

# 遺伝子改変による免疫老化耐性 Armored CAR-T細胞療法の開発

東海国立大学機構 名古屋大学

講師 芳川 修久

(共同研究者)

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター 准教授 中村 香江

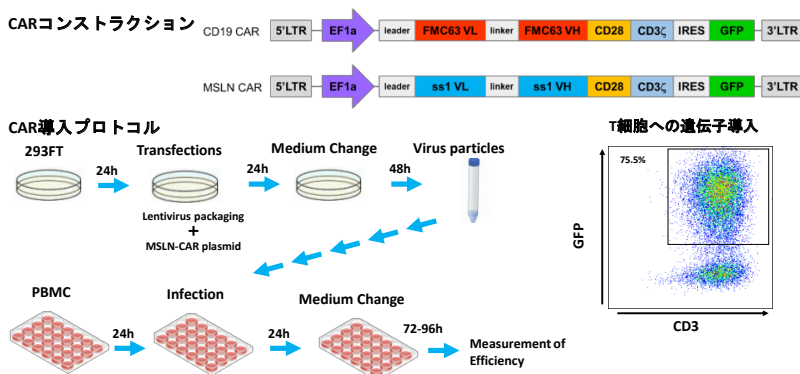
## はじめに

キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor : CAR) を導入したT細胞療法 (以下、CAR-T療法) は、特定の血液がんに対して劇的な治療効果を発揮することから近年注目を集めている新しいモダリティである。しかしながら、固形腫瘍に対する効果は限定的であることが大きな課題であり、世界中で当該モダリティにおける次世代技術の開発が進められている。その一つに、CAR-T細胞の機能増強技術 (以下、Armored CAR-T技術) が挙げられ、様々な機能遺伝子を搭載したCAR-T細胞が検討されている。本研究課題では、申請者が所属する臨床医学教室の強みを最大限に活かし、実際のヒト卵巣がん患者検体を用いて同定した Armored CAR-T技術の実用化検証を提案する。具体的には、悪性腹水誘導性の免疫老化関連遺伝子を用い、卵巣がん患者の免疫老化耐性を付与したCAR-T細胞の有用性を検証する。本研究は、実際の卵巣がん患者検体を用い腫瘍微小環境を模倣した評価系から抽出した因子を用いることに最大の価値があり、免疫療法不応患者への新たな治療が期待できる。

## 結 果

用いたCARは第二世代CARで、CD19およびメソセリンに対するものを使用した。CAR導入プロトコルはレンチウイルスベクター法を用いて293T細胞にトランスフェクションした後に産生されたウイルス粒子を健常コントロール末梢血より分離したPBMCに対して感染させることにより実施した。当初CAR導入効率の安定に苦慮したが、概ね50%以上の遺伝子導入効率の達成が可能となった (図1)。次に、腹

図1 CARの構造と遺伝子導入



水のCAR-Tに細胞に対する抑制的機能を評価するために、CD25およびCD137の2つの活性化マーカーへの影響をFACSにて評価した。腹水によって抑制度合いは異なるものの、腹水で活性化マーカーの発現が抑制されることが確認された(図2)。さらに共培養の系で癌性腹水がCAR-TのKilling活性を低下させるかどうかについて検証した。MSLN強制発現Nalm6にMSLN CAR-Tを共培養するとほとんどが細胞傷害された一方、がん性腹水を添

図2 がん性腹水による活性化マーカーへの影響

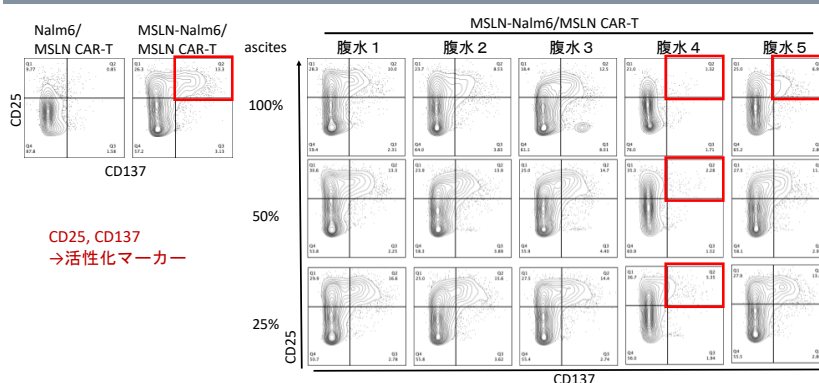
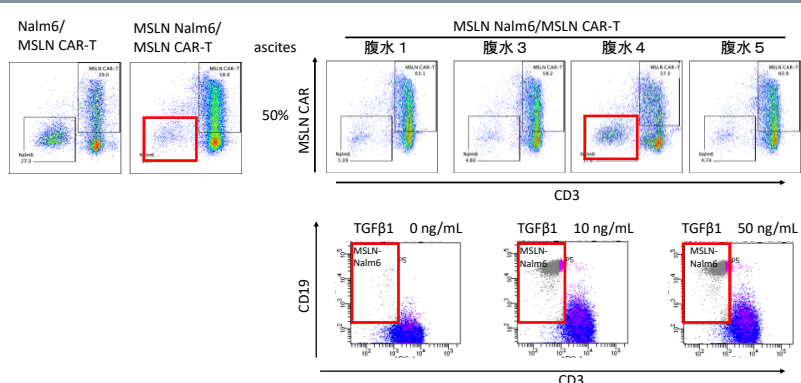


