

PD-1 に対する一本鎖抗体を分泌する  
CAR-T 細胞は CAR-T 細胞のみならず、  
内因性の腫瘍抗原特異的リンパ球の  
アポトーシスを抑制し固形がんに対し  
て高い治療効果を有する

氏名 中島 正夫

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

令和2年1月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	7
5. 考察	10
6. 謝辞	13
7. 参考文献	13
8. 図表	17

## 1. 要旨

目的：キメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor: CAR) 遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T 細胞) 療法は造血器悪性腫瘍に対しては優れた治療効果を発揮しているものの、固形がんに対しては依然として治療効果に乏しい。その理由として、腫瘍局所での CAR-T 細胞の疲弊と、腫瘍抗原の heterogeneity が挙げられる。今回我々は、免疫チェックポイント分子の一つである PD-1 に対して阻害活性を有する一本鎖抗体 (single chain variable fragment: scFv) を産生する CAR-T 細胞を作製し、その抗腫瘍効果とメカニズムを検討した。

方法：通常 of 第二世代 CAR-T (conventional CAR-T: conv. CAR-T) 細胞を元に抗 PD-1 scFv 産生型 CAR-T (scFv CAR-T) 細胞を作製し、in vitro での抗腫瘍効果 (細胞傷害活性、サイトカイン産生能、分裂能) およびアポトーシスに関して検討した。また、マウスモデルを用いて固形がんに対する in vivo での抗腫瘍効果、腫瘍浸潤リンパ球 (CAR-T 細胞および内因性の腫瘍特異的 T 細胞) の機能、抗 PD-1 scFv の体内動態に関して検討した。結果：scFv CAR-T 細胞は conv. CAR-T 細胞と比較して優れた in vitro での腫瘍傷害活性を認めた。また、抗アポトーシス蛋白である Bcl-xL を高発現し、腫瘍細胞との共培養で誘導されるアポトーシスは有意に抑制されていた。In vivo モデルでも固形がんに対して優れた抗腫瘍効果を認め、腫瘍浸潤リンパ球の解析では CAR-T 細胞のみならず内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞のアポトーシスも抑制されていた。また、scFv CAR-T 細胞療法を施行したマウスにおいて、抗 PD-1 scFv は腫瘍局所でのみ検出可能であり、血清では検出されなかった。

結語：抗 PD-1 scFv を産生する CAR-T 細胞は、腫瘍局所での抗 PD-1 scFv 濃度を高めることで CAR-T 細胞のみならず内因性の腫瘍特異的 T 細胞への PD-1 シグナルを阻害し、固形がんに対して優れた抗腫瘍効果を発揮した。本治療技術は免疫チェックポイント阻害剤の投与で問題となる免疫関連合併症の軽減に繋がる新規がん免疫療法になるものと考えられた。

## 2. 背景

キメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor: CAR) 遺伝子導入 T 細胞療法、CAR-T 細胞療法は近年がん免疫療法の分野に革命をもたらした最も有望なアプローチの一つである (1)。CAR とは、がん細胞の表面抗原に結合する一本鎖抗体に、T 細胞活性化に関わる分子のシグナル伝達領域 (CD28、4-1BB や CD3 など) を組み合わせた人工的な抗原受容体である (2)。CAR-T 細胞療法は B 細胞系の血液悪性腫瘍に対して極めて高い奏効率を示し、現在、2 種類の CD19 分子を標的とする CAR-T 細胞療法が FDA に承認されている。1 つは成人 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する tisagenlecleucel であり、もう 1 つはびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する axicabtagene ciloleucel である。

血液悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞の強力な治療効果とは対照的に、固形がんに対する CAR-T 細胞療法の効果は、これまでのところ極めて限定的である (3)。その理由はさまざま報告されている。第一に、腫瘍微小環境においてさまざまな抑制性の共刺激によって CAR-T 細胞の細胞障害活性と生存が抑制される、いわゆる疲弊が挙げられる (4)。中でも、活性化または疲弊した CAR-T 細胞に発現する Programmed cell death-1 (PD-1) 蛋白と、腫瘍細胞および腫瘍微小環境に存在する様々な細胞に発現するそのリガンドである Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) 蛋白との相互作用は、CAR-T 細胞の抑制に重要な役割を果たしている (5)。そのため、これまで CAR-T 細胞に対する PD-1 シグナルを減衰させる様々なアプローチが報告されている。例えば、抗 PD-1/PD-L1 抗体と CAR-T 細胞療法の併用や、CAR-T 細胞自体の改変 (PD-1 ドミナントネガティブ発現 CAR-T 細胞、PD-1/CD28 キメラスイッチ受容体発現 CAR-T 細胞そして CAR-T 細胞での PD-1 の遺伝的ノックダウン) 等である (5-8)。

固形がんにおける CAR-T 細胞療法の第二の問題点は、腫瘍関連抗原の不均一性である。CAR-T 細胞は通常、腫瘍細胞に発現する 1 つの標的分子のみを認識するように設計されている。そのため、CAR-T 細胞療法は腫瘍抗原の消失 (Antigen-loss) を引き起こし免疫逃避を誘発する可能性が示唆されている (9, 10)。この問題に対して我々は最近、IL-7 と CCL19 を発現する次世代 CAR-T 細胞を作成し、CAR-T 細胞に加えて内因性のさまざまな腫瘍抗原に特異的な T 細胞の蓄積と生存性の強化が、強力な治療効果をもたらすために必須である事を報告した (11)。したがって、固形腫瘍に対して高い治療効果を得るためには、ポリクローナルな腫瘍関連抗原に対する内因性のさまざまな腫瘍抗原特異的 T 細胞を動員する戦略が不可欠である。

本研究では、CAR-T 細胞および腫瘍抗原特異的 T 細胞が存在する腫瘍局所において、PD-1 抑制シグナルを減衰させる抗 PD-1 scFv を生成する CAR-T 細胞を開発した。そして、抗 PD-1 scFv 産生 CAR-T 細胞のマウス固形腫瘍モデルに対する高い治療効果を示した。さらに抗 PD-1 scFv 産生 CAR-T 細胞が高い治療効果をもたらす分子および細胞メカニズムを検討した。

### 3. 方法

#### 【マウスおよび細胞株】

オスマまたはメスの 6~10 週齢の DBA/2 および C57BL/6 マウスは、Japan SLC (静岡、日本) から購入した。P1A 特異的 TCR トランスジェニックマウス (12) は Yang Liu 博士のご厚意により提供していただき、本大学の動物施設で DBA/2 マウスと戻し交配した。P815 肥満細胞腫、3LL ルイス肺がん、および B16F10 メラノーマを用いて、P815-hCD20、3LL-hCD20、および B16F10-hCD20 と呼ばれるヒト CD20 を発現する細胞株を我々の研究室で樹立させた。T 細胞、3LL、3LL-hCD20、および B16F10-hCD20 の培地として、10%FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、25 mM HEPES、および 50 mM 2-メルカプトエタノールを



補充した RPMI-1640 を使用した。P815 および P815-hCD20 細胞の培地として、10%FBS および 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充した DMEM を使用した。プロテイン A カラムを使用して、抗マウス PD-1 mAb をハイブリドーマの上清から単離した (13)。すべての動物実験に関しては、山口大学の施設内動物管理使用委員会によって承認されている。

