

主論文の要旨

Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses

（ 免疫シナプスを増強する lenalidomide による
EGFRvIII キメラ抗原受容体発現 T 細胞療法の増強効果 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：若林 俊彦 教授)

倉光 俊一郎

【緒言】

神経膠芽腫は成人の悪性脳腫瘍で最も頻度の高い腫瘍でありその予後は現在の標準治療を用いても依然予後不良の疾患である。T-body 療法は遺伝子導入技術を用いて腫瘍特異的な T 細胞を大量に作成することを可能とした新しい養子免疫療法であり、T-body は Chimeric antigen receptor (CAR) を遺伝子導入することにより作成される。CAR は腫瘍抗原に特異的な抗体と T 細胞受容体 (TCR) を融合させた人工受容体であり、CAR を発現する T 細胞は主要組織適合遺伝子複合体に依存せず殺細胞効果を示す。我々はこれまでに神経膠芽腫に発現する EGFRvIII に対する CAR (3C10-CAR) を作成しその有効性を報告している。しかし、T-body 療法においても他の免疫療法と同様にがん微小免疫抑制環境に晒されるという問題がある。今回我々は免疫調整薬 (immunomodulatory drug ; IMiDs) lenalidomide を T-body 療法に併用することによりがんの微小免疫抑制環境の克服を試みた。併せて CAR 発現 T 細胞における lenalidomide の免疫増強作用の機能解明を試みた。

【方法】

EGFRvIII に対するモノクローナル抗体を単鎖抗体化し、CAR の遺伝子情報を元に作成し 3C10-CAR を作成した。3C10-CAR の T 細胞への遺伝子導入はレンチウイルスを用いて行った。3C10-CAR 導入 T 細胞 (3C10-CAR-T 細胞) に対する lenalidomide の様々な効果を調べるため、3C10-CAR-T 細胞を lenalidomide で処理した後 EGFRvIII 発現神経膠芽腫株と共培養して細胞内染色を行い、interferon- γ (IFN- γ) の産生量を評価した。また、Calcein assay を用いて lenalidomide による細胞障害性の増強効果について評価を行った。続いて poly-L-lysine-coated coverslip 上で免疫染色を行い、腫瘍細胞と 3C10-CAR-T 細胞の間の免疫シナプスの形成と局在について顕微鏡下に定量的に計測を行った。NOD/SCID マウス (NOG マウス) の脳内にルシフェラーゼ発現 EGFRvIII 発現神経膠芽腫株を異種移植し脳腫瘍モデルを作成し、3C10-CAR-T 細胞を経静脈的に投与した後 lenalidomide を連日 35 日間腹腔内注射し、*in vivo* イメージングにて腫瘍の発育過程を非投与群と比較した。また、3C10-CAR-T 細胞の腫瘍部位への遊走について評価するため、3C10-CAR-T 細胞投与後連日 20 日間の lenalidomide 投与を行った後にマウス脳を摘出し、免疫染色を行い非投与群との比較を行った。

【結果】

lenalidomide は 3C10-CAR-T 細胞の IFN- γ 産生を増加し、EGFRvIII 発現神経膠芽腫への細胞障害性を増強する

はじめに、レンチウイルスを用いた 3C10-CAR の導入効率について FACS を用いて解析した。その結果 CD8+T 細胞における 3C10-CAR の発現率は 30-40% と高い導入効率を得られていた。次に IFN- γ の細胞内染色を行い同様に FACS にて解析を行った。Lenalidomide 非処理 3C10-CAR-T 細胞の IFN- γ 陽性細胞数は 9.84% であったのに対し、lenalidomide で前処理した 3C10-CAR-T 細胞の IFN- γ 陽性細胞数は 18.82% と陽性率の上昇を認め、

lenalidomide には 3C10-CAR-T 細胞の IFN- γ の産生を増加させる効果が認められた(図 1)。続いて、lenalidomide による 3C10-CAR-T 細胞の細胞障害性増強効果を評価するため、Calcein assay を行った。その結果、3C10-CAR-T 細胞は非導入 T 細胞に比し有意に細胞障害性が高く、lenalidomide 前処理群ではその細胞障害効果を有意に増強していた(図 2)。

lenalidomide は EGFRvIII 発現神経膠芽腫株異種移植マウスに対する 3C10-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を増強する

ルシフェラーゼ発現 EGFRvIII 発現神経膠芽腫株を頭蓋内に異種移植した NOG マウスに対して 3C10-CAR-T 細胞で治療した群は、mock-T 細胞治療群に比し腫瘍の縮小効果を認め、有意に生存期間が延長していた。さらに、3C10-CAR-T 細胞に lenalidomide を併用して治療した群は、lenalidomide を投与しなかった群に比べて有意に生存期間が延長し、すべてのマウスで腫瘍の消失を認めた(図 3)。また、免疫染色にて 3C10-CAR-T 細胞が腫瘍部位に遊走していることを確認し、lenalidomide 併用治療群では腫瘍部位へ遊走した 3C10-CAR-T 細胞の数が有意に増加していた(図 4)。

lenalidomide は 3C10-CAR-T 細胞と EGFRvIII 発現神経膠芽腫株の間に形成する免疫シナプスを増強する

EGFRvIII 発現神経膠芽腫株と 3C10-CAR-T 細胞の間には免疫シナプスの構成要素である F-actin、CD11a(LFA-1) が局在化し、また同部位に CAR も局在化しており、3C10-CAR-T 細胞と腫瘍細胞の間に免疫シナプスを形成していることがわかった(図 5a)。さらに、lenalidomide 投与群において有意に免疫シナプスが増強されていることが確認された(図 5b)。

【考察】

すべての免疫療法に共通した課題はがん細胞をとりまく免疫抑制環境の打開であり、近年 CTLA-4 や PD-1 などを標的とした免疫チェックポイント阻害薬が注目されている。Lenalidomide は多岐にわたる免疫調整作用や直接的な抗腫瘍効果、血管新生阻害作用をもち、既に血液がん領域で臨床使用されている。

本論文で我々は *in vivo* において lenalidomide が 3C10-CAR-T 細胞療法の併用により著明な生存期間の改善をもたらすことを示した。その機序として lenalidomide が CAR に組み込まれている CD28 を介した共刺激シグナル伝達を活性化し、IFN- γ の産生を増加することや、CAR-T 細胞と標的細胞の間に形成された免疫シナプスを増強することにより、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

サリドマイドは過去その血管新生阻害作用による悪性神経膠腫の治療薬として期待されたが、その有効性を示せなかった。しかし、その誘導体である lenalidomide は免疫調整作用を増強し、副作用が軽減された薬剤であり、T-body 療法をはじめとした免疫療法との併用での有効性が期待できる。

【結論】

本論文は, lenalidomide が CAR-T 細胞療法の治療効果を増強することを示し、CAR-T 細胞と腫瘍細胞の間に免疫シナプスを形成していることを示した初めての論文である。

免疫チェックポイントの阻害は有望な手法であるが、lenalidomide もまた T-body 療法を含めた免疫療法を強化する有望な作用を持つと考えられる。