

Title	発がんリスク因子である加齢性変異を、逆にCAR-T細胞の抗腫瘍治療効果に活用する
Sub Title	Utilizing ageing-related clonal haematopoiesis for effective CAR-T cell therapy
Author	井上, 聡(Inoue, Satoshi)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、加齢に伴い末梢血T細胞において蓄積される遺伝子変異を同定し、これらの変異遺伝子を野生型T細胞に付加することにより、その長期生存能を高め、同細胞から作製される抗腫瘍T細胞が持続的な治療効果を誘導できるという仮説を立て、以下の研究計画を立てた。加齢に伴う遺伝子変異として、TET2、DNMT3Aに加え、DUSP11を抽出した。DUSP11遺伝子をノックアウトさせたT細胞及びCAR-T細胞は、TET2やDNMT3AノックアウトT細胞とは異なり、未分化性(長期生存能)の促進が認められなかった。さらに細胞増殖やサイトカインや細胞障害性因子の産生能や細胞障害能についても影響が認められなかった。 We identified TET2, DNMT3A, and DUSP11 as aging-associated genetic mutations. First, we performed genetical ablations of TET2, DNMT3A, and DUSP11 genes using the CRISPR Cas9 approach and analyzed the effects on the function of T cells and CAR-T cells. T cells or CAR-T cells with knockout of TET2 or DNMT3A genes indeed exhibited significant promotion of undifferentiated state (persistence), in agreement with previous reports. However, T cells and CAR-T cells with DUSP11 gene knockout did not show promotion of undifferentiated state (long-term survival capacity) as observed with TET2 or DNMT3A knockout T cells. Furthermore, no effects were observed on cell proliferation, cytokine and cytotoxic factor production, or cytotoxicity (anti-tumor effect). So far, we were unable to identify aging-related mutations that would favorably impact CAR-T cell immunotherapy.
Notes	研究種目：挑戦的研究 (萌芽) 研究期間：2022～2023 課題番号：22K19474 研究分野：がん免疫
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K19474seika

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 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19474

研究課題名（和文）発がんリスク因子である加齢性変異を、逆にCAR-T細胞の抗腫瘍治療効果に活用する

研究課題名（英文）Utilizing ageing-related clonal haematopoiesis for effective CAR-T cell therapy

研究代表者

井上 聡（Inoue, Satoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：30801930

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、加齢に伴い末梢血T細胞において蓄積される遺伝子変異を同定し、これらの変異遺伝子を野生型T細胞に付加することにより、その長期生存能を高め、同細胞から作製される抗腫瘍T細胞が持続的な治療効果を誘導できるという仮説を立て、以下の研究計画を立てた。加齢に伴う遺伝子変異として、TET2、DNMT3Aに加え、DUSP11を抽出した。DUSP11遺伝子をノックアウトさせたT細胞及びCAR-T細胞は、TET2やDNMT3AノックアウトT細胞とは異なり、未分化性（長期生存能）の促進が認められなかった。さらに細胞増殖やサイトカインや細胞障害性因子の産生能や細胞障害能についても影響が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の正常部ゲノム解析により、多くの正常組織において、加齢によって体細胞変異が蓄積した細胞の一部が分化能を喪失したクローン性増殖能を獲得し、最終的に悪性化腫瘍を発症することが明らかになったが、これらは加齢によって発生する「前がん病変」を捉えることを目的とした研究であり、治療法に活用させることを意図した研究は皆無である。

本研究は、加齢に伴いT細胞で蓄積する、腫瘍化につながり得る遺伝子変異を逆にCAR-T細胞療法の治療効果改善に活用することを目指す、という新しい着想に基づく研究計画であり、既存の治療戦略の延長線にのらない治療法である。

研究成果の概要（英文）：We identified TET2, DNMT3A, and DUSP11 as aging-associated genetic mutations. First, we performed genetical ablations of TET2, DNMT3A, and DUSP11 genes using the CRISPR Cas9 approach and analyzed the effects on the function of T cells and CAR-T cells. T cells or CAR-T cells with knockout of TET2 or DNMT3A genes indeed exhibited significant promotion of undifferentiated state (persistence), in agreement with previous reports. However, T cells and CAR-T cells with DUSP11 gene knockout did not show promotion of undifferentiated state (long-term survival capacity) as observed with TET2 or DNMT3A knockout T cells. Furthermore, no effects were observed on cell proliferation, cytokine and cytotoxic factor production, or cytotoxicity (anti-tumor effect). So far, we were unable to identify aging-related mutations that would favorably impact CAR-T cell immunotherapy.

