

# 学位論文

Development of novel combined immunotherapy  
using tumor antigen-specific T cells  
genetically engineered to produce IL7 and  
CCL19 in combination with anti-PD-1 antibody

(抗 PD-1 抗体と IL-7 及び CCL19 を発現する腫瘍  
抗原特異的 T 細胞を用いた新規免疫療法の開発)

氏名 徳永 良洋

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 病態制御内科学講座

令和 4 年 1 月

## 目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	5
4. 方法	6
1) 方法	6
2) 解析	9
5. 結果	9
6. 考察	27
7. 結語	29
8. 謝辞	29
9. 参考文献	30

## 1. 要旨

近年、遺伝子改変 T 細胞を用いた養子免疫療法の臨床応用が進められているが、未だ治療成績は満足のものではなく、更なる治療の進歩が求められている。我々はこれまで、自律性に IL7 と CCL19 を発現する CAR-T 細胞 (7×19 CAR-T 細胞) が優れた抗腫瘍活性を発揮することを示した。本研究では IL7 及び CCL19 が TCR-T 細胞の抗腫瘍活性を増強させる可能性を検証するため、腫瘍抗原である P1A を特異的に認識する TCR-T 細胞 (P1A-T 細胞) に IL7 及び CCL19 を分泌させる遺伝子改変を加えた 7×19 P1A-T 細胞を作成した。P1A を有する細胞株である P815 を皮下接種したマウスに対する養子免疫療法において、7×19 P1A-T 細胞は IL7 及び CCL19 を分泌しない P1A-T 細胞 (Conv. P1A-T 細胞) と比較し優れた抗腫瘍効果を示した。腫瘍拒絶マウスにおいては、Conv. P1A-T 細胞を使用したマウスと比較し優れた免疫記憶が形成されていた。また抗 PD-1 抗体を用いた複合免疫療法を行うことで、7×19 P1A-T 細胞の有する抗腫瘍効果は更に増強された。CRISPR/ Cas9 システムを用い *Pdcd1* を knockdown した 7×19 P1A-T 細胞は対照 7×19 P1A-T 細胞と比較し強い抗腫瘍効果を示したが、抗 PD-1 抗体を併用することで更なる抗腫瘍効果の増強を認めたことから、7×19 P1A-T 細胞の発揮する抗腫瘍効果には 7×19 P1A-T 細胞そのものばかりでなくマウス内在性の T 細胞が関与していることが分かった。また、7×19 CAR-T 細胞においても抗 PD-1 抗体との併用により抗腫瘍効果が増強することを確認した。本研究における検証により、7×19 TCR-T 細胞及び 7×19 CAR-T 細胞を用いた免疫療法が抗悪性腫瘍療法の発展に寄与できる可能性が示された。

## 2. 研究の背景

遺伝子改変免疫細胞を用いた抗悪性腫瘍治療は、高い治療効果が期待できる新規治療法として注目を集めている。特に、キメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T 細胞) は急性リンパ芽球性白血病や悪性リンパ腫、多発性骨髄腫といった造血器腫瘍において優れた治療効果を発揮することが複数の臨床試験で示され<sup>1-7)</sup>、一部の製剤は保険承認を得て実際の臨床現場で使用されるに至っている。もう 1 つの主要な遺伝子改変 T 細胞として、遺伝子改変により腫瘍抗原特異的な T 細胞受容体 (TCR) を発現させた T 細胞 (TCR-T 細胞) にも関心が寄せられている<sup>8,9)</sup>。CAR-T 細胞は HLA に拘束されることなく腫瘍細胞を認識し、同時に共刺激シグナルを受けて腫瘍細胞を排除できるという利点を有するが、反面標的とする腫瘍抗原分子は細胞表面に発現している必要がある。また

CAR-T 細胞の標的とする腫瘍抗原は副作用のリスクを低減するため極力正常細胞には発現していない必要があるが、そうした条件を満たす適切な腫瘍抗原は限られている。一方で TCR-T 細胞は、エピトープペプチドが HLA に提示される必要はあるものの細胞表面、細胞質内、核内のいずれの場所に存在する腫瘍抗原も標的とすることができる。このように CAR-T 細胞と TCR-T 細胞は異なる特性を有している (図 1) ことから、効果的な抗がん治療の開発のためにそれぞれの治療法における技術的な進歩が求められている。

遺伝子改変 T 細胞を用いた治療が臨床応用される中で、その課題も浮き彫りとなってきた。CAR-T 細胞においては、血液悪性腫瘍に対する短期的な治療成績は優れている反面、再発・難治性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する治療では 1 年以内に 30-40% の症例が再発するなど長期的な治療成績は限られている<sup>5)</sup>。CAR-T 細胞による治療後の再発には、腫瘍細胞における CAR 標的腫瘍抗原の喪失や CAR-T 細胞の機能不全などが関連していると考えられている<sup>10,11)</sup>。さらに、血液悪性腫瘍と比較し固形腫瘍に対する CAR-T 細胞の奏効率は非常に低く更なる発展が求められている<sup>12)</sup>。TCR-T 細胞に関しては、悪性黒色腫や滑膜肉腫など治療効果が確認されている腫瘍の種類はごく限られている<sup>13-15)</sup>。こうした遺伝子改変 T 細胞の課題を解決するために、各施設において様々な研究が行われている。例えば、CAR の細胞内シグナルドメインの改変は CAR-T 細胞の機能不全を抑制し、抗腫瘍効果を高めることが知られている<sup>16,17)</sup>。またゲノム編集技術を用いた CAR-T 細胞の *PD-1* (programmed cell death protein 1 ; *Pdcd1* にコード) 遺伝子のノックダウンや抗 PD-1 抗体の併用は、CAR-T 細胞の疲弊を回避する手段として提唱されている<sup>18-20)</sup>。何らかの共刺激分子を同時に発現する CAR-T 細胞は、第 4 世代 CAR として注目されており、開発が進められている<sup>21,22)</sup>。

こうした取り組みと平行して、我々は先行研究として CAR と同時に IL7 と CCL19 を発現する新しい CAR-T 細胞 (7×19 CAR-T 細胞) の開発を行いその成果を報告した<sup>22)</sup>。IL7 と CCL19 は二次リンパ組織において T 細胞領域の形成、維持に関わる重要なサイトカイン・ケモカインの組み合わせであることが知られている<sup>23)</sup> ことから、CAR-T 細胞にこれらの蛋白質を発現させることで腫瘍微小環境における樹状細胞 (DC) や T 細胞の集積を促進できるとの仮説のもと、我々は CAR-T 細胞に発現させる分子として IL7 と CCL19 を選択した。その他にも、動物実験モデルにおいて IL7 を産生する遺伝子改変 DC や CCL19 の腫瘍内接種が優れた治療効果を示した報告もあり我々の仮説を支持している<sup>24,25)</sup>。想定した通り、7×19 CAR-T 細胞は複数の固形腫瘍モデルにおいて腫瘍組織への DC、T 細胞の集積を促し、優れた治療効果を発揮した。興味深いことに、腫瘍組織へ集積した T 細胞は 7×19 CAR-T 細胞ばかりでなく内在性 T 細胞からも構



成されており、また腫瘍特異的な長期免疫記憶も形成されていた<sup>22)</sup>。

こうした知見をもとに、我々は TCR-T 細胞もまた CAR-T 細胞と同様に IL7、CCL19 を産生することで抗腫瘍効果の増強が得られるという仮説を立て、動物実験モデルにて検証を行った。その結果、IL7、CCL19 産生 TCR-T 細胞が腫瘍接種マウスの長期生存に寄与することを確認した。また本研究では、IL7、CCL19 産生 TCR-T 細胞及び 7×19 CAR-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用による抗腫瘍効果の増強を確認した。

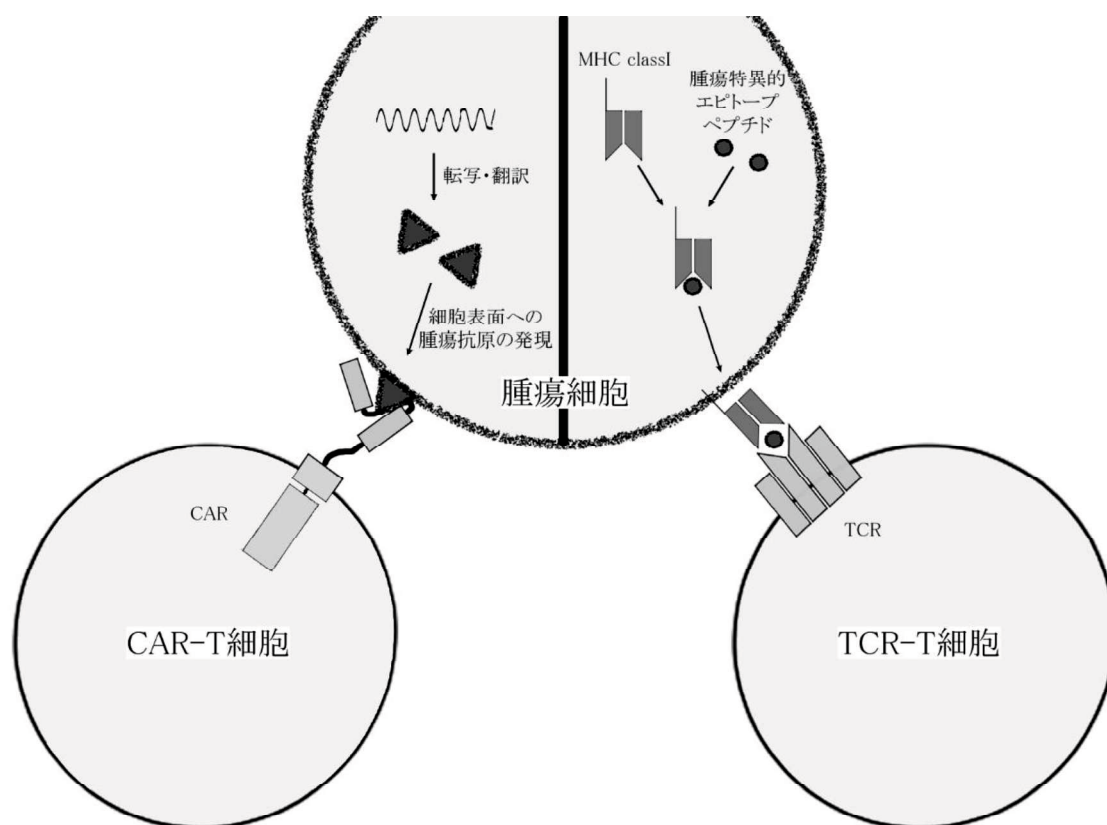


図1 CAR-T細胞と TCR-T細胞の概要

CAR-T 細胞は CAR を介して細胞表面の腫瘍抗原を直接認識し活性化する。一方で TCR-T 細胞は TCR を介して MHC class I 分子と腫瘍特異的エピトープペプチドの複合体を認識し活性化する。

### 3. 目的

本研究では、遺伝子改変技術により IL7 及び CCL19 を発現する TCR-T 細胞を作成し、動物実験モデルで抗腫瘍効果およびそのメカニズムの解析を行っ

た。また、IL7 および CCL19 を発現する TCR-T 細胞または CAR-T 細胞と抗 PD-1 抗体を併用して使用し、同様に動物実験モデルで抗腫瘍効果やそのメカニズムの解析を行った。

## 4. 方法

### 1) 方法

#### マウスと細胞株

6~8 週齢の雄または雌の DBA/2 マウスは SLC から購入した。P1A ペプチドを特異的に認識する TCR のトランスジェニックマウスは Dr. Yang Liu より譲渡していただき<sup>26)</sup>、我々の施設において最低 10 世代の戻し交配を行った。すべてのマウスは無菌環境下で飼育した。すべての動物実験は、山口大学小串地区動物使用計画審査委員会の承認を得て行った。肥満細胞腫の細胞株である P815 は ATCC より購入し、complete RPMI1640 培地で培養した。Complete RPMI1640 培地は RPMI1640 培地に 10% 熱不活化 FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、25 mmol/L HEPES 及び 50 mmol/L の 2-メルカプトエタノールを添加して作成した。ヒト CD20 発現 P815 (P815-hCD20) は既報の記載の通りに作成し<sup>22)</sup>、10% 熱不活化 FBS、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で培養した。P815、P815-hCD20 はともに e-Myco Mycoplasma PCR Detection Kit (iNtRON Biotechnology) を用いてマイコプラズマが検出されないことを確認し、継代回数 10 回以内に実験に使用した。

