

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）エピジェネティクス改変による持続的に疲弊を起こさない抗腫瘍 T 細胞の開発と養子免疫療法への応用

（英 語） Generation of antitumor T cells that are resistant to exhaustion through epigenetic modification for optimal adoptive immunotherapy

研究開発実施期間：2018 年 10 月 15 日～2021 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）籠谷 勇紀

（英 語） Yuki Kagoya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫応答研究分野・分野長

（英 語） Chief, Division of Immune Response, Aichi Cancer Center Research Institute

II 研究開発の概要

腫瘍抗原を特異的に認識する T 細胞を体外で準備・増幅し、患者に輸注する養子免疫療法は、一部のがんでは高い治療効果が実証されているものの、固形がんを中心とする多くの再発・難治性腫瘍では持続的な治療効果が得られておらず、治療効果を高める開発改良を要する。輸注された抗腫瘍 T 細胞は腫瘍細胞を認識してエフェクター機能を発揮するが、慢性的な抗原刺激下で徐々にその機能が低下する（T 細胞の疲弊）。疲弊 T 細胞は輸注前とは異なるエピジェネティックプロファイルを形成することが知られており、これが機能低下の一因であると考えられている。そこで本研究では、T 細胞疲弊に中心的に関わるエピジェネティック制御因子を遺伝子改変（ノックアウト）することにより、疲弊を起こしにくい抗腫瘍 T 細胞を作製できるという仮説を立て、以下の研究を遂行した。

（1）T 細胞疲弊に中心的に関わるエピジェネティック因子の同定

疲弊に関わるエピジェネティック因子の探索にあたっては、特異的薬剤による標的阻害と、CRISPR/Cas9 による標的遺伝子ノックアウトを併用した。後者は疲弊 T 細胞で高発現するエピジェネティック遺伝子をあらかじめ絞り込んだ上で、Cas9 タンパクと *in vitro* 合成ガイド RNA からなるリボヌクレオタンパク複合体（RNP 複合体）を電気穿孔法によりヒト T 細胞に導入する手法を用いた。図 1 に示すように、健常人由来のヒト T 細胞に CD19 に対するキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor: CAR）遺伝子を導入後、3-4 日間の間隔で連続的に抗原刺激を与えた。この連続刺激により T 細胞は分化を進めるとともにサイトカイン分泌能も低下し、*in vivo* における疲弊と類似した状態を誘導することができる。3 回刺激後の T 細胞の分化状態、及びサイトカイン分泌能を解析したところ、gene A をノックアウトされた CAR-T 細胞がコントロールと比較して未分化メモリー形質とサイトカイン IL2 の分泌能が顕著に維持されることがわかった（図 2）。その後、複数の健常人ドナー検体で検証

を行ったところ同様の知見が確認されたことから、gene A を抗腫瘍 T 細胞の機能を高める有望な修飾対象因子として選択した。

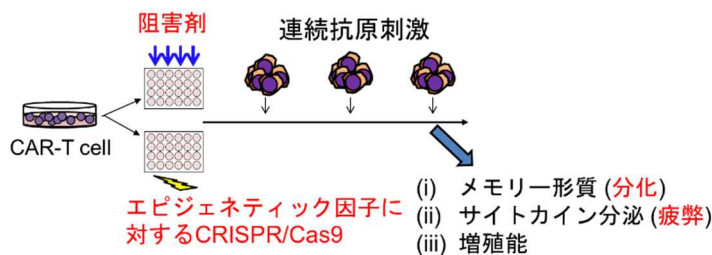


図 1. 抗腫瘍 T 細胞の連続抗原刺激に伴う機能低下を抑制するエピジェネティック因子の探索。薬剤による阻害、遺伝子レベルでのノックアウトを併用して標的探索を行った。

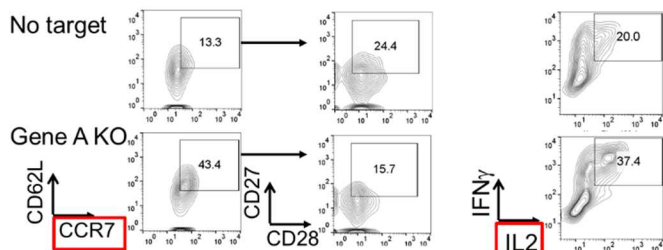


図 2. CAR-T 細胞において gene A をノックアウトすると、抗原刺激に伴い分化が進行する T 細胞の未分化性維持、及びサイトカイン分泌能の亢進に寄与することがわかった。

