

研究報告書

平成30年度：A課題

2020年 4月 27日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 愛知県がんセンター研究所

住 所 〒464-8681
名古屋市千種区鹿子殿1番1号

研究者氏名 籠谷 勇紀



(研究課題)

養子免疫療法で用いる抗腫瘍T細胞におけるSTAT3、STAT5シグナルの役割の解明と抗腫瘍効果改善への応用

平成31年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

研究の背景

がん抗原を認識する T 細胞を体外で培養・増幅し、患者に輸注することで腫瘍細胞を特異的に攻撃させる養子免疫療法は、CD19 に対するキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) 導入 T 細胞療法が再発・難治性の B 細胞性腫瘍に対して著効した一方で、固形腫瘍に対する臨床試験では十分な治療効果が得られていない [1]。同治療法の治療効果を高める上で、ヒト T 細胞のメモリー形成、エフェクター機能などの性質に関わる分子メカニズムの理解を進めることが重要である。サイトカインシグナルにより活性化される JAK-STAT 経路、とりわけ STAT3 と STAT5 はこれらの機能に必須の役割を有することがわかっている [2, 3]。しかし STAT3、STAT5 は各々固有の遺伝子群の発現を制御しており、各々が個別に T 細胞機能に与える影響は十分には解明されていない。本研究では STAT3 と STAT5 の活性が抗腫瘍 T 細胞の機能をどのように制御するかを詳細に解析し、得られた知見を端緒として養子免疫療法の治療効果を高める観点から T 細胞に付与すべきシグナル修飾を探索・同定することを目的とした。

方法

1. ヒト T 細胞の培養

ヒト T 細胞は、健常人由来の末梢血単核球をソースとして用いた。抗 CD3 抗体（クローン OKT3）の単鎖可変領域フラグメントを CD8 α 分子の膜貫通・細胞内ドメインと連結した分子 (OKT3 scFV-CD8) と共に刺激分子 CD80 を白血病細胞株 K562 に発現させ、同細胞と共に培養することにより増殖刺激を付与した。細胞培養は RPMI1640, 10% fetal bovine serum にサイトカイン IL-2 を 100 IU/ml で添加して行った。

STAT3、STAT5 変異遺伝子は、P2A 配列により truncated NGFR 遺伝子（遺伝子導入細胞の識別のための表面マーカーとして使用）、CD19 に対する CAR 遺伝子と連結し、レトロウイルスプラスミドに挿入した。これらのプラスミドはパッケージング細胞 PG13 に安定導入した後、同細胞由来のウイルス上清液を用いてヒト T 細胞に導入した。T 細胞の表面抗原及びサイトカイン産生の解析はフローサイトメトリー (LSRFortessa: BD) により行った。

2. マウス腫瘍モデル

*In vivo*におけるCAR-T細胞の抗腫瘍効果は、NSGマウス（Jackson Lab）にCD19陽性白血病細胞株NALM-6を輸注した後、CD19に対するCAR-T細胞により治療するモデルを用いた。NALM-6にレシフェラーゼ遺伝子を導入しておき、*In vivo* imaging system (IVIS)により腫瘍量をモニターした。またCAR-T細胞の生存は末梢血中のCAR-T細胞割合をフローサイトメトリーにより解析した。

3. RNA シークエンス

STAT3、STAT5変異遺伝子を導入したCAR-T細胞の遺伝子発現プロファイルをRNAシークエンス（NovaSeq）により解析した。HISAT2によるマッピング、HTSeqによる各遺伝子ごとのリードカウントを計算後、EdgeRによりコントロールと比較して発現変化のある遺伝子群を抽出した。

結果と考察

STAT3、STAT5シグナルのT細胞機能における個別の役割を解析するため、CD19に対するCAR-T細胞に恒常的活性化型のSTAT3、STAT5変異遺伝子（STAT3 Y640F、STAT5 N642H）を個別に共発現させ、CAR-T細胞機能を*in vitro*で評価した[4,5]。STAT3 Y640F導入により連続的抗原刺激に伴うCAR-T細胞の増殖能が高まったが、逆に抗原刺激を加えない状態では顕著な細胞死が誘導された（図1、A-C）。従ってSTAT3の恒常的活性化は定常状態ではT細胞のアポトーシスを誘導するが、抗原刺激下ではむしろ増殖を亢進させ、生存に有利なシグナルとして働くことが示唆された。

