

# 新規免疫抑制解除法の併用による 固形がんにも有効なCAR-T細胞療法の開発

加藤侑希<sup>1)</sup>, 池田俊勝<sup>1)</sup>, 加藤果野子<sup>2)</sup>, 杉俊洸<sup>2)</sup>, 川名敬<sup>2)</sup>, 平井宗一<sup>1)</sup>

## Development of chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for solid tumors by modulating immunosuppressive tumor microenvironment.

Yuki KATOH<sup>1)</sup>, Toshikatsu IKEDA<sup>1)</sup>, Kanoko KATOH<sup>2)</sup>,  
Toshihiro SUGI<sup>2)</sup>, Kei KAWANA<sup>2)</sup>, Shuichi HIRAI<sup>1)</sup>

### 要旨

固形がんに対するCAR-T療法の大きな課題は、腫瘍微小環境中の免疫抑制の克服と、腫瘍特異的な標的抗原の同定である。本研究では、著者らがこれまでの研究で新たに同定した、免疫抑制誘導分子：stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)、および、標的抗原分子：Glypican-1 (GPC1)を標的とした、新規CAR-T細胞療法の可能性を検討した。その結果、SCD1は、コレステロール代謝との相互作用によりT細胞のエフェクター機能を負に制御していること、更に、SCD1阻害剤は、抗GPC1-CAR-T細胞の治療効果を著明に増強することを明らかとした。以上より、SCD1およびGPC1は、固形がんにも有効なCAR-T細胞療法を開発するうえで、魅力的なターゲットである可能性が示唆された。

### 1. はじめに

我々はこれまでに、新規の腫瘍抗原GPC1を標的としたヒトCAR-T細胞療法の前臨床研究を行い、GPC1が、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の極めて有望な標的である可能性を報告した<sup>1)</sup>。また、並行して進めていた、多種のがん患者の臨床検体を用いた網羅的遺伝子発現解析から、がん微小環境およびT細胞において、SCD1が、免疫抑制を誘導する鍵分子であることを見出し、SCD1阻害剤は、CD8陽性T細胞の抗腫瘍活性を直接増強することを明らかにしている<sup>2)</sup>。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、SCD1阻害剤がT細胞のエフェクター機能を増強するメカニズムを明らかにし、最終的には、担癌マウスモデルを用いて、SCD1阻害剤が、抗GPC1-CAR-T細胞療法の治療効果を増強しうるかを検証し、固形がんにも有効な新たなCAR-T

細胞療法の開発を行うこととした。

### 2. 対象及び方法

まず、*in vitro*において、SCD1がT細胞のエフェクター機能を負に制御している分子メカニズムの解析を行った。具体的には、ヒト末梢血からCD8<sup>+</sup>T細胞をMACS beadsを用いて単離・活性化し、SCD1阻害剤 (A939572またはCAY10566)を作用させた。SCD1存在下、或いは、非存在下で、数日間培養した後、サイトカイン産生能、細胞内脂肪酸代謝状態およびコレステロール代謝状態を、ELISA、qPCR、WB、ガスクロマトグラフィー-質量分析および、コレステロール測定キットで評価した。

次にGPC1 CAR-T細胞に対する、SCD1阻害剤の作用を検証した。GPC1 CAR-T細胞は、マウス脾細胞を、IL-7およびconcanavalin Aで活性化し、翌日、抗GPC1-CAR遺伝子を導入することで作製した。

1) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野  
2) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野  
加藤侑希 : kato.yuki@nihon-u.ac.jp

上記、T細胞での評価項目に加え、ターゲットのがん細胞と共培養したときの、IFN- $\gamma$ 生産能および細胞傷害活性に対する効果を、それぞれ、ELISAおよびカルセイン放出アッセイにより評価した。

最後に、担癌マウスモデルを用いて、SCD1阻害剤と抗GPC1-CAR-T細胞の併用治療効果を評価した。具体的には、8週齢のC57BL/6マウスの脇腹にGPC1を恒常的に発現させたマウス肉腫細胞(MCA205-mGPC1細胞)を皮下接種し、移植4日後に、培養したGPC1-mCAR-T細胞、または、マウスコントロールT(mCont-T)細胞を静脈内投与した。その後、IL-2を1日2回、合計6回腹腔内注射した。また、併用療法群のマウスには、腫瘍移植後4日目から16日間、1日2回、10mg/kgのA939572を経口投与した。

### 3. 結果

#### 3-1. SCD1阻害剤は、acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1) 依存的なコレステロールエステル化反応の抑制を介して、T細胞のエフェクター機能を増強する

我々はこれまでに、SCD1がCD8<sup>+</sup>T細胞に対して直接的な免疫抑制活性を持つことを明らかにしてきたが、その分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、SCD1阻害剤がCD8<sup>+</sup>T細胞に直接作用し、その抗腫瘍活性を増強するかを評価した。抗CD3および抗CD28抗体で活性化したヒトCD8<sup>+</sup>T細胞をSCD1阻害剤で処理すると、SCD1が生成する脂肪酸であるオレイン酸およびパルミトレイン酸の細胞内レベルが低下し、CD8<sup>+</sup>T細胞によるIFN- $\gamma$ 生産が著しく増強した。興味深いことに、このSCD1阻害剤によるT細胞機能増強効果は、パルミトレイン酸ではなくオレイン酸の添加によってキャンセルされた。従って、SCD1によって細胞内のオレイン酸の増加を介してT細胞活性が抑制されていることが示唆された。