#### プラスミド

IL7、CCL19 と同時にレポーター遺伝子として EGFP を発現するプラスミドは、F2A 自己切断ペプチド<sup>27,28)</sup>の塩基配列をマウス IL7、CCL19 及び EGFP の塩基配列で挟んで設計し、既報で用いたレトロウイルスベクターである MSGV1 へ遺伝子導入して作成した<sup>22,29,30)</sup>。対照として、EGFP の塩基配列のみを MSGV1 へ導入したプラスミドを作成した。マウス IL7、CCL19 と同時に抗ヒト CD20 CAR の塩基配列を組込んだプラスミドは既報の記載の通りに作成した<sup>22)</sup>。

#### T 細胞の遺伝子改変

前述の様に作成したプラスミドは、Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてパッケージング細胞である GP2 へ遺伝子導入した。遺伝子導入の 48 時間後に培養上清中のレトロウイルス粒子を回収し T 細胞への遺伝子導入に使用した。P1A ペプチド (アミノ酸配列 : LPYLGWLVF) と遺伝子組み換え IL2 の存在下に、P1A ペプチド特異的 TCR のトランスジェニックマウスから

回収した脾臓細胞を培養した。培養開始 48 時間後に細胞を回収し、マウス Pan T-cell Isolation Kit (Milteny Biotec) を用いたネガティブセレクションにより T 細胞を単離した。単離した T 細胞は RetroNectin (Takara Bio) 及び IL2 の存在下に遺伝子導入を行ったレトロウイルス粒子へ 2 時間暴露させ、洗浄後に培養を継続した。6 時間の培養後、再度遺伝子導入 T 細胞を回収、洗浄し更に 2 日間の培養を行った後動物実験に使用した。一部の実験では、フローサイトメトリーを用いた細胞分離により EGFP 陽性細胞の純化を行い動物実験に使用した。遺伝子導入の成否を確認するため、遺伝子導入 T 細胞の培養上清を回収し、培養上清中のマウス IL7、CCL19 の濃度をそれぞれ ELISA にて測定した。抗ヒト CD20 7×19 CAR-T 細胞は既報の記載の通りに作成した<sup>22)</sup>。

*Pdcd1* のノックダウンに際しては、まず上述と同様に P1A ペプチドと遺伝子組み換え IL2 にて P1A ペプチド特異的 TCR トランスジェニックマウスから回収した脾臓細胞に刺激を加え、磁気ビーズを用いたネガティブセレクションにより T 細胞を単離した。単離した T 細胞は TrueCut Cas9 Protein v2 (Thermo Fisher Scientific) と遺伝子特異的ガイド RNA から成る Cas9-RNP 複合体の存在下に Buffer R (Thermo Fisher Scientific) で懸濁した。Cas9-RNP 複合体は Neon Transfection System (Invitrogen) を用いたエレクトロポレーションにより T 細胞内に導入した。エレクトロポレーション直後に、上述の方法で T 細胞に対するレトロウイルスを用いた遺伝子導入を行った。マウス *Pdcd1* 特異的ガイド RNA は既報の記載に基づき設計した<sup>31)</sup>。対照として、マウス *ROSA26* を標的とする *ROSA26* 特異的ガイド RNA (Thermo Fisher Scientific) を用いた。以下にそれぞれの特異的ガイド RNA の塩基配列を示す。マウス *Pdcd1* 特異的ガイド RNA : 5' -UCUGGGCAUGUGGGUCCGGC-3'、マウス *ROSA26* 特異的ガイド RNA : 5' -CUCCAGUCUUUCUAGAAGAU-3'。

### フローサイトメトリー

フローサイトメトリーに用いた蛍光標識抗体や試薬を以下に挙げる。Zombie Yellow Fixable Viability Kit (BioLegend)、phycoerythrin (PE)、allophycocyanin (APC)-Cy7 または Brilliant Violet (BV) 421 標識抗 CD3e 抗体 (BioLegend または BD Biosciences)、BV421 または APC 標識抗 CD8a 抗体 (BioLegend)、APC-Cy7 標識抗 CD4 抗体 (BD Biosciences)、PerCP-Cy5.5 標識抗 CD11b 抗体 (BioLegend)、BV421 または APC 標識抗 CD11c 抗体 (BD Biosciences または eBioscience)、PE 標識抗 Gr-1 抗体 (eBioscience)、PE-Cy7 または biotin 標識抗 CD117 (c-kit) 抗体 (BioLegend)、PerCP-Cy5.5 標識抗 CD44 抗体 (BioLegend)、APC 標識抗 CD62 L 抗体 (eBioscience)、PE 標識 PD-1 抗体 (eBioscience)、PE または biotin 標識

抗 Va8.3 抗体 (eBioscience)、PE 標識抗 IFN $\gamma$  抗体 (eBioscience)、PerCPCy5.5 標識抗 IL2 抗体 (BioLegend)、BV421 標識抗 TNF $\alpha$  抗体 (BioLegend)、BV421 標識抗ヒト CD20 抗体 (BD Biosciences)。抗 CD16/CD32 抗体 (clone 2.4G2) は我々の施設でハイブリドーマを培養し培養上清より回収、純化し使用した。抗 CD16/CD32 抗体は Fc $\gamma$  受容体を介した非特異的な抗体の結合を防ぐため、蛍光標識抗体との反応に先立って反応させた。細胞質内サイトカインの解析に際しては、まず Fixation Buffer (BioLegend) を用いて細胞を固定し、十分に洗浄した後 Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (BioLegend) を用いて細胞の透過処理を行い、最後に蛍光標識抗体を用いて染色した。フローサイトメトリーのデータの取得には EC800 (Sony) や BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences)、CytoFLEX (Beckman Coulter) を使用した。フローサイトメトリーのデータの解析には FlowJo software (FlowJo, LLC) を使用した。フローサイトメトリーを用いた細胞分離には SH800 (Sony) を使用した。

#### ***In vivo* モデルによる遺伝子改変 T 細胞の抗腫瘍効果の評価**

P1A ペプチド特異的 TCR 遺伝子導入マウスから単離した T 細胞 (P1A-T cell) を用いた動物実験モデルでは、DBA/2 マウスに対し  $5 \times 10^5$  個の P815 を右側腹部に皮下接種し day0 とした。Day6 に亜致死量の全身放射線照射 (3 Gy または 5 Gy) を行い、day7 に  $1 \times 10^6$  個の遺伝子改変 P1A-T cell の静脈内注射を行った。腫瘍径は (腫瘍長径)  $\times$  (腫瘍短径)<sup>2</sup>/2 で計算した。マウスの生存の評価も同時に行った。一部の実験では、遺伝子改変 P1A-T 細胞に抗 PD-1 抗体を併用した。抗 PD-1 抗体は day10 より 7 日ごとに計 6 回、一頭あたり 150  $\mu$ g を腹腔内投与した。また一部の実験では *Pdcd1* または *ROSA26* をノックダウンした遺伝子改変 P1A-T 細胞を使用し、抗 PD-1 抗体は一部のマウスに併用した。

腫瘍浸潤免疫細胞の解析においては、DBA/2 マウスに対し  $5 \times 10^5$  個の P815 を右側腹部に皮下接種し day0 とし、フローサイトメトリーを用いた細胞分離により EGFP 陽性細胞に純化した遺伝子改変 P1A-T 細胞  $1.5 \times 10^6$  個を day7 に静脈内注射した。Day12 に既報の方法に基づき腫瘍組織の切除と間質組織の消化、均質化処理を行った<sup>32)</sup>。処理した細胞溶液は細胞数をカウントしフローサイトメトリーで解析した。

CAR-T 細胞を用いた実験モデルでは、day0 に DBA/2 マウスに対し  $5 \times 10^5$  個のヒト P815-hCD20 を右側腹部に皮下接種し、day11 にシクロホスファミド 100 mg/kg を腹腔内投与した。 $7 \times 19$  CAR-T 細胞  $2.5 \times 10^5$  個を day14 に静脈内注射し、抗 PD-1 抗体または対照としてハムスター IgG を一頭あたり 100  $\mu$ g 腹腔内投与した。抗 PD-1 抗体またはハムスター IgG は day17 より投与を開始し、4

または5日毎に計5回投与した。

### メモリーT細胞の残存及び機能の解析

遺伝子改変 P1A-T 細胞の投与により腫瘍を拒絶したマウスを day119 に安楽死させ実験に使用した。マウスの脾臓を摘出、均質化し、細胞数カウントを行った後フローサイトメトリーで EGFP 陽性細胞すなわち遺伝子改変 P1A-T 細胞分画を測定した。マウス脾臓内 T 細胞の腫瘍細胞に対する反応性を評価するため、磁気ビーズを用いたネガティブセレクションにより脾臓細胞から T 細胞を単離し、マイトマイシン C で処理した P815 の存在下で培養を行った。3 日後及び 5 日後に培養上清を回収し、ELISA を用いて培養上清中の IFN $\gamma$  を測定した。また培養細胞を回収し、各細胞における EGFP や CD8 の発現をフローサイトメトリーで解析した。

一部の実験では、 $7 \times 10^9$  P1A-T 細胞単独または  $7 \times 10^9$  P1A-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用により腫瘍を拒絶したマウスを day67 に安楽死させ脾臓を摘出した。摘出した脾臓は均質化した後細胞数をカウントし、フローサイトメトリーを用いて  $7 \times 10^9$  P1A-T 細胞及び内在性 T 細胞におけるメモリー分画の解析を行った。また、磁気ビーズを用いたネガティブセレクションにより脾臓細胞から T 細胞を単離し、マイトマイシン C で処理した P815 の存在下で培養を行った。細胞質内 IFN $\gamma$  の解析にあたり、培養開始 18 時間後に Brefeldin A (BioLegend) を添加し、更に 6 時間後に細胞を回収した。メモリーT細胞の解析にあたっては、培養 3 日後に細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて  $7 \times 10^9$  P1A-T 細胞および内在性 T 細胞それぞれの分画の評価を行った。

## 2) 解析

*In vitro* 実験データの統計解析は両側 t 検定を用いて行った。マウスの生存率の評価には Log-rank 検定を使用した。統計学的有意差の定義は P 値 0.05 未満とした。

## 5. 結果

### IL7 及び CCL19 産生 P1A-T 細胞の作成

我々は IL7、CCL19 を同時に発現する CAR-T 細胞の開発を行い、固形腫瘍に対し優れた治療効果を発揮することを報告している<sup>22)</sup>。本研究では、同様の遺伝子改変が TCR-T 細胞の機能を強化することができるかどうか評価するため、腫瘍抗原の一つである P1A を発現する、マウス肥満細胞腫細胞株 P815 を用いた動物モデルを採用した<sup>33)</sup>。P1A ペプチド特異的 TCR のトランスジェニック

