プレスリリース

慶應義塾大学

2024 年 8 月 20 日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

固形がんに対し強い抗腫瘍効果をもつ CAR-T 細胞の作成に成功
ー「疲弊」に打ち勝つ新規の CAR-T 細胞療法の開発ー

CAR-T 細胞療法（注 1）は、患者の末梢血から T 細胞を採取し、体外でがんを認識する遺伝子 CAR を導入してがん細胞を攻撃できるようにしてから患者へ再び戻す治療法です。現在 B 細胞性血液悪性腫瘍に対し臨床応用がなされていますが、固形がん（注 2）に対する CAR-T 細胞療法の有効性は限定的でした。その要因の一つに CAR-T 細胞が体内でがん細胞と戦ううちに消耗し攻撃力が落ちる「疲弊」と呼ばれる現象があります。過去に東京理科大学・生命医科学研究所の吉村昭彦教授（研究当時：慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）らの研究グループは、マウスの実験モデルにおいて、疲弊の調節因子である NR4A（注 3）をなくすことで、CAR-T 細胞が疲弊しにくく、強い抗腫瘍効果を発揮することを報告しました（Nature 2019; 567: 530-534）。しかし、これまでヒトの T 細胞において NR4A の発現を抑えることによる影響や、疲弊化を回避する潜在的なメカニズムについては明らかにされていませんでした。

今回、本学医学部内科学教室（呼吸器）の中川原賢亮大学院生（学術振興会特別研究員）、福永興壱教授、および東京理科大学の吉村昭彦教授らの研究グループは、NR4A の発現を全てなくしたヒト由来 CAR-T 細胞を作成することに成功し、その抗腫瘍効果を評価しました。NR4A を無くした CAR-T 細胞は、がん細胞との培養下において、野生型の CAR-T 細胞と比較し高い増殖能と疲弊化への抵抗性をもち、持続的に強い抗腫瘍効果を発揮することが確認されました。また NR4A の発現を抑えた CAR-T 細胞は、ミトコンドリアの恒常性が高まり、優れた代謝活性をもつことも明らかにしました。さらに人の肺がん細胞株を移植したマウスの実験モデルにおいても、NR4A を無くした CAR-T 細胞はヒト肺がんへの治療効果が増強され、マウスの寿命を延長することができました。

この研究は、固形がんに対する CAR-T 細胞療法の新規治療戦略につながり、固形がんに対する免疫療法への応用が期待されます。

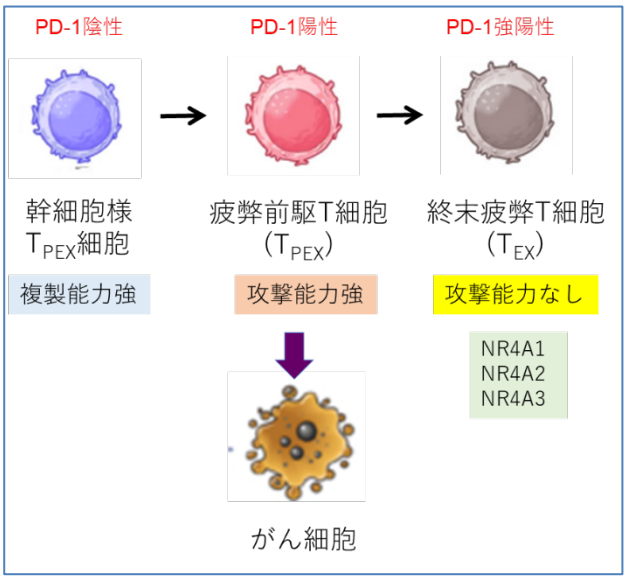
本研究成果は、2024 年 8 月 16 日（英国夏時間）に、米国がん免疫治療学会（*Society for Immunotherapy of Cancer*）の機関誌である *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* に公開されました。

