

Title	腫瘍微小環境中の免疫抑制性シグナルを変換する新規CAR-T療法の開発
Sub Title	Development of novel CAR-T cell therapy modulating immunosuppressive signals in the tumor microenvironment
Author	伊藤, 雄介(Ito, Yusuke)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	キメラ抗原受容体 (CAR: Chimeric antigen receptor) 導入T細胞療法 (CAR-T療法) は主に造血器腫瘍に対して優れた治療効果を示しているが、副作用としてIL-6によるサイトカイン放出症候群が生じる。そこで、IL-6の受容体に恒常的活性化型IL-7受容体の細胞内ドメインを連結させてT細胞に発現させた。これにより、IL-6を捕捉し、かつT細胞の増殖能を長期間維持することが可能となった。 Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy is effective against hematological malignancies but causes a severe side effect known as cytokine release syndrome (CRS) induced by IL-6. We developed a chimeric cytokine receptor consisting of the extracellular domains of IL-6 receptors linked to the intracellular domain of an IL-7R mutant that constitutively activates the JAK-STAT pathway. This receptor enabled T cells to capture IL-6 and enhanced the persistence of CAR-T cells.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2022～2023 課題番号：22K15575 研究分野：腫瘍免疫
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K15575seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15575

研究課題名（和文）腫瘍微小環境中の免疫抑制性シグナルを変換する新規CAR-T療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel CAR-T cell therapy modulating immunosuppressive signals in the tumor microenvironment

研究代表者

伊藤 雄介 (ITO, Yusuke)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・専任講師

研究者番号：80931807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：キメラ抗原受容体（CAR: Chimeric antigen receptor）導入T細胞療法（CAR-T療法）は主に造血器腫瘍に対して優れた治療効果を示しているが、副作用としてIL-6によるサイトカイン放出症候群が生じる。そこで、IL-6の受容体に恒常的活性化型IL-7受容体の細胞内ドメインを連結させてT細胞に発現させた。これにより、IL-6を捕捉し、かつT細胞の増殖能を長期間維持することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T細胞療法は、造血器腫瘍に対して優れた効果を示しているが、多くの固形腫瘍に対しては持続的な効果が得られていない。また、サイトカイン放出症候群といった副作用が懸念されるため、有効性と安全性の両面を高める方が必要となる。本研究では、サイトカイン放出症候群の引き金となるIL-6を捕捉し、かつT細胞の長期生存に寄与するIL-7のシグナルをT細胞に恒常的に入れる人工サイトカイン受容体を開発した。これを組み込んだCAR-T細胞が長期間にわたり抗腫瘍効果を維持し、かつIL-6の濃度を下げられることを示した。

研究成果の概要（英文）：Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy is effective against hematological malignancies but causes a severe side effect known as cytokine release syndrome (CRS) induced by IL-6. We developed a chimeric cytokine receptor consisting of the extracellular domains of IL-6 receptors linked to the intracellular domain of an IL-7R mutant that constitutively activates the JAK-STAT pathway. This receptor enabled T cells to capture IL-6 and enhanced the persistence of CAR-T cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：CAR-T細胞療法 IL-7 IL-6

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CAR-T 細胞療法や免疫チェックポイント阻害剤などのがん免疫療法は、特に CD19 に対する CAR-T 細胞療法が B 細胞系の血液腫瘍に対して高い治療効果をもたらしたが、その効果は未だ限定的で一過性に留まっており、この治療法の有効性を高めるためにはさらなる改良が必要である。治療効果が不十分である主な原因の一つとして、腫瘍が周囲に形成する免疫抑制性の腫瘍微小環境が挙げられる (Marofi et al., Stem Cell Res Ther 2021)。腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来免疫抑制細胞、制御性 T 細胞などの細胞が集積し、腫瘍細胞と共に TGF- β や IL-10 などのサイトカインを産生し、また PD-L1/PD-1 や CTLA-4 といった免疫チェックポイント分子を介して T 細胞の活性化を抑制し、疲弊を誘導する。疲弊に陥った T 細胞は活性化 T 細胞とは異なる特有のエピジェネティックプロファイルを有しており、免疫チェックポイント阻害剤による治療で機能を回復できるのは precursor exhausted T cell (T_PEX) と呼ばれる一部の細胞のみに限られることが分かってきており (Kallies et al., Nat Rev Immunol 2020)、疲弊に至るのを防ぐことが必要である。

IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 といった共通 γ 鎖ファミリーサイトカインによる JAK-STAT 経路の活性化はメモリー T 細胞への分化促進による長期生存能の獲得、エフェクター機能の亢進、T 細胞疲弊の回避などに作用することから (Leonard et al., Immunity 2019, Zander et al., Immunity 2019, Melchionda et al., J Clin Invest 2005)、CAR-T 細胞療法にも有用と考えられるが、サイトカインの全身投与は副作用が大きいため治療として適さない。従って、免疫抑制性の腫瘍微小環境に打ち勝って CAR-T 細胞療法の有効性を高めるには、これらの免疫抑制シグナルを回避し、CAR-T 細胞が疲弊に陥るのを防ぎ、かつ長期生存能を付与して殺腫瘍効果を持続させるという新たな方策が必要となる。

一方、CAR-T 療法の副作用としてサイトカイン放出症候群 (CRS) が問題となる。活性化したマクロファージなどが分泌する IL-6 が CRS の引き金になると考えられており、CAR-T 療法の効果が高まると CRS の発症リスクも上がる。従って、治療効果を高めると同時に、CRS を防ぐ方策も重要となってくる。

2. 研究の目的

これらの課題を克服するため、本研究では、まず初めに TGF- β や PD-L1 を認識して高親和性に結合する蛋白と、IL-7 受容体の細胞内ドメインを連結した新規の人工受容体を設計し、これを CAR-T 細胞に発現させる (図 1)。この受容体を搭載することにより、TGF- β や PD-L1 による本来のシグナルが遮断されるのみならず、免疫抑制シグナル依存性かつ CAR-T 細胞特異的にインターロイキン受容体の下流シグナルが活性化し、T 細胞の長期生存能やエフェクター機能の亢進など T 細胞に有利に作用するように変換される。加えてこれらの CAR-T 細胞が腫瘍微小環境中に集積し、免疫抑制シグナルのリガンドを捕捉することで周囲の免疫細胞が受ける免疫抑制シグナルが減弱し、内在性の免疫細胞を活性化させることも期待できる。

加えて、IL-6 を捕捉するために、IL-6 受容体の細胞外ドメインと、恒常的活性化型変異を入れた IL-7 受容体の細胞内ドメインを連結した人工受容体を設計する。これにより、周囲の IL-6 を捕捉して取り込むことによって IL-6 濃度を下げて CRS の発症を防ぐとともに、IL-7 のシグナルを恒常的に入れることによって、T 細胞に長期生存能を賦与することが可能となると推察される。この新規受容体搭載 CAR-T 細胞の腫瘍制御能を *in vitro*, *in vivo* の系において検証し、従来の CAR-T 療法と比較して有効性を高めることを目的とする。

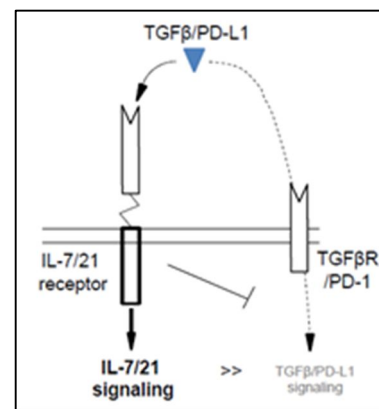


図 1 シグナル変換受容体

3. 研究の方法

(1) TGF- β 受容体+IL-7 受容体

TGF- β 受容体の細胞外ドメインと、IL-7 受容体の細胞内ドメインを結合させた新規キメラ受容体を作成した。ヒト T 細胞の細胞株である Jurkat 細胞にこの受容体を遺伝子導入し、TGF- β の免疫抑制シグナルを与えて IL-7 の下流の JAK/STAT 経路にシグナル変換されることをリン酸化ウェスタンブロットで検証した。

(2) IL-6 受容体+IL-7 受容体

IL-6 受容体である IL-6 α と GP-130 の細胞外ドメインを連結させて細胞外に発現させ、これに IL-7 受容体の恒常的活性化型の細胞内ドメインを繋げた。ヒト T 細胞に遺伝子導入し、培養液中の IL-6 の濃度を経時的に測定して、IL-6 を捕捉できるかを検証した。また、IL-7 のシグナルが入ることで T 細胞の増殖能や細胞傷害活性が高まることを確認した。

(3) in vivo での治療効果の検証

膀胱癌細胞株 AsPC-1 を移植した腫瘍モデルマウスに、IL-6 受容体+IL-7 受容体を搭載した抗 Mesothelin-CAR-T 細胞を投与し、腫瘍増殖抑制効果を in vivo で検証した。