(2) マウス腫瘍モデルを用いた *in vivo* での抗腫瘍効果の評価

上記(1)で同定した gene A ノックアウト T 細胞について、さらに *in vivo* における機能解析を進めた。まずはノックアウト CAR-T 細胞を放射線照射後の免疫不全マウス (NSG マウス) に移植し、*in vivo* における T 細胞の生存をモニターした。この移植実験系では、未分化な状態のメモリー T 細胞が体内における生存能に優れ、また経過とともにマウスの抗原をヒト T 細胞が認識・攻撃する xenogeneic GVHD (xenogeneic GVHD) が起こることが知られている (Gattinoni et al. Nat Med 2011)。末梢血中のヒト T 細胞の経時的解析では、gene A をノックアウトした CAR-T 細胞が有意に高い増生を示した。さらに同 CAR-T 細胞を移植されたマウスは徐々に xeno-GVHD に伴う体重減少を来した。次に、*in vivo* 腫瘍モデルを用いた抗腫瘍効果への影響を解析した。まずは CD19 に対する CAR-T 細胞を用いて、CD19 陽性 B 細胞性腫瘍細胞株である NALM-6 を移植して発症させた NSG マウスを治療するモデルを用いた (Kagoya et al. Nat Med 2018)。上記の腫瘍なしの NSG マウスへの移植と同様に、やはり gene A をノックアウトした CAR-T 細胞はマウス体内での優れた生存・増殖能を示し、腫瘍の進行をコントロールと比較して有意に抑制することができた。以上より、ノックアウト CAR-T 細胞が *in vitro* における単なる表面抗原形質の変化のみならず、実際に高い長期生存能を獲得していることが示された。

次に、本研究の主眼である疲弊環境下での抗腫瘍効果を評価するために、固形腫瘍モデルを用いた解析を行った。悪性黒色腫細胞株 A375 に Mesothelin 遺伝子を導入した上で NSG マウスに皮下注射し、Mesothelin に対する CAR-T 細胞で治療するモデルを用いた。図 3 に示すように、gene A ノックアウト CAR-T 細胞において、有意に腫瘍細胞の増生をコントロールできた。また一定のポイントで腫瘍細胞を摘出して、腫瘍内の CAR-T 細胞の形質を解析したところ、ノックアウト CAR-T 細胞では一部で CCR7 の発現が維持されていた。一方、PD1 の発現レベルはコントロールと同様に亢進していた。すなわち、gene A は抗原刺激に伴う T 細胞の機能低下に関わるものの、これに伴い発現が亢進する免疫チェックポイント分子の制御には関わらないことが示唆された。近年、終末分化疲弊 T 細胞は通常メモリー、エフェクター T 細胞と全く異なるエピジェネティックプロファイルを有することがわかってきたが、PD1 経路の阻害によって同プロファイルはほとんど変化しないことが示されている (Pauken et al. Science 2016)。このことから、gene A は免疫チェックポイント分子のシグナルによらない、より根源的な T 細胞の分化・疲弊状態の形成に関与することが推測される。

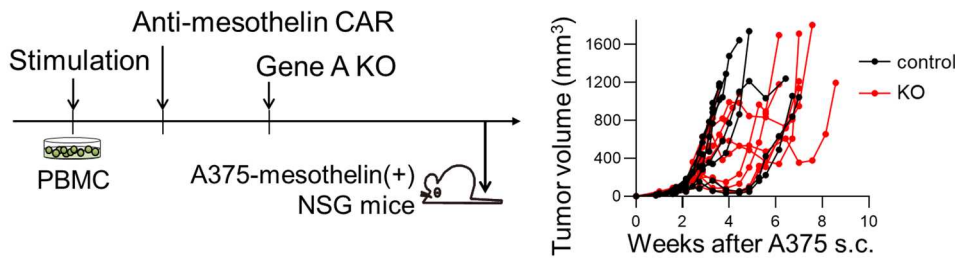


図 3. 固形がん治療モデルにおいて、gene A ノックアウト CAR-T 細胞はコントロールと比較して優れた治療効果を示した。

(3) 同定したエピジェネティック因子の改変に伴う、CAR-T 細胞における遺伝子発現・エピジェネティックプロファイル変化の解析

Gene A による遺伝子発現プロファイルを、3 ドナー検体を用いて RNA シークエンスにより網羅的に解析した。有意な発現変化 (false discovery rate<0.05) が認められた遺伝子群について、unsupervised clustering を行ったところ、gene A ノックアウト CAR-T 細胞はドナーの違いに関係なく独立したクラスターを形成した (図 4)。個別遺伝子レベルで見るとコントロールと比較して 2000 個程度の遺伝子で有意な発現変化が見られており、単一遺伝子の改変においても広範なプロファイル変化を誘導できることが示された。また個別遺伝子レベルで見ると、メモリー形成に重要な転写因子 TCF7、LEF1、未分化メモリー T 細胞で高発現する表面抗原分子である CCR7 や IL7R が遺伝子レベルで発現亢進を来しており、上記で示した表面抗原解析、及び *in vivo* における長期生存能獲得と合致する結果であった。さらに、Gene A ノックアウトによるエピジェネティック変化を網羅的に解析するため、CAR-T 細胞に連続抗原刺激を加えた後、ATAC シークエンスによる解析を行った。遺伝子発現プロファイルと同様に、7000 以上の広範なゲノム領域で有意なエピジェネティックプロファイルの変化が見られた。特に上記と同様に、未分化メモリーで高発現する遺伝子群 (TCF7、CCR7、IL7R など) のプロモーター領域におけるエピゲノム変化を確認することができた。