#### 【プラスミド構成および CAR-T 細胞生成】

ヒト CD20 をターゲットとした第 2 世代 CAR (conv. CAR) を設計するために、抗ヒト CD20 scFv をマウス CD8a 鎖の膜貫通ドメインとマウス CD28 および CD3 $\zeta$  で構成される細胞質領域に接続し、レトロウイルスベクター-MSGV1 にクローニングした (11、14、15)。抗マウス PD-1 scFv は、抗マウス PD-1 mAb のシーケンスから生成した (13)。抗 PD-1 scFv をコードする DNA 配列は、重鎖可変ドメイン、(GGGGS) x3 リンカー、軽鎖可変ドメイン、および FLAG タグを接続し作製した。抗 PD-1 scFv を分泌する CAR (scFv CAR) をコードするベクターを構築するために、conv. CAR と抗 PD-1 scFv の間に 2A 自己切断可能リンカー配列を挿入した。Conv. および scFv CAR の後に自己切断可能な 2A ペプチド配列を介して eGFP を接続し、eGFP を共発現する CAR のベクターを作製した。マウス T 細胞によるレトロウイルス形質導入は、既報と同様の手順で施行した (11)。

#### 【フローサイトメトリー】

この研究では、以下のモノクローナル抗体を使用した。抗 CD8 $\alpha$ 、抗 TIGIT、抗 CD107a、および抗 Bcl-2 mAb (BioLegend)。抗 CD90.2、抗 PD-1、抗 LAG-3、抗 TIM-3、および抗 V $\alpha$ 8.3 mAb (Thermo Fisher Scientific)。抗ヒト CD20 mAb (BD Biosciences)。抗 Bcl-xL mAb (Abcam)。抗 Bim mAb (CST)。アネキシン V (BD Biosciences) および Zombie Yellow viability dye (BioLegend)。既報と同様に、ビオチン化組換えタンパク L (GenScript) を使用して CAR-T 細胞を検出した (16)。一部の実験では、細胞内タンパク質染色バッファーセット (Thermo Fisher Scientific) を使用した。APC 結合抗ヒト IgG mAb (BioLegend) を使用して、マウス PD-L1 ヒト Fc 融合タンパク質 (R&D システム) の PD-1 蛋白への結合を検出した。抗マウス CD16/CD32 mAb は、Fc $\gamma$  受容体への抗体の非特異的結合をブロックするために使用した。フローサイトメトリーデータは、EC800 (SONY) または BD LSRFortessa X-20 セルアナライザー (BD Biosciences) を使用して取得し、FlowJo ソフトウェア (FlowJo、LLC) を使用して分析した。

#### 【CAR-T 細胞細胞の In-vitro 機能解析】

conv. CAR-T または scFv CAR-T 細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞/ウェル) を 3LL-hCD20 腫瘍細胞とさまざまなエフェクター/標的細胞 (E/T) 比で共培養し細胞傷害性アッセイを行った。共培養には 24 ウェル組織培養プレートを使用した。陰性対照として、遺伝子導入のない活性化 T 細胞を同じ総細胞数で使用した。2 日後、残存腫瘍および CAR-T 細胞を検出するため

に培養細胞を回収し、Zombie Yellow viability dye、抗 hCD20 mAb および抗 CD90.2 mAb で染色した後、フローサイトメーターで分析した。

頻回刺激に対する CAR-T 細胞の応答を評価するためにストレス試験を以下の様に施行した。まず 24 ウェル組織培養プレート内で CAR-T 細胞をマイトマイシン C 処理 3LL-hCD20 で刺激した（どちらも  $1 \times 10^6$  細胞/ウェル）。72 時間後、CAR-T 細胞を回収し、マイトマイシン C 処理 3LL-hCD20 腫瘍細胞を用いて 1 : 1 の比率で再刺激した。2 回目の刺激の 48 時間後、CAR-T 細胞を回収して、細胞数、アポトーシスのレベル、細胞内のアポトーシス関連タンパク質、疲弊マーカーおよび CD107a 蛋白発現状況を評価した。

分裂能を評価するために、CytoTell Blue (AAT Bioquest) で標識した CAR-T 細胞を、96 ウェル組織培養プレート内でマイトマイシン C 処理 3LL-hCD20 細胞を用いて 1 : 1 の比率で刺激した。3 日後と 5 日後、CytoTell Blue の強度をフローサイトメトリーで分析した。

#### 【マウスモデルによる scFv CAR-T 細胞の抗腫瘍効果評価】

C57BL/6 マウスに、0 日目に  $2.5 \times 10^6$  細胞の 3LL-hCD20 を皮下接種 (sc) した。6 日目に放射線照射 (3Gy) し、7 日目に Effector cell を静脈内注射 (iv) した ( $1 \times 10^6$  細胞の conv. CAR-T 細胞、scFv CAR-T 細胞または遺伝子導入のない活性化 T 細胞。また、これらの合計細胞数は全て等しくなるように調整)。いくつかの実験では、3LL-hCD20 の代わりに  $2.5 \times 10^6$  細胞の B16F10-hCD20 を皮下接種した。scFv CAR-T 細胞のメモリー形成能を評価するためにリチャレンジ試験では scFv CAR-T 細胞での治療により完全寛解を達成したマウスに  $2.5 \times 10^6$  細胞の 3LL-hCD20 を再接種した。すべての実験で、腫瘍の大きさとマウスの生存率を週 2 回評価した。

#### 【マウスモデルによる CAR-T 細胞および内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞の動態評価】

DBA/2 マウスに 0 日目に  $5 \times 10^5$  個の P815-hCD20 腫瘍細胞を sc し、13 日目に放射線照射 (3Gy) し、14 日目に  $1 \times 10^6$  細胞の scFv CAR-T または conv. CAR-T 細胞とともに内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞のサロゲートとして  $1 \times 10^6$  細胞の P1A 特異的 T 細胞を iv した。P1A 特異的 T 細胞は、P1A 特異的 TCR トランスジェニックマウスの脾臓およびリンパ節から単離した。21 日目に、腫瘍組織から腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を採取し、CAR-T 細胞と P1A 特異的 T 細胞の数およびアポトーシスの程度を分析した。

#### 【抗 PD-1scFv および抗 PD-1 抗体の体内動態評価】

C57BL/6 マウスに 0 日目に  $2.5 \times 10^6$  個の 3LL-hCD20 細胞を皮下接種し、6 日目に放射線照射 (3Gy) し、7 日目に  $1 \times 10^6$  scFv CAR-T 細胞のみ iv または conv. CAR-T 細胞の iv に加えて抗 PD-1 抗体 (200 $\mu$ g) の腹腔内注射を行った (抗 PD-1 抗体は 7、12、17 日目に投与)。18 日目にマウスから腫瘍組織と血清を採取し、抗 PD-1 scFv および抗 PD-1 抗体の濃度を測定した。