マウスが有する T 細胞は MHC H-2L<sup>d</sup> 拘束性に P1A ペプチドを認識することが分かっている<sup>26)</sup>。我々はまず、IL7、CCL19、EGFP をコードする遺伝子を F2A 自己切断ペプチド配列を挟んで組み込んだレトロウイルスベクターを作成した (図 2A 右)<sup>22)</sup>。対照のため、EGFP をコードする遺伝子のみを組み込んだレトロウイルスベクターも同時に作成した (図 2A 左)。これらのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行い、IL7、CCL19、EGFP を発現する活性化 P1A-T 細胞 (7 × 19 P1A T 細胞) と、EGFP のみを発現する対照 P1A-T 細胞 (Conv. P1A-T 細胞) を作成した。それぞれの P1A-T 細胞の EGFP の発現率は概ね 70~80%であった (図 2B)。EGFP の発現強度は Conv. P1A-T 細胞と比較し 7 × 19 P1A-T 細胞でやや低かったが、7 × 19 P1A-T 細胞の作成に使用したプラスミドが Conv. P1A-T 細胞の作成に使用したプラスミドと比較し組み込んだ遺伝子配列の全長が長く、また EGFP を IL7、CCL19 の後ろに配置したためと考えられた。IL7、CCL19 が 7 × 19 P1A-T 細胞のみで産生され、非遺伝子改変 T 細胞や Conv. P1A-T 細胞からはほぼ産生されていないことを ELISA を用いて確認した (図 2C)。

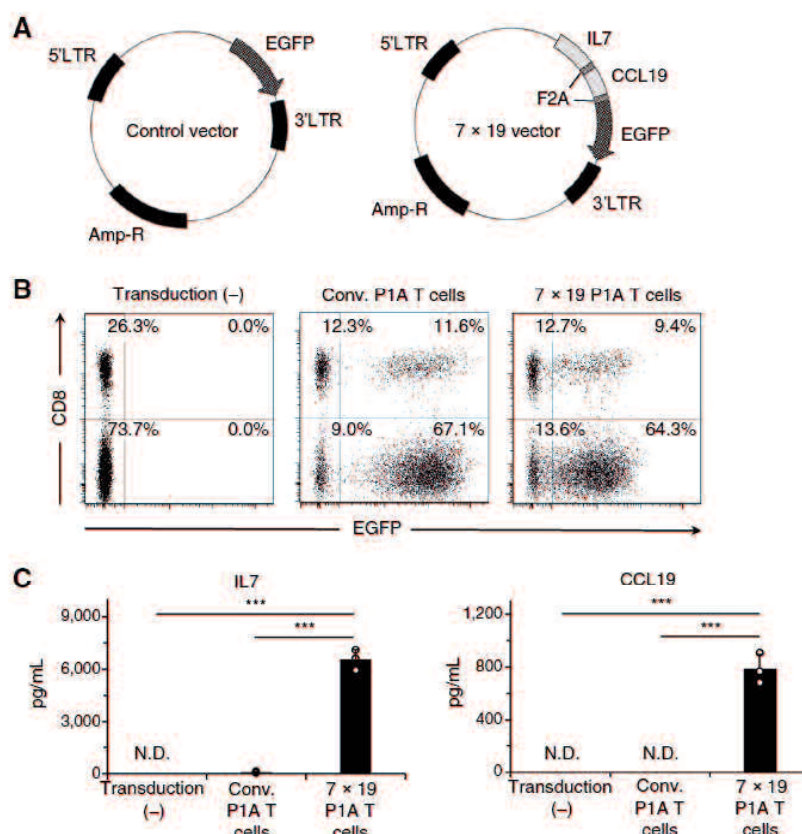


図 2 P1A-T 細胞の遺伝子改変

A、P1A-T 細胞の遺伝子改変に用いたプラスミドの概要を示す。左側が Conv. P1A-T 細胞の作成に用いた EGFP をコードする遺伝子のみを配置したプラスミドであり、右側が

7×19 P1A-T 細胞の作成に用いた F2A ペプチドを挟んで IL7、CCL19、EGFP をコードする遺伝子を配置したプラスミドである。**B**、非遺伝子改変 P1A-T 細胞、Conv. P1A-T 細胞、7×19 P1A-T 細胞それぞれにおける CD8、EGFP の発現をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。**C**、Conv. P1A-T 細胞、7×19 P1A-T 細胞それぞれにつき、遺伝子導入 2 日後の培養上清を回収し IL7、CCL19 の濃度を ELISA を用いて解析した結果を示す。遺伝子改変 P1A-T 細胞と同様に培養し、遺伝子導入を行わなかった P1A-T 細胞の培養上清を対照として解析した。5 回の同実験で同様の結果が得られた。3 well のサンプルの平均値±SD を棒グラフとエラーバーで、各 well の個別の結果をプロットで示している。N.D. : not detected、\*\*\*,  $P < 0.001$

### **7×19 P1A-T 細胞は優れた抗腫瘍効果を発揮し腫瘍接種マウスの生存率を改善させる**

IL7、CCL19 の産生が P1A-T 細胞の抗腫瘍効果に及ぼす影響を *in vivo* モデルで検証するため、P815 を DBA/2 マウスに接種し亜致死量の放射線照射を行った後に 7×19 P1A-T 細胞で治療を行い、放射線照射及び Conv. P1A-T 細胞で治療したマウスや放射線照射のみを行ったマウスと経過を比較した。放射線照射のみを行ったマウスと比較し、放射線照射と Conv. P1A-T 細胞で治療を行ったマウスでは有意な生存率の改善を認めず (図 3A)、また腫瘍増殖の抑制効果もほとんど確認できなかった (図 3B 左上段、左中段) が、放射線照射と 7×19 P1A-T 細胞を用いて治療を行ったマウスでは有意な生存率の改善 (図 3A) と腫瘍増殖の抑制を認め、50%のマウスで腫瘍を拒絶した (図 3B 左下段)。これらの結果は、Conv. P1A-T 細胞が明らかな抗腫瘍活性を示すことのできない状況下においても、IL7 と CCL19 を同時に発現することで P1A-T 細胞の有する抗腫瘍活性を増強できたことを明らかとしている。

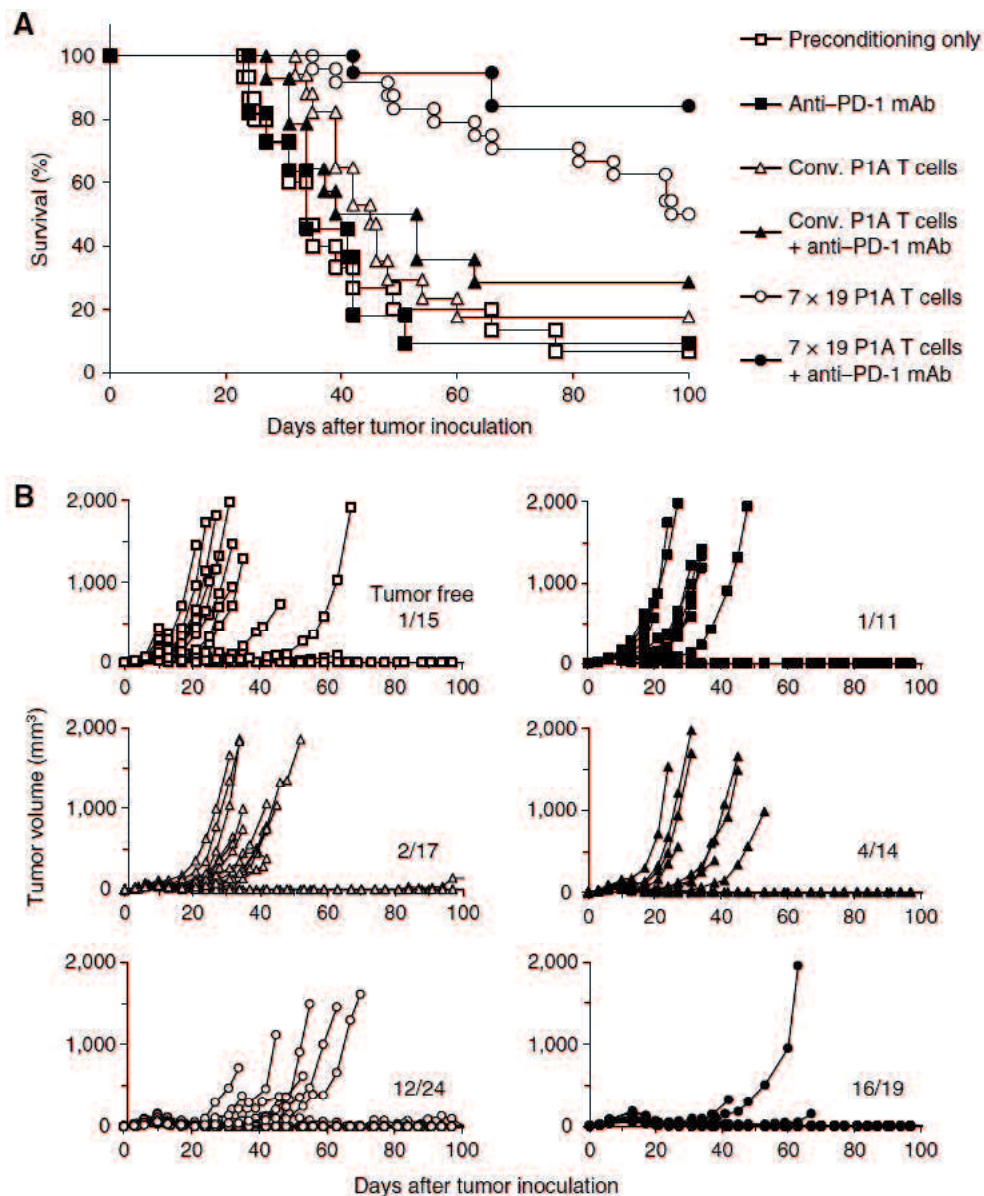


図3 抗PD-1抗体併用/非併用下における7×19 P1A-T細胞の抗腫瘍効果

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day6 に亜致死量の放射線照射で前処置を行った。一部のマウスではそれ以上の治療を行わず、一部のマウスでは day7 に Conv. P1A-T 細胞または 7×19 P1A-T 細胞の静脈内輸注を行った。一部のマウスでは更に抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を day10 から 7 日毎に計 6 回行った。腫瘍接種マウスの生存曲線 (A) および腫瘍体積 (B) を示す。データは独立した 5 回の実験データを集約して解析した。B では各治療群のマウスの頭数と、そのうち day100 において腫瘍を拒絶したマウスの頭数を図中に示している。Log-rank 検定にて行った、day100 における各群間生存率の有意差検定の結果を以下に示す。open square vs. solid square;  $P=0.8213$ , open square vs. open triangle;  $P=0.1538$ , open triangle vs. solid triangle;  $P=0.7284$ , open triangle vs. open circle;  $P=0.0005$ , solid triangle



vs. solid circle;  $P=0.0002$ , open circle vs. solid circle;  $P=0.0253$

### 抗 PD-1 抗体の併用は 7×19 P1A-T 細胞の抗腫瘍効果を相乗的に増強する

7×19 P1A-T 細胞の輸注により腫瘍接種マウスの生存率は有意に改善するものの、半数のマウスは腫瘍が進行し 100 日までに死亡した。7×19 P1A-T 細胞の抗腫瘍効果を更に増強するため、我々は抑制性シグナルである PD-1 を阻害するため、抗 PD-1 抗体を併用する実験を行った。放射線照射のみを行ったマウスと放射線照射及び Conv. P1A-T 細胞で治療したマウスにおいては抗 PD-1 抗体を併用することによる有意なマウス生存率の改善効果や腫瘍増殖の抑制効果を認めなかった (図 3A、図 3B 右上段、右中段) が、放射線照射及び 7×19 P1A-T 細胞で治療を行ったマウスに抗 PD-1 抗体を併用したところ、非併用マウスと比較し有意な腫瘍増殖の抑制と生存率の改善を認め、80%以上のマウスで腫瘍を拒絶した (図 3A、図 3B 右下段)。これらの結果は、内在性 T 細胞や Conv. P1A-T 細胞に対する P815 の治療抵抗性は抗 PD-1 抗体の併用では克服できないが、IL7 及び CCL19 を産生する P1A-T 細胞に対する P815 の治療抵抗性は抗 PD-1 抗体の併用で克服し得ることを示している。また、P1A ペプチド特異的 TCR を有さない T 細胞に対し IL7 及び CCL19 を産生させる遺伝子改変を行い治療に用いたところ、抗 PD-1 抗体併用の有無に関わらず有意なマウスの生存率改善及び腫瘍増殖の抑制効果が得られなかった (図 4) ことから、7×19 P1A-T 細胞及び抗 PD-1 抗体による悪性腫瘍の治療においては、T 細胞の腫瘍抗原に対する特異性が重要な因子の一つであることが示唆される。我々が以前に報告した 7×19 CAR-T 細胞に関する既報において、IL7 及び CCL19 の産生が腫瘍局所に多くの内在性 T 細胞集積を誘導した<sup>22)</sup> という知見を考慮すると、7×19 P1A-T 細胞ばかりでなく腫瘍組織に浸潤した内在性 T 細胞に対する PD-1 シグナルの抑制も、抗 PD-1 抗体併用による抗腫瘍効果の相乗的な増強のメカニズムとして寄与していたと考えられた。

