

T 細胞疲弊の制御によるリプログラミング法の開発と固形がん治療への応用

安藤 眞

慶應義塾大学医学部 微生物学免疫学教室

【研究の背景】

がん免疫の主体である細胞傷害性 CD8+T 細胞はがん微小環境下で、慢性的な抗原刺激によって「疲弊化」し抗腫瘍効果が減弱する。Chimeric Antigen Receptor (CAR) T 細胞療法は血液がんでは大きな成果が得られたが、疲弊化に起因する治療効果の低下により、固形がんに対しては未だ十分な治療効果は認められない。一方、幹細胞様メモリーT (T_{SCM}) 細胞は最も幼若なメモリーT 細胞で、ミトコンドリア優位な代謝により効率的な自己複製や長期生存が可能であり、強力な抗腫瘍活性を有する(Ando et al. 2020. Immunol Med.)。よって T 細胞疲弊を回避し、より抗腫瘍活性の高い T 細胞へ「脱分化」させることが、固形がんに応用可能な新たながん免疫療法の開発に繋がると考えられる。申請者の研究室では、世界で初めて NR4A が疲弊化の中心となる転写因子であることを示した(Chen et al. 2019. Nature)。一方で、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。申請者らは一旦活性化したヒト CAR T 細胞を T_{SCM} 様 CAR T (CAR-iT_{SCM}) 細胞に転換できる手法を確立した(Kondo et al. 2017. Nat Commun., Kondo et al. 2018. Cancer Sci., Kondo et al. 2020. Cancer Res., Ando et al. 2021. Cancer Res Commun.)。これによって部分的に疲弊した T 細胞を T_{SCM} 様の良質なメモリーT 細胞に転換しうる可能性が初めて示された。

【目 的】

がん免疫療法はがん治療の第4の柱として確立されつつあるが、依然として T 細胞の”疲弊化”に起因する治療効果の低下が問題となっている。疲弊化を回避し、より抗腫瘍活性の高い T 細胞へ転換させることができれば、極めて有効的ながん免疫療法となる。本研究では、これまでの NR4A を中心とする疲弊化制御に関する研究と CAR-iT_{SCM} 誘導による幹細胞様リプログラミングに関する研究の知識と経験を生かして、CAR T 細胞の疲弊解除および良質なメモリーT 細胞へと若返らせる方法を開発し、固形がん治療への応用を目指すものである。さらに、単なるリプログラミングの技術開発にとどまらず、メモリーT 細胞の分化およびその可塑性に関する基本原理の理解を目指す。

【方 法】

本研究では、ヒト CAR T 細胞の疲弊および幹細胞性の両側面からアプローチすることで、CAR T 細胞のリプログラミング法の開発を目指す。①疲弊の観点からは、NR4A 編集による疲弊抵抗性 CAR T 細胞の作製および、遺伝子発現解析や機能解析、代謝解析を用いて疲弊回避機構を解明する。②幹細胞性の観点からは、CAR-iT_{SCM} 誘導による幹細胞性の獲得および疲弊の解除機構を遺伝子発現解析やオープンクロマチン解析、機能解析、代謝解析を用いて明らかとする。

【結 果】

① NR4A 編集による疲弊抵抗性 CAR T 細胞

我々は、CRISPR/Cas9 を用いた NR4A1、NR4A2、NR4A3 の遺伝子欠損(NR4A^{TKO})および Dominant Negative NR4A 遺伝子の強制発現(DN-NR4A^{OE})によって、疲弊抵抗性ヒト CAR T 細胞の作製に成功した。NR4A^{TKO} および DN-NR4A^{OE}

CAR T 細胞はがん細胞による慢性抗原刺激後も、ミトコンドリア代謝や細胞増殖能の亢進が認められた。さらにヒト固形がんモデルマウスにおいて、NR4A^{TKO} CAR T 細胞および DN-NR4A^{OE} CAR T 細胞は従来の CAR T 細胞よりも優れた抗腫瘍効果を発揮した。

② 幹細胞様 CAR T 細胞へのリプログラミング

我々は、トニックシグナル依存的な CAR T 細胞疲弊モデルを用いることで、CAR-iT_{SCM} 誘導条件の中でも特に、一過性の CAR/TCR シグナルの遮断すなわち”rest”が、CAR T 細胞のエピジェネティクスおよびミトコンドリア代謝の幹細胞様プログラミングに重要であることを明らかとした。さらに、”rest”による幹細胞様プログラミングの主要制御転写因子として FOXO1 を同定した。FOXO1 強制発現 CAR T 細胞は、エピジェネティックレベルで疲弊プログラムの遮断および、幹細胞様プログラムの獲得、ミトコンドリア代謝の改善を示した。ヒト固形がんモデルマウスにおいて、FOXO1 強制発現 CAR T 細胞は、CAR-iT_{SCM} 細胞と同様に in vivo で顕著な細胞増殖を示し、強力な抗腫瘍効果を発揮した。