#### 【ELISA】

IFN- $\gamma$  ELISA キット (BD Biosciences) を使用して、IFN- $\gamma$  濃度を測定した。ホモジナイズされた腫瘍組織およびマウス血清中の抗 PD-1 scFv および抗 PD-1 mAb の濃度は、以下のように当研究室で確立した ELISA 法によって決定した。捕獲抗体として組換えマウス PD-1-ヒト Fc 融合タンパク質 (R&D Systems) を使用した。スタンダードとして、FLAG タグ付き抗 PD-1 scFv またはハムスター抗 PD-1 mAb を使用した。検出抗体として HRP 結合抗 FLAG Ab (Sigma-Aldrich) または HRP 結合抗ハムスター IgG Ab (Jackson Immunoresearch) を使用した。

#### 【統計解析】

生存実験を除くすべてのアッセイの統計分析は両側スチューデントの t 検定を使用した。マウスの生存率については、カプラン・マイヤー曲線を描き、統計分析にはログランク検定を使用した。0.05 未満の P 値での差は有意とみなした。

## 4. 結果

#### 【抗 PD-1scFv 分泌 CAR-T 細胞の作製】

まず、hCD20 を標的とする第二世代 CAR コンストラクトを精製した。これは、抗 hCD20 一本鎖抗体、CD8 膜貫通ドメインそして T 細胞活性化に関わる細胞内シグナル領域 (CD28 と CD3 $\zeta$ ) から構成される (以降、このコンストラクトを移行 conv. CAR と記載)。抗 PD-1scFv を分泌する CAR コンストラクトを作製するために、conv. CAR コンストラクトと抗 PD-1scFv を自己切断型 2A ペプチドを介して接続する配列とした (このコンストラクトを以降 scFv CAR と記載) (Fig. 1A)。レトロウイルスを用いて scFv CAR をマウス T 細胞に遺伝子導入し scFv CAR-T 細胞を作製した。scFv CAR の発現率は約 70~80% と、従来型の CAR-T 細胞と同程度の高い発現効率であった (Fig. 1B)。また、ELISA 法を用いて上清中に約 1 $\mu$ g/ml 程度の濃度の抗 PD-1scFv が分泌されている事を確認した (Fig. 1C)。さらに、この抗 PD-1scFv は 293T 細胞上に一時的に発現させた PD-1 蛋白と PD-L1 蛋白の結合を濃度依存的に阻害した (抗 PD-1scFv は約 1 $\mu$ g/ml の濃度で同結合を完全に阻害した) (Fig. 1D, E)。以上の事より、scFv CAR-T 細胞は PD-1/PD-L1 結合を阻害する生理活性を持った scFv を分泌する機能を有することが分かった。

#### 【アポトーシスを抑制することで scFv CAR-T 細胞は高い抗腫瘍効果を有する】

scFv CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を調べるために、conv. CAR-T、scFv CAR-T、または遺伝子導入なしの活性化 T 細胞を、さまざまなエフェクター対ターゲット比 (E:T) で 2 日間、3LL-hCD20 と共培養した。なおこのアッセイでは、in vitro での IFN- $\gamma$  刺激により

PD-L1 が 3LL-hCD20 上に発現することを確認している (データは非表示)。1 : 1 の E : T 比では conv. CAR-T 細胞と scFv CAR-T 細胞は、ほぼ同等の細胞傷害活性を示した (Fig. 2A)。対照的に、E : T 比が 1 : 3 と腫瘍細胞数が多い場合は、conv. CAR-T 細胞は腫瘍殺傷活性を著しく損なう一方、scFv CAR-T 細胞は高い細胞障害活性を維持した。この条件では、共培養後の残存腫瘍細胞の数は、conv と比較して scFv CAR-T 細胞との共培養により有意に減少した (Fig. 2B)。また、共培養後の CAR-T 細胞の数は scFv CAR-T 細胞の方が conv の数よりも有意に多かった (Fig. 2C)。さらに scFv CAR-T 細胞は、conv. CAR-T 細胞と比較してはるかに大量の IFN- $\gamma$  を産生した (Fig. 2D)。以上の結果より、scFv CAR-T 細胞が分泌する抗 PD-1 scFv は PD-1/PD-L1 相互作用を遮断し高い抗腫瘍効果を発揮した。特に *in vivo* での腫瘍環境に類似した多くの腫瘍細胞と CAR-T 細胞が直面する条件下で、scFv CAR-T 細胞は抗腫瘍活性を改善している可能性が示唆された。

scFv CAR-T 細胞の高い抗腫瘍活性のメカニズムを調べるために、*in vitro* で生体内での腫瘍免疫細胞相互作用の状態を模倣するいわゆる「ストレステスト」を実施した (17)。このモデルでは、conv. CAR-T 細胞および scFv CAR-T 細胞を、マイトマイシン C で処理した 3LL-hCD20 細胞で 0 および 3 日目に E : T 比 1 : 1 で刺激し、さらに 2 日間培養し解析を行った。まず、LAG-3、TIM-3、および TIGIT の発現を検討することにより、CAR-T 細胞の疲弊状態を調べた。疲弊マーカーの発現レベルは、conv. CAR-T および scFv CAR-T 細胞の間ではほぼ同等であることがわかった (Sup. Fig. 1A)。ただし、TIGIT の発現は conv. CAR-T 細胞と比較して scFv CAR-T 細胞ではわずかであるが有意に減少していた (Sup. Fig. 1B)。また、個々の CAR-T 細胞の細胞傷害活性を反映するマーカーである CD107a の発現、および蛍光プローブ希釈アッセイを使用し CAR-T 細胞の細胞分裂を検討した。その結果、conv. CAR-T 細胞および scFv CAR-T 細胞は、同等レベルの CD107a 発現および増殖能を示した (Sup. Fig. 1c, D)。これらの結果からは、scFv CAR-T 細胞が高い抗腫瘍活性を示すメカニズムとして、T 細胞疲弊の予防または回復、個々の CAR-T 細胞あたりの細胞障害活性の増強、または CAR-T 細胞の増殖促進とは異なったメカニズムが関与している可能性が示唆された。

前述のように、共培養後の scFv CAR-T 細胞の数は conv. CAR-T 細胞の数よりも有意に多く (Fig. 2C)、ストレステストの結果も同様であった (Fig. 3A)。そこで抗 PD-1 scFv による PD-1/PD-L1 相互作用の遮断は、*in vivo* で引き起こされる様な頻回な腫瘍抗原と CAR-T 細胞の接触により誘導される活性化誘導細胞死 (Activation induced cell death: AICD) を阻害することで、scFv CAR-T 細胞の増殖を促していると仮定した。まず、抗原刺激を繰り返した後の CAR-T 細胞の初期 (ゾンビイエロー染色陰性/アネキシン V 染色陽性集団) および後期アポトーシス (ゾンビイエロー染色/アネキシン V 染色二重陽性集団) の割合を調べた。結果 scFv CAR-T 細胞の初期および後期アポトーシスの割合は、conv. CAR-T 細胞における割合よりも有意に低いことがわかった (Fig. 3B, 3C)。これは scFv CAR-T 細胞における PD-1 シグナルの遮断が、AICD の阻害により CAR-T 細胞の生存を促進した可能性

