

## 急性リンパ性白血病に対する NK 細胞分子の制御に基づく細胞傷害性 CD4<sup>+</sup>T 細胞療法の開発研究

石山賢一

京都大学医学部附属病院 血液内科

### 【研究の背景】

成人急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia: ALL)の予後は極めて不良であるが、近年、抗 CD22 抗体に抗腫瘍薬(calicheamicin)を結合させた抗体医薬の inotuzumab ozogamicin(InO)、抗 CD19 抗体と抗 CD3 抗体の可変部のみを結合させた bispecific T cell engager (BiTE)抗体製剤の blinatumomab (BL)、CD19 抗原を標的とした CAR-T 細胞療法など、複数の免疫療法が使用されるようになった。中でも、BL は比較的合併症が少なく、再発 ALL だけでなく、初発 ALL の地固め療法などにも幅広く使用されている。BL は投与直後から CD3/T cell receptor (TCR) 刺激によって、T 細胞を増殖、活性化することが報告されている。実際に、effector 分画の CD8<sup>+</sup>T 細胞が増加し、殺白血病作用を有することが知られている。

しかし、CD4<sup>+</sup>T 細胞に関する知見はほとんど報告がない。一方、CAR-T 療法後の長期寛解患者では体内に輸注された CAR-T 細胞が長期的に残存し、その 95%以上は NK 細胞分子を豊富に持ち合わせた cytotoxic CD4<sup>+</sup>T 細胞であることが報告され、これらの細胞群が白血病の長期寛解維持に直接的に寄与している可能性が強く示唆される<sup>1,2)</sup>。また、CAR-T 細胞は長期間の腫瘍抗原やサイトカイン刺激によって、多数の NK 細胞分子や免疫チェックポイントを発現した NK 細胞様 T 細胞(NK-like T 細胞)に変化し、これらの細胞群の疲弊を制御することによって治療効果が向上することを報告した<sup>3)</sup>。これまでに細胞傷害性機能を有する CD4<sup>+</sup>T 細胞は慢性ウイルス感染症などで出現することが報告されているが、腫瘍疾患における意義は不明である。細胞傷害性 CD4<sup>+</sup>T 細胞は標的細胞に一定期間暴露されるような環境下によって誘導される長期間作用型の細胞傷害性 T 細胞と想定され、抗白血病作用を有するエクフェーター細胞集団として機能している可能性がある。

### 【目 的】

急性リンパ性白血病に対する細胞傷害性 CD4<sup>+</sup>T 細胞における NK 細胞分子・共刺激分子の制御機構を明らかにする。

### 【方 法】

-末梢血リンパ球の CyTOF 解析

健常者末梢血リンパ球の CyTOF 解析によって、CD4<sup>+</sup>T 細胞の single cell phenotyping を行う。CD4<sup>+</sup>T 細胞の分画を検証し、細胞傷害顆粒を有するサブセットの表現型を明らかにする。

-Blinatumomab 存在下による共培養アッセイ

Blinatumomab 存在下に CD4<sup>+</sup>T 細胞と ALL 細胞の共培養を行い、NK 細胞受容体・サイトカイン阻害抗体を用いて、CD4<sup>+</sup>T 細胞の殺白血病作用の制御機構を検証する。

-Blinatumomab による細胞傷害性 CD4<sup>+</sup>T 細胞誘導の検証

上記共培養系において、blinatumomab による細胞傷害性 CD4<sup>+</sup>T 細胞の誘導に必要な受容体機構を検証する。

### 【結 果】

-末梢血リンパ球の CyTOF 解析

CyTOF 解析により健常者末梢血リンパ球の CD4<sup>+</sup> T 細胞の中に、granzymeB、perforin 陽性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が存在することを確認した。これらは CD57 陽性であり、terminal effector 分画に該当する。

-Blinatumomab 存在下による共培養アッセイ

Blinatumomab 存在下における CD4<sup>+</sup> T 細胞と ALL 細胞の共培養系を構築した。CD4<sup>+</sup> T 細胞を CD45RA および CCR7 抗体を用いてサブセットに分け、sorting によって分離し、アッセイを行ったところ、memory 分画 (CD45RA-CCR7<sup>±</sup>) と terminal effector 分画 (CD45RA+CCR7<sup>-</sup>) では殺白血球効果を認め、naïve 分画では認めなかった。更に、CD2 or CD58 阻害抗体存在下ではこの殺白血球効果は 50%以上の低下を認めたが、DNAM1、IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  阻害抗体下では有意な低下を認めなかった。以上より、blinatumomab による CD4<sup>+</sup> T 細胞の殺白血球作用は CD2-CD58 axis に大きく制御されていることを確認した。