1. 研究の背景と概要

免疫細胞、特に T 細胞はウイルスや細菌だけでなく、がん細胞を体内から排除するのに極めて重要な細胞です。近年、がん患者から T 細胞を分離しがん細胞を攻撃できるように遺伝子を導入した T 細胞（CAR-T）を、再び患者体内に戻す CAR-T 細胞療法が次世代のがん免疫療法として注目されています。しかしながら、現在 CAR-T 細胞療法は主に B 細胞の悪性腫瘍に対して高い治療効果がありますが、固形がんに対する効果は限定的とされます。その

原因の一つとして、腫瘍内でがん細胞と戦って消耗することによる CAR-T 細胞の「疲弊」化があげられます。特に抗がん剤治療を受けた患者や高齢の患者由来の CAR-T 細胞は疲弊化しやすいことがわかっています。T 細胞の「疲弊」は固形がんに対する CAR-T 細胞療法の臨床応用に向けて克服すべき重大な問題と考えられています。

大まかに言って、腫瘍内で疲弊化し攻撃能を失った T 細胞を「終末疲弊 T 細胞（T_{EX}）」、疲弊化する前のがん細胞と戦っている腫瘍内の T 細胞を「疲弊化前駆 T 細胞（T_{PEX}）」、その前の細胞分裂が盛んで T_{PEX} を生み出す細胞を「幹細胞様 T_{PEX}」と呼びます（図 1）。疲弊前駆細胞（T_{PEX}）は固形がんに対する免疫療法において重要な役割を果たすと考えられています。PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害療法（注 4）は疲弊前駆細胞に作用し、抗腫瘍効果を改善させますが、終末疲弊 T 細胞（T_{EX}）にはあまり効果がありません。したがって、終末疲弊 T 細胞（T_{EX}）を減らして疲弊前駆 T 細胞（T_{PEX}）を増やすことが固形腫瘍に対する T 細胞療法の有効性を上げる鍵と考えられています。



【図 1】固形がんとの反応による T 細胞の分化様式

T 細胞は固形がん等の慢性的な抗原刺激下において、幹細胞様 T_{PEX} から疲弊前駆細胞（T_{PEX}）、さらに終末疲弊 T 細胞（T_{EX}）へと分化する。疲弊前駆細胞は、がん細胞に対して強い抗腫瘍効果を有する。一方で、終末疲弊 T 細胞（T_{EX}）は短命で増殖や活性化が起こりにくいため、抗腫瘍効果は期待できず、この細胞が多い患者では免疫療法の効果が乏しいと考えられている。

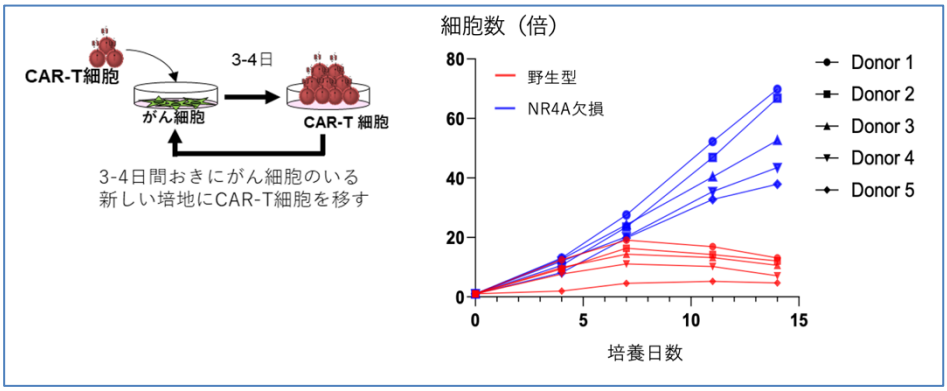
研究グループは、過去にマウスを用いた研究において、T 細胞疲弊を引き起こす遺伝子として転写因子の NR4A を発見しました（Nature 2019; 567: 530-534）。NR4A には NR4A1、NR4A2、NR4A3 の 3 種類が存在しますが、それぞれよく似ており同じ機能を持つと考えられています。遺伝子操作によって NR4A の発現を抑えたマウス T 細胞は疲弊しにくく強い抗腫瘍効果を発揮しました。しかしながら、人間の CAR-T 細胞において、NR4A の発現を抑える方法は確立されておらず、また各 NR4A 遺伝子の寄与や、疲弊化を回避するメカニズムについては明らかにされていませんでした。