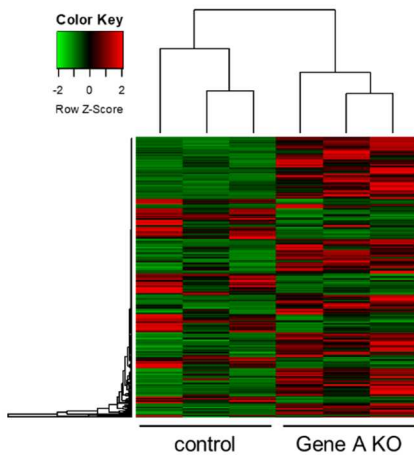


図 4. 健常人由来 T 細胞から作製した CAR-T 細胞において、連続抗原刺激後の遺伝子発現プロファイルを、gene A ノックアウトあり、なしで、3 ドナーについて解析した。有意な発現変化が行った遺伝子群についてのクラスタリングにおいて、ドナーの違いに関わらず、gene A ノックアウト CAR-T 細胞はコントロールと異なるクラスターに分類された。

以上より、抗腫瘍 T 細胞の持続的抗原刺激に伴う分化・疲弊に中心的に関わるエピジェネティック遺伝子として gene A を導入し、その修飾 (ノックアウト) が実際に抗腫瘍効果の改善につながることを複数のがん治療モデルを用いて証明した。本遺伝子修飾は、上記の結果に示されるように、抗原の種類を選ばず、あらゆる標的抗原に対する養子免疫療法に広く応用することができる。

Adoptive cancer immunotherapy, in which T cells that specifically recognize tumor cells are prepared *in vitro* and infused back into the patient, has already achieved remarkable clinical efficacy in several types of cancer. However, adoptive immunotherapy against solid tumors has not been successful in inducing durable clinical response. Infused antitumor T cells undergo progressive differentiation as well as exhaustion, which emerges as loss of long-surviving capacity and effector functions. Terminally differentiated and exhausted antitumor T cells possess epigenetic profiles distinct from those before infusion, which underlies treatment failure. We hypothesized that modulation of key epigenetic factors related to T cell differentiation and exhaustion can suppress T cell dysfunction and contributes to improving durable therapeutic efficacy in adoptive immunotherapy.

(i) Exploration of epigenetic genes related to T cell differentiation and exhaustion

We explored key epigenetic factors associated with T cell dysfunction accompanied by repeated antigen exposure. The CD19-targeting CAR-T cells were individually treated with specific inhibitors against epigenetic enzymes or ablated with epigenetic genes which are upregulated in terminally exhausted T cells (Figure 1). As shown in Figure 2, we found that genetic knockout of gene A significantly augmented maintenance of an early memory phenotype as well as cytokine-producing capacity in the repeatedly stimulated CAR-T cells compared with the control T cells. These results were validated using multiple donor samples.

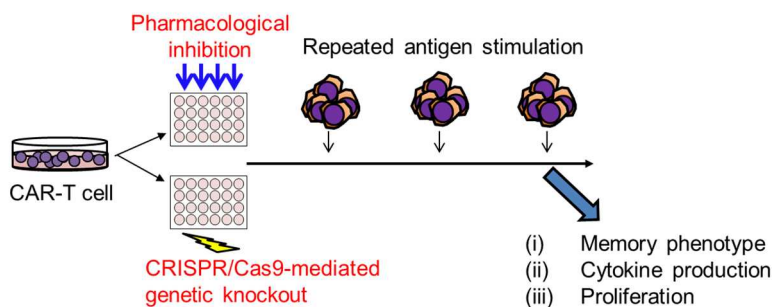


Figure 1. Exploration of epigenetic genes related to changes in T cell functions accompanied by repeated antigen stimulation.

