

STAT3 シグナル活性化によるがんに対する養子免疫療法の治療効果改善

籠谷勇紀

愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫応答研究分野

【研究の背景】

がんに対する養子免疫療法は、CD19 を標的としたキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) 導入 T 細胞療法が B 細胞性腫瘍に著効したが、他のがん、特に固形腫瘍に対しては顕著な有効性が示されていない^{1, 2)}。加えて、CD19 に対する CAR-T 細胞療法においても、完全寛解後の再発例が少なくないこと、慢性リンパ性白血病や非ホジキンリンパ腫といった疾患群に対しては効果が十分でないこともわかってきた^{3, 4)}。輸注した T 細胞が長期間で生存することが持続的な抗腫瘍効果にとって重要であり、特にメモリー T 細胞の分化状態が長期生存能と密接に関わることがわかっている⁵⁾。また持続的抗原刺激を受けた抗腫瘍 T 細胞は体内で疲弊状態に陥り、十分な細胞傷害活性を誘導できないことも課題である⁶⁾。T 細胞機能は複数の転写因子群による遺伝子発現プロファイルの形成により規定されており、特定の転写因子活性を外的に修飾することによりその機能を大きく改変させられることが可能であることから、上記の諸課題を解決できる遺伝子改変方法の確立が期待されている。

【目 的】

上記の背景に基づき、本研究では抗腫瘍 T 細胞を遺伝子レベルで改変し、その治療効果を高めることを目的とした。特にサイトカイン刺激で誘導される STAT3 はメモリー T 細胞の形成やエフェクター機能と密接に関わることがわかっており⁷⁾、この転写活性を利用して T 細胞の自己複製能、長期生存能を向上させることを目指す。具体的には、以下の項目に沿って、研究を進めることとした。

1. STAT3 シグナルの抗腫瘍 T 細胞における役割を明らかにする。
2. STAT3 活性を CAR-T 細胞療法の治療効果改善に活用するための遺伝子修飾方法を検討する。

【方 法】

1. ヒト T 細胞の培養・遺伝子導入

ヒト T 細胞は、健康人由来の末梢血単核球を刺激・増殖させて用いた。T 細胞の刺激は、抗 CD3 抗体 (クローン OKT3) の単鎖可変領域フラグメントを CD8 α 分子の膜貫通・細胞内ドメインと連結して HLA 陰性の白血病細胞株 K562 の細胞表面に発現させ、同時に共刺激分子 CD80 を導入することにより作製した K562-OKT3/80 細胞と共培養することにより行った。細胞培養は RPMI1640, 10% fetal bovine serum にサイトカイン IL-2 を 100 IU/ml で添加して行った。CD19 に対する CAR 遺伝子は、クローン FMC63 由来の単鎖可変領域フラグメントに CD28, CD3 ζ の細胞内ドメインを連結した第二世代 CAR を用いた。STAT3 遺伝子は、P2A 配列により truncated NGFR 遺伝子 (遺伝子導入細胞の識別のための表面マーカーとして使用) 及び CAR 遺伝子と連結し、レトロウイルスプラスミド pMX に挿入した。これらのプラスミドはパッケージング細胞 PG13 に安定導入した後、同細胞のウイルス上清液をレトロネクチン (タカラバイオ) を用いてプレートにはりつけ、ヒト T 細胞に導入した。

2. T 細胞の網羅的遺伝子発現プロファイル解析

CAR-T 細胞の遺伝子発現プロファイルは、Novaseq 6000 を用いた RNA シークエンスにより解析した。得られたシークエンスデータは HISAT2 によりヒトゲノムにマッピングを行った後、HTSeq により各遺伝子ごとのリードカウントを計算した。2 群間

