

Title	疲弊T細胞の幹細胞様メモリー化とがん治療への応用
Sub Title	Conversion of exhausted CAR T cells into stem-like CAR T cells to treat solid tumors
Author	安藤, 眞(Ando, Makoto)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	CAR T細胞の幹細胞性の喪失や疲弊は、固形癌を標的としたCAR T細胞療法の大きな障壁となっている。我々は、これらの課題を解決すべくCAR T細胞の疲弊と幹細胞性に焦点を当て、CAR T細胞のリプログラミング法の開発に取り組んだ。本研究では、ドミナントネガティブNR4Aの遺伝子導入がCAR T細胞の抗腫瘍活性を増強させることを明らかとした。一方、CAR T細胞の幹細胞様プログラムがFOXO1によって制御されていることを明らかとした。以上より、疲弊化因子NR4Aの機能阻害および幹細胞様因子FOXO1の活性制御は、固形癌を標的としたCAR T細胞療法の開発戦略として極めて有望であると考えられる。 Loss of stemness and exhaustion of CAR T cells are major obstacles to CAR T cell therapy targeting solid tumors. We focused on the exhaustion and stemness in CAR T cells to address these issues and developed a method for reprogramming CAR T cells into stem-like CAR T cells. In this study, we found that gene transfer of dominant-negative NR4A enhanced the antitumor activity of CAR T cells. On the other hand, we found that the stem-like program of CAR T cells is regulated by FOXO1. In conclusion, inhibiting the function of the exhaustion factor NR4A and regulating the activity of the stem-like factor FOXO1 are promising strategies for the development of CAR T cell therapy targeting solid tumors.
Notes	研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2022～2023 課題番号：22K20778 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_22K20778seika

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 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20778

研究課題名（和文）疲弊T細胞の幹細胞様メモリー化とがん治療への応用

研究課題名（英文）Conversion of exhausted CAR T cells into stem-like CAR T cells to treat solid tumors

研究代表者

安藤 眞（ANDO, Makoto）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60962222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：CAR T細胞の幹細胞性の喪失や疲弊は、固形癌を標的としたCAR T細胞療法の大きな障壁となっている。我々は、これらの課題を解決すべくCAR T細胞の疲弊と幹細胞性に焦点を当て、CAR T細胞のリプログラミング法の開発に取り組んだ。本研究では、ドミナントネガティブNR4Aの遺伝子導入がCAR T細胞の抗腫瘍活性を増強させることを明らかにした。一方、CAR T細胞の幹細胞様プログラムがFOXO1によって制御されていることを明らかにした。以上より、疲弊化因子NR4Aの機能阻害および幹細胞様因子FOXO1の活性制御は、固形癌を標的としたCAR T細胞療法の開発戦略として極めて有望であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。本研究では、今まで不明であったCAR T細胞の運命を左右する転写因子として、FOXO1を同定した。さらに、疲弊因子NR4Aの機能阻害および幹細胞性因子FOXO1の活性増加による抗腫瘍活性の増加には、ミトコンドリア代謝リプログラミングが重要であることが明らかとなった。これらを同時に調節できれば、より効果的なCAR T細胞療法として未だ達成されていない固形がんを標的としたCAR T細胞療法への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Loss of stemness and exhaustion of CAR T cells are major obstacles to CAR T cell therapy targeting solid tumors. We focused on the exhaustion and stemness in CAR T cells to address these issues and developed a method for reprogramming CAR T cells into stem-like CAR T cells. In this study, we found that gene transfer of dominant-negative NR4A enhanced the antitumor activity of CAR T cells. On the other hand, we found that the stem-like program of CAR T cells is regulated by FOXO1. In conclusion, inhibiting the function of the exhaustion factor NR4A and regulating the activity of the stem-like factor FOXO1 are promising strategies for the development of CAR T cell therapy targeting solid tumors.