研究グループでは、幅広い年齢層の健常者の血液から採取した T 細胞から CAR-T 細胞を作成し、より強力な抗腫瘍活性を引き出すために NR4A の遺伝子を無くした場合の、固形がんに対する反応を調べました。

2．研究の成果と意義・今後の展開

研究グループはまず健常者由来の T 細胞で NR4A 遺伝子を破壊し、CAR 遺伝子を導入する方法を確立しました。CAR 遺伝子としては乳がんや肺がんなど多くのヒトのがんで高発現している HER2 遺伝子を認識する HER2 CAR が選ばれました。まず、単離された T 細胞にレンチウイルスによって HER2 CAR 遺伝子を導入し、次に CRISPR による遺伝子編集法（注5）を用いて NR4A1、NR4A2、NR4A3 を無くすことに成功しました。

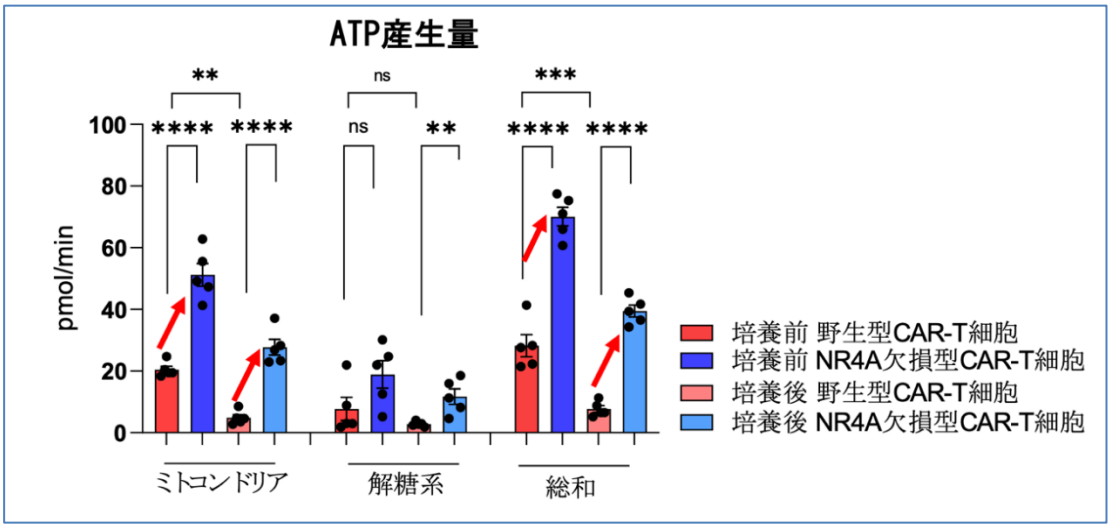
CAR-T 細胞の有効性を試験管内で評価するために、CAR-T 細胞と固形がん細胞を長期間培養することで、CAR-T 細胞を疲弊化させる実験を行いました。この実験モデルでは野生型の CAR-T 細胞はがん細胞と培養を開始した直後は増殖しがん細胞を攻撃して細胞死をもたらしますが、やがて増殖能を失い、2 週間の培養後ではがん細胞を殺すことができなくなっていました。その一方で、NR4A1, 2, 3 全て欠損させた CAR-T 細胞は、がん細胞との培養開始直後から強い抗腫瘍効果を発揮しただけでなく、2 週間のがん細胞との培養後も疲弊化を免れ、優れた抗腫瘍効果が維持されていました（図 2）。重要なことは、この方法はドナーの年齢に関わらず有効で、65 歳以上の高齢者の T 細胞でも疲弊を免れて増殖を続けたということです。