で発現変化が起こっている遺伝子は、EdgeR により抽出した。

【結 果】

1. STAT3 活性化 CAR-T 細胞の機能解析

STAT3 の恒常的活性化による T 細胞機能変化を観察するため、一部の T 細胞性リンパ腫で報告されている、STAT3 の活性化型変異体(STAT3 Y640F)を CD19 に対する CAR 遺伝子と連結して、STAT3 シグナルが恒常的に活性化される CAR-T 細胞を作製した⁸⁾。同様に、T 細胞機能と深く関与することが知られている STAT5 についても、恒常的活性化変異体(STAT5 N642H)を準備して、CAR-T 細胞の機能変化を解析した。STAT3 の恒常的活性化は抗原刺激に伴う細胞増殖能を亢進させたが、これは一時的な増殖であり、長期間の細胞生存を評価するとむしろコントロール CAR-T 細胞よりもアポトーシスが亢進することが確認された(図 1)。また STAT3 の活性化により CD62L、CD28 といった未分化メモリーで高発現する表面抗原分子の発現が顕著に亢進した一方、細胞傷害活性も亢進しており、未分化メモリー、エフェクター T 細胞双方の形質を獲得していることが示唆された。また、Y640F 以外の活性化型変異体として STAT3 D661V、さらに STAT3 を活性化させる機能が報告されている融合遺伝子である NCOR2-ROS1 遺伝子を T 細胞に導入して機能解析を行ったが、やはり同様に、抗原刺激依存性の増殖亢進、非抗原刺激下での生存能低下が観察された。

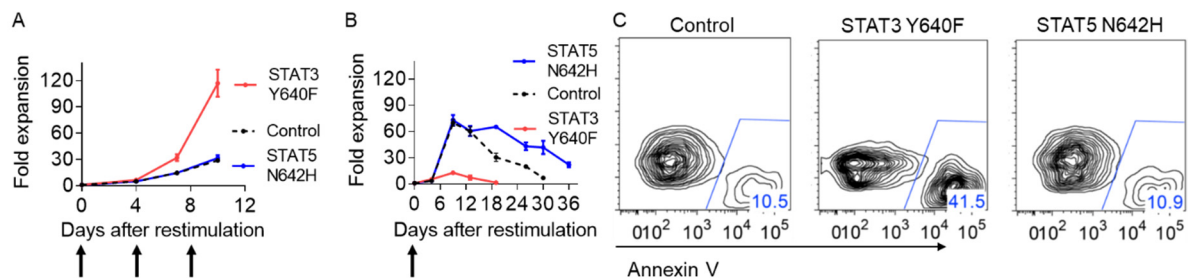


図 1. ヒト T 細胞に、CD19 に対する CAR 遺伝子とともに STAT3, STAT5 の変異遺伝子を個別に共導入し、連続的な抗原刺激による増殖能(A)、単回刺激後の長期的な細胞生存を解析した(B)。また長期培養後の T 細胞のアポトーシス割合を Annexin V 染色で評価した(C)。

2. STAT3 活性化による T 細胞の遺伝子発現プロファイル変化

STAT3 活性化により誘導される T 細胞機能変化のメカニズムを明らかにするために、CAR-T 細胞の遺伝子発現プロファイルを RNA シークエンスにより網羅的に解析した。同 CAR-T 細胞を CD19 陽性白血病細胞である NALM-6 で再刺激した後、3 日後に CD8+CAR+ 分画の RNA を採取した。STAT3 活性化型 CAR-T 細胞は、コントロールと比較して 5641 遺伝子で有意な発現変化を認め(FDR q value<0.05)、大幅なプロファイル変化が誘導された。これとは対照的に、STAT5 活性化型 CAR-T 細胞では有意な発現変化遺伝子は 11 個にとどまっていた。3 群において有意な発現変化を示した遺伝子群によるクラスタリングを行ったところ、STAT3 活性化 CAR-T 細胞のみがドナーの違いに関わらず独立したクラスターに分類された(図 2)。STAT3 の活性化により有意な発現変化が起こる具体的な遺伝子では、メモリー T 細胞に特徴的な転写因子(TCF7, LEF1)や表面抗原遺伝子(SELL, CD28)が高発現を示した一方で、細胞傷害活性に関わるエフェクター分子(GZMB, PRF1)も高発現していた。

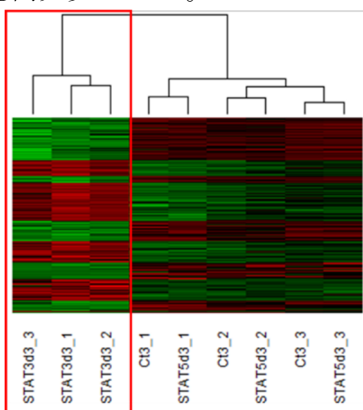


図 2. CD19 に対する CAR-T 細胞に STAT3, STAT5 変異遺伝子を共発現させた上で CD19 による再刺激を加え、3 日後の遺伝子発現プロファイルを RNA シークエンスにより解析した。3 群の比較で有意な変化(adjusted p value<0.01)についてヒートマップを描いたところ、STAT3 変異遺伝子導入 CAR-T 細胞がドナーの際に関わらず別のクラスターに分類された。