研究分野：がん免疫

キーワード：CAR-T細胞 加齢 ゲノム異常

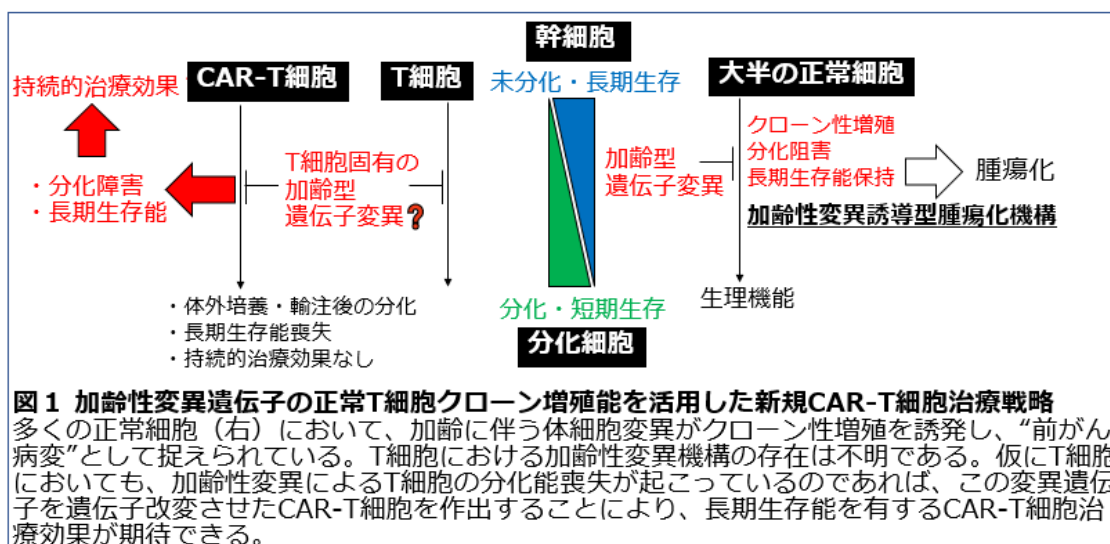
1. 研究開始当初の背景

キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor, CAR) T細胞は、患者由来の末梢血 T細胞から、体外で腫瘍抗原を認識する CAR 遺伝子を導入して製造する“生きた医薬品”である。再発・難治性の B 細胞性腫瘍に著効したことから脚光を浴びているが、大半の悪性腫瘍に対する治療効果は乏しいのが現状である。その原因として、殆どの CAR-T 細胞は長期生存能が喪失し、輸注後早期に死滅することが挙げられる (Chan et al. *Nat Rev Immunol* 2021)。

細胞の寿命は、その分化状態によって規定される。造血器細胞や T 細胞も例外ではなく、長期生存能・未分化性に優れた幹細胞を頂点とし、細胞増殖に伴う不可逆的な分化と共に長期生存能を失なう (Gattinoni et al *Nat Med* 2011)。近年のゲノム解析により、造血幹細胞において、加齢に伴い、主にエピゲノム関連遺伝子の変異が蓄積すると、分化能を失い、クローン性増殖能を獲得し、最終的に造血器腫瘍の発症に至ることが明らかとなってきた (Jaiswal et al. *NEJM* 2014)。現在、食道、胃、大腸、皮膚、子宮などの数多くの正常細胞においても、造血幹細胞と同様に、加齢依存性ゲノム異常の蓄積に伴う、クローン性増殖の存在が明らかになっているが、変異遺伝子は臓器によって多種多様である (Kakiuchi et al *Nat Rev Cancer* 2021、Inoue et al *Nat Commun* 2019)。意外なことに、T 細胞における加齢に伴うクローン性増殖の検証がなされていないため、その存在自体が不明であった。

2. 研究の目的

T 細胞においても加齢に伴う遺伝子変異が蓄積し、分化障害に伴うクローン性増殖能（長期生存能）を獲得しているという仮定が成立すれば、これらの遺伝子を末梢血 T 細胞に CAR 遺伝子と共に遺伝子導入することで、長期生存能を獲得した CAR-T 細胞の作出につながり、持続的な治療効果を誘導出来るという仮説を立てた。そこで本研究は加齢に伴い T 細胞で蓄積する、腫瘍化につながり得る遺伝子変異を、逆に CAR-T 細胞療法の治療効果改善への活用を目指すことを本研究の目的とした。