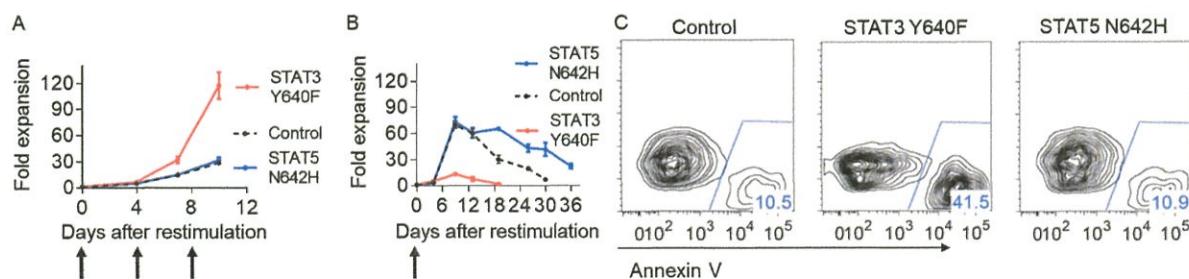


図1. ヒトT細胞にCD19に対するCARとSTAT3、STAT5の活性化型変異遺伝子を共導入した後、連続的抗原刺激を加えた場合(A)、単回刺激のみの場合(B)のCAR-T細胞の増殖を解析した。また単回刺激後のアポトーシス割合をAnnexin V染色で評価した(C)。

CAR-T 細胞のメモリー形質を解析したところ、STAT3 変異遺伝子を導入した CAR-T 細胞では、未分化なメモリー一分画である幹細胞様メモリー（CD45RA+CD62L+CCR7+CD27+CD28+）、セントラルメモリー（CD45RA-CD62L+CCR7+CD27+CD28+）分画が顕著に増加していた（図 2）[6]。また STAT3 活性化 CAR-T 細胞は、サイトカイン分泌能ではコントロールと比べて劣る一方で、細胞傷害活性においては有意に亢進していた（図 3）。STAT5 活性化型 CAR-T 細胞は、いずれの機能解析においてもコントロール CAR-T 細胞と比較して有意な変化は起こさなかった。

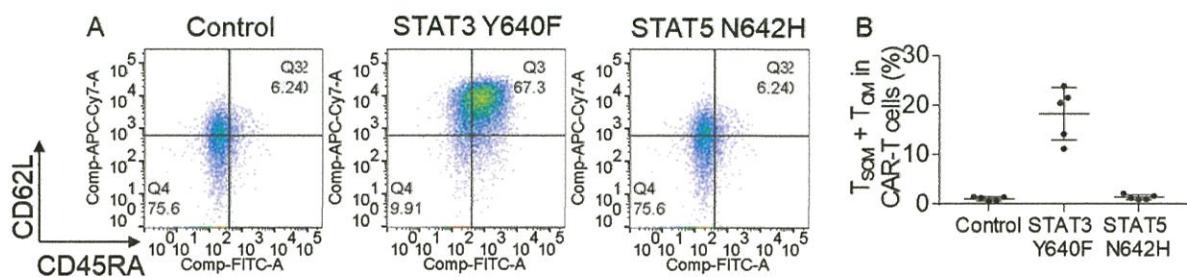


図 2. CAR-T 細胞に抗原刺激を加えた後、メモリー形質を解析。（A）Day 11 における代表的な FACS プロット。（B）3 回刺激後の未分化メモリーの割合。