図3 がん性腹水によるKilling活性への影響



加すると腹水毎に程度は異なるものの、生存しているNalm6の割合が増えており特に腹水4では顕著に細胞傷害が阻害されていることが確認された。また、癌性腹水に多量に含まれることが知られているTGFβ1を用いて同様の共培養実験を行うことにより、Killing活性が阻害されることも確認できており、癌性腹水のKilling阻害はTGFβ1によって部分的には誘導されていることが示唆される結果であった(図3)。ここまでの結果をまとめると、腫瘍微小環境においてがん性腹水を介した免疫抑制の誘導が示唆された。内因性PBMCに対する抑制だけでなくCAR-Tに対しても活性化マーカー阻害や細胞傷害性阻害が確認され、がん性腹水を介した細胞療法の治療効果低下が確認された。一方で、T細胞の変化を捕捉することにより、がん性腹水に機能阻害されにくい強化CAR-Tを作成できるのではないかと考え、以後の実験を進めることとした。

まず、がん性腹水患者と良性卵巣腫瘍由来腹水を健常コントロール由来PBMCに投与しRNAを回収し、差次的発現遺伝子解析を行うことによりがん性腹水投与によって低下する4遺伝子、上昇する54遺伝子を同定した(図4)。その中には、T細胞の持続性に関与しCAR-T細胞を強化する可能性のある分子であるSOX4等も含まれており、これら58の遺伝子群にはT細胞機能を改善する遺伝子が含まれていることが期待された。遺伝子機能解析としてORAおよびGOエンリッチメント解析を行った結果、特にORA解析においては、核分裂や染色体セグメンテーション、紡錘体形成といった細胞分裂に関わる遺伝子セットの誘導

が確認された(図5)。

次に差次的発現遺伝子解析結果から、がん性腹水投与によって低下した4遺伝子について、強化CAR-T療法の候補遺伝子として抽出し、まずシーケンス結果をPCRでValidationすることとした。LMX1b、FEZF2、Nova2はCD3/CD28刺激によって発現が強く誘導され、がん性腹水投与によって発現が抑制されることが共通して確認された。この3つの遺伝子のうち、遺伝子発現レベルが一定程度以上あるLMX1bおよびFEZF2をCAR-Tに導入する候補とした(図6)。なお、LMX1bは、細胞の分化と発生に重要なLIMホメオボックス転写因子であり、神経系の発達において重要な役割を果たすことが報告されている。T

細胞での機能は不明だが、nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1) の作用を阻害することや、NFATc1欠損はT細胞のMemory形質を増加させることが知られる。FEZF2は、髄質胸腺上皮細胞(mTEC)における組織特異的抗原の発現を調節する転写因子として知られており、mTEC以外の細胞でどのような役割をしているかに関する情報はほとんど存在しない。T細胞での機能は全く不明であり、代謝やミトコンドリア機能、酸化リン酸化といったT細胞機能に影響を与えるメカニズムとの関連する報告も見当たらない。これら2つに注目して続きの実験を行うこととした。抽出した2因子をそれぞれ、ベースとなるMSLN CAR-T細胞に過剰発現させ、それらの遺伝子改変CAR-Tについて免疫フェノタイプをFACSにて評価した。CD4分画・CD8分画について、ナイーブから早期エフェクターを示