3. 研究の方法

(1) 末梢血 T 細胞における加齢に伴う遺伝子変異を検出する。

加齢誘導性変異を検出するため、65 歳以上の高齢者に限定して、10 症例の市販の健康人由来の末梢血単核細胞を収集した。既報をもとに加齢性クローン造血因子である TET 2、DNMT 3 A に加え、DUSP 1 の変異に着目して解析した。

(2) 加齢に伴う遺伝子変異(群)が正常 T 細胞機能の長期生存能に寄与することを示す。

高齢者において特異的な遺伝子変異が正常 T 細胞の長期生存能に寄与することを検証するために、若年健康人の T 細胞に対して、これらの遺伝子を過剰発現又は破壊させ、*in vitro*、*in vivo*で長期生存能、抗腫瘍能を検証し、治療戦略の有効性を明らかにすることを旨とした。

(3) 個々の変異遺伝子が CAR-T 細胞機能に及ぼす性質変化を分子レベルで解明する

本研究で同定される変異遺伝子群について、変異遺伝子導入 CAR-T 細胞のエピゲノム変化を ATAC シークエンス、遺伝子発現変化を RNA シークエンスにより網羅的に解析し、両データを比較しながら変化が起こる具体的な下流遺伝子、シグナル経路レベルで明らかにする。

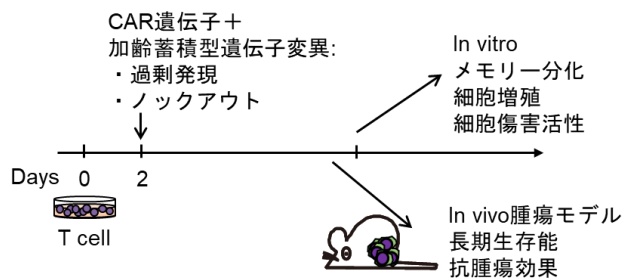


図 2. 加齢蓄積型遺伝子変異を末梢血 T 細胞において導入した上で、*in vitro*, *in vivo*での機能解析を通じて CART 細胞機能の向上につながる遺伝子改変の開発につなげる。