4. 研究成果

(1) TGF- β 受容体+IL-7、IL-21 受容体

TGF- β 受容体と、IL-7 もしくは IL-21 受容体を結合させたキメラ受容体を設計し、ヒト T 細胞の細胞株である Jurkat 細胞に発現させた。TGF- β の刺激を加えた際に、本来の TGF- β シグナルである SMAD2/3 のリン酸化が抑制され、JAK/STAT 経路活性化に変換されることを示した (図 2)。

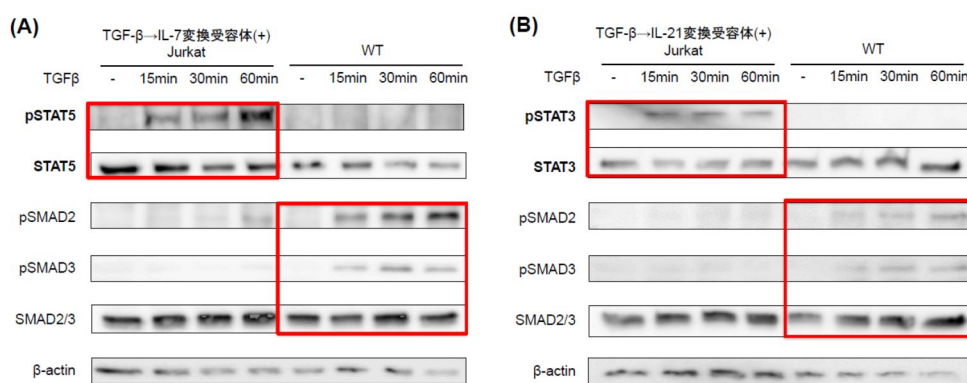


図 2 (A) TGF- β 投与により、TGF- β →IL-7 変換受容体を発現させた Jurkat 細胞で TGF- β の下流の SMAD2/3 リン酸化が減弱し、STAT5 リン酸化が生じた。
(B) TGF- β →IL-21 変換受容体により IL-21 シグナルの下流の STAT3 リン酸化が生じた。

IL-3 依存性の Ba/F3 細胞にこれらの受容体を導入して TGF- β を添加することにより、IL-3 非依存性に長期増殖することを示した (図 3)。

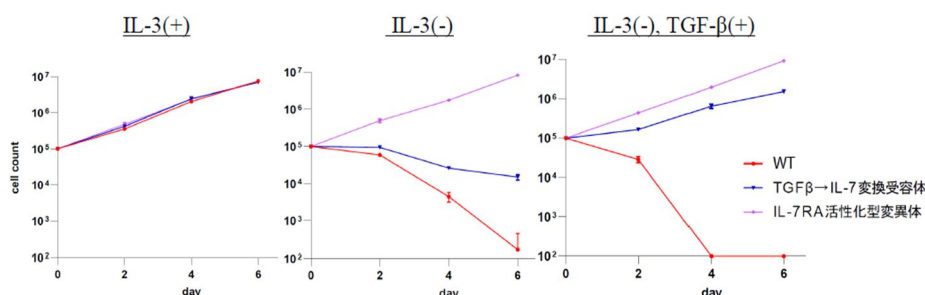


図 3 IL-7 受容体の活性化型変異体を導入した Ba/F3 細胞では IL-3 非存在下で増殖し、TGF- β →IL-7 シグナル変換受容体により、IL-3(-)TGF- β (+)の条件下で増殖。

以上により、TGF- β によるシグナルを JAK/STAT 経路に変換できることを示した。

(2) IL-6 受容体+IL-7 受容体

IL-6 受容体 (GP-130、IL-6R α) と IL-7 受容体の恒常的活性化型を連結した受容体 (G6/7R) を搭載した CAR-T 細胞を作成し、培養液中に IL-6 を添加して、経時的に培養上清中の IL-6 の濃度を測定したところ、G6/7R 搭載によって、IL-6 が捕捉された (図 4)。

