ、CEA.CAR-gdTとCEA.CAR-GITRL-gdT）を作成した。CEA.CAR-gdTは腫瘍縮小効果を発揮し、GITRL導入によりCEA.CAR-gdTの抗腫瘍効果はさらに増強されることを明らかにした。さらにNAC存在化にCAR-Tを調製することで、疲弊抵抗性のCAR-gdTを調製する培養法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCAR-Tでは、患者自身の末梢血からCAR-Tを調整するため、CAR-Tの質・量・均一性が安定せず、治療効果に大きな影響を及ぼす。さらに、病勢の進行した患者も含め、より多くの患者に対応するためには、調整時間を短くコストを下げなければならない。そこでアロ反応性を持たない 型T細胞を用いてCAR-Tを作製し、off-the-shelf化によるCAR-T輸注療法の適応拡大を目指した。その結果、CAR導入 型T細胞はCAR-T輸注療法の生物製剤としての有効性を示した。

研究成果の概要（英文）：Gamma/delta T cells were successfully transduced with a CAR specific to CEA with signaling domains of CD3zeta and CD28 (CEA.CAR-gd T cells). In a xenograft mouse model, CEA.CAR-gdT cells suppressed CEA+ tumor growth through a limited time window. Provision of GITRL co-stimulation enhanced anti-tumor function of CEA.CAR-gd T cells, the result of which imposes additional measures to be adopted in CAR- T cells for an allogeneic adoptive immunotherapy. Therefore, CEA.CAR-gd T cells were prepared in the presence of NAC. NAC-pretreated CAR-T cells produced more IFN-g, enhanced serial killing function. These results suggest that supplementation of NAC during CAR-gd T cell preparation may be one of ways to obtain exhaustion resistant CAR-gdT cells which may have higher in vivo tumor control ability.

研究分野：免疫学

キーワード：キメラ抗原受容体 抗性 T細胞 off-the-shelf アロ反応性 移植片対宿主反応 抗酸化因子 疲弊抵抗性

1. 研究開始当初の背景

近年、CD19 を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞 (CAR-T) 輸注療法の臨床試験において、造血器腫瘍に対して既存の治療法ではなしえなかった高い奏効率を達成したことから、2017 年には CD19 を標的とした 2 つの CAR-T 細胞療法が米国 FDA で承認され、2018 年には本邦でも承認申請がなされている。しかし、従来の CAR-T では、固形がんにおける腫瘍細胞集団の異種性 (Heterogeneity) と腫瘍抗原の動的な変動 (Antigen loss) や、がん微小環境における免疫抑制機構に対応しきれず、十分な治療効果は得られていない。また、患者自身の末梢血から CAR-T を調整するため、CAR-T の質・量・均一性が安定せず、治療効果に大きな影響を及ぼす。さらに、病勢の進行した患者も含め、より多くの患者に対応するためには、調整時間を短くコストを下げなければならない。従来 CAR を導入する細胞として、抗 CD3 と抗 CD28 で刺激増殖させた $\alpha\beta$ TCR を発現する末梢血中の T 細胞 ($\alpha\beta$ 型 T) が用いられてきた。 $\alpha\beta$ 型 T は、MHC Class I 拘束性に抗原を認識し活性化するために、アロ反応性を示し同種細胞を利用することは困難である。一方、同じく末梢血中には $\gamma\delta$ TCR を発現し MHC 非拘束性に内因性・外因性のリン酸化抗原 (PAg) を認識し活性化する自然免疫系細胞に近似の T 細胞 ($\gamma\delta$ 型 T) が存在し、ストレスを受けた細胞 (ウイルス感染、腫瘍化細胞) の排除に寄与していることや、がん組織への浸潤が認められている (Nat Med 2015;21:9358, Oncoimmunol 2017;6:e1284723)。また、自然免疫系細胞としての性質を有する $\gamma\delta$ 型 T は、CD16 依存性の強い ADCC 活性を示す (Int J Cancer 2008;122:2526)。さらに、認識様式が MHC 非拘束性であることからアロ反応性を欠くことが予想され、事実 AML 患者に対する同種造血幹細胞移植においてアロ $\gamma\delta$ 型 T は長期間にわたって GVHD を発症しないことが示されている (Bone Marrow Transplant 2007;39:751)。これらの特性から、固形がんに対する CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T を用いた細胞輸注療法や、メバロン酸代謝阻害薬投与による PAg 発現増強を介して患者個体内の $\gamma\delta$ 型 T を増殖・活性化し、同時にがん細胞表面抗原 (TAA) に対する抗体を投与する ADCC 療法が開発されている。しかし臨床効果は限定的である (Reviewed in Front Immunol 2018;9:4099, Front Immunol 2018;9:605)。