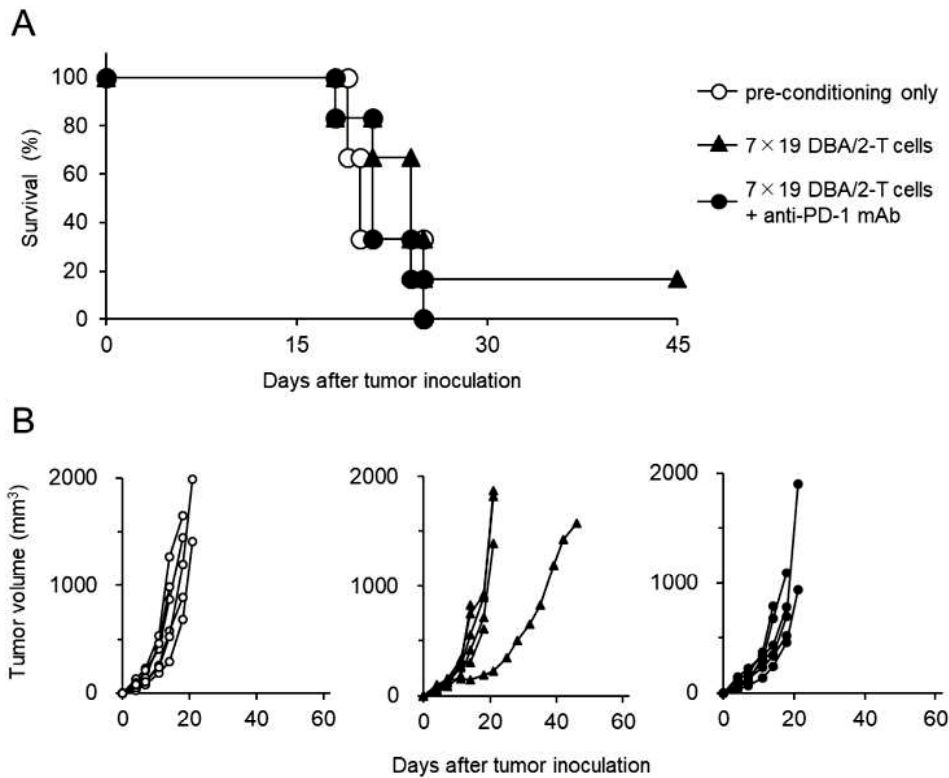


図4 P1A 特異的 TCR を有さない遺伝子改変 P1A-T 細胞の抗腫瘍効果

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day6 に亜致死量の放射線照射で前処置を行った。一部のマウスはそれ以上の治療を行わず、一部のマウスでは IL7、CCL19 を産生させる遺伝子改変を行った P1A 特異的 TCR を有さない DBA/2 マウス由来 T 細胞を day7 に静脈内輸注した。一部のマウスでは更に抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を day10 から 7 日毎に計 6 回行った。腫瘍接種マウスの生存曲線 (A) および腫瘍体積 (B) を示す。Log-rank 検定にて行った、day25 における各群間生存率の有意差検定の結果を以下に示す。open circle vs. filled triangle;  $P=0.4431$ , open circle vs. filled circle;  $P=0.9029$ , filled triangle vs. filled circle;  $P=0.3126$

#### 7×19 P1A-T 細胞及び内在性 T 細胞に対する PD-1 シグナル抑制の影響

抗 PD-1 抗体を併用した際に 7×19 P1A-T 細胞と内在性 T 細胞のいずれの T 細胞がより効果的に抗腫瘍効果を発揮するのかを検証するため、我々は *Pdcd1* 遺伝子をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞を作成し、抗 PD-1 抗体の併用下と非併用下で治療を行った。*Pdcd1* 遺伝子のノックダウンは CRISPR/Cas9 システムを用いて行い、7×19 P1A-T 細胞の PD-1 の発現率を 2.8%まで低下させた (図 5)。第一に、*Pdcd1* 遺伝子をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞は *ROSA26* 遺伝子をノックダウンした対照 T 細胞と比較し、有意なマウスの生存期間の延長と腫瘍増殖抑制効果を示した (図 6A、図 6B 上段、中段)。この結果より、

抗 PD-1 抗体併用下の 7×19 P1A-T 細胞の抗腫瘍効果増強には 7×19 P1A-T 細胞そのものに対する PD-1 シグナルの抑制が寄与していることが分かった。図 6 で行った実験において、放射線照射及び *ROSA26* をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞による腫瘍接種マウスに対する治療効果が、図 3 の実験において放射線照射及び 7×19 P1A-T 細胞を用いて治療を行った際と比較し減弱していることは、*Pdcd1* 遺伝子のノックダウンに当たり実施したエレクトロポレーションによって細胞に生じたダメージに由来すると考えられた。第二に、*Pdcd1* 遺伝子をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞に抗 PD-1 抗体を併用して治療を行ったところ、併用しなかった際と比較し更に有意な生存期間の延長と腫瘍増殖の抑制効果が得られた（図 6）。このことから、抗 PD-1 抗体を 7×19 P1A-T 細胞に併用した際に得られる治療効果の増強には、7×19 P1A-T 細胞ばかりでなく内在性 T 細胞における PD-1 シグナルの抑制も寄与していることが示唆される。

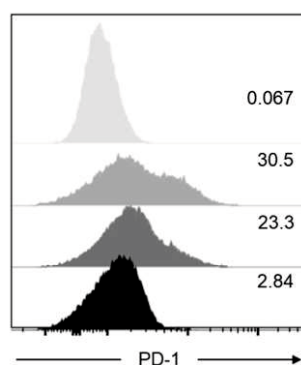


図 5 *Pdcd1* をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞の PD-1 発現

CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Pdcd1* をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞を作成した。フローサイトメトリーで PD-1 の発現を確認することで *Pdcd1* のノックダウン効率を評価した結果を示す。上記ヒストグラムで評価している各細胞の内訳は以下の通りである。最上段：遺伝子ノックダウン未実施の 7×19 P1A-T 細胞の無染色コントロール、二段目：遺伝子ノックダウン未実施の 7×19 P1A-T 細胞、三段目：*ROSA26* ノックダウン 7×19 P1A-T 細胞、最下段：*Pdcd1* ノックダウン 7×19 P1A-T 細胞

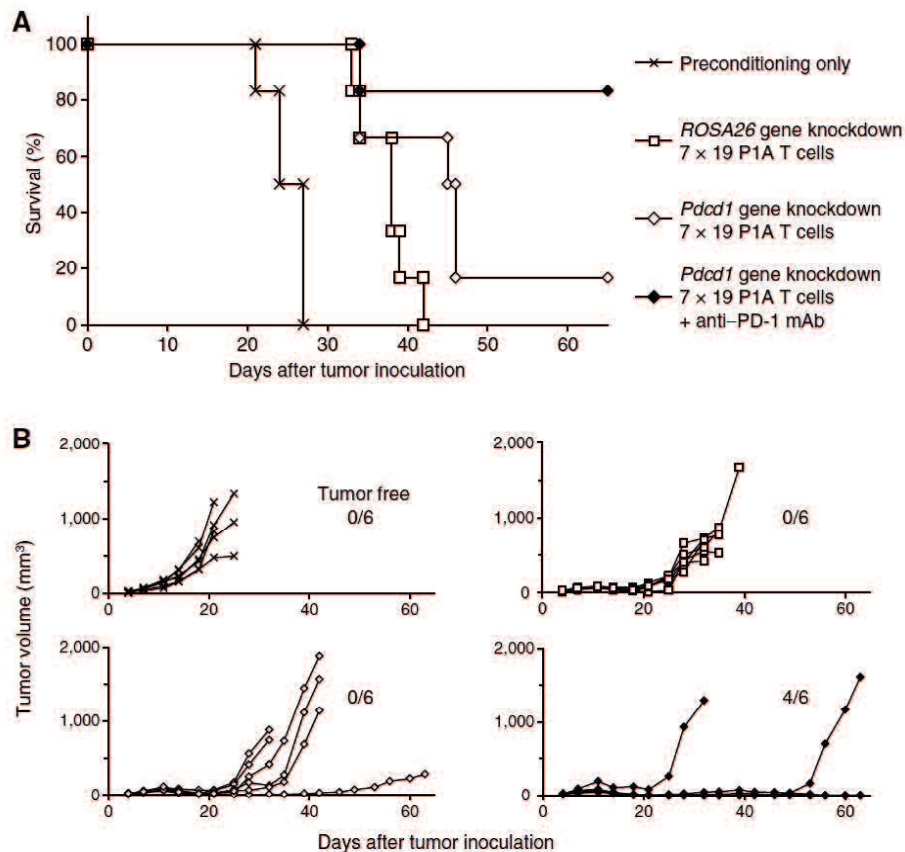


図6 抗PD-1抗体併用/非併用下における*Pcd1*ノックダウン7×19 P1A-T細胞の抗腫瘍効果

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day6 に亜致死量の放射線照射で前処置を行った。一部のマウスはそれ以上の治療を行わず、一部のマウスでは *ROSA26* をノックダウンをした7×19 P1A-T細胞または *Pcd1* をノックダウンした7×19 P1A-T細胞を day7 に静脈内輸注した。一部のマウスでは更に抗PD-1抗体の腹腔内投与を day10 から7日毎に計6回行った。腫瘍接種マウスの生存 (A) および腫瘍体積 (B) を示す。Bでは各治療群のマウスの頭数と、そのうち day65 において腫瘍を拒絶したマウスの頭数を図中に示す。Log-rank 検定にて行った、day60 における各群間生存率の有意差検定の結果を以下に示す。cross vs. open square;  $P=0.001$ , open square vs. open diamond;  $P=0.0431$ , open diamond vs. solid diamond;  $P=0.0402$

続いて、7×19 P1A-T細胞による抗腫瘍効果における内在性T細胞につき更に詳細に検証するため、我々はフローサイトメトリーを用いて腫瘍浸潤免疫細胞の解析を行った。Conv. P1A-T細胞または7×19 P1A-T細胞それぞれにつき、フローサイトメトリーを用いた細胞分離によりEGFP陽性細胞割合を95%以上に純化しP815接種マウスに輸注を行った。回収した腫瘍組織は単細胞に均質化した後、DC、マウス内在性T細胞、輸注した遺伝子改変T細胞の細胞数をカ

ウントしフローサイトメトリーで解析を行った。フローサイトメトリーにおいては、P815 を除外し非腫瘍細胞のみを解析するため c-kit の強発現細胞を除外した。c-kit は P815 に高発現する一方で成熟 T 細胞には発現せず DC にはわずかに発現するのみであることが知られている。第一に、c-kit 陰性細胞分画の細胞の割合は 7×19 P1A-T 細胞で治療したマウスで Conv. P1A-T 細胞で治療したマウスと比較して多いことが分かった (図 7A)。更に、c-kit 陰性分画において、CD3 陰性/CD11c 陽性で示される DC、CD3 陽性/EGFP 陰性で示される内在性 T 細胞、CD3 陽性/EGFP 陽性で示される P1A-T 細胞のいずれにおいても、Conv. P1A-T 細胞治療マウスと比較し 7×19 P1A-T 細胞治療マウスで細胞の割合が多かった (図 7A)。更に詳細な解析を行ったところ、腫瘍浸潤 CD8 陽性 DC、CD4 陽性内在性 T 細胞、CD8 陽性内在性 T 細胞、CD8 陽性 P1A-T 細胞が 7×19 P1A-T 細胞治療マウスにおいて Conv. P1A-T 細胞と比較し有意に細胞数が多かった (図 7A-C)。c-kit 陽性で示される P815 の細胞数は 7×19 P1A-T 細胞治療マウスで少ない傾向があったが、有意差は認めなかった (図 7D)。これらの結果は、7×19 P1A-T 細胞が治療効果を発揮するに当たり内在性 T 細胞、DC が重要な役割を果たしていることを示している。