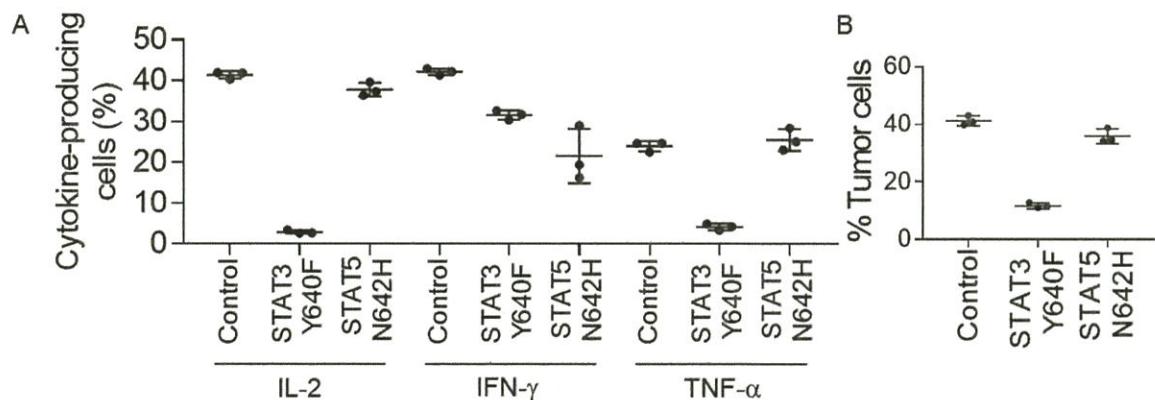


図 3. STAT, STAT5 変異遺伝子を共発現させた CAR-T 細胞の機能解析。（A）CD19 陽性細胞 NALM6 による再刺激を行った際のサイトカイン産生を解析。（B）NALM6 と共に培養した際の NALM6 に対する細胞傷害活性を定量。

次に、STAT3, STAT5 活性化型 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を *in vivo* において解析した。NALM6 を輸注した NSG マウスを CD19 に対する CAR-T 細胞で治療するモデルを用いて検証したところ、STAT5 活性化型 CAR-T 細胞が優れた抗腫瘍効果を誘導できた一方、STAT3 活性化型 CAR-T 細胞では腫瘍の進行を抑えられなかった（図 4）。上記の *in vitro* におけるデータとあわせて考えると、STAT3 の活性化は抗原刺激後の増生は促進し、またメモリー形質の維持能にも寄与するものの、抗原刺激のない状態では細胞死が加速するため、結果的に *in vivo* における持