3. STAT3 活性化 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果

STAT3 活性化 CAR-T 細胞の *in vivo* における抗腫瘍効果を評価するため、上記で作製した CD19 に対する CAR-T 細胞を用いて、CD19 陽性白血病細胞 NALM6 を移植した免疫不全マウス(NSG マウス)に輸注して治療効果を評価した。NALM6 にはルシフェラーゼ遺伝子を導入しておき、*in vivo* imaging system (IVIS) により、腫瘍量を定期的にモニターした。STAT3 の恒常的活性化により抗腫瘍効果が改善することが期待されたが、図 3 に示すように、今回行った実験条件では有意な改善効果は見られなかった。

STAT3 活性化によって T 細胞の一過性の増殖能は亢進するものの、長期的には細胞死を促進してしまい、持続的な抗腫瘍効果の改善にはつながらないと考えられるため、細胞毒性を軽減するための追加修飾が必須である。STAT3 活性化 CAR-T 細胞は抗原刺激後の増殖能において優れていることから、抗原刺激に伴い T 細胞に付与されるシグナル伝達経路と STAT3 の活性化が何らかの相乗効果を有すると予想した。そこで、CAR や T 細胞受容体刺激により T 細胞で活性化される代表的なシグナルである MAPK シグナルの恒常的活性化を STAT3 活性化 CAR-T 細胞に追加で付与することを試みた。KRAS 遺伝子の活性化型変異 KRAS G12V は恒常的な MAPK のリン酸化を誘導する。実際、KRAS 遺伝子の変異は末梢性 T 細胞リンパ腫でも報告されていることから、T 細胞の生存能においても重要な役割を果たしていることが示唆される⁹⁾。同遺伝子を STAT3 Y640F、CAR 遺伝子とタンデムにつないだレトロウイルスプラスミドを末梢血 T 細胞に導入して抗原刺激後の形質を評価したところ、KRAS G12V 遺伝子の付加により、STAT3 により誘導されるメモリーマーカーの過剰発現は大幅に低減するものの、やはりコントロール CAR-T 細胞と比較して有意に未分化状態の維持に優れていた(図 4A)。一方、細胞増殖については STAT3 単独の活性化ではやはり経時的に細胞毒性が出現したのと対照的に、KRAS、STAT3 同時導入 CAR-T 細胞は持続的な増殖能を維持し、長期的にはコントロール CAR-T 細胞よりも優れていた。すなわち STAT3 活性化による細胞毒性を抑えることができた。

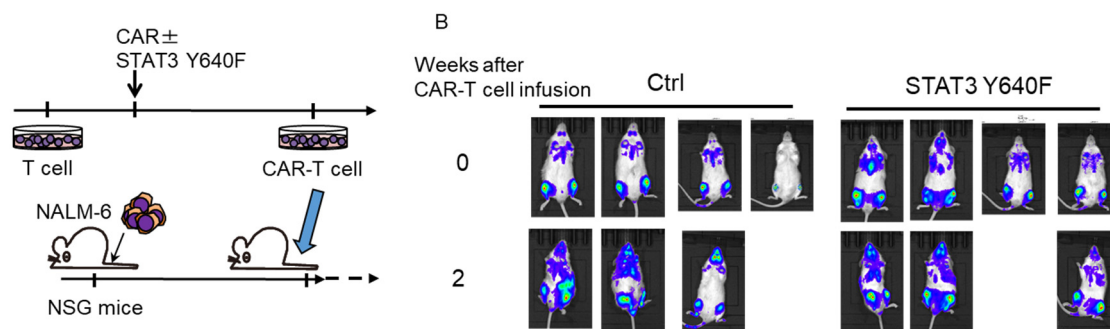


図 3. NSG マウスに CD19 陽性白血病細胞 NALM6 を輸注した後、コントロールまたは STAT3 Y640F 共発現の CAR-T 細胞を輸注して、治療効果を IVIS により経時的に評価した。

