

疲弊 T 細胞の形成初期段階に関わる分子機構の解明

愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫応答研究分野

籠谷 勇紀

腫瘍抗原を特異的に認識するT細胞を体外で準備・増幅し、患者に輸注する養子免疫療法は、一部のがんでは高い治療効果が実証されているものの、固形がんを中心とする多くの再発・難治性腫瘍では持続的な治療効果が得られておらず、治療効果を高める開発改良を要する。輸注された抗腫瘍T細胞は腫瘍細胞を認識してエフェクター機能を発揮するが、慢性的な抗原刺激下で徐々にその機能が低下する（T細胞の疲弊）。疲弊T細胞は輸注前とは異なるエピジェネティックプロファイルを形成することが知られており、これが機能低下の一因であると考えられている。そこで本研究では、治療への応用側面も意識して、T細胞疲弊に中心的に関わるエピジェネティック制御因子を遺伝子改変（ノックアウト）を通じて探索し、疲弊を起こしにくい抗腫瘍T細胞の形成につながる因子を探索する計画とした。

疲弊に関わるエピジェネティック因子の探索にあたっては、特異的薬剤による標的阻害と、CRISPR/Cas9による標的遺伝子ノックアウトを併用した。後者は疲弊T細胞で高発現するエピジェネティック遺伝子をあらかじめ絞り込んだ上で、Cas9タンパクと *in vitro* 合成ガイドRNAからなるリボヌクレオタンパク複合体（RNP複合体）を電気穿孔法によりヒトT細胞に導入する手法を用いた。図1に示すように、健康人由来のヒトT細胞にCD19に対するキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor: CAR）遺伝子を導入後、3-4日間の間隔で連続的に抗原刺激を与えた。この連続刺激によりT細胞は分化を進めるとともにサイトカイン分泌能も低下し、*in vivo* におけるT細胞疲弊とある程度類似した状態を誘導することができる。3回刺激後のT細胞の分化状態、及びサイトカイン分泌能を解析したところ、gene AをノックアウトされたCAR-T細胞がコントロールと比較して未分化メモリー形質とサイトカインIL2の分泌能が顕著に維持されることがわかった（図2）。複数の健康人ドナー検体でも同様の知見が確認され、gene Aは抗腫瘍T細胞の機能低下と関わる重要なエピジェネティック因子であると考えられた。

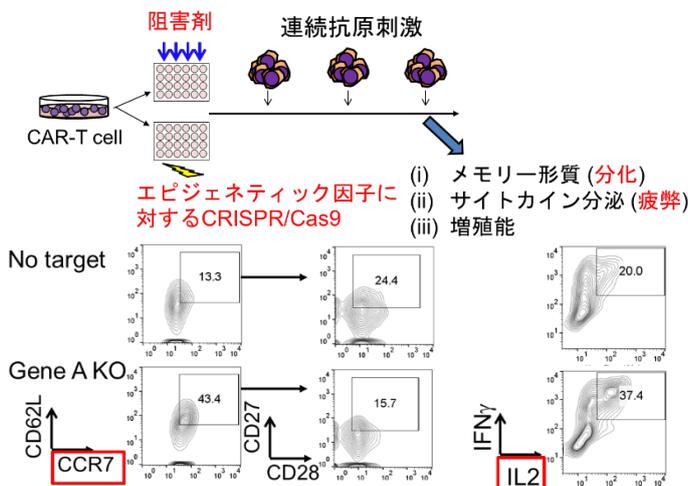


図1. 抗腫瘍T細胞の連続抗原刺激に伴う機能低下を抑制するエピジェネティック因子の探索。薬剤による阻害、遺伝子レベルでのノックアウトを併用して標的探索を行った。

図2. CAR-T細胞においてgene Aをノックアウトすると、抗原刺激に伴い分化が進行するT細胞の未分化性維持、及びサイトカイン分泌能の亢進に寄与することがわかった。