統的な抗腫瘍効果の誘導にはつながらないことが示唆された。

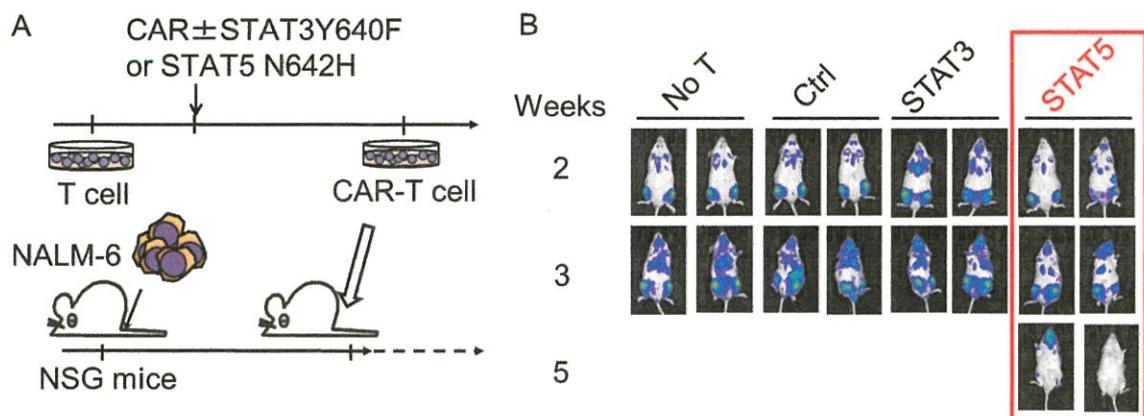


図 4. (A) CD19 に対する CAR-T 細胞治療モデル。(B) 腫瘍量を *in vivo* imaging system により経時的に解析。

STAT3, STAT5 により誘導される機能変化をさらに解析するため、CAR-T 細胞の遺伝子発現プロファイルを RNA シークエンスにより網羅的に解析した。STAT3 活性化型 CAR-T 細胞は、コントロールと比較して 5641 遺伝子で有意な発現変化を認め、大幅なプロファイル変化が起こっていた。一方、STAT5 活性化型 CAR-T 細胞は 11 個にとどまっていた。また図 5 に示すように、STAT3 活性化 CAR-T 細胞はドナーの違いに関わらず独立したクラスターに分類された。具体的な遺伝子ではメモリー形質に関わる転写因子 (TCF7, LEF1) や表面マーカー (SELL, CD28) が高発現であった一方で、細胞傷害活性に関わるエフェクター分子 (GZMB, PRF1) も高発現していた。後者は本来エフェクター T 細胞へ分化が進むにつれて発現が亢進する遺伝子群であることから、興味深いことに STAT3 の活性化によりメモリー形質の維持・エフェクター機能への分化という通常相反する機能が同時に進行することがわかった。これらは、例えば STAT3 を誘導するサイトカインである IL-21 がメモリー形成・エフェクター機能の双方に関わることと合致する結果である [7]。

In vivo における抗腫瘍効果の実験から、STAT3 の活性化単独では治療効果増強に寄与できないが、これらの広範な遺伝子変化を他の修飾と組み合わせることで、より生存に有利な機能変化を誘導できる可能性があり、現在 STAT3 の活性化に伴い細胞死の亢進につながるメカニズムを解析中である。

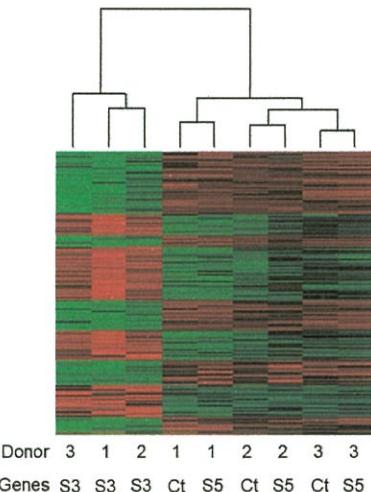


図 5. CD19 に対する CAR-T 細胞に STAT3, STAT5 変異遺伝子を共発現させた上で CD19 による再刺激を加え、3 日後の遺伝子発現プロファイルを RNA シークエンスにより解析した。3 群の比較で有意な変化 (adjusted p value<0.01)についてヒートマップを描いたところ、STAT3 変異遺伝子導入 CAR-T 細胞がドナーの際に関わらず別のクラスターに分類された。

謝辞

本研究は、公益財団法人 がん研究振興財団・がん研究助成金の支援を得て遂行した。

参考文献

1. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med*. 2017 Jan 14;68:139-152.
2. Hand TW, Cui W, Jung YW, Sefik E, Joshi NS, Chandele A, Liu Y, Kaech SM. Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 21;107(38):16601-6.
3. Siegel AM, Heimall J, Freeman AF, Hsu AP, Brittain E, Brenchley JM, Douek DC, Fahle GH, Cohen JI, Holland SM, Milner JD. A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. *Immunity*. 2011 Nov 23;35(5):806-18.
4. Rajala HL, Eldfors S, Kuusanmäki H, van Adrichem AJ, Olson T, Lagström S, Andersson EI, Jerez A, Clemente MJ, Yan Y, Zhang D, Awwad A, Ellonen P, Kallioniemi O, Wennerberg K, Porkka K, Maciejewski JP, Loughran TP Jr, Heckman C, Mustjoki S. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 May 30;121(22):4541-50.
5. Fasan A, Kern W, Grossmann V, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. STAT3 mutations are highly specific for large granular lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013 Jul;27(7):1598-600.
6. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP: A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17:1290-1297.
7. Croce M, Rigo V, Ferrini S. IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *J Immunol Res*. 2015;2015:696578.