これまでに、オレイン酸は、コレステロールエステラーゼであるACAT1の最良の基質で、また、ACAT1遺伝子ノックアウトがCD8<sup>+</sup>T細胞による細胞傷害性サイトカイン産生を増強することが報告されている<sup>3)</sup>。そこで我々は次に、CD8<sup>+</sup>T細胞のエフェクター機能におけるSCD1とACAT1の関係を明らかにしようと試みた。CD8<sup>+</sup>T細胞において

ACAT1によって制御されるコレステロールのエステル化に対するSCD1阻害剤の効果を評価したところ、SCD1阻害剤はエステル化コレステロール(ACAT1代謝産物)とコレステロール(ACAT1代謝前駆体)の比率(代謝産物/基質比)を低下させることがわかった。詳細な解析の結果、SCD1阻害剤は細胞内の総コレステロール量にはほとんど影響を与えず、エステル化コレステロールを有意に減少させることが判明した。更に、エステル化コレステロールであるオレイン酸コレステリルの添加により、CD8<sup>+</sup>T細胞による、SCD1阻害剤誘導性IFN- $\gamma$ 産生の増強がキャンセルされることが判明した。これらの結果から、SCD1阻害剤は、細胞内オレイン酸レベルを低下させることにより、ACAT1依存的に産生されるエステル化コレステロールを減少させ、T細胞のエフェクター機能を増強している可能性が示唆された。

#### 3-2. SCD1阻害剤は、GPC1特異的マウスCAR-T細胞の抗腫瘍機能を高める

SCD1阻害剤が、CD8<sup>+</sup>T細胞に直接作用し、その抗腫瘍機能を高める可能性が示唆されたため、SCD1阻害剤がCAR-T細胞の抗腫瘍機能も高めるかどうか検討した。我々はこれまでに、GPC1高発現の固形がんに対して強力な抗腫瘍活性を発揮するGPC1特異的マウスCAR-T(GPC1-mCAR-T)細胞を開発している<sup>2)</sup>。この、GPC1-mCAR-T細胞をSCD1阻害剤で処理すると、T細胞と同様に、細胞内のオレイン酸およびエステル化コレステロールレベルの著明な低下が確認された。続いて、SCD1阻害剤処理または非処理のGPC1-mCAR-T細胞とmGPC1を安定発現するMCA205腫瘍細胞(MCA205-mGPC1)を*in vitro*で共培養し、サイトカイン分泌能および細胞傷害性を評価した。その結果、SCD1阻害剤処理により、GPC1-mCAR-T細胞のIFN- $\gamma$ 産生および細胞傷害活性が有意に向上することが示された。

SCD1阻害剤が、*in vitro*でCAR-T細胞のエフェクター機能を高めることから、MCA205-mGPC1移植担癌マウスモデルを用いてGPC1-mCAR-T細胞とSCD1阻害剤の併用効果を評価した。その結果、SCD1阻害剤とGPC1-mCAR-T細胞の併用療法はGPC1-mCAR-T細胞単独、SCD1阻害剤単独よりも強い抗腫瘍活性を示した。これらの結果から、SCD1-

ACAT1軸は、抗PD-1抗体やCAR-T細胞療法を併用したがん免疫療法の治療効果を向上させるための重要なターゲットであることが強く示唆された。

#### 4. 考 察

免疫チェックポイント阻害剤やCAR-T細胞療法などのがん免疫療法の効果を高めるためには、non-T cell-inflamedによる炎症性免疫抵抗性に関わるメカニズムを理解することが重要である。近年、抗腫瘍免疫応答を高めるためのターゲットとして、腫瘍微小環境における脂質代謝を含む免疫代謝が注目されている<sup>4)</sup>。我々は以前、脂肪酸不飽和化酵素SCD1が、がん細胞やT細胞において免疫抑制活性を持つことを明らかにし、その活性を阻害すると、がん細胞やT細胞によるCCL4などのDC-recurringケモカインの産生を増加させることにより、抗PD-1抗体の抗腫瘍活性を高めることをマウス腫瘍モデルで示した<sup>2)</sup>。本研究では、SCD1-オレイン酸-ACAT1-エステル化コレステロール経路を阻害することで、ヒトおよびマウスの抗腫瘍CD8<sup>+</sup>T細胞のエフェクター機能を直接高めるSCD1阻害の新規メカニズムを示し、SCD1-ACAT1 axisへの介入が、CAR-T細胞療法との併用がん免疫療法の開発に有用であることを明らかとした(図1)。