【考 察】

CAR T 細胞療法において、CAR T 細胞の幹細胞性の喪失や疲弊化など T 細胞内因性の障害が CAR T 細胞療法の大きな障壁となっている。また、免疫チェックポイント阻害剤との関連からも、メモリー T 細胞分化や疲弊化の分子機構とその回避方法を究明すべく、研究は精力的に進められている。本研究では、ヒト CAR T 細胞は慢性抗原刺激によって、NR4A 依存的な転写やエピジェネティクス制御を介して疲弊化することを明らかとした。さらに、NR4A は、エフェクター分子の抑制だけでなく、ミトコンドリア代謝も抑制していることが明らかとなった。よって、NR4A の機能障害は CAR T 細胞のエフェクター機能およびミトコンドリア代謝の増強をもたらすことができ、強力な抗腫瘍効果を有した CAR T 細胞の開発が期待できる。一方で、幹細胞性の維持を目的とした TCF1 や BACH2 過剰発現 CAR T 細胞は、幹細胞性は維持されるがエフェクター分化が阻害されるために、CAR T 細胞の抗腫瘍機能の増強には結びつかないと考えられている。本研究にて我々は、CAR T 細胞の幹細胞性の維持、疲弊化の抑制、ミトコンドリア制御の主要制御因子として FOXO1 因子を同定し、FOXO1 強制発現が CAR T 細胞の抗腫瘍機能を増強させることを示した。FOXO1 は TCF1 や BACH2 の上流で幹細胞性を調節しており、かつその転写活性は CAR/TCR シグナル依存的な翻訳後修飾によって調節されているため、CAR T 細胞機能を増強させる理想的な転写因子であると考えられる。本研究ではヒト CAR T 細胞において、NR4A の機能障害によって疲弊抵抗性を獲得できること、FOXO1 活性の増強によって幹細胞性を付与できることを明らかとした。NR4A と FOXO1 の関係性については不明であるが、これら2つの遺伝子操作によって、幹細胞性を維持しつつ疲弊化に抵抗性を有した理想的な CAR T 細胞を作成できる可能性がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CAR T 細胞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、固形がん患者に対しては未だ十分な治療効果が認められていない。本研究は CAR T 細胞療法の大きな障壁である CAR T 細胞の幹細胞性の喪失および疲弊化を克服することで、長期的な治療効果を狙うものであり、より効果的な CAR T 細胞療法として固形がん治療への応用が期待できる。

【参考・引用文献】

1. Kondo T, Morita R, Okuzono Y, Nakatsukasa H, Sekiya T, Chikuma S, Shichita T, Kanamori M, Kubo M, Koga K, Miyazaki T, Kassai Y, Akihiko Y. Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. **Nat Commun.** 8:15338, 2017.
2. Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, **Ando M**, Akanuma T, Iizuka M, Sakai R, Morita R, Yoshimura A. Generation and application of human induced stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. **Cancer Sci.** 2018 Jul;109(7):2130-2140.
3. Chen J, López-Moyado IF, Seo H, Lio CJ, Hempleman LJ, Sekiya T, Yoshimura A, Scott-Browne JP, Rao A. NR4A

transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. **Nature**. 2019 Mar;567(7749):530-534.

4. **Ando M**, Ito M, Srirat T, Kondo T, Yoshimura A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. **Immunol Med**. 2020 Mar;43(1):1-9.
5. Kondo T*, **Ando M***, Nagai N, Tomisato W, Srirat T, Liu B, Mise-Omata S, Ikeda M, Chikuma S, Nishimasu H, Nureki O, Ohmura M, Hayakawa N, Hishiki T, Uchibori R, Ozawa K, Yoshimura A. The NOTCH-FOXO1 Axis Plays a Key Role in Mitochondrial Biogenesis in the Induction of Human Stem Cell Memory-like CAR-T Cells. **Cancer Res**. 2020 Feb 1;80(3):471-483. *equal contributions
6. **Ando M**, Kondo T, Tomisato W, Ito M, Shichino S, Srirat T, Mise-Omata S, Nakagawara K, Yoshimura A. Rejuvenating Effector/Exhausted CAR T Cells to Stem Cell Memory-Like CAR T Cells By Resting Them in the Presence of CXCL12 and the NOTCH Ligand. **Cancer Res Commun**. 2021 Oct;1(1):41-55.