が示唆された。このメカニズムをさらに検討するため、抗原刺激を繰り返した後のアポトーシス関連蛋白の細胞内発現レベルを検討した。結果、scFv CAR-T 細胞内の抗アポトーシス蛋白である Bcl-xL の発現は、conv. CAR-T 細胞内での発現よりも有意に高いことがわかった。一方で、別の抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 と、アポトーシス促進蛋白である Bim の発現レベルは両 CAR-T 細胞間で同程度であった (Fig. 3D)。以上の結果より、scFv CAR-T 細胞は CAR-T 細胞の AICD を抑制することで高い抗腫瘍効果をもたらしており、そのメカニズムには Bcl-xL の高発現が関連している可能性が示唆された。

#### 【マウス腫瘍モデルに対する scFv CAR-T 細胞の治療効果】

次に、固形腫瘍を有するマウス腫瘍モデルに対する scFv CAR-T 細胞の治療効果を検討した。0 日目に 3LL-hCD20 を C57BL/6 マウスに sc した。6 日目に亜致死量の放射線を照射し、7 日目に抗 hCD20 conv. CAR-T 細胞、scFv CAR-T 細胞、または遺伝子導入なしの活性化 T 細胞を尾静脈より移入した。結果、scFv CAR-T 細胞による治療は conv. CAR-T 細胞または活性化 T 細胞で治療したものと比較して、腫瘍増殖を抑制し (Fig. 4A)、マウスの生存を有意に延長した (Fig. 4B)。一方で、conv. CAR-T 細胞は、活性化 T 細胞と比較して、腫瘍増殖抑制や生存延長効果も認められなかった。scFv CAR-T 細胞の優れた治療効果は、B16F10-hCD20 を有する他の固形腫瘍モデルによっても確認された (sup. Fig. 2A, 2B)。

さらに scFv CAR-T 細胞療法により長期の、抗腫瘍免疫記憶を誘導できるかどうかを確認した。scFv CAR-T 細胞による治療で 3LL-hCD20 を拒絶したマウスを 80 日間維持し、その後 3LL-hCD20 を再度 sc した。結果、これらのマウスは 3LL-hCD20 細胞を完全に拒絶した一方で、ナイーブマウスに接種した同腫瘍は急速に増大した (Fig. 4C)。

以上の結果より、通常の CAR-T 細胞療法に耐性であった固形腫瘍に対して、scFv CAR-T 細胞は優れた治療効果を有し、また抗腫瘍免疫記憶応答を有することにより腫瘍再発を抑制することを示した。

#### 【scFv CAR-T 細胞による腫瘍に浸潤した腫瘍抗原特異的リンパ球のアポトーシス抑制】

我々は最近の研究で、固形腫瘍に対して CAR-T 細胞療法が優れた抗腫瘍効果をもたらすためには内在性の腫瘍抗原特異的 T 細胞が非常に重要であることを明らかにした (12)。scFv CAR-T 細胞の治療効果は CAR-T 細胞のアポトーシスの減少と関連しているため (Fig. 3)、次に scFv CAR-T 細胞によって産生される抗 PD-1 scFv がオートクラインだけでなくパラクラインに作用し内在性の腫瘍抗原特異的な非 CAR-T 細胞のアポトーシスも防止できるかどうかを調べた。マウスに P815-hCD20 を SC し十分に大きくなったのを確認し、致死量以下の放射線照射を行った後、P1A 特異的 TCR トランスジェニック T 細胞 (P1A-CTL) とともに conv. CAR-T 細胞または scFv CAR-T 細胞をマウス尾静脈より移入した。このモデルでは、P815 に由来する P1A 腫瘍抗原を認識する P1A-CTL を、内因性の腫瘍抗原特

異的 T 細胞の代替として使用した。Effector 細胞の移入後 7 日目に腫瘍浸潤リンパ球を腫瘍組織から採取し、CAR-T 細胞と P1A-CTL の数および、初期・後期アポトーシスの程度を分析した。結果、*in vitro* の結果と一致して、TIL 中の scFv CAR-T 細胞の数は conv. CAR-T 細胞よりも有意に多く (Fig. 5A)、アポトーシスの有意な減少を認めた (Fig. 5B, 5C)。さらに、conv. CAR-T 細胞を併用投与したマウスと比較して scFv CAR-T 細胞を共に投与したマウスでは有意に多くの腫瘍に浸潤した P1A-CTL を認めた (Fig. 5D)。P1A-CTL のアポトーシス細胞の割合も、scFv CAR-T 細胞併用群では、conv CAR-T 併用群でのそれよりも有意に低かった Fig. 5E, 5F)。以上の結果より、腫瘍微小環境で scFv CAR-T 細胞によって産生された抗 PD-1 scFv はオートクラインおよびパラクライン様式によって CAR-T 細胞および内因性腫瘍特異性 T 細胞の両方に対して作用しアポトーシスを阻害することで、これらの細胞の相乗作用により固形腫瘍に対して優れた治療効果をもたらす可能性が示唆された。

#### 【scFv CAR-T 細胞により産生された抗 PD-1scFv は主に腫瘍局所に存在する】

抗 PD-1 抗体は、進行がん患者および難治性がん患者に強力な治療効果をもたらすが、免疫関連有害事象 (irAE) の発生が大きな問題となっている。さらに CAR-T 細胞療法と抗 PD-1 抗体を併用すると、全身に作用する抗 PD-1 抗体により CAR-T 細胞療法の主要な有害事象であるサイトカイン放出症候群 (CRS) の重篤化が危惧される。そこで、scFv CAR-T 細胞によって産生される抗 PD-1scFv の生体内分布を評価した。scFv CAR-T 細胞を *iv* したマウスの血清および腫瘍組織における抗 PD-1scFv の濃度を測定した。対照として、conv. CAR-T 細胞の静脈内投与に加えて、抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を行ったマウスの血清および腫瘍組織中の抗 PD-1 抗体の濃度を測定した。結果、scFv CAR-T 細胞によって産生される抗 PD-1scFv は、腫瘍組織抽出物からは検出可能であったが、血清からは検出されなかった。一方で、抗 PD-1 抗体は腫瘍組織抽出物および血清から同等のレベルで検出された (Sup. Fig. 3)。以上のデータから、scFv CAR-T 細胞は通常の CAR-T 細胞と比較して優れた治療効果を維持しながら、CAR-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用治療よりも安全性の面で優れている可能性が強く示唆された。

## 5. 考察

本研究では、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の治療効果を高める事を目的として、抗 PD-1scFv を生成する新規 CAR-T 細胞システムを開発した。scFv CAR-T 細胞は、*in vitro* での高い抗腫瘍効果と、*in vivo* での固形腫瘍に対する治療効果の改善とともに長期抗腫瘍免疫記憶形成を示した。機能解析により、scFv CAR-T 細胞によって分泌された抗 PD-1scFv のオートクラインおよびパラクライン効果により、CAR-T 細胞自体だけでなく腫瘍組織内の腫瘍抗原特異的 T 細胞のアポトーシスをも抑制することが明らかになった。生体内分布分析では、scFv CAR-T 細胞の静脈内投与により、腫瘍組織では抗 PD-1scFv の検出が可能であったが、血清では検出されなかった。以上の結果より、scFv CAR-T 細胞が CAR-