図4 がん性腹水 vs 良性患者由来腹水での差次的発現遺伝子解析

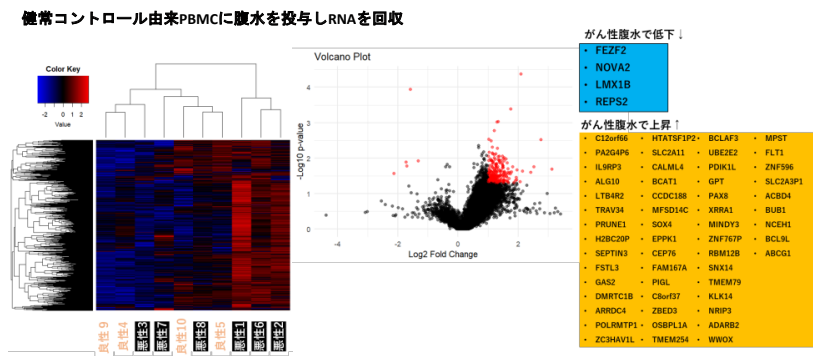


図5 遺伝子機能解析

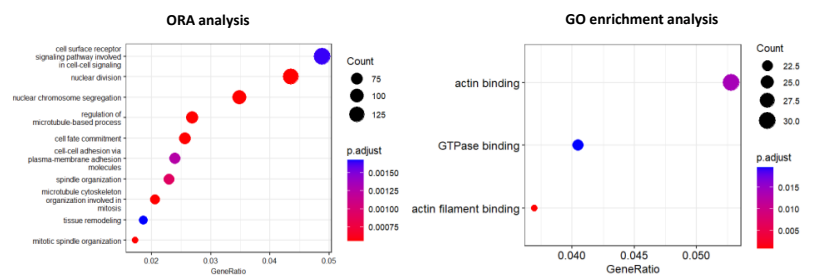


図6 がん性腹水で低下する4因子のPCRでのValidation



すCD45RO陰性CD62L陽性分画、CD45RA陽性CCR7陽性分画について、総じてその比率が高く良好な免疫フェノタイプを有していることが確認された(図7)。活性化マーカーについても同様であり、抗原刺激に対する反応性は同程度保たれていることが確認された(図8)

図7 遺伝子改変CAR-Tの免疫フェノタイプ

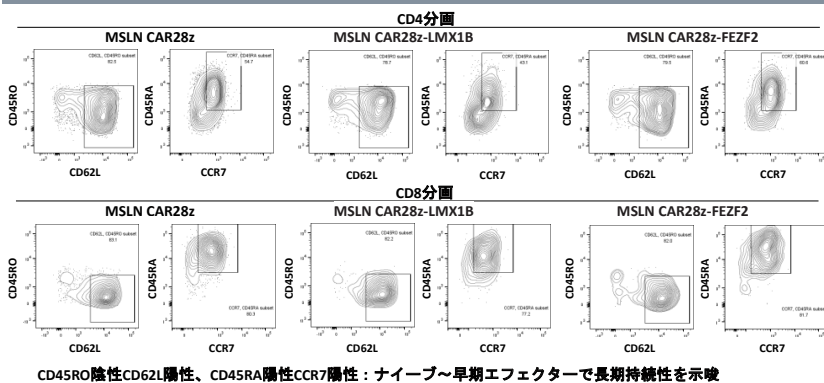
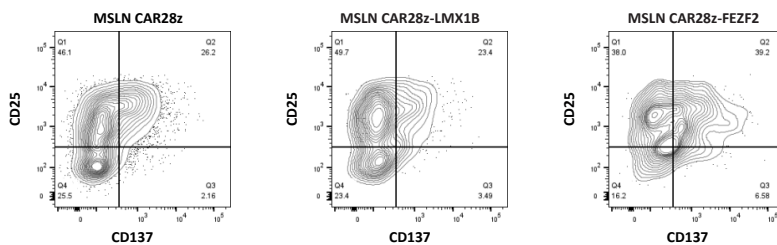


図8 遺伝子改変CAR-Tの活性化マーカー

MSLN発現Nalm6と1:1で3日間共培養後にFACSで解析



## 考察

CAR-Tに対するがん性腹水を介したエフェクター活性阻害(IFN $\gamma$ 産生抑制・細胞傷害性阻害)が確認され、腹水を介した免疫疲弊誘導と考えられた。DEGs解析より58の有意に変化する遺伝子を同定し、その中で発現誘導によって疲弊抵抗性を付与し得る4遺伝子(FEZF2、LMX1b、REPS2、Nova2)を同定した。ValidationのとれたFEZF2、LMX1bの2遺伝子の遺伝子改変CAR-Tを樹立した。遺伝子改変CAR-Tは免疫フェノタイプや活性化マーカーは特に変化を示さなかったが、細胞傷害性に優れている可能性が示唆された。これら2遺伝子による強化CAR-T療法の可能性が示された。

## 要約

CAR-T療法は固形腫瘍に対して効果が限定的である課題を克服するため、がん性腹水がCAR-T細胞の活性を抑制する現象をもとに抽出した遺伝子群より、強化CAR-T細胞を開発する試みを行った。本研究では、差次的発現遺伝子解析によりがん性腹水により低下する4つの遺伝子(FEZF2、LMX1b、REPS2、Nova2)を同定し、Validationを行った。その結果、FEZF2とLMX1bを導入したCAR-T細胞を樹立し、良好な免疫フェノタイプと細胞傷害性の改善が確認された。