2. 研究の目的

我々はヒトと同様の CEA 発現様式 (気道 / 消化管の管腔側への局在的発現) を示す CEA トランスジェニックマウス (CEA-Tg) を用いて、 $\alpha\beta$ 型 T から調整した CEA 特異的 CAR-T の CEA 陽性固形がん治療に対する有効性と安全性を明らかにしてきた (Oncoimmunol 2016;5:e1211218)。また、GITR シグナルは制御性 T 細胞 (Treg) の免疫抑制作用に抵抗性を付与することを明らかにしている (Cancer Res 2008;68:5948)。そこで、本研究では $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いて、免疫抑制に抵抗性を付与する GITR シグナル伝達可能な GITR リガンド (GITRL) を搭載したキメラ抗原受容体導入 T 細胞 (CAR-T) を調整し、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞のアロ未反応性を利用した off-the-shelf 化を介して固形がんに対する CAR-T 細胞療法の POC を確立する目的で、細胞内に CD28 と CD3zeta のシグナル伝達ドメインを含む癌胎児性抗原 (CEA) 特異的 CAR ならびに GITRL を同時に発現する $\gamma\delta$ 型 T 細胞 (それぞれ、CEA.CAR-gdT と CEA.CAR-GITRL-gdT) を調製し、抗腫瘍効果とその作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CAR 導入 $\gamma\delta$ T 細胞の調整

比重遠心法にて調製した健常人末梢血単核球を新規プロドラッグ Tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino)ethylidene-1,1-bisphosphonate (PTA) にて刺激し IL-2 存在下に拡大培養をおこなった。CAR の導入は CD28 および CD3 のシグナル伝達ドメインから成り立つ CAR レトロウイルスベクターを用いて感染・導入した。感染・導入条件は既報のレトロウイルスベクターを用いた TCR 導入条件に基づいて行った (Iwamura K, Kato T et al. Gene Ther. 2012;19:959)。CEA 特異的 CAR の発現確認は、ビオチン化 CEA と蛍光標識アビジンを用いて行った。

(2) invitro における機能評価

固相化 CEA または CEA 発現腫瘍株 (BXPC-3, MKN45) を用いて CEA.CAR-gdT と CEA.CAR-GITRL-gdT のサイトカイン産生ならびに腫瘍細胞傷害性を測定した。

(3) in vivo における機能評価

膵がん細胞株 BxPC-3 (CEA+) MIA PaCa-2 (CEA-) を皮下接種した NOG マウスに、接種後 7 日目に GITRL 搭載 CEA 特異的 CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞 (CEA.CAR-gdT あるいは CEA.CAR-GITRL-gdT) を尾静脈投与した。腫瘍径ならびに体重変化を指標とした GvHD の程度を観察した。

4. 研究成果

(1) 次世代型ビスフォスホン酸プロドラッグ PTA を用いた $\gamma\delta$ 型 T 細胞の拡大培養

十分でなおかつ純度の高い $\gamma\delta$ 型 T 細胞を得る目的で、次世代型ビスフォスホン酸プロドラッ

グ PTA と IL-7 ならびに IL-15 を用いてヒト末梢血単核球細胞集団刺激した結果、zoledronate を用いた場合に比較して高い収率で $\gamma\delta$ 型 T 細胞を得ることが出来た。また、GVHD の原因となる $\alpha\beta$ 型 T 細胞の混入も極めて低かった。

(2) CEA 特異的 CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の調製と in vitro 機能評価

そこで、細胞内に CD28 と CD3zeta のシグナル伝達ドメインを含む癌胎児性抗原 (CEA) 特異的 CAR を従来の方法に基づいて導入した所、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞に 90 % 以上の効率で CAR を導入することができた (CEA.CAR-gdT)。また導入した CAR の機能性を評価する目的で CEA 発現量の異なる種々の腫瘍株と CEA.CAR-gdT を共培養し、gdT 由来の IFN-g を測定したところ、CEA 発現量の低い腫瘍によっても十分な IFN-g 産生が誘導された。また、in vivo において抗腫瘍効果に密接に関係するシリアルキリング能力を測定したところ、3 ラウンドのシリアルキリング活性が認められた。