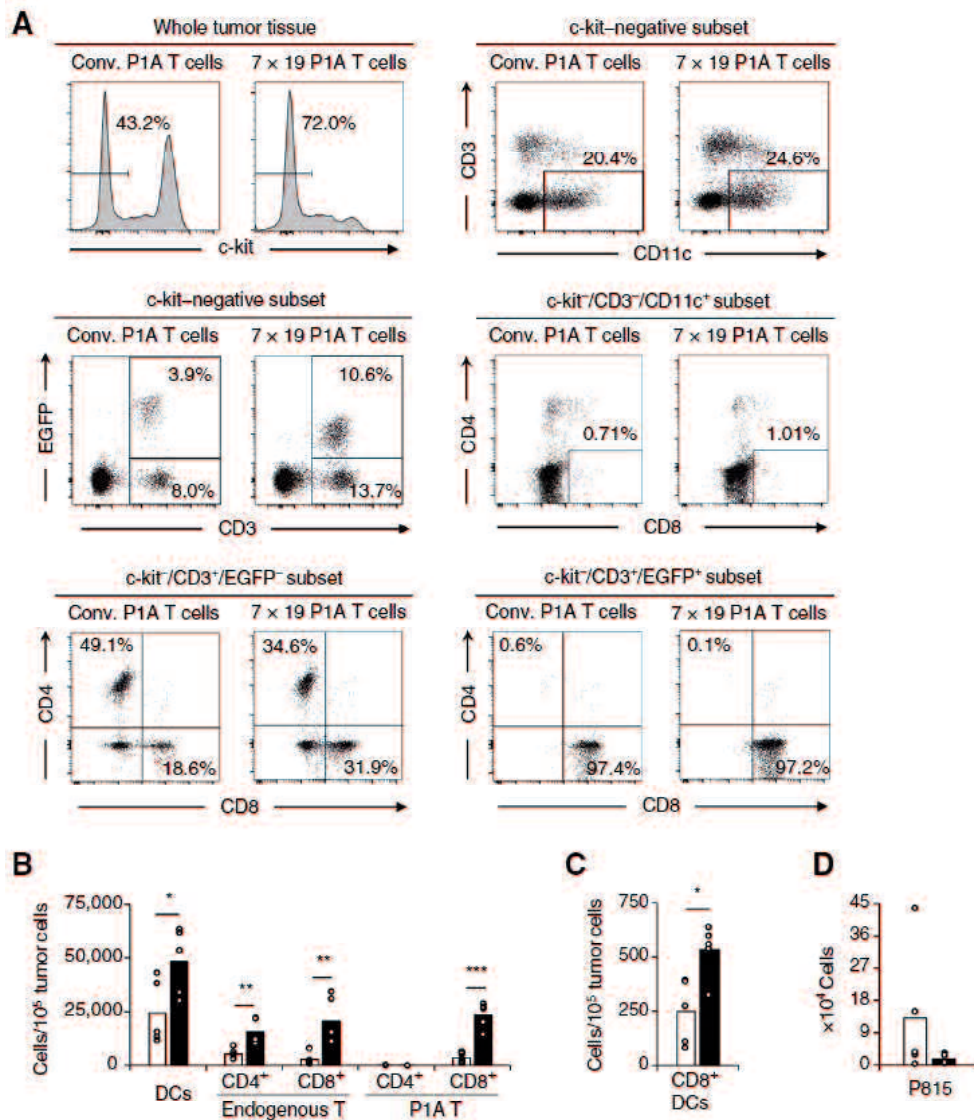


図 7 遺伝子改変 P1A-T 細胞輸注後の DC、P1A-T 細胞、内在性 T 細胞の腫瘍組織への浸潤

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day7 にフローサイトメトリーによる細胞分離で EGFP 陽性細胞を 95%以上 に純化した Conv. P1A-T 細胞または 7×19 P1A-T 細胞の静脈内輸注を行った。腫瘍細胞は day12 に回収し、単細胞へ均質化し、細胞数カウントを行った後フローサイトメトリーで c-kit、EGFP、CD11c、CD3、CD4、CD8 の発現を解析した。A、代表的な結果のドットプロットを示す。上段左の図中には c-kit 陰性細胞すなわち非腫瘍細胞の割合を示している。c-kit 陰性細胞のうち、CD3 陰性/CD11c 陽性の DC の割合を上段右の図中に、CD3 陽性/EGFP 陰性の内在性 T 細胞の割合を中段左の図中右下方に、CD3 陽性/EGFP 陽性の輸注した遺伝子改変 P1A-T 細胞の割合を中段左の図中右上方にそれぞれ示している。また、DC のうち CD8 陽性細胞の割合を中段右の図中に、内在性 T 細胞のうち CD4 陽性または CD8 陽性細胞の割合を下段左の

図中左上方または右下方に、輸注した遺伝子改変 P1A-T 細胞のうち CD4 陽性または CD8 陽性細胞の割合を下段右の図中左上方または右下方にそれぞれ示している。B~D、腫瘍に浸潤した DC、各種 T 細胞分画 (B) と CD8 陽性 DC (C) の P815 10 万個あたりの細胞数、各腫瘍組織中の c-kit 陽性細胞数 (D) を示す。腫瘍細胞及び各免疫細胞分画の平均値を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示している ( $n=5$ )。Open bar、solid bar はそれぞれ Conv. P1A-T 細胞、7×19 P1A-T 細胞を輸注したマウスの腫瘍組織中の腫瘍細胞及び各免疫細胞分画解析結果を示している。\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$

続いて我々は、P1A-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用が腫瘍浸潤免疫細胞の表現型や機能に及ぼす影響を検証した。すると、7×19 P1A-T 細胞治療マウスにおいては、抗 PD-1 抗体を併用した際に併用しなかったマウスと比較して CD3 陽性/EGFP 陽性の P1A-T 細胞、CD3 陽性/EGFP 陰性の内在性 T 細胞の数が多い傾向が認められたが、Conv. P1A-T 細胞では抗 PD-1 抗体併用の有無による細胞数の変化を認めなかった (図 8A)。こうした結果は、図 3 の実験において、Conv. P1A-T 細胞治療マウスでは 7×19 P1A-T 細胞治療マウスと異なり抗 PD-1 抗体による治療効果の改善が認められなかったという結果と合致している。DC、腫瘍浸潤マクロファージについても 7×19 P1A-T 細胞治療マウスにおいて抗 PD-1 抗体併用時に細胞数が増える傾向が認められ、Conv. P1A-T 細胞治療マウスでは認められなかった (図 8A) が、この機序については更なる検証が必要である。興味深いことに、腫瘍浸潤 T 細胞中の細胞質内 IFN  $\gamma$ 、IL2、TNF  $\alpha$  陽性細胞の割合は Conv. P1A-T 細胞治療マウス、7×19 P1A-T 細胞治療マウスいずれにおいても抗 PD-1 抗体併用の有無による変化が認められなかったが、総じて内在性 T 細胞と比較し P1A-T 細胞で高い傾向にあった (図 8B)。これらの結果から、7×19 P1A-T 細胞と抗 PD-1 抗体を併用した際に腫瘍浸潤 T 細胞で認められる変化は、サイトカイン産生や細胞傷害活性の増強といった機能的な変化よりも、腫瘍反応性 T 細胞の生存や細胞数増加が主体であると考えられる。



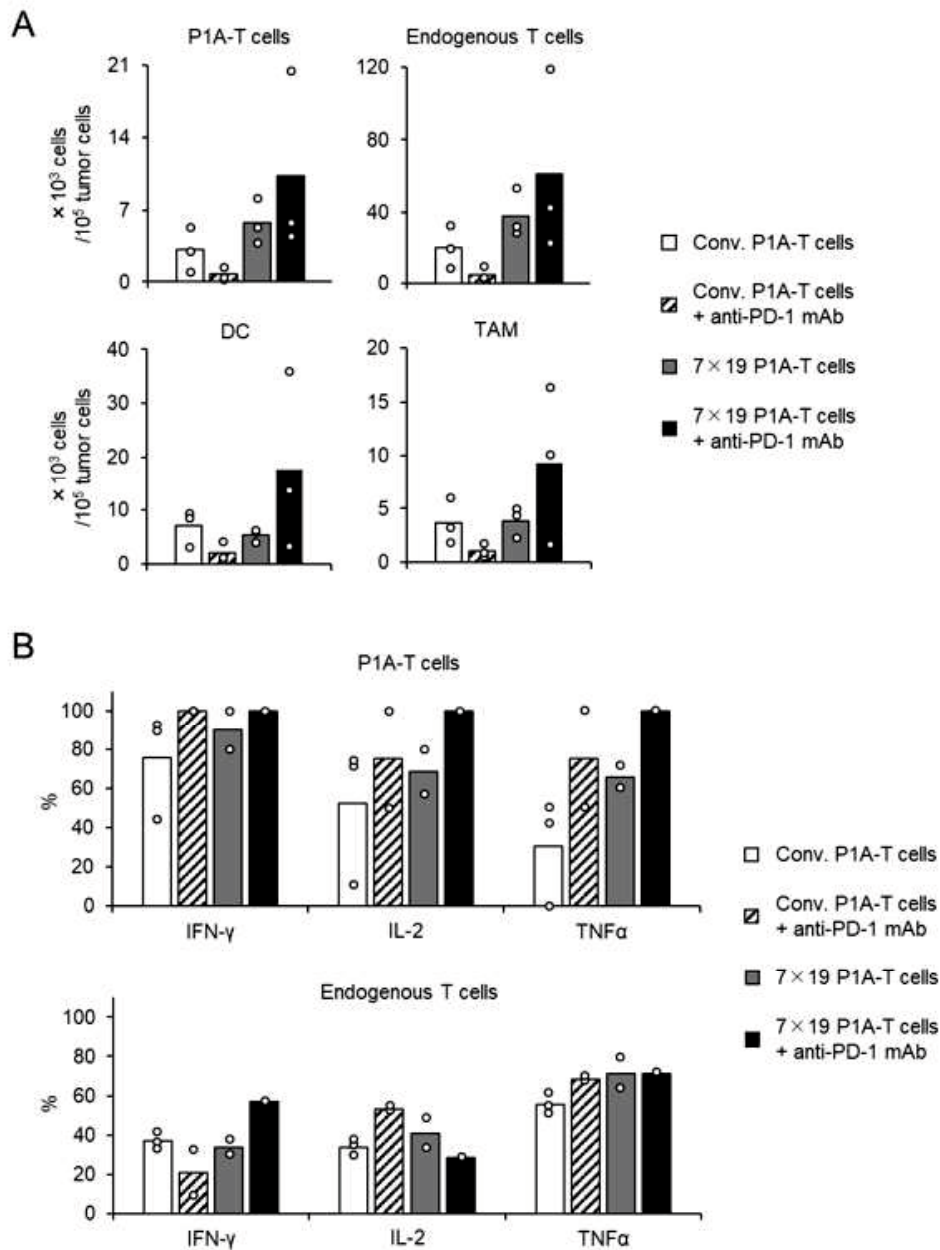


図 8 抗 PD-1 抗体併用/ 非併用下における遺伝子改変 P1A-T 細胞輸注後の腫瘍浸潤免疫細胞の腫瘍組織への浸潤

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day7 にフローサイトメトリーによる細胞分離で EGFP 陽性細胞を 95%以上に純化した Conv. P1A-T 細胞または 7×19 P1A-T 細胞の静脈内輸注を行った。一部のマウスでは更に抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を day7 に行った。腫瘍細胞は day12 に回収し、単細胞へ均質化し、細胞数カウントを行った後フローサイトメトリーで解析した。A、各細胞の c-kit、EGFP、CD3 の発現を確認し、輸注した遺伝子改変 P1A-T 細胞分画 (c-kit 陰性/CD3 陽性/EGFP 陽性) または内在性 T 細胞分画 (c-kit 陰性/CD3 陽性/EGFP 陰性) を同定した。上段に P815 10 万個あたりの