この結果を踏まえて、さらにgene AノックアウトCAR-T細胞の*in vivo*における機能解析を進めた。ノ

ックアウトCAR-T細胞を放射線照射後の免疫不全マウス (NSGマウス)に移植し、in vivoにおけるT細胞の生存をモニターした。この移植実験系では、未分化な状態のメモリーT細胞が体内における生存能に優れ、また経過とともにマウスの抗原をヒトT細胞が認識・攻撃するxenogeneic GVHD (xenogeneic GVHD)が起ることが知られている (Gattinoni et al. Nat Med 2011)。末梢血中のヒトT細胞の経時的解析では、gene AをノックアウトしたCAR-T細胞が有意に高い増生を示した。次に、in vivo腫瘍モデルを用いた抗腫瘍効果への影響を解析した。CD19に対するCAR-T細胞を用いて、CD19陽性B細胞性腫瘍細胞株であるNALM-6を移植して発症させたNSGマウスを治療するモデルを用いた (Kagoya et al. Nat Med 2018)。上記の腫瘍なしのNSGマウスへの移植と同様に、やはりgene AをノックアウトしたCAR-T細胞はマウス体内での優れた生存・増殖能を示し、腫瘍の進行をコントロールと比較して有意に抑制した (図3)。以上より、ノックアウトCAR-T細胞がin vitroにおける単なる表面抗原形質の変化のみならず、実際に高い長期生存能を獲得していることが示された。

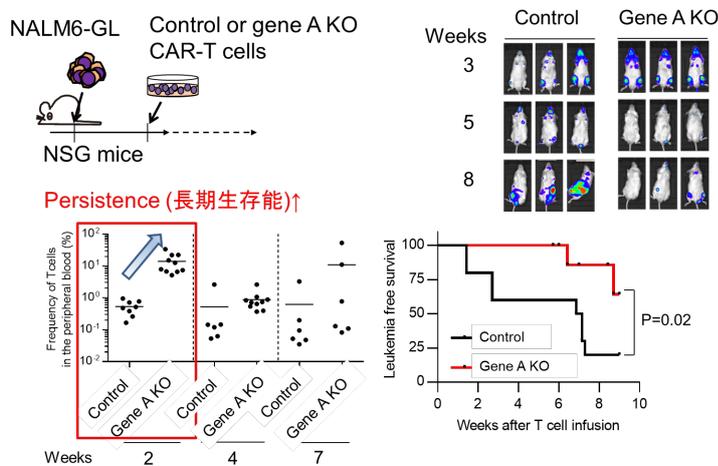


図3. CD19に対するCAR-T細胞を用いて、NSGマウスに移植したNALM6細胞株を治療するモデル。Gene Aのノックアウトにより、末梢血中のCAR-T細胞の持続が長期間に渡り改善し、その結果として有意に優れた抗腫瘍効果を示した。

Gene Aノックアウトによる遺伝子発現プロファイルを、3ドナー検体を用いてRNAシーケンスにより網羅的に解析した。有意な発現変化 (false discovery rate<0.05)が認められた遺伝子群について、unsupervised clusteringを行ったところ、gene AノックアウトCAR-T細胞はドナーの違いに関係なく独立したクラスターを形成した (図4)。コントロールと比較して2000個程度の遺伝子で有意な発現変化が見られており、単一遺伝子の改変においても広範なプロファイル変化を誘導できることが示された。また個別遺伝子レベルで見ると、メモリー形成に重要な転写因子TCF7、LEF1、未分化メモリーT細胞で高発現する表面抗原分子であるCCR7やIL7Rが遺伝子レベルで発現亢進を来しており、上記で示した表面抗原解析、及びin vivoにおける長期生存能獲得と合致する結果であった。さらに、Gene Aノックアウトによるエピジェネティック変化を網羅的に解析するため、CAR-T細胞に連続抗原刺激を加えた後、ATACシーケンスによる解析を行った。遺伝子発現プロファイルと同様に、7000以上の広範なゲノム領域で有意なエピジェネティックプロファイルの変化が見られた。特に上記と同様に、未分化メモリーで高発現する遺伝子群 (TCF7, CCR7, IL7Rなど)のプロモーター領域におけるエピゲノム変化を確認することができた。

