

代謝リプログラミングによるステムセルメモリー T 細胞の誘導とがん免疫療法への応用

近藤泰介

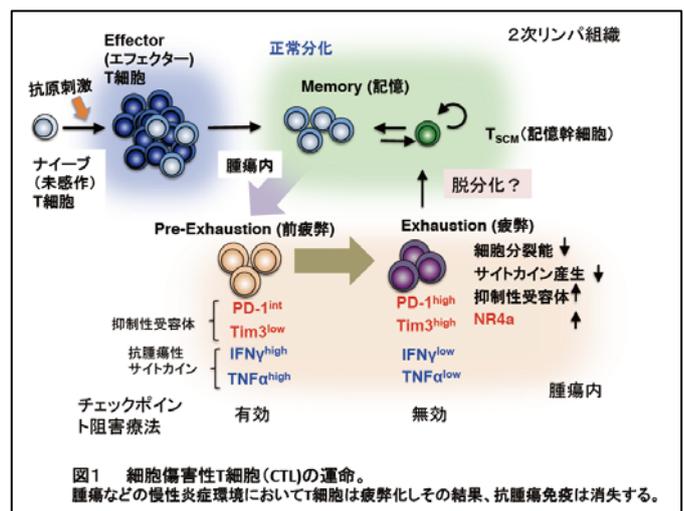
慶應義塾大学医学部 微生物学免疫学教室

【研究の背景】

現在、免疫チェックポイント療法は抗腫瘍免疫療法で中心的な位置を占め、極めて精力的に研究されている。しかし腫瘍免疫の主体である細胞傷害性 CD8⁺ T 細胞 (CTL) は、がん微小環境における慢性的な炎症状態では持続的な T 細胞受容体 (TCR) の刺激やがん微小環境因子によって**疲弊 (exhaustion)**と呼ばれる現象が生じ、抗腫瘍効果が減弱する (Philip *et al. Curr Opin Immunol.* 2019; 58: 98-103)。疲弊化した T 細胞は PD-1 や CTLA-4、Tim-3、Lag3、SOCS1 といった抑制性の分子を高発現し、その結果、TCR 刺激に応答することができないため、インターフェロン γ (IFN γ) や TNF α などの抗腫瘍性サイトカインの分泌や細胞障害活性が低下していることが知られている。初期には免疫チェックポイント阻害は疲弊化 T 細胞を再活性化すると考えられたが、最新の研究では CTLA-4 や PD-1 抗体による免疫チェックポイント阻害によって再活性化できる T 細胞は pre-exhausted (前疲弊) T 細胞と呼ばれ、まだ完全に疲弊しておらず、脱分化可能な状態であると考えられている (図 1) (Wherry *et al. Nat Rev Immunol.* 2015; 15: 486-499)。キメラ型抗原受容体 (CAR)-T 療法においても、T 細胞の疲弊化と治療効果が強く関連していることが報告されている (Fraiotta *et al. Nat Med,* 2018; 24: 568-71)。これらの T 細胞疲弊のメカニズムを解明し、疲弊を抑制し、さらに疲弊状態から回復して機能的 T 細胞へ「脱分化」させることができれば、全く新しい抗腫瘍免疫療法を開発できる可能性がある。

【目 的】

T 細胞移入療法において、T 細胞の疲弊を抑制し、高い治療成績を期待する研究は多くなされているが、疲弊化 T 細胞を機能的な T 細胞へ脱分化させる方法は確立されていない。新規メモリー T 細胞サブセットである幹細胞メモリー T (T_{SCM}) 細胞が発見され、新たな腫瘍免疫 T 細胞の素材として注目されている。T_{SCM} 細胞は一旦活性化されたメモリー T 細胞でありながら、ナイーブ T 細胞様の表面マーカー表現型を示し、長命で抗原刺激に応答して急速に増殖し、多数のエフェクター T 細胞を産生する。我々は一旦活性化した T 細胞 (エフェクター T) をヒト Notch-ligand, hDLL1 を発現する OP9 細胞と共培養することにより、T_{SCM} 様細胞 (iT_{SCM}) に転換できることを示した¹⁾。iT_{SCM} 細胞はヒト化マウスモデルにおいて従来の活性化 T 細胞よりもはるかに強い抗腫瘍能力を示した²⁾。本研究提案ではこれまで我々が開発してきた方法を活用し、新たに疲弊 T 細胞を iT_{SCM} 様の正常メモリー T 細胞に再分化する方法の開発を目指す。



【方 法】

我々は試験管内で Notch リガンドを発現させたストローマ細胞 (OP9-DL1) と活性化 T 細胞を共培養することで TSCM 様細胞 (iTSCM) を誘導する方法を確立した¹⁻³⁾。本研究提案では iTSCM の誘導分子機構を明らかにし、活性化 T 細胞を iTSCM 様の正常メモリー T 細胞に分化転換する方法の開発を目指す。その方法として 1. 遺伝子発現解析によって iTSCM 化の中心となる候補遺伝子を検索する。すでに有力な候補として幹細胞の性質を付与するとされる FoxM1 を同定し、その機能を解析している。2. メモリー T 細胞分化にはミトコンドリア代謝が強く関連することが知られており、良質なメモリー T 細胞ほどミトコンドリアの酸化的リン酸化が亢進している (Ramon et al. *Cell* 2017; 171: 385-397)。我々は iTSCM における fused 型ミトコンドリアの増加と酸化的リン酸化の亢進を確認している。今後、メタボローム解析により iTSCM のエネルギー源を明らかにすると同時に、このような代謝変化をもたらす根本原因を阻害剤や選択的な代謝基質の添加によって明らかにする。さらに CAR-T 細胞を iTSCM 化することで新たな CAR-T 療法を開発し、ヒト白血病モデルを用いて、有用性を実証する。