【図 2】CAR-T 細胞の疲弊化実験のモデル
CAR-T 細胞をがん細胞と同じ培地で培養した場合、CAR-T 細胞ががん細胞を殺すため、3-4 日おきに新しいがん細胞がいる培地に CAR-T 細胞を移動させる必要がある。5 名の健常人ドナーから CAR-T 細胞を作成し、野生型の CAR-T 細胞（赤）と 3 つの NR4A 遺伝子を破壊した CAR-T 細胞（青）の細胞数を比較した。どのドナー由来の野生型 CAR-T 細胞でも 14 日間程度の培養で疲弊し細胞の増殖が停止したが、NR4A 欠損 CAR-T 細胞は増殖を続けた。

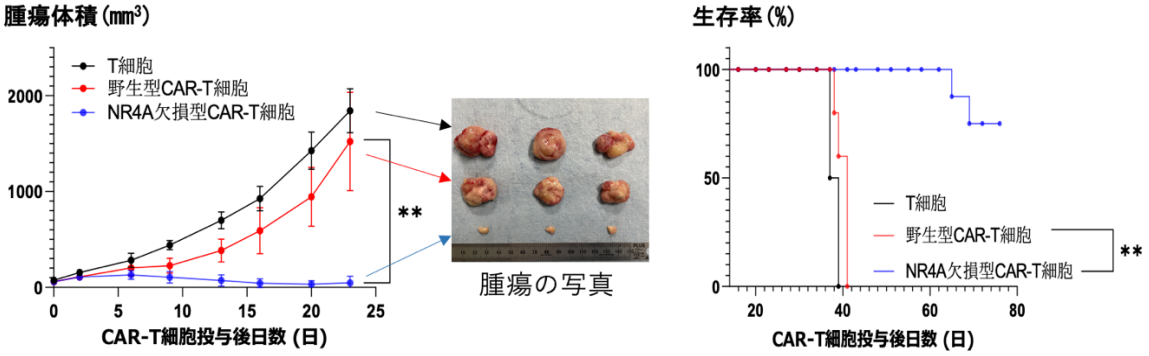
それから、NR4A1、NR4A2、NR4A3 単独欠損、もしくは 2 つの欠損、3 つの欠損を比較したところ、単独欠損でも多少の持続的な抗腫瘍効果はみられるものの、2 つの組み合わせのほうが強力で、さらに 3 つの NR4A 全ての遺伝子を同時に破壊した場合が最も強力であることがわかりました。

つぎに、研究グループでは NR4A の欠損がなぜ CAR-T 細胞に高い増殖能を付与できるのかを調べました。遺伝子解析の結果、NR4A の欠損では「幹細胞様 T_{PEX}」に関連する遺伝子の発現が活性化されていると同時に、解糖系やミトコンドリア代謝に関連する遺伝子が活性化されていることがわかりました。ミトコンドリアは細胞のエネルギー源である ATP の産生を行う細胞内器官で、T 細胞の場合、疲弊化するとミトコンドリアは萎縮しエネルギー産生ができなくなります。NR4A を無くすことで、CAR-T 細胞ではミトコンドリアの恒常性が改善することにより高い ATP 産生能を有していることが明らかになりました。この特徴は NR4A 欠損型 CAR-T 細胞が疲弊化を免れて、がん細胞を長期に攻撃できる理由の一つと考えられます（図 3）。