-Blinatumomab による細胞傷害性 CD4<sup>+</sup> T 細胞誘導実験

共培養アッセイ系を用いて、blinatumomab によって末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞から細胞傷害性 T 細胞が誘導されるか検証した。Naïve および memory 分画では一定の割合で CD2 の upregulation が起こり、CD2<sup>high</sup> 分画に置いて高度な細胞分裂を認め、granzymeB、perforin の高発現を認めたが、CD2<sup>dim</sup> 分画では細胞分裂は認めなかった。一方、terminal effector 分画では CD2 発現は変わらず、細胞分裂も認めなかった。以上のことから、blinatumomab は naïve および memory 分画において、CD2 upregulation によって CD2-CD58 機構を活性化することで、細胞増殖・細胞傷害性顆粒の高発現を誘導することを明らかにした。

## 【考 察】

Blinatumomab は CD8<sup>+</sup> T 細胞だけでなく、CD4<sup>+</sup> T 細胞の殺白血球作用を誘導し、CD2-CD58 axis がその分子機構に大きく寄与していることを明らかにした。定常状態では memory および terminal effector 分画が細胞傷害性顆粒を発現し、殺白血球作用を有していることが分かったが、ex vivo では terminal effector 分画の細胞分裂能はほぼ認めなかった。一方で、naïve および memory 分画から細胞傷害顆粒を含んだ T 細胞が有意に誘導されることから、blinatumomab は immature な T 細胞に CD2 upregulation を誘導し、CD2-CD58 axis を活性化することによって、細胞傷害顆粒を含んだ殺白血球作用を有するエフェクター T 細胞を誘導する可能性が考えられる。今後追加実験として、naïve T 細胞から誘導される細胞傷害顆粒を含む T 細胞が殺白血球作用を獲得しているか、および、CD58 阻害抗体を用いて、naïve T 細胞から細胞傷害性 T 細胞を誘導するかどうかを検証する。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

急性リンパ性白血病に対して、blinatumomab は免疫療法として頻繁に使用されるようになったが、殺白血球作用に関わる分子機構は不明な点も多い。本研究は blinatumomab による殺白血球作用が、CD2-CD58 axis を主軸として介していることが killing assay および proliferation assay によって示された。これは、naïve および memory 分画を豊富に持つ患者において CD4<sup>+</sup> CTL が誘導されやすい可能性を示唆する。また、ALL 細胞における CD58 陽性割合や発現強度が blinatumomab の効果を予測する有意な分子マーカーになる可能性が示唆される。これらは今後、患者検体において検証される必要がある。

## 【参考・引用文献】

1. Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, Porter DL, Chen C, Collins MA, Gao P, Bandyopadhyay S, Sun H, Zhao Z, Lundh S, Pruteanu-Malinici I, Nobles CL, Maji S, Frey NV, Gill SI, Loren AW, Tian L, Kulikovskaya I, Gupta M, Ambrose DE, Davis MM, Fraitra JA, Brogdon JL, Young RM, Chew A, Levien BL, Siegel DL, Alanio C, Wherry EJ, Bushman FD, Lacey SF, Tan K, June CH. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4<sup>+</sup> CAR T cells. *Nature*. 602 (7897), pp. 503-509, 2022
2. Maus MV. A decade of CAR T cell evolution. *Nat Cancer*. 3(3), pp.270-271, 2022
3. Good CR, Aznar MA, Kuramitsu S, Samareh P, Agarwal S, Donahue G, **Ishiyama K**, Wellhausen N, Rennels AK, Ma Y,

Tian L, Guedan S, Alexander KA, Zhang Z, Rommel PC, Singh N, Glastad KM, Richardson MW, Watanabe K, Tanyi JL, O'Hara MH, Ruella M, Lacey SF, Moon EK, Schuster SJ, Albelda SM, Lanier LL, Young RM, Berger SL, June CH. An NK-like CAR T cell transition in CAR T cell dysfunction. *Cell*. 184(25), pp. 6081-6100, 2021