細胞数の平均値を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示す。また、同細胞につき c-kit、CD11c、MHC classII、CD11b、Gr-1 の発現を確認し、DC 分画 (c-kit 陰性/CD11c 陽性/MHC classII 陽性) または腫瘍浸潤マクロファージ (TAM) 分画 (c-kit 陰性/CD11b 陽性/Gr-1 陰性/MHC classII 陽性) を同定した。下段に P815 10 万個あたりの細胞数の平均値を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示す。B、腫瘍浸潤免疫細胞を PMA、Ionomycin、Brefeldin A の存在下に 6 時間培養し、c-kit、EGFP、CD3 に加え細胞質内 IFN- $\gamma$ 、IL2、TNF  $\alpha$  を染色しフローサイトメトリーで解析した。輸注した遺伝子改変 P1A-T 細胞分画 (c-kit 陰性/CD3 陽性/EGFP 陽性) または内在性 T 細胞分画 (c-kit 陰性/CD3 陽性/EGFP 陰性) それぞれにおける細胞質内サイトカイン陽性細胞割合の平均値を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示す。

### 脾臓における抗腫瘍免疫記憶を有する 7 $\times$ 19 P1A-T 細胞の長期残存

がん免疫療法の重要な特徴の一つとして、腫瘍に対する長期免疫記憶が形成され腫瘍の再発を抑制する防御免疫が獲得できることが挙げられる。そのため、我々は 7 $\times$ 19 P1A-T 細胞が効果的な抗腫瘍免疫記憶を形成できるかどうかの検証を行った。遺伝子改変 T 細胞による治療を行い、腫瘍接種後 119 日に腫瘍を拒絶し生存しているマウスから脾臓細胞を抽出し、EGFP 陽性 P1A-T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、CD8 陽性/CD8 陰性いずれの EGFP 陽性 P1A-T 細胞も 7 $\times$ 19 P1A-T 細胞治療マウスの脾臓に残存していることが確認できたが、Conv. P1A-T 細胞治療マウスにおいてはほとんど認められなかった (図 9A、B)。更に、得られた脾臓中 T 細胞を P815 と共培養したところ、7 $\times$ 19 P1A-T 細胞治療マウスの脾臓中 T 細胞において EGFP 陽性/CD8 陽性 P1A-T 細胞の増殖と IFN  $\gamma$  の産生が認められた (図 9C、D)。これらの所見から、7 $\times$ 19 P1A-T 細胞は腫瘍を拒絶したマウスにおいても長期間残存し、P815 に対する免疫記憶を形成していることを確認した。

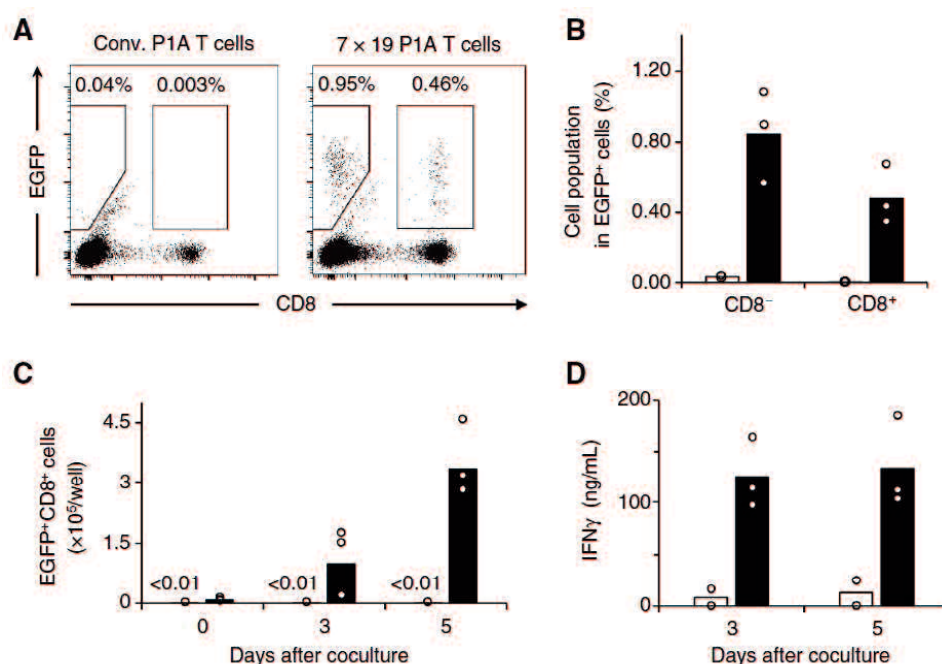
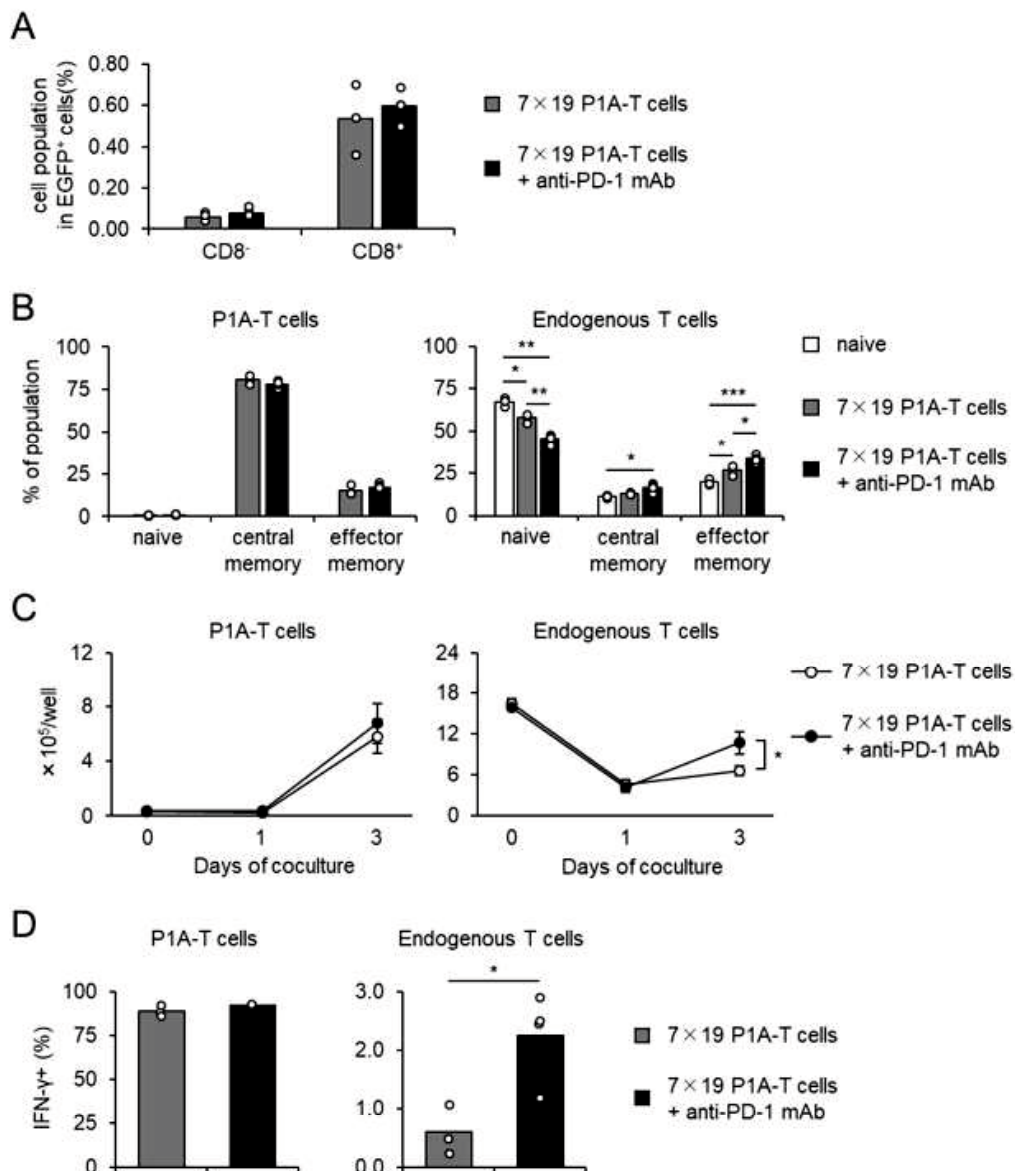


図9 7×19 P1A-T 細胞治療マウスにおける長期免疫記憶の形成

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day6 に亜致死量の放射線照射で前処置を行った後、Conv. P1A-T 細胞または 7×19 P1A-T 細胞を day7 に静脈内輸注した。day119 において腫瘍を拒絶し生存しているマウスから脾臓細胞を回収し、免疫細胞分画及びその機能を解析した。A 及び B、脾臓細胞の CD8 及び EGFP の発現をフローサイトメトリーで評価した。代表的なデータのドットプロットを A に示す。EGFP 陽性/CD8 陰性細胞分画及び EGFP 陽性/CD8 陽性細胞分画の平均を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで B に示す。C 及び D、磁気ビーズを用いたネガティブセレクションにより T 細胞を分離し、マイトマイシン C で処理した P815 と共培養した。C、共培養開始時、3 日後、5 日後に細胞を回収し、細胞数カウント及びフローサイトメトリーを用いて EGFP 陽性/CD8 陽性細胞の細胞数を算出した。1well あたりの細胞数の平均を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示す。D、培養 3 日後、5 日後の培養上清を回収し、ELISA を用いて培養上清中 IFN $\gamma$  の濃度を測定した。濃度の平均値を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示した。

続いて抗 PD-1 抗体の併用が免疫記憶に与える影響を検証するため、抗 PD-1 抗体の併用下または非併用下で 7×19 P1A-T 細胞を用いて治療を行い、腫瘍を拒絶したマウスの脾臓を腫瘍接種 67 日後に回収し脾臓中 T 細胞の表現型および機能を解析、比較した。脾臓に残存した 7×19 P1A-T 細胞の割合や 7×19 P1A-T 細胞分画におけるセントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞の割合は抗 PD-1 抗体併用の有無で変化を認めなかった (図 10A、B 左) が、内在性 T 細胞においてはセントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞

胞いずれにおいても  $7 \times 19$  P1A-T 細胞単独で治療を行ったマウスと比較して  $7 \times 19$  P1A-T 細胞と抗 PD-1 抗体を併用して治療を行ったマウスで有意な割合の増加を認めた (図 10B 右)。更にこれらの細胞に P815 で再刺激を加えたところ、抗 PD-1 抗体を併用して治療を行ったマウスの脾細胞では、 $7 \times 19$  P1A-T 細胞単独で治療を行ったマウスと比較し、 $7 \times 19$  P1A-T 細胞の細胞数の推移に差は認めなかったものの、内在性 T 細胞における有意な増殖及び  $\text{INF} \gamma$  産生の亢進を認めた (図 10C、D)。これらの結果は、 $7 \times 19$  P1A-T 細胞に抗 PD-1 抗体を併用することで、P1A-T 細胞ではなく内在性 T 細胞の免疫記憶形成が促進されることを示している。