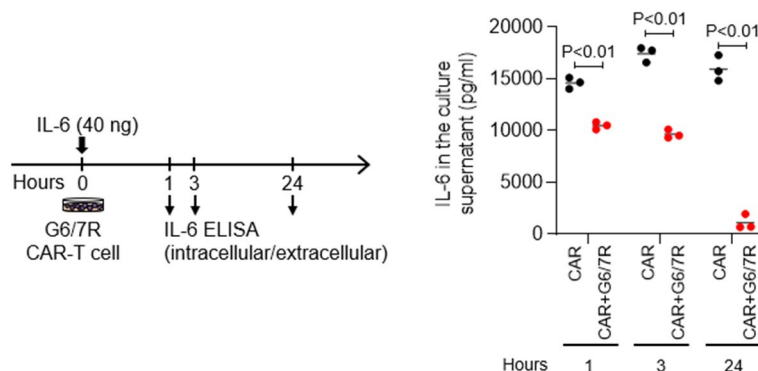


図 4 G6/7R 搭載 CAR-T 細胞の培養液中に IL-6 を加え、1, 3, 24 時間後の培養上清中の IL-6 の濃度を ELISA で測定したところ、経時的に IL-6 の濃度が下がった。

続いて、G6/7R 搭載 CAR-T 細胞の増殖能、細胞傷害活性を評価した。IL-7 のシグナルが恒常的に入ることにより、長期にわたって増殖能を維持することが出来た。また、CD19 陽性の細胞株に対する CAR-T 細胞の細胞傷害活性も増強することを確認した (図 5)。

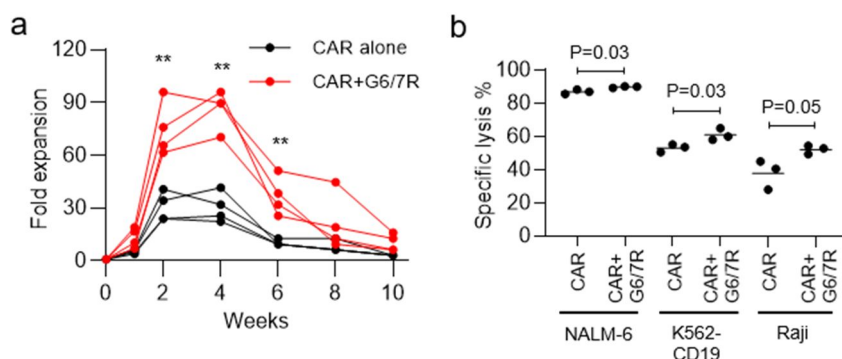


図 5 (a) G6/7R 搭載 CAR-T 細胞の増殖能を 2 週間ごとに測定。(b) T 細胞と腫瘍細胞を共培養して 24 時間後の腫瘍細胞の減少率を測定。

(3) in vivo での治療効果の検証

免疫不全マウス (NSG マウス) に、腫瘍細胞株 AsPC-1 を皮下投与し、13 日後に抗 Mesothelin-CAR-T 細胞を静脈内投与した。腫瘍径を経時的に測定したところ、G6/7R を搭載した CAR-T 細胞でより腫瘍の増殖抑制が見られ、生存延長効果を認めた (図 6)。

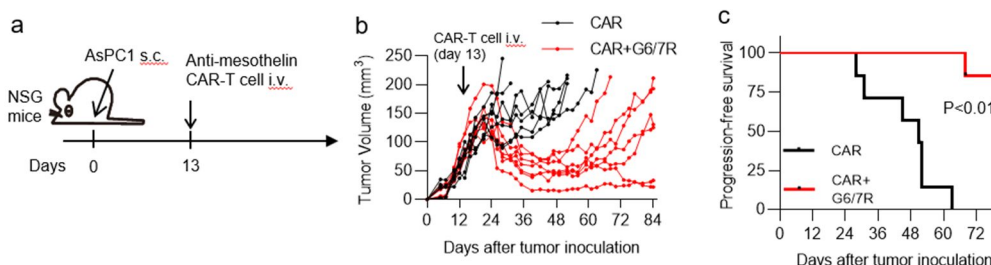


図 6 (a) 実験スケジュール。NSG マウスに AsPC1 を day0 に皮下投与し、day13 に CAR-T 細胞を投与した。(b) 腫瘍径、(c) 生存曲線ともに G6/7R 搭載が優れていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshikawa Toshiaki, Ito Yusuke, Wu Zhiwen, Kasuya Hitomi, Nakashima Takahiro, Okamoto Sachiko, Amaishi Yasunori, Zhang Haosong, Li Yang, Matsukawa Tetsuya, Inoue Satoshi, Kagoya Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a chimeric cytokine receptor that captures IL-6 and enhances the antitumor response of CAR-T cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 101526～101526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xcrm.2024.101526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------