T 細胞のみならず内在性の腫瘍抗原特異的 T 細胞の両方を腫瘍組織内で局所的に生存させることにより固形腫瘍に対して優れた治療効果を誘導するとともに、抗 PD-1 抗体の併用により問題となるであろう免疫関連有害事象の発生を抑えることができる可能性が示唆された。

scFv CAR-T 細胞は、頻回な抗原刺激にさらされたときに誘発されるアポトーシス細胞死 (Activation induced cell death: AICD) が抑制されていることが明らかとなった。AICD は、自己反応性 T 細胞を排除し末梢 T 細胞の免疫応答を停止させる重要な生体メカニズムである (20)。また PD-1/PD-L1 経路が、アポトーシス促進分子および抗アポトーシス分子の転写調節 (例えば、抗アポトーシスタンパク質である Bcl-xL のダウンレギュレーションまたはアポトーシス促進タンパク質である Bim のアップレギュレーションを介した PI3K/Akt 脱リン酸化) による抗原特異的 T 細胞の AICD を部分的に誘導することが報告されている (21, 22)。がん免疫療法の分野では、TIL のアポトーシスが治療効果を制限する主要な因子であることが報告されており、TIL のアポトーシスを抑制することは抗腫瘍免疫による腫瘍制御を達成するための重要な戦略となる可能性がある (23)。さらに CAR-T 細胞療法に関しては、AICD が固形腫瘍に対する CAR-T 細胞の治療効果を妨げる重要なメカニズムの 1 つであることが示されている (24, 25)。しかし、我々の知る限りでは、CAR-T 細胞の AICD と PD-1/PD-L1 経路との関係を解明した報告はこれまでに 1 編存在するのみである (19)。これに関して、我々は scFv CAR-T 細胞が抗アポトーシス分子である Bcl-xL の発現増加に関連して、抗原刺激の繰り返し下で誘導される初期および後期アポトーシスの両方を抑制することを明らかにした。この結果は、PD-1 シグナルを阻害する PD-1-CH3 融合タンパク質を産生するように設計された CAR-T 細胞が、Bcl-xL のアップレギュレーションに関連して CAR-T 細胞を疲弊から保護できるという報告と一致している (26)。以上の知見より、Bcl-xL を過剰発現する様に CAR-T 細胞を遺伝子改変することは、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を高めるための有望なアプローチになると予想された。

固形腫瘍に対する治療抵抗性を改善するために CAR-T 細胞への PD-1 シグナルを減衰させる目的で、さまざまな方法が報告されている。例えばドミナントネガティブ型の PD-1 を有する CAR-T 細胞、PD-1/CD28 キメラスイッチ受容体を有する CAR-T 細胞そして PD-1 発現を遺伝的に欠失させた CAR-T 細胞システムなどである (6-8)。これらのアプローチは、CAR-T 細胞自体への PD-1 シグナルを減衰可能であるが、内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞を含む非 CAR-T 細胞には影響を与えることは出来ない。我々が IL-7/CCL19 産生 CAR-T 細胞に関して報告したように、内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞との相乗効果は、固形腫瘍に対して CAR-T 細胞療法が高い治療効果を得るためには不可欠である (12)。これに関して、可溶性の PD-1 阻害蛋白 (抗 PD-1scFv または PD-1-Fc 融合タンパク質) を産生するように設計された CAR-T 細胞に関する 3 編の報告がある (26-28)。これらはすべて抗腫瘍効果の向上を報告しているが、そのうち 2 編は NSG 免疫不全マウスをレシピエントとして使用しているため、改良された CAR-T 細胞が内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞に対してどの様な影

響をおよぼすかという点は評価されていない (26, 27)。 Rafiq らは我々と同様に抗 PD-1scFv 産生 CAR-T 細胞を作製し免疫保持マウスモデルを用いてバイスタンダーT 細胞および CAR-T 細胞の抗腫瘍活性が改善されることを示している (28)。この研究では、腫瘍抗原特異的な内因性 T 細胞は検討されず、代わりに総 T 細胞またはバイスタンダーCAR-T 細胞に関して検討されている。さらに、バイスタンダーT 細胞の高い抗腫瘍活性の根底にあるメカニズムは完全には明らかにされていない。対照的に、我々の研究では、PIA 特異的 TCR トランスジェニック T 細胞をサロゲートとして利用することで内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞の応答を評価し、CAR-T 細胞のみならず PIA-CTL においてもアポトーシス細胞死が減少することを見いだした。したがって、我々の今回の研究は、PD-1 阻害蛋白を産生する CAR-T 細胞による治療では、内因性の腫瘍抗原特異的 T 細胞の抗腫瘍効果が増強している事を明確に実証し、その潜在的なメカニズムを明らかにした最初の報告である。高い Heterogeneity を有する固形腫瘍に対して効果的な治療効果を得るためには、ポリクローナルもしくはオリゴクローナルな腫瘍抗原特異的な内因性 T 細胞の活性化が、極めて重要であり、その点からも本治療法は固形腫瘍に対して極めて有効である可能性を有する。

免疫チェックポイント阻害剤は現在多種の進行がんに対して保険収載され使用されており、既存の治療法と比較しても優れた治療効果を発揮している。しかし同時に、治療に関連する免疫関連有害事象は実臨床で重要な問題となっている (29)。また、CAR-T 細胞療法は、CRS や on-target off-tumor toxicity などの有害事象を誘発することが多いことも知られている (15, 30)。免疫チェックポイント阻害剤または CAR-T 細胞療法それぞれによって引き起こされる免疫関連有害事象は、時に重篤で致命的となる可能性がある。そのため、特に免疫チェックポイント阻害剤と CAR-T 細胞療法を組み合わせた最近の臨床試験では、免疫関連有害事象を減らすための新規戦略の探索が非常に重要視されている。これに関して、我々の作製した新規 CAR-T 細胞から分泌された抗 PD-1scFv は、腫瘍組織局所でのみ検出された。この結果は、抗 PD-1scFv 産生 CAR-T 細胞療法が、抗 PD-1 抗体投与に関連する重度の irAE を誘発することなく、治療効果を高めることができる可能性を示唆している。

以上より、抗 PD-1scFv を産生する CAR-T 細胞は、CAR-T 細胞自体のみならず腫瘍抗原特異的な非 CAR-T 細胞のアポトーシスも抑制し、マウス固形腫瘍モデルに対する高い抗腫瘍効果を示した。抗 PD-1scFv の効果は、全身ではなく腫瘍組織で局所的に誘導されており、PD-1 阻害によって引き起こされる重篤な免疫関連有害事象の発生が少ない可能性を有している。免疫チェックポイント阻害剤を可溶性タンパク質として産生することのできる CAR-T 細胞を作製するという技術は、他の免疫チェックポイント分子にも適用できる有望なアプローチであり、今後はこれらのアプローチの可能性を探るさらなる研究が必要である。



## 6. 謝辞

本研究はThe Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) による Practical Research for Innovative Cancer Control, and Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution (P-CREATE) 16770206 の研究プログラムとして行われた。本研究は Editage (Tokyo, Japan) で英文校正された。また、本研究をサポートしてくださった山口大学免疫学教室の技術補佐員、事務員そして大学院生の方々には深く御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

1. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 2013 Dec 20;1432-3.
2. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13(6):370-83 doi 10.1038/nrclinonc.2016.36.
3. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng* 2018;2(6):377-91 doi 10.1038/s41551-018-0235-9.
4. Moon EK, Wang L-C, Dolfi DV, Wilson CB, Ranganathan R, Sun J, et al. Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20(16):4262-73 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-2627.
5. John LB, Devaud C, Duong CPM, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19(20):5636-46 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
6. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2016;126(8):3130-44 doi 10.1172/JCI83092.
7. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, et al. A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors. *Cancer research* 2016;76(6):1578-90 doi 10.1158/0008-5472.CAN-15-2524.
8. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific reports* 2017;7(1):737 doi 10.1038/s41598-017-00462-8.

