

令和 5 年 6 月 5 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：20K07656

研究課題名（和文）エネルギー代謝に注目した多機能遺伝子改変 T細胞の追求

研究課題名（英文）Pursuit of multifunctional gene-modified gamma-delta T cells focusing on energy metabolism

研究代表者

石原 幹也（Ishihara, Mikiya）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20707369

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）： $\gamma\delta$ -TCRとCD8を発現する遺伝子改変 T細胞（GMC）は、抗原特異的細胞傷害性と優れた持続性を示した。GMCのサイトカイン分泌は非遺伝子改変 $\gamma\delta$ -T細胞（NGMC）よりもATP合成酵素阻害剤により強く阻害された。メタボロームおよびトランスクリプトーム解析により、GMCはTCAサイクルと酸化リン酸化をより利用していることが明らかになった。細胞外フラックスによるOCR/ECAR比は、GMCのミトコンドリア機能の利用が高いことを支持していた。以上より、 $\gamma\delta$ -TCRを遺伝子導入した $\gamma\delta$ -T細胞は、ミトコンドリアのエネルギー代謝を優先的に利用し、優れた持続性をもたらすと結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
患者由来の細胞を用いた養子免疫療法では、以前に行われた抗悪性腫瘍薬の治療による自己リンパ球への影響により、思うような細胞増殖が得られないことがあるため、同種リンパ球を用いた養子免疫療法の開発が検討されている。 $\gamma\delta$ -T細胞に $\gamma\delta$ -T細胞受容体（TCR）を遺伝子導入したT細胞においては、ミスマッチTCRにより予期しない有害事象を生じるリスクがある。このため、同種 $\gamma\delta$ -T細胞は、有害事象のリスクが低い細胞製剤となることが期待される。十分な治療効果には持続性も肝要であるが、本研究は $\gamma\delta$ -TCRを遺伝子導入した $\gamma\delta$ -T細胞の持続性の機序を説明するものであり、この成果は更なる臨床開発につながるものである。

研究成果の概要（英文）：Genetically modified $\gamma\delta$ T cells expressing a tumor antigen-specific $\gamma\delta$ -TCR and CD8 coreceptor (GMC) showed target-specific killing and excellent persistence. To clarify the mechanisms, we investigated the metabolic characteristics of GMC. Cytokine secretion of $\gamma\delta$ -TCR-stimulated GMCs was more strongly inhibited by ATP synthase inhibitors than that of $\gamma\delta$ -TCR-stimulated nongene-modified $\gamma\delta$ -T cells (NGMCs). Metabolomic and transcriptomic analyses revealed that GMCs utilize the TCA cycle and oxidative phosphorylation more than NGMCs. The higher oxygen consumption rate-to-extracellular acidification rate ratio by extracellular flux analysis supports higher utilization of mitochondrial oxidative metabolism in $\gamma\delta$ -TCR-stimulated GMCs. In conclusion, $\gamma\delta$ -T cells transduced with $\gamma\delta$ -TCR use mitochondrial energy metabolism preferentially, leading to excellent persistence.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード： $\gamma\delta$ -T細胞 $\gamma\delta$ -TCR ミトコンドリア機能