## 図 10 抗 PD-1 抗体の併用が T 細胞免疫記憶形成に及ぼす影響

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day6 に亜致死量の放射線照射で前処置を行った。一部のマウスはそれ以上の治療を行わず、一部のマウスでは  $7 \times 19$  P1A-T 細胞を day7 に静脈内輸注した。一部のマウスでは更に抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を day10 から 7 日毎に計 6 回行った。day67 において腫瘍を拒絶し生存しているマウスから脾臓細胞を回収した。A 及び B、輸注した  $7 \times 19$  P1A-T 細胞 (CD3 陽性/EGFP 陽性/ $V\alpha 8.3$  陽性) と内在性 T 細胞 (CD3 陽性/EGFP 陰性/ $V\alpha 8.3$  陰性) を同定し、更にそれぞれの T 細胞における CD8 陽性細胞分画 (A) またはナイーブ T 細胞 (CD44 陰性/CD62L 陽性)、セントラルメモリー T 細胞 (CD44 陽性/CD62L 陽性)、エフェクターメモリー T 細胞 (CD44 陽性/CD62L 陰性) (B) を同定した。各細胞分画の割合を示す。細胞分画の平均値を棒グラフで、各マウスの個別の結果をプロットで示している。C 及び D、磁気ビーズを用いたネガティブセレクションにより T 細胞を分離し、マイトマイシン C で処理した P815 と共培養した。C、共培養開始時、1 日後、3 日後に細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて  $7 \times 19$  P1A-T 細胞と内在性 T 細胞を同定した。1well あたりの細胞数の平均  $\pm$  SEM を折れ線グラフとエラーバーで示す。D、培養 18 時間後に培養液に Brefeldin A を添加し、更に 6 時間後に細胞を回収した。輸注した  $7 \times 19$  P1A-T 細胞及び内在性 T 細胞の細胞質内  $IFN\gamma$  の発現をフローサイトメトリーを用いて評価した。それぞれの T 細胞における  $IFN\gamma$  陽性細胞の割合の平均を棒グラフで、各マウスの個別のデータをプロットで示す。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$

同様のモデルにおける免疫記憶による抗腫瘍効果を更に評価するため、 $7 \times 19$  P1A-T 細胞単独または  $7 \times 19$  P1A-T 細胞と抗 PD-1 抗体を併用して治療を行ったマウスのうち day80 時点で腫瘍を拒絶し生存しているマウスの皮下に P815 の再接種を行った。対照として P815 を接種した DBA/2 マウスでは腫瘍の急速な増大を認めしたが、 $7 \times 19$  P1A-T 細胞で治療を行ったマウスでは、両群とも全頭で腫瘍を拒絶した (図 11)。この結果から、 $7 \times 19$  P1A-T 細胞で治療し腫瘍を拒絶したマウスにおいては抗 PD-1 抗体の有無に依らず長期の免疫記憶が形成され、再発の抑制に機能すると考えられる。

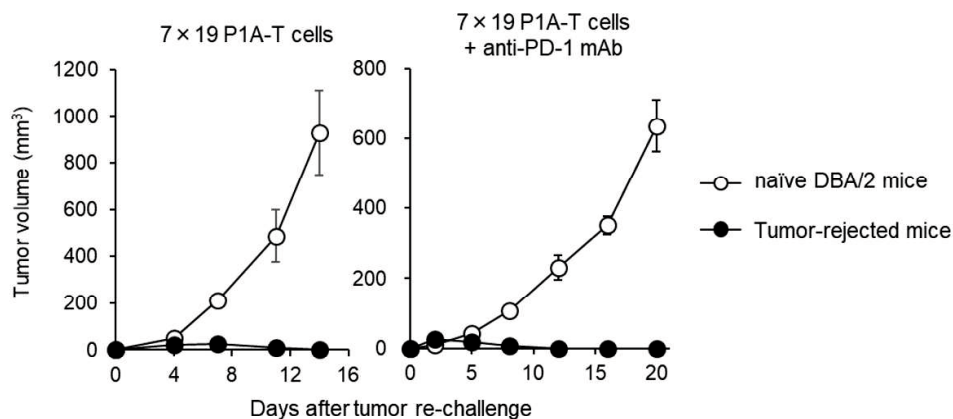


図 11 *in vivo*モデルにおける 7×19 P1A-T 細胞の長期免疫記憶形成の検証

DBA/2 マウスに対し day0 に P815 を皮下接種し、day6 に亜致死量の放射線照射で前処置を行った後 7×19 P1A-T 細胞を day7 に静脈内輸注した。一部のマウスでは更に抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を day10 から 7 日毎に計 6 回行った。day80 において腫瘍を拒絶し生存しているマウスに対し P815 の皮下接種を再度行った。対照として、無治療 DBA/2 マウスの皮下に P815 を接種した。デジタルノギスで週 2 回腫瘍径を測定し、腫瘍体積を算出した。腫瘍体積の平均±SD の推移を折れ線グラフで示す。

### 7×19 CAR-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用における相乗的な抗腫瘍効果の増強

7×19 P1A-T 細胞に抗 PD-1 抗体を併用することで相乗的な抗腫瘍効果の増強を確認できたことから、我々は 7×19 CAR-T 細胞においても同様に抗 PD-1 抗体の併用が抗腫瘍効果を効果的に増強できるかどうかの検証を行った。実験に際し、既報と同様にヒト CD20 特異的な 7×19 CAR-T 細胞を作成し、恒常的にヒト CD20 を高発現する P815-hCD20 (図 12) を皮下接種した DBA/2 マウスに輸注した。各マウスは CAR-T 細胞輸注前処置としてシクロホスファミドを投与し、また CAR-T 細胞輸注後には抗 PD-1 抗体または対照となるハムスター IgG を投与した。シクロホスファミドと抗 PD-1 抗体で治療を行ったマウスは、シクロホスファミド単独治療マウスと比較し生存期間延長と腫瘍増殖の抑制は認められなかった (図 13A、B)。シクロホスファミド、7×19 CAR-T 細胞及びハムスター IgG を投与したマウスでは弱い生存期間延長効果、腫瘍増殖抑制効果が認められたが、腫瘍接種 70 日後までに 90% のマウスが死亡した (図 13A、B)。この生存率は 7×19 CAR-T 細胞に関する既報のデータと比較し劣っているが、これは輸注した CAR-T 細胞の数が既報と比べ少なかったためであると考えられる<sup>22)</sup>。一方で、シクロホスファミド、7×19 CAR-T 細胞に加え抗 PD-1 抗体を併用したマウスにおいては顕著に腫瘍の増殖が抑制され、腫瘍接種 70 日の時点で 90% のマウスが腫瘍を拒絶し生存していた。このことから、7×19 TCR-T 細胞と

同様に 7×19 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果も抗 PD-1 抗体の併用により増強されることが示唆された。

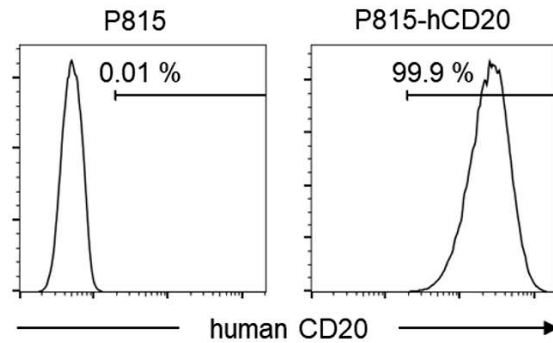


図 12 P815-hCD20 におけるヒト CD20 の発現

フローサイトメトリーを用いて評価した P815、P815-hCD20 細胞表面のヒト CD20 の発現を示す。ヒト CD20 陽性細胞の割合を図中に示している。

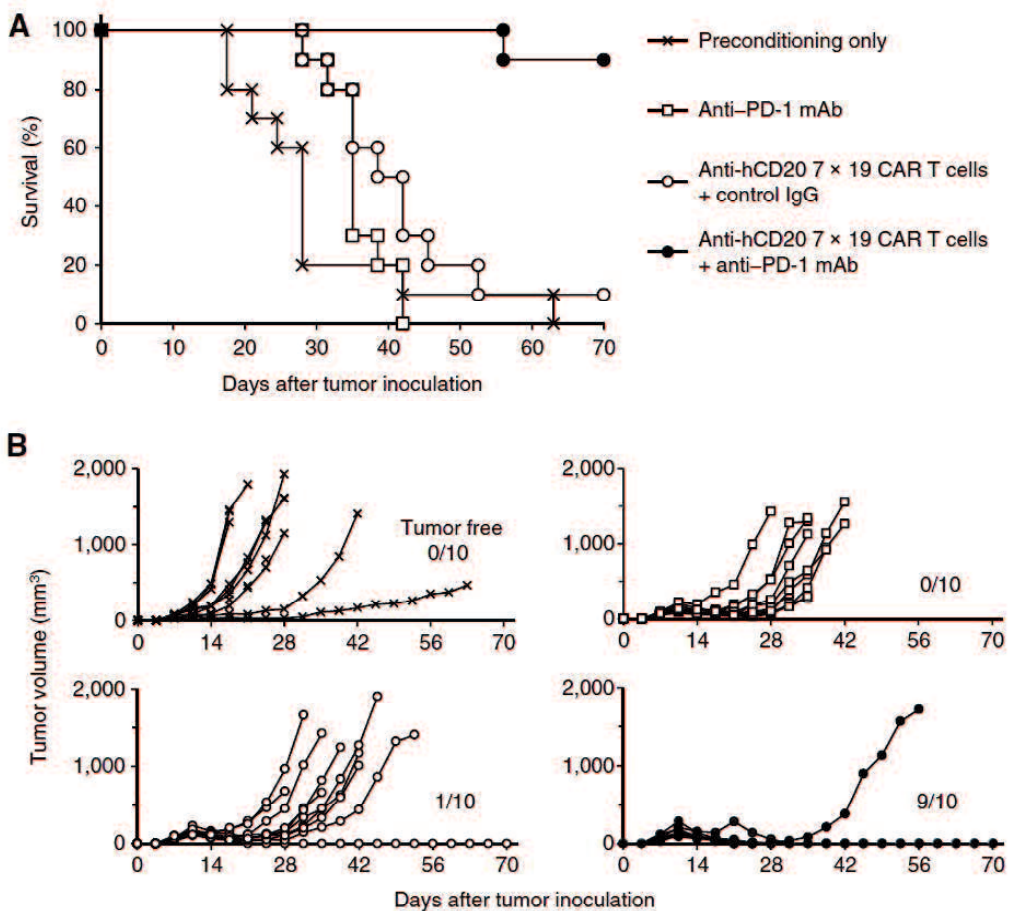


図 13 抗 PD-1 抗体併用/ 非併用下における 7×19 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果

DBA/2 マウスに対し day0 に P815-hCD20 を皮下接種し、day11 に CAR-T 細胞輸注の前

処置としてシクロホスファミドの腹腔内投与を行った。一部のマウスはそれ以上の治療を行わず、一部のマウスでは day14 に抗ヒト CD20 7×19 CAR-T 細胞の静脈内輸注を行い day17 から 4、5 日毎に計 5 回抗 PD-1 抗体またはハムスター-IgG を腹腔内投与した。腫瘍接種マウスの生存 (A) および腫瘍体積 (B) を示す。データは独立した 2 回の実験データを集約して解析した。B では各治療群のマウスの頭数と、そのうち day70 において腫瘍を拒絶したマウスの頭数を図中に示している。Log-rank 検定にて行った各群間の有意差検定の結果を以下に示す。cross vs. open square;  $P=0.1995$ , cross vs. open circle;  $P=0.062$ , open square vs. solid circle;  $P<0.0001$ , open circle vs. solid circle;  $P<0.0001$