研究分野：がん免疫

キーワード：CAR T細胞 疲弊T細胞 ステムセルメモリーT細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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」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。我々の研究室では、世界で初めて NR4A が T 細胞疲弊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 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。我々は、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。

2. 研究の目的

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」に起因する治療効果の低下が問題となっている。疲弊を回避し、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。

3. 研究の方法

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、トニックシグナル依存的な疲弊 CAR T 細胞から、CAR-iT_{SCM} 細胞を誘導する系を確立し、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。

4. 研究成果

(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 ドミナントネガティブ 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。遺伝子発現解析より、DN-NR4A^{OE} CAR T 細胞は、がん細胞による慢性抗原刺激後も、対照 CAR T 細胞と比べてミトコンドリア代謝や細胞増殖関連の遺伝子発現が増加していることが明らかとなった。さらにヒト固形がんを用いた *in vitro* および *in vivo* 実験より、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有することが明らかとなった (図 1)。

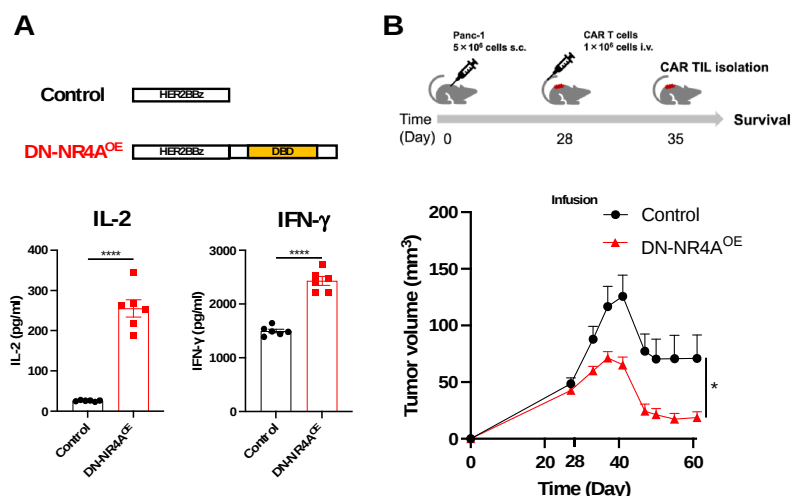


図 1. DN-NR4A^{OE} CAR T 細胞は強力な抗腫瘍活性を発揮する

A. HER2 陽性膵臓がん細胞株 Panc-1 に対する Control HER2 CAR T 細胞および DN-NR4A^{OE} HER2 CAR T 細胞の IL-2 産生と IFN-γ 産生

B. *in vivo* における HER2 陽性膵臓がん細胞株の腫瘍増殖と HER2 CAR T 細胞の移入実験

(2) 幹細胞様 CAR T 細胞へのリプログラミング

我々は、恒常的かつ強力なトニックシグナルを有する疲弊 HER2 CAR T 細胞において、チロシンキナーゼ阻害剤 Dasatinib による一過性の CAR/TCR シグナルの遮断が、CAR-iT_{SCM} 誘導培養条件 (IL-7/CXCL12/IGF-1: 7/12/1) 特異的に、強力な抗腫瘍活性を有した CAR-iT_{SCM} 細胞を誘導することを見出した(図 2)。さらなる解析の結果 7/12/1 +Dasatinib によって、疲弊 HER2 CAR T 細胞で認められたミトコンドリア機能障害は改善され、疲弊から幹細胞様メモリーへのエビジェネティックリプログラミングが確認された。さらに、これら幹細胞様メモリーリ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。また、7/12/1 +Dasatinib によるエビジェネティクスの変化すなわち、疲弊プログラムの遮断および幹細胞様メモリープログラムの亢進は、FOXO1 に起因することが明らかとなった。