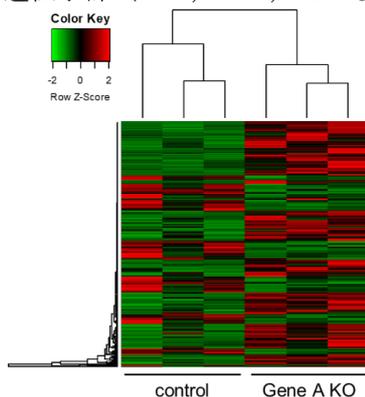


図4. 健常人由来T細胞から作製したCAR-T細胞において、連続抗原刺激後の遺伝子発現プロファイルを、gene Aノックアウトあり、なしで、3ドナーについて解析した。有意な発現変化が行った遺伝子群についてのクラスタリングにおいて、ドナーの違いに関わらず、gene AノックアウトCAR-T細胞はコントロールと異なるクラスターに分類された。

最後に、T細胞におけるgene Aノックアウトが他の抗腫瘍T細胞においても応用可能であるか、検討を進めた。養子免疫療法として、CAR-T細胞のような遺伝子改変T細胞に加えて、腫瘍に浸潤するT細胞を体外で増殖させて輸注する、腫瘍浸潤T細胞(tumor-infiltrating lymphocyte (TIL))療法が挙げられる。同治療法では、末梢血を用いるCAR-T細胞と異なり、T細胞がしばしば腫瘍内で既にかん抗原に持続的に曝露され、機能低下に陥っていることから、十分な細胞数を輸注しても長期生存が得られず、結果として持続的な治療効果につながらないという問題点がある。Gene Aのノックアウトがこの問題を解決できる可能性があるか見積もるため、卵巣癌患者由来のTIL検体の供与を受け、上記と同様の方法によりTILにおけるgene Aノックアウトを行った。図5に示すように、TIL検体はメモリーマーカーの大半を既に失っていたが、gene A KOにより、一部のマーカーが回復する、すなわち表面抗原形質上は若返りを示すデータが得られた。またこのT細胞ではサイトカイン分泌の向上や、メモリー形成に関わる転写因子であるTCF7の発現上昇も見られており、実際に機能改変が起きていることが示唆された。

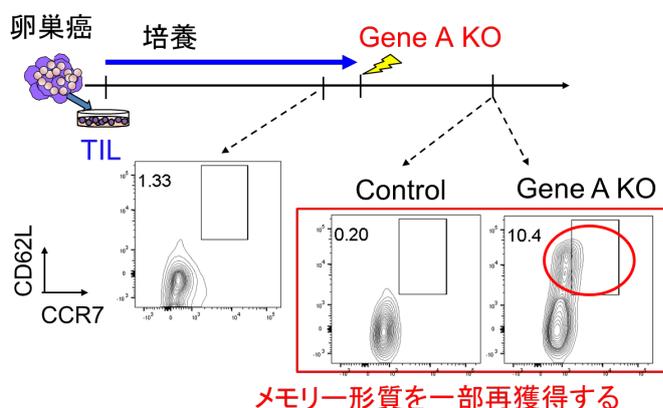


図5. 卵巣癌由来TILを用いてgene Aをノックアウトしたところ、メモリー形質(CCR7, CD62Lなど)の回復が観察された。すなわち終末分化を遂げたT細胞においてもgene Aノックアウトにより、メモリーT細胞の長期生存能が再獲得される可能性が示唆された。

以上より、抗腫瘍T細胞の終末分化、疲弊による機能低下に関わる鍵遺伝子として、gene Aを同定した。この遺伝子の修飾(ノックアウト)により、抗腫瘍T細胞の効果を標的抗原に関わらず高められる可能性があり、有望な治療標的であると考えられる。以上の成果は、Blood誌に掲載された。

[発表論文]

Yoshikawa T, Wu Z, Inoue S, Kasuya H, Matsushita H, Takahashi Y, Kuroda H, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y. Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy. Blood. 2022;139(14):2156-2172.