9. O' Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science translational medicine* 2017;9(399):eaaa0984 doi 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
10. Majzner RG, Mackall CL. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* 2018;8(10):1219-26 doi 10.1158/2159-8290.CD-18-0442.
11. Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, Kwek SS, Madhiredy D, Martins MM, et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168(3):487-502. e15 doi 10.1016/j.cell.2016.12.022.
12. Adachi K, Kano Y, Nagai T, Okuyama N, Sakoda Y, Tamada K. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nature biotechnology* 2018;36(4):346-51 doi 10.1038/nbt.4086.
13. Sarma S, Guo Y, Guilloux Y, Lee C, Bai XF, Liu Y. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor rejection antigen P1A: normal development but restrained effector function in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189(5):811-20.
14. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer research* 2005;65(3):1089-96.
15. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy* 2010;18(4):843-51 doi 10.1038/mt.2010.24.
16. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18(23):6436-45 doi 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449.
17. Zheng Z, Chinnasamy N, Morgan RA. Protein L: a novel reagent for the detection of chimeric antigen receptor (CAR) expression by flow cytometry. *Journal of Translational Medicine* 2012;10(1):29 doi 10.1186/1479-5876-10-29.
18. Chang ZL, Chen YY. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends in Molecular Medicine* 2017;23(5):430-50 doi 10.1016/j.molmed.2017.03.002.
19. Gargett T, Yu W, Dotti G, Yvon ES, Christo SN, Hayball JD, et al. GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade.

Molecular Therapy 2016;24(6):1135-49 doi 10.1038/mt.2016.63.

20. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews Immunology* 2007;7(7):532-42 doi 10.1038/nri2115.

21. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25(21):9543-53 doi 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005.

22. Gibbons RM, Liu X, Pulko V, Harrington SM, Krco CJ, Kwon ED, et al. B7-H1 limits the entry of effector CD8(+) T cells to the memory pool by upregulating Bim. *Oncoimmunology* 2012;1(7):1061-73 doi 10.4161/onci.20850.

23. Horton BL, Williams JB, Cabanov A, Spranger S, Gajewski TF. Intratumoral CD8+ T-cell Apoptosis Is a Major Component of T-cell Dysfunction and Impedes Antitumor Immunity. *Cancer immunology research* 2018;6(1):14-24 doi 10.1158/2326-6066.CIR-17-0249.

24. Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJW, Sievers SA, et al. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Molecular Therapy* 2017;25(11):2452-65 doi 10.1016/j.ymthe.2017.07.013.

25. Künkele A, Johnson AJ, Rolczynski LS, Chang CA, Hoglund V, Kelly-Spratt KS, et al. Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8+ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD. *Cancer immunology research* 2015;3(4):368-79 doi 10.1158/2326-6066.CIR-14-0200.

26. Pan Z, Di S, Shi B, Jiang H, Shi Z, Liu Y, et al. Increased antitumor activities of glypican-3-specific chimeric antigen receptor-modified T cells by coexpression of a soluble PD1-CH3 fusion protein. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67(10):1621-34 doi 10.1007/s00262-018-2221-1.

27. Li S, Siriwon N, Zhang X, Yang S, Jin T, He F, et al. Enhanced Cancer Immunotherapy by Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Engineered to Secrete Checkpoint Inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017;23(22):6982-92 doi 10.1158/1078-0432.CCR-17-0867.

28. Rafiq S, Yeku OO, Jackson HJ, Purdon TJ, van Leeuwen DG, Drakes DJ, et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo. *Nat Biotechnol* 2018;36(9):847-56 doi 10.1038/nbt.4195.

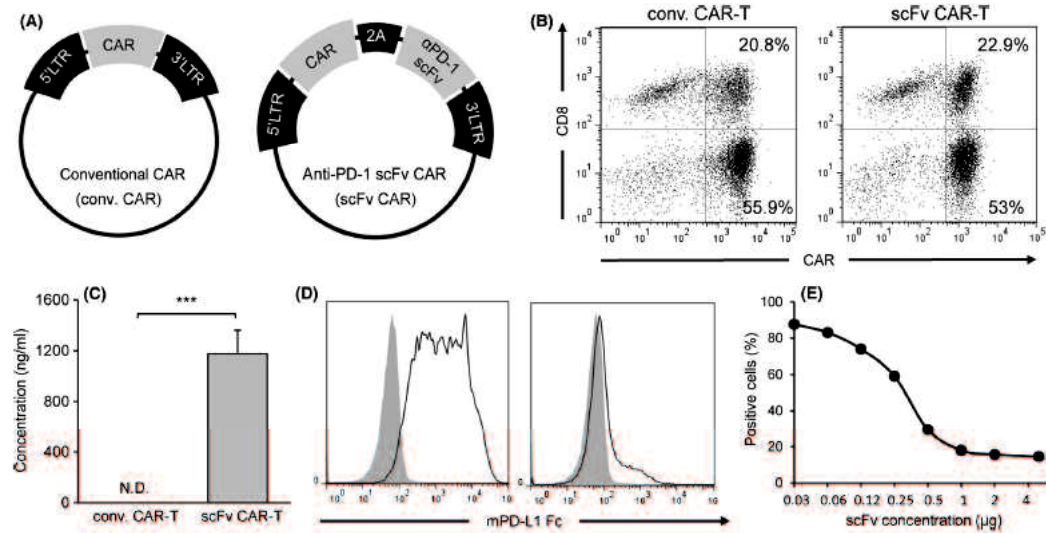
29. Friedman CF, Proverbs-Singh TA, Postow MA. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review. *JAMA Oncol*

2016;2(10):1346-53 doi 10.1001/jamaoncol.2016.1051.