1. 研究開始当初の背景

T細胞はT細胞受容体(TCR)によって型と型とに大別されるが、 α -T細胞は末梢血中に10%未満と少ない細胞集団である(Immunol Rev. 120: 137-83, 1991)。 α -T細胞はTCRを介してmajor histocompatibility complex(MHC)に結合した腫瘍由来ペプチドを認識して特異的応答を示すことから、事前にTCRの自己反応性を予測することにより、自己反応性の高いTCRの使用を避けることもできるため、 α -TCRを遺伝子導入したT細胞療法はオフターゲット効果の低い治療となると期待される。しかし、腫瘍においては腫瘍抗原やMHCの発現低下によってT細胞に対して抵抗性となることが知られており、一つの腫瘍変異抗原のみを認識するT細胞療法では長期の抗腫瘍効果が得られない可能性がある。治療効果を上げるための方法としてMHC非拘束性に腫瘍を認識して細胞傷害活性を示し、抗原提示能や抗体依存性細胞傷害能も有していることが報告されているT細胞を用いることが挙げられる(Oncotarget 8: 8900-9, 2017, Nat Rev Cancer 19: 392-404, 2019)。このため、T細胞に型TCR遺伝子やCAR遺伝子を導入して、T細胞の本来持つ腫瘍認識能に他の腫瘍認識能を付加することは、認識抗原欠失による腫瘍の免疫からの退避の機会を減らし、これまでのT細胞を用いたT細胞療法の問題点の解決にもつながる。また、T細胞に型TCRを遺伝子導入した場合には内在性のTCRと導入したTCRから成るミスマッチTCRによって想定していない自己反応性を示す可能性がある(Nat Med 16: 565-70, 2019)。T細胞には内在性の型TCRの発現が無いため型TCR遺伝子導入でもミスマッチTCRの形成の無い安全性の高い治療につながる。また、以前我々が行った検討において、腫瘍抗原特異的な α -TCRとCD8コアセプターを遺伝子導入したV9+V2+T細胞は、抗原特異的な細胞傷害性と優れた持続性を示した。長期間の持続性は、 α -T細胞製剤の臨床開発を後押しする可能性がある。

2. 研究の目的

従来、T細胞はナイーブ、エフェクター、メモリーに大別されていたが、メモリーT細胞の中でCD45RO(-), CCR7(+), CD45RA(+), CD62L(+), CD27(+), CD28(+) and IL-7R (+)のフェノタイプを持つ分画が、自己複製能を持ちセントラルメモリー、エフェクターメモリー、エフェクターの各T細胞を生み出す多分化能を持つstem cell-like memory T細胞であることが報告された(Nat Med 17: 1290-7, 2011)。このstem cell-like memory T細胞は高い増殖能、抗腫瘍活性を示すことから、遺伝子改変T細胞療法に有用であると考えられる。一方、T細胞をエネルギー代謝の面から検討した研究も進展し、エフェクター細胞では解糖優位であるが、メモリーT細胞ではミトコンドリアでの脂肪酸代謝優位となることが示された(Nature 460: 103-7, 2009)。また、最近、CAR-T細胞の細胞内ドメインが28zの場合解糖優位であるが、4-1BBzの場合ミトコンドリアでの脂肪酸酸化による酸化的リン酸化優位となり、よりメモリーフェノタイプで持続性に優れるとの報告がある(Immunity 44: 380-90, 2016)。そのためstem cell-like memory like 遺伝子改変T細胞作製は最も効果の高いT細胞療法に繋がる可能性があるが、これらの検討はT細胞についておこなわれたものであり、遺伝子改変T細胞についての知見は我々の知る限りない。

本研究においては、腫瘍抗原特異的な α -TCRとCD8コアセプターを発現する遺伝子組み換えV9+V2+T細胞の優れた持続性メカニズムを明らかにするために、遺伝子導入した受容体と内在性型TCRの刺激によるT細胞の代謝の違いを機能を、エネルギー代謝の面から追求した。

3. 研究の方法

ビスホスホネートの prodrug である tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino) ethylidene-1, 1-bisphosphonate (PTA)を用いてV9+V2+T細胞を誘導し、非遺伝子導入 α -T細胞(nongene-modified α -T cell, 以下 NGMC)をコントロールとして、型TCRを遺伝子導入したV9+V2+T細胞(gene-modified α -T cell, 以下 GMC)の特性を検討した。型TCRの刺激にはアゴニスティック抗体を、TCR刺激にはペプチドとMHCの複合体を用いた。

まず、TCR刺激時に細胞培養液に解糖系阻害薬(2-deoxyglucose)や酸化的リン酸化阻害薬(oligomycin)脂肪酸酸化阻害薬(etomoxir)を添加して、これらの阻害薬によるサイトカイン産生能への影響を比較した。続いて、TCR非刺激及び刺激後のGMC及びNGMC由来のRNAサンプルを用いてRNAマイクロアレイを行った。RNAマイクロアレイはアジレントテクノロジー社に外部委託し、得られたRNA発現データはGene Set Enrichment Analysis(GSEA)で解析した。