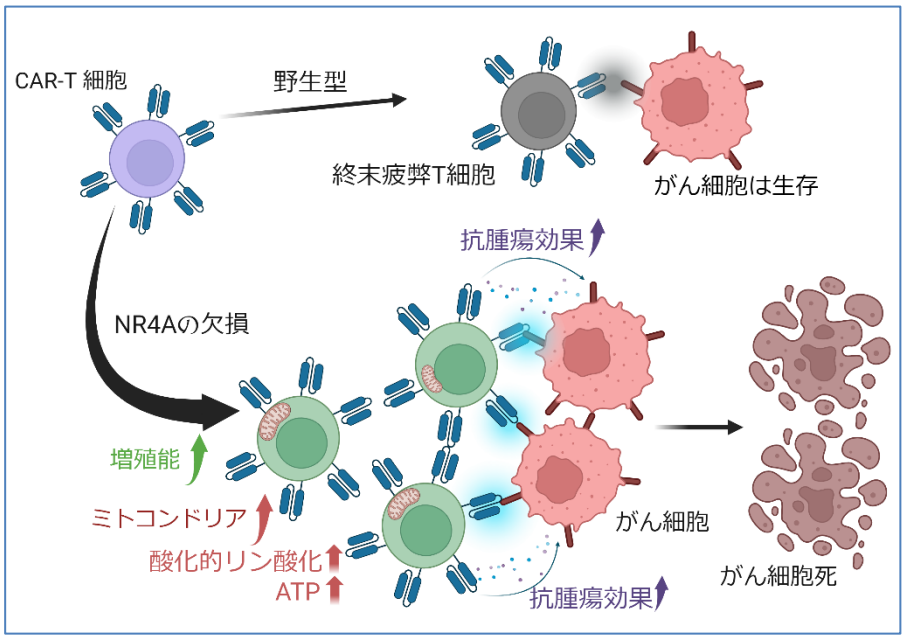
【図 3】NR4A 欠損型 CAR-T 細胞は高い代謝活性を有する
T 細胞の ATP の産生経路としてミトコンドリアによる酸化的リン酸化と解糖系があげられるが、NR4A を欠損させた CAR-T 細胞は、がん細胞との培養前からミトコンドリアによる ATP 産生能が向上しており、がん細胞との培養後でも高い ATP 産生能が維持されていた。****は有意差があることを示す。

最後に、これらの結果をヒトでのがん治療に応用するために、ヒトの肺がん細胞を移植した免疫不全マウスに NR4A 欠損型のヒト CAR-T 細胞を移入し、抗腫瘍作用を調べました。通常の T 細胞や、野生型の CAR-T 細胞を移入した超免疫不全マウスでは腫瘍細胞が盛んに増殖しマウスは死亡します。これに対し、NR4A 欠損 CAR-T 細胞を移入した免疫不全マウスでは腫瘍は増殖せず、マウスの寿命を延ばすことができました（図 4）。



【図 4】NR4A 欠損型 CAR-T 細胞は強い抗腫瘍効果を発揮する
マウスの皮下に腫瘍細胞を移植し、その後に図に示す遺伝子型の CAR-T 細胞を血管内に注入した。CAR 遺伝子導入をしていない T 細胞や野生型の CAR-T 細胞では腫瘍が大きくなったが、NR4A 欠損型 CAR-T 細胞では抗腫瘍作用が強いため、腫瘍は成長しなかった（左）。また NR4A の発現をなくした CAR-T 細胞は、野生型の CAR-T 細胞に比べ、有意にマウスの寿命を延ばした（右）。**は有意差があることを示す。

以上のように、ヒトの CAR-T 細胞においても NR4A を欠損することで優れた代謝活性をもち、疲弊化を回避し高い抗腫瘍効果を維持できることが明らかになりました。この結果を通して NR4A を抑制することで、CAR-T 細胞療法の新しい治療戦略となる他、がん免疫療法における新規治療薬の開発につながることが期待できます（図 5）。



【図 5】NR4A 欠損型 CAR-T 細胞は高い代謝活性を有し疲弊化を回避し抗腫瘍効果を発揮する。野生型の CAR-T 細胞はがん細胞と長期間培養すると終末疲弊 T 細胞へと分化し、抗腫瘍効果を発揮できないが、NR4A 欠損型 CAR-T 細胞はミトコンドリアの機能を向上させ、高い ATP 産生能をもち、疲弊化を回避し、持続的に抗腫瘍効果を発揮する。