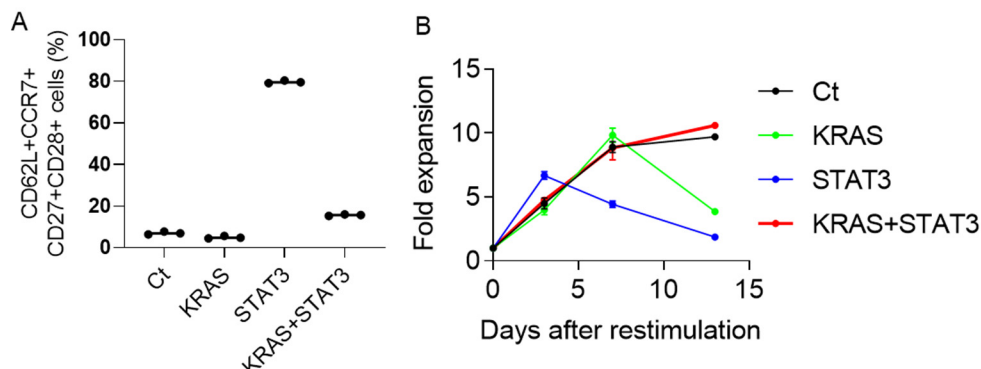


図 4. CD19 に対する CAR 遺伝子に STAT3 Y640F、KRAS G12V 遺伝子を単独、または同時に連結して T 細胞に導入し、抗原刺激後のメモリー形質(A)、増殖能(B)を評価した。STAT3 と KRAS を同時導入された CAR-T 細胞は、細胞増殖能を保持しながら、T 細胞の未分化性形質において優れていた。

【考 察】

上記の結果に示されるように、STAT3 活性化は T 細胞のメモリー形質を亢進させる一方で、エフェクター分子の遺伝子レベルでの発現上昇の誘導を通して細胞傷害活性も高めるという、二重の性質変化を引き起こした。これらは、例えば STAT3 を誘導するサイトカインである IL-21 がメモリー形成・エフェクター機能の双方に関わる多機能分子であることと合致する結果である¹⁰⁾。しかし、*in vivo* の腫瘍治療モデルでは STAT3 の活性化は抗腫瘍効果の改善にはつながらず、これは抗原非刺激下においては STAT3 活性化がむしろ T 細胞のアポトーシス亢進に働くため、総合的な抗腫瘍効果という点で優位性が消失するためと考えられる。従って STAT3 活性化による細胞傷害活性の増強という利点を生かしながら、アポトーシス誘導を抑制する仕組みを共導入する必要がある。図 4 に示したように、KRAS 活性化がこの点で有効である可能性があり、今後は STAT3、KRAS 同時導入 CAR-T 細胞の *in vivo* における抗腫瘍効果を評価する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

養子免疫療法、特に CAR-T 細胞療法は再発・難治性腫瘍の治癒を目指せる有望な治療法であり、この治療効果を高めるための遺伝子改変は難治性悪性腫瘍に対する新規治療法開発としての臨床的な意義が大きい。本研究結果が臨床に応用できるかどうかは、*in vitro* での機能解析では不十分であり、*in vivo* における複数の腫瘍モデルを用いた検証が今後不可欠である。

【参考・引用文献】

1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-48.
2. Hou B, Tang Y, Li W, Zeng Q, Chang D. Efficiency of CAR-T Therapy for Treatment of Solid Tumor in Clinical Trials: A Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2019;2019:3425291.
3. Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-59.
4. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 2018;24(5):563-71.
5. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):671-84.
6. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3130-44.
7. Siegel AM, Heimall J, Freeman AF, Hsu AP, Brittain E, Brenchley JM, et al. A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. *Immunity*. 2011;35(5):806-18.
8. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, Tabbo F, Gaudiano M, Chiesa N, et al. Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015;27(4):516-32.
9. Nicolae A, Xi L, Pham TH, Pham TA, Navarro W, Meeker HG, et al. Mutations in the JAK/STAT and RAS signaling pathways are common in intestinal T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2016;30(11):2245-7.
10. Croce M, Rigo V, Ferrini S. IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *J Immunol Res*. 2015;2015:696578.