(3) ヒト腫瘍株接種 NOG マウスを用いた CEA 特異的 CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の治療効果

CEA.CAR-gdT の治療効果を評価する目的で NOG マウスに CEA 陽性腫瘍株 (BxPC-3) を皮下接種し、担癌 7 日目に CEA.CAR-gdT を尾静脈より投与して腫瘍縮小効果を測定した。その結果、コントロールの CAR 非導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞に比較して優位な腫瘍縮小効果を認めた。

(4) GITR シグナルによる CEA 特異的 CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の抗腫瘍機能の増強

CEA.CAR-gdT の抗腫瘍機能をさらに高めるために GITRL を CAR コンストラクトに含めた。GITR シグナルは制御性 T 細胞の機能を抑制することから、GITR シグナルドメインを付加するのではなく GITRL を導入することで CEA.CAR-gdT のさらなる活性化と制御性 T 細胞の機能抑制をも目指した。GITRL 導入 CEA.CAR-gdT (即ち CEA.CAR-GITRL-gdT) は CEA.CAR-gdT に比してより強い抗腫瘍効果を発揮した。

(5) NAC 添加による疲弊抵抗性 CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の調製

CEA.CAR-gdT も CEA.CAR-GITRL-gdT のいずれも抗腫瘍効果は限定的であり、その原因の一つとして CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞が腫瘍局所で慢性的抗原刺激により疲弊が誘導されていることにある。T 細胞疲弊には慢性的抗原刺激によるミトコンドリアの酸化ストレスが関与することが明らかになりつつある。そこで酸化ストレスを弱める細胞内グルタチオンレベルを上昇させることが出来る NAC を CAR 導入 $\gamma\delta$ 型 T 細胞調製時に添加することで疲弊抵抗性が付与できるかを検討した。その結果、NAC 添加により細胞内グルタチオンレベルの上昇に伴って CEA.CAR-gdT のミトコンドリア呼吸能の昂進が認められ、in vitro のおける CEA.CAR-gdT のサイトカイン産生能や細胞傷害活性を増強できた。

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 2件）

1. 著者名 Sato, T., T. Tsuchikawa, T. Kato, Y. Amaishi, S. Okamoto, U. Mineno, Y. Yakeuchi, K. Sasaki, T. Nakamura, K. Umemoto, T. Suzuki, W. Wang, Y. Wang, K.C. Hatanaka, T. Misuhashi, Y. Hatanaka, H. Shiku, S. Hirano	4. 巻 15
2. 論文標題 Tumor Growth Suppression of Pancreatic Cancer Orthotopic Xenograft Model by CEA-Targeting CAR-T Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15030601	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 -

1. 著者名 Ito A, Akama Y, Sato-Takayama N, Saito K, Kato T, Kawamoto E, Gaowa A, Park EJ, Takao M and Shimaoka M	4. 巻 14
2. 論文標題 Possible metastatic stage-dependent ILC2 activation induces differential functions of MDSCs through IL-13/IL-13Ra1 signaling during the progression of breast cancer lung metastasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 3267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14133267	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yizheng Wang, Linan Wang, Satoshi Okumura, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Yoshimasa Tanaka, Takuma Kato and Hiroshi Shiku
2. 発表標題 Potential for the use of gene-modified V 9V 2 T cells for cancer immunotherapy
3. 学会等名 日本サイトカイン・インターフェロン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yizheng Wang, Linan Wang, Satoshi Okumura, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Yoshimasa Tanaka, Takuma Kato and Hiroshi Shiku
2. 発表標題 Potential for the use of gene-modified V 9V 2 T cells for cancer immunotherapy
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yizheng Wang, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineino,Takuma Kato, and Hiroshi Shiku
2 . 発表標題 N-acetylcysteine trigger exhaustion resistant CAR-T cell for solid tumor immunotherapy
3 . 学会等名 日本癌学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Yizheng Wang, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineino,Takuma Kato, and Hiroshi Shiku
2 . 発表標題 N-acetylcysteine trigger exhaustion resistant CAR-T cell for solid tumor immunotherapy
3 . 学会等名 日本がん免疫学会
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
研究 分 担 者	王 立楠	三重大学・医学系研究科・助教	
	(Wang Linan)		
	(00589484)	(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
---------	---------