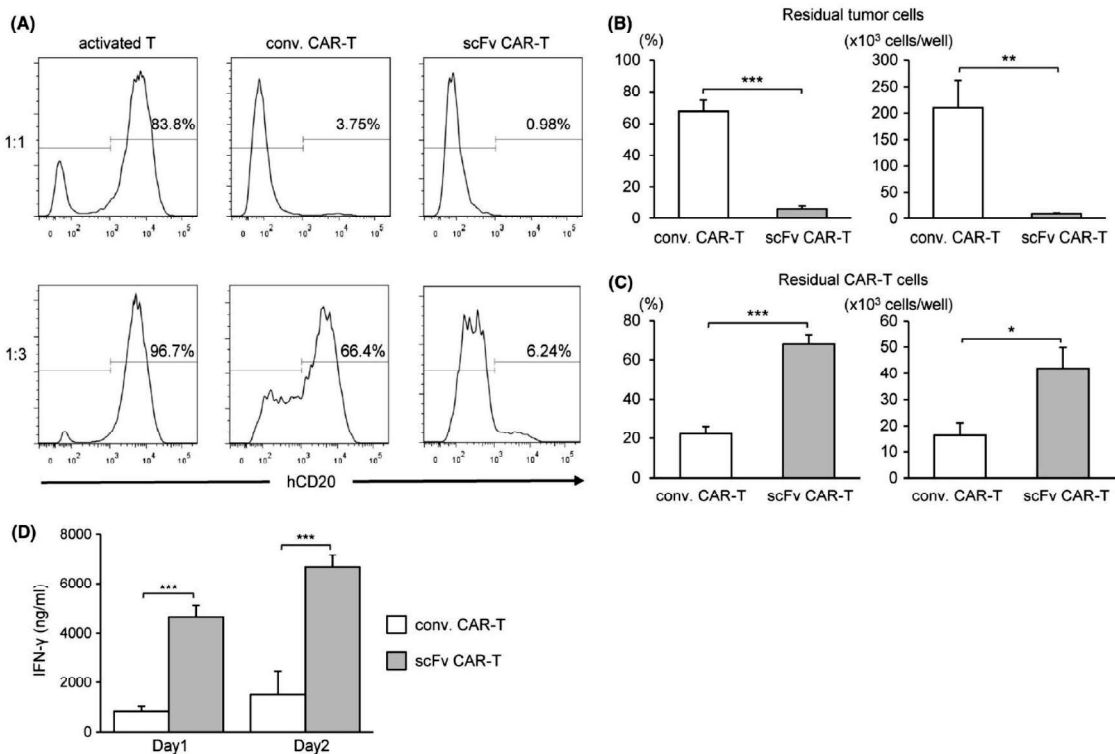
30. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014;124(2):188-95 doi 10.1182/blood-2014-05-552729.

31. Nakajima M, Sakoda Y, Adachi K, Nagano H, Tamada K. Improved survival of chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) and tumor-specific T cells caused by anti-programmed cell death protein 1 single-chain variable fragment-producing CAR-T cells. *Cancer Science*. 2019 Oct;110(10):3079-3088. doi: 10.1111/cas.14169.

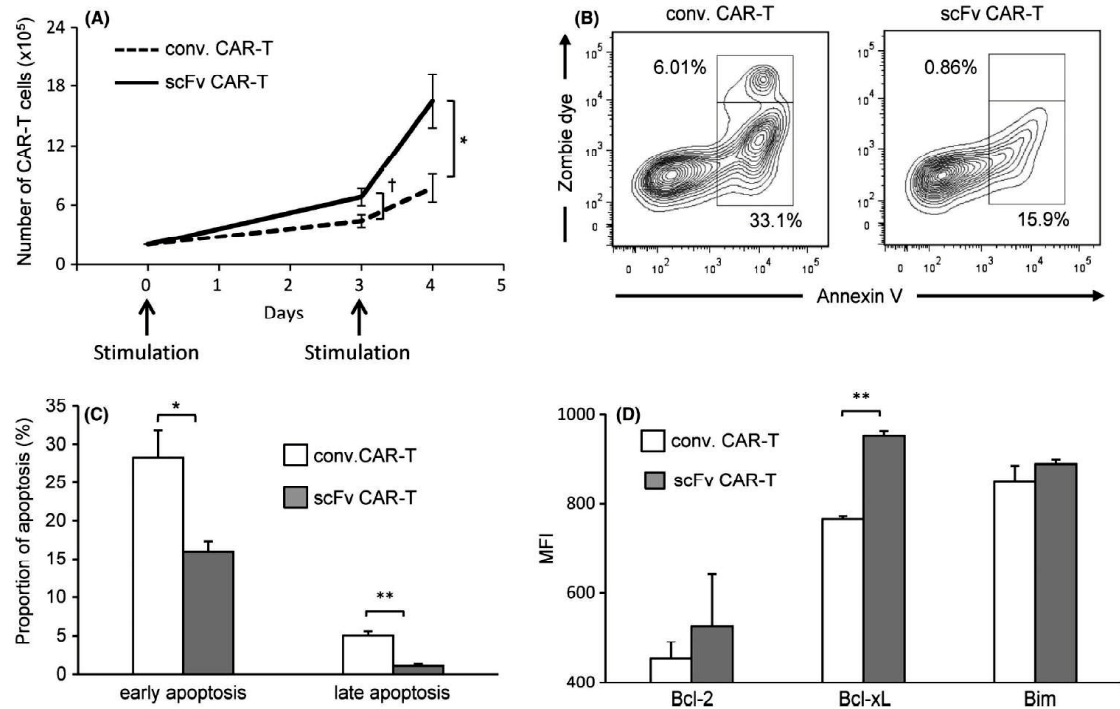
8. 图表



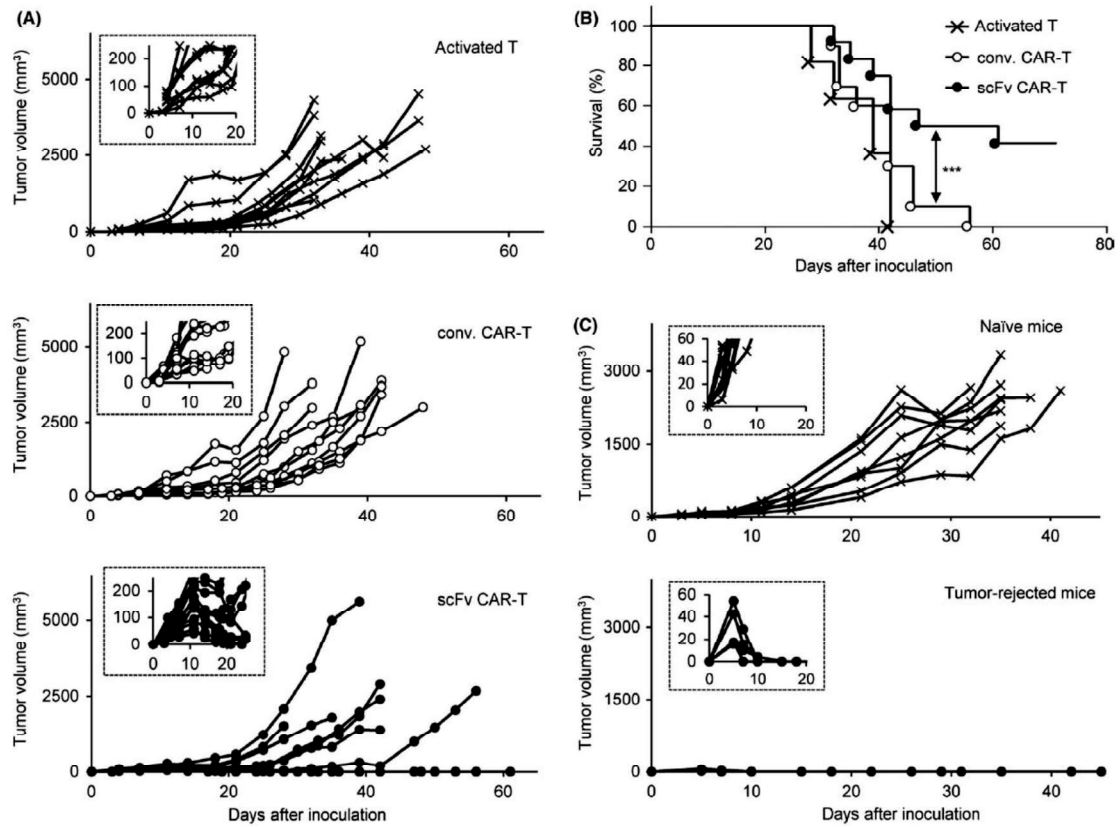
**FIGURE 1** Generation and functional characterization of single-chain variable fragment (scFv) chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) cells. A, Schematic representation of anti-hCD20 conv. CAR and scFv CAR retroviral vectors. B, Two days after retroviral transduction, CAR expressions were analyzed. C, Four days after retroviral transduction, production of anti-programmed cell death protein 1 (PD)-1 scFv in the culture supernatants were analyzed by ELISA (mean ± SD, n = 3, \*\*\*P < .001). D, 293T cells expressing PD-1 were first incubated with 2 μg control hamster immunoglobulin (left panel) or anti-PD-1 scFv (right panel), and then stained with control immunoglobulin (filled lines) or PD-L1-Fc protein (open lines), followed by APC-conjugated antihuman IgG mAb. E, In the assay similar to (D), binding of programmed death-ligand 1 (PD-L1)-Fc protein to PD-1-expressing 293T cells in the presence of titrated doses of anti-PD-1 scFv was assessed by flow cytometry. Representative data from at least three independent experiments are shown