本研究では、SCD1-ACAT1 axisによって制御される細胞内のオレイン酸とエステル化コレステロールが、抗腫瘍CD8<sup>+</sup>T細胞のエフェクター機能に重要であることを明らかにしたが、エステル化コレステロールによる免疫抑制のメカニズムについては更なる検討が必要である。最近の研究では、様々な脂肪

酸がT細胞機能の重要な制御因子であることが示されている。Ma *et al.*は、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸が、脂質過酸化とフェロトーシスの増加を介してCD8<sup>+</sup>T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を低下させることを示した<sup>5)</sup>。Nava Lauson *et al.*は、リノール酸がミトコンドリア機能を向上させ、疲弊を防ぐことを通じて、CD8<sup>+</sup>T細胞のエフェクター機能の主要なポジティブレギュレーターであることを報告した<sup>6)</sup>。また最近では、細胞内コレステロールもまた、脂肪酸同様にT細胞の抗腫瘍活性の制御に大きな役割を果たしていることが示されている。Yang *et al.*は、CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞膜におけるコレステロールレベルの上昇が、T細胞受容体のクラスタリングとシグナル伝達を促進し、その結果、サイトカインとcytotoxic granulesの産生が著しく促進されると報告した<sup>3)</sup>。Ma *et al.*は、CD8<sup>+</sup>T細胞におけるコレステロールの蓄積は、ERストレスを増大させることで、PD-1, 2B4, TIM-3, LAG-3などの免疫チェックポイント分子の発現を促進し、CD8<sup>+</sup>T細胞を疲弊に導くことを報告した<sup>7)</sup>。しかし、腫瘍免疫微小環境における脂質代謝の全貌は、脂肪酸代謝とコレステロール代謝のクロストークを含めて、まだ解明されていない。我々は、SCD1-ACAT1 axis, 即ち、fatty acid metabolism - cholesterol metabolism axisが、抗腫瘍CD8<sup>+</sup>T細胞のエフェクター機能の重要な制御因子の一つであることを証明した。脂肪酸とコレステロール、およびそれらの代謝物の適切なレベルは、抗腫瘍T細胞の機能にとって重要であると考えられ、今後さらなる研究が必要である。

#### 5. 結 語

SCD1は、ACAT1が生成する免疫抑制性のエステル化コレステロールの増加を通じて、抗腫瘍CD8<sup>+</sup>T細胞のエフェクター機能を抑制していることが明らかとなった。従って、SCD1-ACAT1 axisは、CAR-T細胞療法の治療効果を増強する魅力的なターゲットである。

#### 謝 辞

本研究遂行にあたり、多大なるご助言とご協力を賜りました。原弘之准教授、金川太郎氏および富田直子氏に深謝いたします。本研究は、令和3年度若手研究者環境整備支援助成金の支援を受けたものであります。

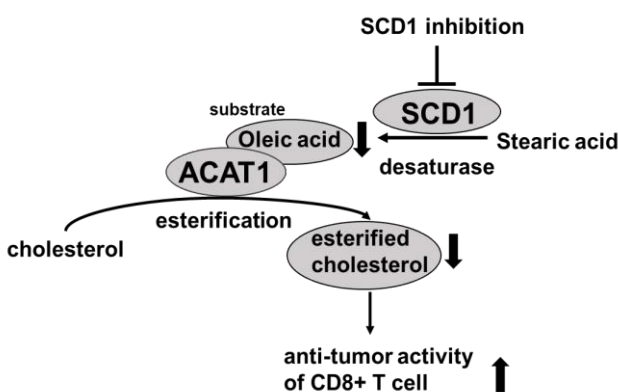


図1 SCD1阻害により、T細胞の細胞傷害活性が増強されるメカニズムの概略図。

## 文 献

- 1) Kato D, Yaguchi T, Iwata T, *et al.* GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab. *Elife* 2020; 9: e49392.
- 2) Katoh Y, Yaguchi T, Kubo A, *et al.* Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) enhances the antitumor T cell response through regulating  $\beta$ -catenin signaling in cancer cells and ER stress in T cells and synergizes with anti-PD-1 antibody. *J Immunother Cancer* 2022; 10(7): e004616.
- 3) Yang W, Bai Y, Xiong Y, *et al.* Potentiating the antitumor response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature* 2016; 531: 651-655.
- 4) Bader JE, Voss K, Rathmell JC. Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Mol Cell* 2020; 78: 1019-1033.
- 5) Ma X, Xiao L, Liu L, *et al.* CD36-mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8(+) T cell effector function and impairs their antitumor ability. *Cell Metab.* 2021; 33: 1001-1012.e1005.
- 6) Nava Lauson CB, Tiberti S, Corsetto PA, *et al.* Linoleic acid potentiates CD8(+) T cell metabolic fitness and antitumor immunity. *Cell Metab* 2023; 35: 633-650.e639.
- 7) Ma X, Bi E, Lu Y, *et al.* Cholesterol Induces CD8(+) T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab* 2019; 30: 143-156.e145.