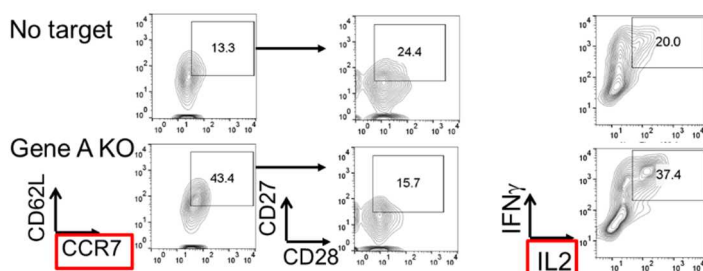
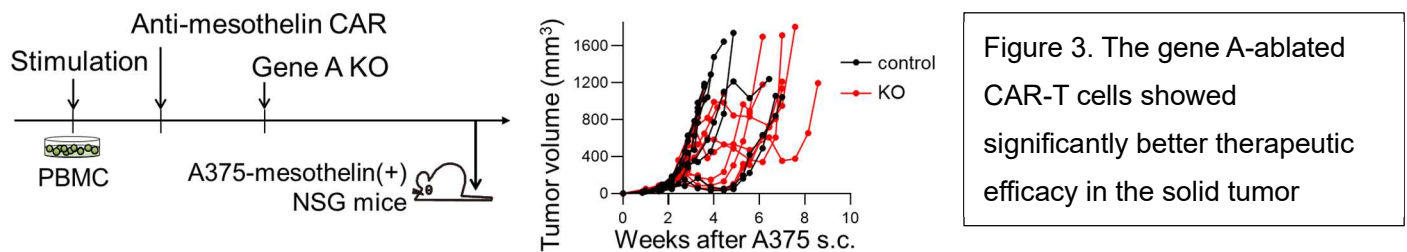


Figure 2. Knockout of the gene A in CAR-T cells augmented maintenance of an early memory phenotype and cytokine production.

(ii) Evaluation of *in vivo* antitumor effects using multiple mouse tumor models

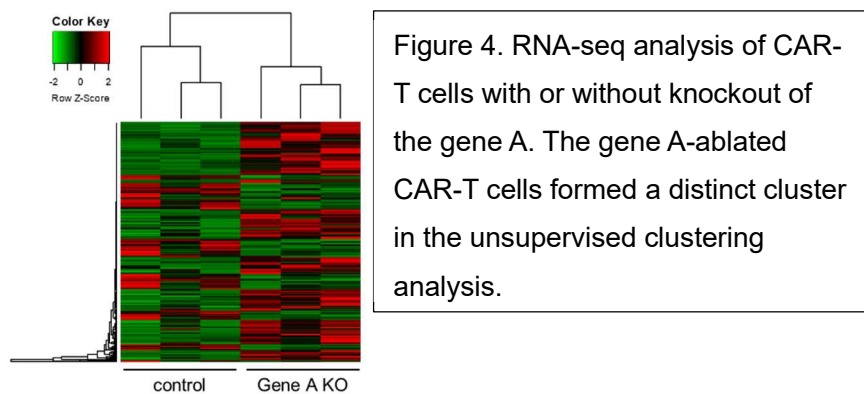
We evaluated the effect of gene A knockout on CAR-T cell functions *in vivo*. When adoptively transferred into tumor-free NSG mice, the gene A-ablated CAR-T cells persisted significantly better than the control T cells and induced xenogeneic GVHD at later time points, confirming that the gene-modified T cell have acquired young memory T cell properties (Gattinoni et al. Nat Med 2011).

We then assessed the *in vivo* antitumor response by gene-modified CAR-T cells. First, we confirmed that the CD19-targeting CAR-T cells ablated with the gene A accomplished significantly better therapeutic efficacy in the NALM6 leukemia model. We also confirmed that the gene A-knockout CAR-T cells targeting Mesothelin were able to control progression of the subcutaneously injected solid tumor significantly better than the control CAR-T cells (Figure 3). Importantly, analysis of the intratumoral CAR-T cells showed that the gene-modified CAR-T cell retained an immature memory phenotype compared with the control CAR-T cells, suggesting that the acquisition of long-surviving capacity resulted in better antitumor response.



(iii) Gene expression and epigenetic profiles induced by genetic modification

We analyzed gene expression changes in CAR-T cells induced by the gene A knockout using RNA-seq. Unsupervised clustering of differentially expressed genes demonstrated that the knockout CAR-T cells formed a cluster different from the control CAR-T cells regardless of different donor samples (Figure 4). In individual genes, the gene A-deficient CAR-T cells possessed increased expression of key memory genes such as *TCF7*, *LEF1*, *CCR7* and *IL7RA*. We also performed ATAC-seq and identified that gene A ablation induced epigenetic changes in more than 7,000 genomic regions, including the promoter regions of the above memory genes.



These results collectively show that genetic knockout of the gene A improves long-term therapeutic efficacy of antitumor T cells. Our findings can be applicable in any type of adoptive immunotherapy regardless of the target antigen.