3. 特記事項

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）革新的先端研究開発支援事業 T 細胞の老化、疲弊による生体機能不全とその解除方法の開発、ムーンショット型研究開発等事業炎症誘発細胞除去による 100 歳を目指した健康寿命延伸医療の実現、JSPS 科研費 JP23K06723, JP22K19444、慶應義塾学事振興資金などの支援によって行われました。

4. 論文

英文タイトル：NR4A ablation improves mitochondrial fitness for long persistence in human CAR-T cells against solid tumors
タイトル和訳：NR4A を欠損させたヒト CAR-T 細胞はミトコンドリアの恒常性を改善し、固形がんに対し長期的な抗腫瘍効果をもたらすことができる
著者名：中川原賢亮、安藤眞、スリラットタナコーン、三瀬節子、早川妙香、伊藤美菜子、福永興壱、吉村昭彦
掲載誌：*Journal for ImmunoTherapy of Cancer*
DOI：10.1136/jitc-2023-008665

【用語解説】

（注 1）CAR-T 細胞療法： Chimeric antigen receptor-T の略です。遺伝子導入により腫瘍細胞抗原を認識する抗体部分の細胞外ドメインと、抗原受容体のシグナルを伝えるためのドメインを人工的に細胞内に持たせた T 細胞。がん患者の末梢血 T 細胞から樹立し、CAR 遺伝子を導入してから患者の体内に戻すことによってがんを治療することを CAR-T 細胞療法と言います。

（注 2）固形がん：固形がんは、血液がん以外の、臓器や組織などで塊をつくる癌の総称です。固形がんは、各種臓器や表皮の上皮細胞から発生する上皮細胞がん（胃癌・肺癌・子宮癌など）と骨、筋肉などから発生する非上皮細胞がん（肉腫）に分かれます。固形がんの多くは、上皮から発生する上皮細胞がんとされます。

（注 3）免疫チェックポイント阻害療法：がん細胞は免疫細胞の攻撃から逃れるために、免疫応答にブレーキをかけます。免疫チェックポイント分子と呼ばれるたんぱく質は、このようなブレーキの役割を果たしており、その代表的なものが PD-1 や CTLA4 であり、PD-1 や CTLA4 の機能を抗体により阻害することで腫瘍内の免疫反応を増強するのが免疫チェックポイント阻害療法です。抗 PD-1 抗体の代表的なものがオプジーボであり、発見者の本庶佑教授がノーベル医学生理学賞を受賞しました。

（注 4）NR4A：NR4A は、NR4A1、NR4A2、NR4A3 からなるオーファン核内受容体ファミリーのメンバーであり、転写因子として働き、T 細胞の活性化を強く抑制します。マウスモデルにおける慢性免疫応答では、NR4A 転写因子は NF-AT によって誘導され、AP-1/NF-kB と競合することでサイトカインの発現を抑制し、PD-1 などの抑制性受容体の発現を直接促進することで、CD8+ T 細胞の機能不全／疲弊状態を引き起こします。よって NR4A は T 細胞の疲弊に中心的な役割を果たす因子の一つと考えられています。

（注 5）CRISPR による遺伝子編集（ゲノム編集）：CRISPR-Cas9 とは DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる新しい遺伝子改変技術です。CRISPR タンパク質に会合する RNA が標的 DNA を見出して切断します。今回は電気穿孔法という方法で CRISPR タンパク質と RNA の複合体を T 細胞に導入して NR4A 遺伝子を破壊しました。その破壊効率はどの遺伝子も 8 割以上でした。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部　内科学教室（呼吸器）

大学院生（学術振興会特別研究員）　中川原　賢亮（なかがわら　けんすけ）

TEL：03-5363-3793　E-mail：k.nakagawara@keio.jp

東京理科大学生命医科学研究所　分子病態学部門

教授　吉村　昭彦（よしむら　あきひこ）

TEL：03-5363-3483　FAX：03-5360-1508　E-mail：yoshimura@keio.jp

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚・岸

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL：03-5363-3611　FAX：03-5363-3612　E-mail：med-koho@adst.keio.ac.jp

https://www.med.keio.ac.jp