【結 果】

我々は CAR-T 細胞を Notch リガンドを発現するフィーダー細胞と共培養することで iTSCM 様の CAR-T 細胞、CAR-iTSCM 細胞を誘導することに成功した。また CAR-iTSCM 細胞の誘導にはミトコンドリアの代謝プログラミングが重要であること特定した。Notch シグナルはミトコンドリア新生および脂肪酸合成を誘導し、これらの特性は iTSCM 細胞誘導過程で重要なイベントであった。さらに我々は Notch シグナルの下流因子である FOXM1 を同定し、FOXM1 がこれらの代謝学的変化および iTSCM 細胞の誘導に重要であることを見出した。Notch リガンドを発現するフィーダー細胞との共培養で作成された CAR-iTSCM 細胞と同様に FOXM1 の強制発現で CAR-iTSCM と同等の細胞が得られ、これらの TSCM 細胞様 CAR-T 細胞はヒト白血病モデルマウスにおいて強い抗腫瘍効果を示した⁴⁾。

【考 察】

免疫チェックポイント阻害剤との関連から、現在「メモリー T 細胞」は免疫学、腫瘍免疫学のなかで最も精力的に研究されている分野のひとつである。特に疲弊の分子機構の解明とその回避方法の究明についての研究が進められている (*Annu Rev Immunol.* 2019; 37:457-495. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):486-99.)。疲弊 T 細胞発生の直接の原因としては持続的な TCR 刺激による DNA のメチル化、ヒストン修飾等のエピジェネティクスな変化が重要と考えられる。これまでに疲弊化した T 細胞を脱分化させて良質なメモリー T 細胞に転化させる方法は報告されていない。唯一腫瘍内 T 細胞を iPS 化して T 細胞に戻す方法が報告されているが (Nishimura, T., et al. *Cell Stem Cell* 2013, 12, 114-126, Vizcardo, R., et al. *Cell Stem Cell* 2013 12, 31-36)、iPS 細胞を作成する効率や時間、治療コストの点で改良の余地がある。試験管内で T 細胞から人工的に TSCM を誘導する方法としては Wnt シグナル活性化剤や Akt 阻害剤など様々な方法が報告されている (Gatinoni et al. *Nat Med.* 2009; 15: 808-13, *EBioMedicine.* 2016; 4 :50-61) が、すべてナイーブ T 細胞を出発点としており、一旦活性化されたエフェクターやメモリーから誘導する方法を確立したのは我々が世界初である。今回我々は、活性化して疲弊分子を発現した T 細胞を TSCM のような良質なメモリー T 細胞に転換しうる可能性を初めて示した。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CAR-T 療法は抗癌剤耐性の白血病患者に対して強い治療効果を示し、期待されている T 細胞移入療法であるが、CAR-T 細胞移入後に患者体内で移入細胞が消失するなど、持続的な効果が見られず、再発も見られる。本研究は従来の CAR-T 細胞を長寿命なメモリー T 細胞へ変化させることで、長期的な治療効果を狙うものであり、より効果的な細胞移入療法の開発が期待できる。

【参考・引用文献】

1. **Taisuke Kondo**, Rimpei Morita, Yuumi Okuzono, Hiroko Nakatsukasa, Takashi Sekiya, Shunsuke Chikuma, Takashi Shichita, Mitsuhiro Kanamori, Masato Kubo, Keiko Koga, Takahiro Miyazaki, Yoshiaki Kassai, Yoshimura Akihiko. Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. *Nature Communications*. 8:15338, 2017.
2. **Taisuke Kondo**, Yukl Kimura, Shanduka Chukwuma, Sana Hibino, Setsuko Omasa-Mise, Makoto Ando, Takashi Akamai, Mana Iizuka, Riot Sakai, Rime Morita, Akihiko Yoshimura. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy, *Cancer Science*, 109(7):2130-2140, 2018.
3. **Taisuke Kondo**, Youku immure, Makoto Ando, Shinseki Chakma, Akihiko Yoshimura. *In vitro* conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells. *Methods in Molecular Biology*, 2018.
4. **Taisuke Kondo**, Makoto Ando, Nao Nagai, Watery Tomaso, Tankan Spirit, Bimbi Liu, Setsuko Mise-Omaha, Mari Ikeda, Shanduka Chukwuma, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Mitsuyo Ohmura, Noriyo Hayakawa, Takako Hishiki, Ryosuke Uchibori, Keiya Ozawa, and Akihiko Yoshimura*. The NOTCH-FOXM1 Axis Plays a Key Role in Mitochondrial Biogenesis in the Induction of Human Stem Cell Memory-like CAR-T Cells. *Cancer Research*, 2019.