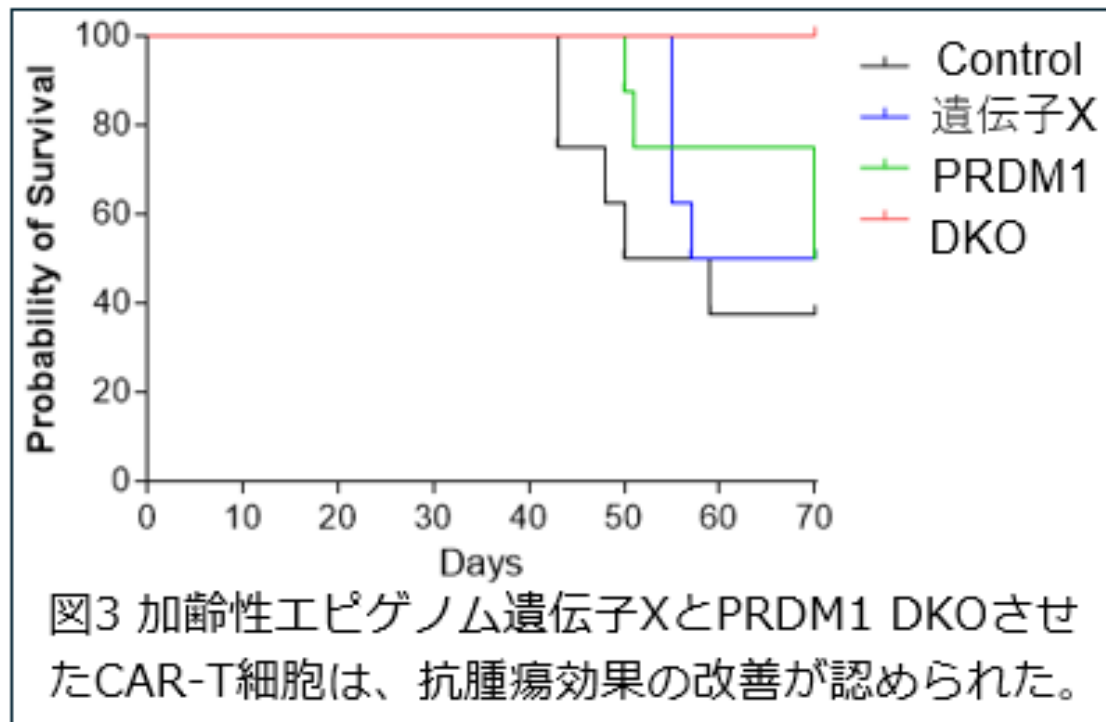
4. 研究成果

加齢性クローン造血因子である TET 2、DNMT 3 A に加え、DUSP 1 の変異に着目して解析した。これら 3 種類の遺伝子を CRISPR-Cas 9 法により遺伝子破壊し、T 細胞の機能解析を行った。その結果、TET2 や DNMT3A KO させた T 細胞は、顕著な分化阻害が認められ、増殖能も維持された。一方、DUSP 1 KO 細胞は、未分化性、増殖、細胞障害性因子の産生能に影響が認められなかった。

続いて、加齢に伴って影響を受けるエピゲノム関連遺伝子破壊による機能解析を行った。加齢に伴い、DNA だけでなくヒストンのメチル化状態も変動することが知られているため、加齢と相関することが知られているエピゲノム遺伝子 X に着目して機能解析を行った。その結果、遺伝子 X を KO した細胞では、未分化性が保持されることが明らかとなった。

申請者らは、異なるエピゲノム関連遺伝子 PRDM1 を KO すると、CAR-T 細胞の長期生存能の亢進を介した抗腫瘍治療効果の改善を報告している (Yoshikawa T Blood 2022 139, 2156-72)。興味深い点として、遺伝子 X を PRDM1 と共に KO させた CAR-T 細胞は、更なる分化阻害能が認められた。さらに白血病細胞を免疫不全マウスに移植した腫瘍マウス

モデルにおいて、遺伝子 X と PRDM1 DKO CAR-T 細胞は、PRDM1 KO と比較して、更なる抗腫瘍効果が認められた。現在、PRDM1 と遺伝子 X とのダブルノックアウト CAR-T 細胞による機能改変に関する分子機序を理解するために、RNAseq や ATACseq を行い、加齢型エピゲノムと CAR-T 細胞治療効果を結びつける転写ネットワークを解析している。これらのデータの蓄積を含め、論文投稿に向けて準備中である。以上のように、本研究課題では、当初、加齢性遺伝子変異による CAR-T 細胞の機能改変を目指したが、当初の目的を達成することができなかった。しかしながら、加齢と相関するエピゲノム遺伝子に着目したことで、CAR-T 細胞の治療効果の向上に結び付く研究成果が得られつつある。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 Yoshikawa T, Wu Z, Inoue S, Kasuya H, Matsushita H, Takahashi Y, Kuroda H, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y.	4 . 巻 139
2 . 論文標題 Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 Blood	6 . 最初と最後の頁 2156-2172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2021012714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1 . 著者名 Wu Z, Yoshikawa T, Inoue S, Ito Y, Kasuya H, Nakashima T, Zhang H, Kotaka S, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y.	4 . 巻 11
2 . 論文標題 CD83 expression characterizes precursor exhausted T cell population.	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Commun Biol	6 . 最初と最後の頁 258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04631-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1 . 著者名 Ito Y, Inoue S, Nakashima T, Zhang H, Li Y, Kasuya H, Matsukawa T, Wu Z, Yoshikawa T, Kataoka M, Ishikawa T, Kagoya Y	4 . 巻 52
2 . 論文標題 Epigenetic profiles guide improved CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in human T cells	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Nucleic Acids Res .	6 . 最初と最後の頁 141-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkad1076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1 . 著者名 Ito Y, Inoue S, Kagoya Y	4 . 巻 44
2 . 論文標題 Gene editing technology to improve antitumor T-cell functions in adoptive immunotherapy	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Inflamm Regen	6 . 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-024-00324-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1．著者名 Yoshikawa T, Ito Y, Wu Z, Kasuya H, Nakashima T, Okamoto S, Amaishi Y, Zhang H, Li Y, Matsukawa T, Inoue S, Kagoya Y.	4．巻 5
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 Rep Med	6．最初と最後の頁 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------	---------