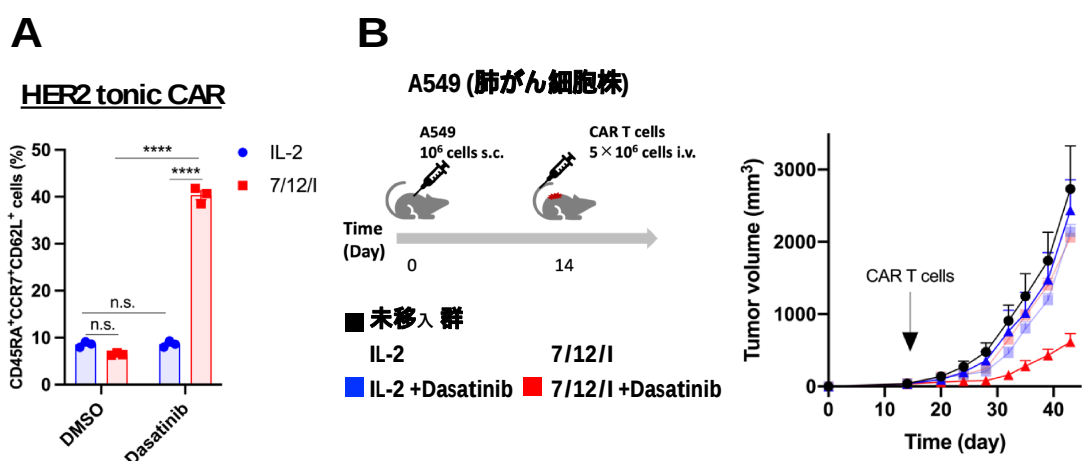


図 2. 7/12/1 +Dasatinib は疲弊 HER2 CAR T 細胞を強力な抗腫瘍活性を有した CAR-iT_{SCM} 細胞へと転換させる

A) Dasatinib 非存在下もしくは存在下における、IL-2 もしくは 7/12/1 培養による HER2 CAR T 細胞の幹細胞様メモリー誘導

B) *in vivo* における HER2 陽性肺がん細胞株 A549 の腫瘍増殖と HER2 CAR T 細胞の移入実験

以上より、疲弊因子 NR4A の機能阻害および幹細胞因子 FOXO1 の活性制御は、固形癌を標的とした CAR T 細胞療法の開発戦略として極めて有望であると考えられる。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。

<引用文献>

- 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.
- 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.
- 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-FOXM1 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.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1 . 著者名 Mise-Omata Setsuko, Ando Makoto, Srirat Tanakorn, Nakagawara Kensuke, Hayakawa Taeko, Iizuka-Koga Mana, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu, Ito Minako, Yoshimura Akihiko	4 . 巻 42
2 . 論文標題 SOCS3 deletion in effector T cells confers an anti-tumorigenic role of IL-6 to the pro-tumorigenic cytokine	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Cell Reports	6 . 最初と最後の頁 112940 ~ 112940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112940	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 -

1 . 著者名 Srirat Tanakorn, Hayakawa Taeko, Mise-Omata Setsuko, Nakagawara Kensuke, Ando Makoto, Shichino Shigeyuki, Ito Minako, Yoshimura Akihiko	4 . 巻 43
2 . 論文標題 NR4a1/2 deletion promotes accumulation of TCF1+ stem-like precursors of exhausted CD8+ T cells in the tumor microenvironment	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Cell Reports	6 . 最初と最後の頁 113898 ~ 113898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2024.113898	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 安藤 眞
2 . 発表標題 Reprogramming of exhausted CAR-T cells by " T cell rest "
3 . 学会等名 JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 安藤 眞
2 . 発表標題 " CAR T cell rest " による 疲弊 CAR-T 細胞のリプログラミング
3 . 学会等名 第43回 日本炎症・再生医学会
4 . 発表年 2022年

1．発表者名 安藤 眞
2．発表標題 Exhaustion-resistant CAR-T cells by overexpressing dominant negative form of NR4A factors for the treatment of solid tumors
3．学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4．発表年 2022年

1．発表者名 中川原 賢亮
2．発表標題 Antitumor efficacy of NR4a knock out HER2 CAR T-cell therapy for solid tumors
3．学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (国際学会)
4．発表年 2022年

1．発表者名 安藤 眞
2．発表標題 “ CAR T cell rest ” によるTSCM様CAR T細胞の誘導と固形がん治療への応用
3．学会等名 第32回 Kyoto T Cell Conference
4．発表年 2023年

〔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
---------	---------