エネルギー代謝解析には細胞外フラックスアナライザーSeahorse XF HS Miniを用いて酸素消費速度(OCR)と細胞外酸性化速度(ECAR)の比を検討した。

4. 研究成果

-TCR 刺激非遺伝子修飾 T 細胞 (NGMC) と -TCR 刺激 GMC によるサイトカイン分泌は、解糖阻害剤によって同様に抑制されたが、-TCR 刺激 GMC のサイトカイン分泌は -TCR 刺激 NGMC よりも ATP 合成酵素阻害剤によって強く阻害された。メタボロームおよびトランスクリプトーム解析から、GMC は NGMC よりも TCA サイクルと酸化的リン酸化をより活発に利用していることが示された。より高い酸素消費率対細胞外酸性化率比は、-TCR 刺激 GMC におけるミトコンドリアの酸化的代謝の高い利用を支持する。結論として、-TCR を導入した T 細胞は、有望な持続性を示し、ミトコンドリアのエネルギー代謝への依存性が高かった。

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の結果、NGMC と比較して、NY-ESO-1 特異的 TCR を遺伝子導入した T 細胞 (NE1-GMC) では、非刺激および TCR 刺激時の両方でミトコンドリア電子伝達系関連遺伝子の発現が有意に高く (非刺激時 $p=0.042$ 、刺激時 $p=0.004$)、また、TCR 刺激時には酸化的リン酸化関連遺伝子の発現も有意に高かった ($p=0.006$)。非刺激時の OCR/ECAR 率は NGMC、NE1-GMC とともに同程度であったが、TCR 刺激後では NE1-GMC の OCR/ECAR 率が NGMC に比べて有意に増加していた ($p < 0.001$)。OCR/ECAR 率の増加は、他の TCR を遺伝子導入した GMC でも観察された。

-TCR と CD8 を発現する遺伝子改変 T 細胞 (GMC) は、抗原特異的細胞傷害性と優れた持続性を示した。GMC のサイトカイン分泌は非遺伝子改変 T 細胞 (NGMC) よりも ATP 合成酵素阻害剤により強く阻害された。メタボロームおよびトランスクリプトーム解析により、GMC は TCA サイクルと酸化的リン酸化をより利用していることが明らかになった。細胞外フラックスによる OCR/ECAR 比は、GMC のミトコンドリア機能の利用が高いことを支持していた。以上より、-TCR を遺伝子導入した T 細胞は、ミトコンドリアのエネルギー代謝を優先的に利用し、優れた持続性をもたらすと結論付けた。

本研究は TCR を遺伝子導入した T 細胞の持続性の機序を説明するものであり、この成果は更なる臨床開発につながるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 石原 幹也、三輪 啓志、藤原 弘、赤堀 泰、加藤 琢磨、田中 義正、俵 功、珠玖 洋
2. 発表標題 Energy metabolism spread to non-glycolysis in TCR transduced T cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 幹也、三輪 啓志、藤原 弘、赤堀 泰、加藤 琢磨、田中 義正、俵 功、珠玖 洋
2. 発表標題 NY-ESO-1特異的 TCR遺伝子導入 T細胞のエネルギー代謝
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 幹也、三輪 啓志、藤原 弘、赤堀 泰、加藤 琢磨、田中 義正、俵 功、珠玖 洋
2. 発表標題 NY-ESO-1特異的 TCR遺伝子導入 T細胞の機能とエネルギー代謝特性
3. 学会等名 第6回 日本サルコーム治療研究学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikiya Ishihara, Hiroshi Miwa, Yasushi Akahori, Hiroshi Fujiwara, Takuma Kato, Yoshimasa Tanaka, Isao Tawara and Hiroshi Shiku
2. 発表標題 Function and metabolism of NY-ESO-1-specific TCR transduced V α 2+ cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
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	三輪 啓志 (Miwa Hiroshi) (00209967)	三重大学・医学系研究科・産学官連携講座准教授 (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
---------	---------