**FIGURE 2** In vitro antitumor activity of single-chain variable fragment (scFv) chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) cells. Anti-hCD20 CAR-T cells or activated T cells were cocultured with 3LL-hCD20 in an E:T ratio of 1:1 and 1:3 for 2 d. Representative data of residual viable tumor cells (A), percentages and cell numbers of tumor cells (B) and CAR-T cells (C) are shown (mean ± SD, n = 3). D, On days 1 and 2, culture supernatants were harvested and assessed for concentration of interferon (IFN)-γ by ELISA (mean ± SD, n = 3). Representative data from at least three independent experiments are shown. \*\*\*P < .001. \*\*P < .005. \*P < .01

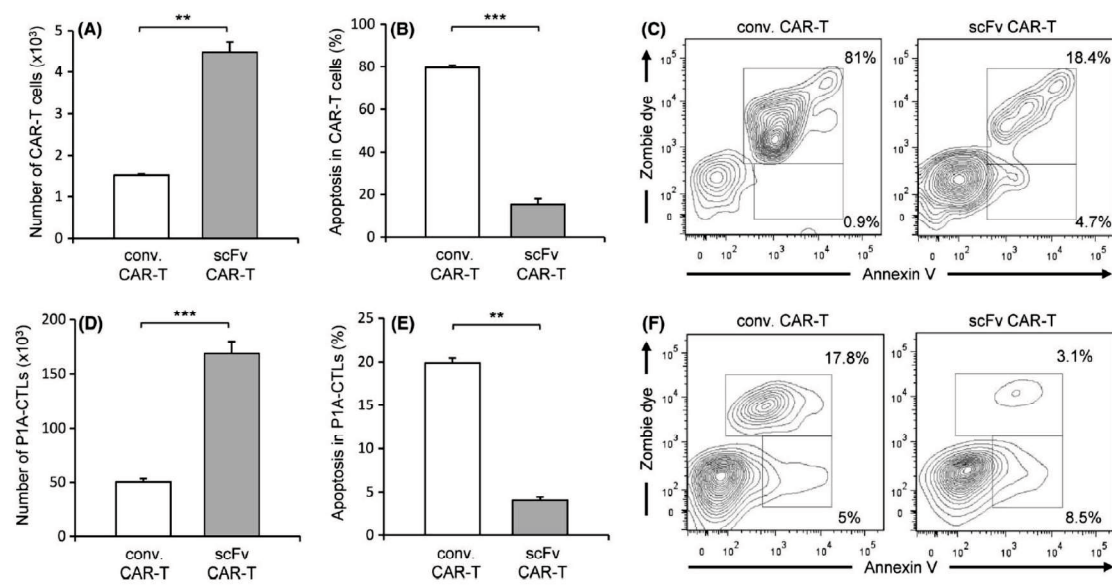


**FIGURE 3** In vitro survival and activation-induced cell death (AICD) of single-chain variable fragment (scFv) chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) cells. Anti-hCD20 CAR-T cells were stimulated with mitomycin C-treated 3LL-hCD20 on days 0 and 3 in a 1:1 E:T ratio. A, Number of CAR-T cells was counted on days 3 and 4 (mean  $\pm$  SD, n = 3). B-D, On day 5, level of apoptosis of CAR-T cells was analyzed by flow cytometry. Zombie Yellow dye/Annexin V-staining of CAR-T cells (B), its percentages (mean  $\pm$  SD, n = 3) (C), and the expression of apoptosis-related proteins (mean  $\pm$  SD, n = 3) (D) are shown. Representative data from three independent experiments are shown. \*\* $P < .005$ , \* $P < .01$ , † $P < .05$



**FIGURE 4** In vivo therapeutic effects of single-chain variable fragment (scFv) chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) cells against a pre-established solid tumor model. 3LL-hCD20-bearing C57BL/6 mice were exposed to sublethal irradiation and treated with anti-hCD20 conv. CAR-T cells (n = 12), scFv CAR-T cells (n = 12), or activated T cells (n = 10). A, Tumor growth was measured periodically. Each line indicates an individual mouse. B, Survival of mice was assessed. \*\*\*P < .001. C, Mice which had rejected initial 3LL-hCD20 by treatment with scFv CAR-T cells were rechallenged s.c. with 3LL-hCD20 (n = 4). As a control, naïve C57BL/6 mice were inoculated s.c. with 3LL-hCD20 (n = 8). Tumor growth was measured periodically. Representative data from at least two independent experiments are shown





**FIGURE 5** Anti-apoptotic effects of single-chain variable fragment (scFv) chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) cells in tumor-specific T cells. P815-hCD20-bearing DBA/2 mice were exposed to sublethal irradiation and treated with P1A-CTL together with either anti-hCD20 conv. CAR-T or scFv CAR-T cells. On day 21, tumor tissues were harvested, prepared for single-cell suspension, and analyzed by flow cytometry. Cell numbers of CAR-T cells (A) and P1A-CTL (D) were assessed (mean  $\pm$  SD, n = 3). Percentages of late apoptotic cells among CAR-T cells (B) and P1A-CTL (E) were also examined (mean  $\pm$  SD, n = 3). Representative flow cytometric data of (B) and (E) are shown in (C) and (F), respectively. Representative data from three independent experiments are shown. \*\*\*P < .001, \*\*P < .005