## 6. 考察

本研究において、我々は遺伝子改変により IL7、CCL19 を産生する P1A-T 細胞を作成し P815 の腫瘍に対する優れた治療効果を発揮することを確認した。この P1A-T 細胞による治療効果は、P1A-T 細胞のみならず DC や内在性 T 細胞を腫瘍局所に集積させることで発揮された。更に、7×19 P1A-T 細胞や 7×19 CAR-T 細胞に抗 PD-1 抗体を併用することで、相乗的な治療効果の増強により多くのマウスで腫瘍を拒絶し、内在性 T 細胞の免疫記憶形成を促し、腫瘍再発を長期間抑制した。以上の結果から、IL7、CCL19 を T 細胞に産生させる遺伝子改変技術の応用性の高さが明らかとなった。既報において、P1A-T 細胞は *in vitro* では P815 を含む P1A 発現細胞株に対する直接細胞傷害を示すものの、*in vivo* での治療効果は限定的である<sup>37)</sup>ことが示されていた。本研究においても、図 3 で示した実験の結果から P1A-T 細胞単独では P815 の腫瘍に対する治療効果が不十分であることを確認している。これらの結果から、P815 は DBA/2 マウスの内在性免疫監視機構や P1A-T 細胞に対する抵抗性を有していることが示唆される。更に我々は、抗 PD-1 抗体が Conv. P1A-T 細胞を併用してもなお P815 接種マウスの生存期間の改善に寄与しないことを確認しており、本研究で用いた動物モデルは床現場における抗 PD-1 抗体抵抗性の悪性腫瘍症例に類似していると言える。様々な因子が抗 PD-1 抗体による治療反応性を予測するバイオマーカーとして報告されているが、腫瘍局所に浸潤している T 細胞の程度がその一つとしてよく知られている<sup>38)</sup>。局所に T 細胞が十分に浸潤している腫瘍は”hot tumor”と呼ばれ、抗 PD-1 抗体に対する反応性が良好であるとされている。一方で局所に浸潤する T 細胞が認められない、あるいは少数である腫瘍は”cold tumor”と呼ばれており、抗 PD-1 抗体に対し抵抗性であるとされている。そのため、抗 PD-1 抗体による治療効果を高めるためには、いかに cold tumor を hot tumor へ転換させることができるかが非常に重要である。この目的を達成する



ために、二重特異性抗体や腫瘍溶解ウイルス、また腫瘍特異的 T 細胞による養子免疫療法などが試みられている<sup>38)</sup>。本研究で示した実験結果から P815 は cold tumor に分類される腫瘍細胞株と考えられるが、Conv.P1A-T 細胞では P815 を cold tumor から hot tumor へ変換させることができなかった。一方で、7×19 P1A-T 細胞や 7×19 CAR-T 細胞は抗 PD-1 抗体と組み合わせることで P815 接種マウスの生存率、生存期間改善に寄与していることから、腫瘍微小環境における腫瘍反応 T 細胞からの IL7 及び CCL19 分泌は、cold tumor を hot tumor へ転換させる可能性を有しているものと考えられた。実際に、本研究の腫瘍浸潤免疫細胞の解析において、7×19 P1A-T 細胞を用いて治療したマウスの腫瘍局所には DC、7×19 P1A-T 細胞のみならず内在性の T 細胞が多く集積していることが示されており、この仮説を支持している。更には、*Pdcd1* をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞を抗 PD-1 抗体と併用した際に、*Pdcd1* をノックダウンした 7×19 P1A-T 細胞単独で治療を行った際と比較し抗腫瘍効果の増強が観察されたことから、内在性 T 細胞は単に腫瘍局所に集積しているのみではなく、機能的にも P815 に対する抗腫瘍効果に一定の役割を果たしていることが分かった。これらの結果は、7×19 CAR-T 細胞に関して我々の行った既報の結果と合致するものである<sup>22)</sup>。腫瘍微小環境において IL7 や CCL19 が機能する正確な機序は明らかとなっていないが、P1A-T 細胞や内在性 T 細胞に対しそれぞれ自己分泌作用および傍分泌作用を果たしていると考えられる。内在性 T 細胞は、直接細胞傷害及び/またはサイトカイン産生により直接的、間接的に抗腫瘍効果を発揮していると想定される (図 14)。



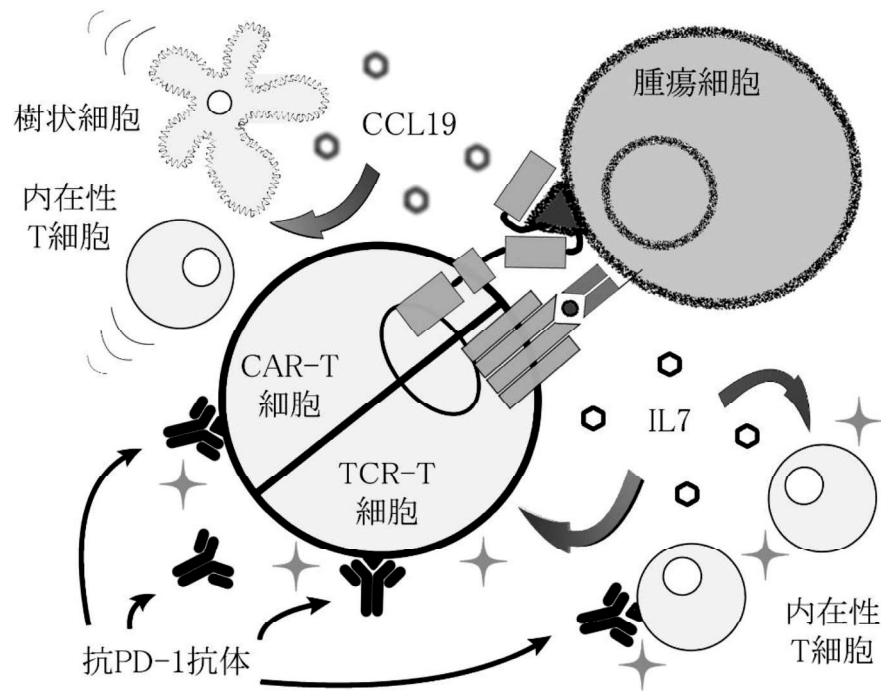


図 14 IL7 及び CCL19 を産生する遺伝子改変 T 細胞と抗 PD-1 抗体を用いた複合免疫療法の概要

IL7、CCL19 を産生する TCR-T 細胞及び CAR-T 細胞は CCL19 の作用により樹状細胞や内在性 T 細胞を腫瘍局所へ集積させ、IL7 の作用により遺伝子改変 T 細胞及び内在性 T 細胞の生存・増殖を促すことで抗腫瘍効果を発揮する。抗 PD-1 抗体の併用は遺伝子改変 T 細胞ばかりでなく内在性 T 細胞の活性化をも促し抗腫瘍効果を増強させる。

## 7. 結語

我々は本研究において以下の 2 つの点を明らかにした。第一に、IL7 及び CCL19 を産生する遺伝子改変を TCR-T 細胞に加えることで TCR-T 細胞の有する抗腫瘍効果が増強し、既存の各種免疫療法、すなわち抗 PD-1 抗体や TCR-T 細胞療法、およびその併用にさえも抵抗性の腫瘍を寛解に導くことができた。第二に、IL7 及び CCL19 を産生する TCR-T 細胞、CAR-T 細胞の抗腫瘍免疫反応は抗 PD-1 抗体を併用することで更に増強した。本研究で得られた知見により、既存の免疫療法に抵抗性の悪性腫瘍を患う患者により多くの治療選択肢を呈示できるようになることが期待される。

## 8. 謝辞

本研究において貴重なご指導をいただきました山口大学医学部大学院

医学系研究科免疫学講座 玉田耕治教授、佐古田幸美先生、安達圭志先生、実験のご協力や実験手技のご指導等をいただきました同講座 立壁賢様、宮本真紀子様、岡田奈々様、伊田三保子様、黒澤宏美様、中村七海様、大橋玲子様、河合亜紀様、佐々木貴宏先生、後藤駿介先生に心より深謝申し上げます。また、本研究を行うにあたって終始ご支援・ご助言をいただいた谷澤幸生教授（現山口大学理事・副学長）に感謝します。

## 9. 参考文献

1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:439-48.
2. Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:449-59.
3. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med* 2018;24:20-8.
4. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377:2531-44.
5. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2019;380:45-56.
6. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2019;380:1726-37.
7. Xu J, Chen LJ, Yang SS, Sun Y, Wu W, Liu YF, et al. Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in

relapsed/refractory multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:9543-51.

8. Zhang J, Wang L. The emerging world of TCR-T cell trials against cancer: a systematic review. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18:1533033819831068.
9. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol Rev* 2019;290:127-47.
10. Song MK, Park BB, Uhm JE. Resistance mechanisms to CAR T-cell therapy and overcoming strategy in B-cell hematologic malignancies. *Int J Mol Sci* 2019; 20:5010.
11. Cheng J, Zhao L, Zhang Y, Qin Y, Guan Y, Zhang T, et al. Understanding the mechanisms of resistance to CAR T-cell therapy in malignancies. *Front Oncol* 2019;9:1237.
12. Yeku O, Li X, Brentjens RJ. Adoptive T-cell therapy for solid tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2017;37:193-204.
13. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, HughesMS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314:126-9.
14. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011;29:917-24.
15. Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 2015;21:1019-27.
16. Guedan S, Posey AD Jr, Shaw C, Wing A, Da T, Patel PR, et al.

Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight* 2018;3:e96976.

17. Quintarelli C, Orlando D, Boffa I, Guercio M, Polito VA, Petretto A, et al. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology* 2018;7:e1433518.
18. 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. *Sci Rep* 2017;7:737.
19. John LB, Devaud C, Duong CP, 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. *Clin Cancer Res* 2013;19:5636-46.
20. 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. *J Clin Invest* 2016;126:3130-44.
21. Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. IL-12 secreting tumortargeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* 2015;4:e994446.
22. 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. *Nat Biotechnol* 2018;36:346-51.
23. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 2002;169:424-33.

24. Miller PW, Sharma S, Stolina M, Butterfield LH, Luo J, Lin Y, et al. Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum Gene Ther* 2000;11:53-65.
25. Hillinger S, Yang SC, Zhu L, Huang M, Duckett R, Atianzar K, et al. EBV-induced molecule 1 ligand chemokine (ELC/CCL19) promotes IFN-gamma-dependent antitumor responses in a lung cancer model. *J Immunol* 2003;171:6457-65.
26. 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. *J Exp Med* 1999;189:811-20.
27. Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 2011;6:e18556.
28. Deng W, Yang D, Zhao B, Ouyang Z, Song J, Fan N, et al. Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer. *PLoS One* 2011;6:e19986.
29. 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. *Mol Ther* 2010;18:843-51.
30. 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. *Clin Cancer Res* 2012;18:6436-45.
31. Okada M, Chikuma S, Kondo T, Hibino S, Machiyama H, Yokosuka T, et al. Blockage of core fucosylation reduces cell-surface expression of PD-1 and promotes anti-tumor immune responses of T cells. *Cell Rep* 2017;20:1017-28.

32. Umezu D, Okada N, Sakoda Y, Adachi K, Ojima T, Yamaue H, et al. Inhibitory functions of PD-L1 and PD-L2 in the regulation of anti-tumor immunity in murine tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68:201-11.
33. Van den Eynde B, Lethe B, Van Pel A, De Plaen E, Boon T. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 1991;173:1373-84.
34. Tsujimura T, Furitsu T, Morimoto M, Isozaki K, Nomura S, Matsuzawa Y, et al. Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood* 1994;83:2619-26.
35. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, et al. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood* 1991;78:1706-12.
36. Tan JK, Periasamy P, O' Neill HC. Delineation of precursors in murine spleen that develop in contact with splenic endothelium to give novel dendritic-like cells. *Blood* 2010;115:3678-85.
37. Bai XF, Liu JQ, Joshi PS, Wang L, Yin L, Labanowska J, et al. Different lineages of P1A-expressing cancer cells use divergent modes of immune evasion for T-cell adoptive therapy. *Cancer Res* 2006;66:8241-9.
38. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, et al. Cold tumors: a therapeutic challenge for immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:168.

この学位論文は、Yoshihiro Tokunaga, Takahiro Sasaki, Shunsuke Goto, Keishi Adachi, Yukimi Sakoda and Koji Tamada. Enhanced anti-tumor responses of tumor antigen-specific TCR-T cells genetically engineered

to produce IL-7 and CCL19. *Molecular Cancer Therapeutics* : DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0400 に原著論文として発表したものから、データを引用して作成しました。