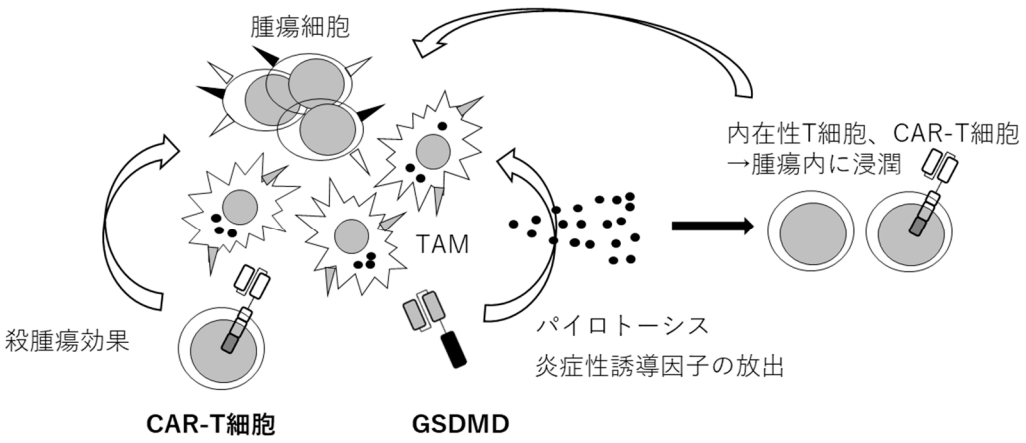
102　マクロファージに炎症性細胞死を誘導するCAR-T療法	伊藤　雄介

【目的】PD1/PDL1、CTLA4 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤や、CD19、BCMA を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞（CAR-T）療法などのがん免疫療法の発展により、悪性腫瘍の治療成績は向上してきたが、一部の血液腫瘍を除き、固形腫瘍においては奏効率が低く、再発率も高いのが現状である。持続的な抗腫瘍効果が得られない主な原因の一つとして、腫瘍周囲の免疫抑制性の微小環境が挙げられ、様々な免疫抑制性細胞が腫瘍免疫応答活性を阻害し、有効性を減弱させている。中でも腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage：TAM）は腫瘍内に豊富に存在し、様々なサイトカイン、ケモカイン産生などを通じて免疫抑制環境の誘導のみならず、血管新生、上皮間葉転換、がん幹細胞性の維持、遠隔転移をも司る。そのため、がん免疫療法の効果を高めるには TAM による免疫抑制シグナルの解除が重要であり、これまでに TAM を腫瘍微小環境から排除する手法が広く研究されている。近年、主にマクロファージにおいて、アポトーシスと異なり、ガスダーミン D（GSDMD）という因子を介して炎症性の細胞死を引き起こすパイロトーシスと呼ばれる細胞死のメカニズムが明らかになってきた。細胞内の細菌感染などを契機として炎症性カスパーゼが活性化され、GSDMD が切断されて活性化型が遊離することで、GSDMD が重合して細胞膜に孔を形成する。こうして出来た孔から、細胞が IL-1 や IL-18 などの様々な炎症誘導因子を放出しながら細胞死に陥ることで、周囲の炎症を惹起する。従ってこの生理反応を応用し、TAM にパイロトーシスを誘導することが出来れば、TAM の除去による免疫抑制シグナルの排除に加えて、腫瘍内に炎症を惹起することによって内在性免疫細胞の浸潤を促進し、抗腫瘍活性を増強することが期待でき、CAR-T 療法や免疫チェックポイント阻害剤の効果を高めることが可能となる。ガスダーミンのがん治療への応用に関して、ナノ粒子を用いて腫瘍内にガスダーミンを取り込ませる手法が報告されている。本研究では、より生理的にパイロトーシスを起こしやすく、炎症を惹起しやすい TAM を標的とした戦略を立てる。

【方法】標的抗原にヒト及びマウスの CD163 を用いる。CD163 抗体と GSDMD の活性化型をリンカーで結合し、TAM に取り込まれた後に活性化型の GSDMD が抗体から遊離するように、抗体との間にフューリン切断サイトを挿入し、TAM 内のフューリンによって切断されるように設計し、CD163 を遺伝子導入した細胞株やヒト及びマウスのマクロファージに対する毒性を評価した。

【結果】LDH assay を行い、パイロトーシスの誘導を評価したが、明らかな効果を認めなかった。GSDMD に変えて緑膿菌由来毒素（PEA）を用いたところ、CD163 を遺伝子導入したヒト由来細胞株およびマクロファージに対して細胞傷害活性を認めた。

腫瘍関連マクロファージ（TAM）に対する免疫毒素の治療効果の概念図



102. マクロファージに炎症性細胞死を誘導する CAR-T 療法

伊藤　雄介

*愛知県がんセンター 腫瘍免疫応答研究分野

Key words：腫瘍関連マクロファージ，パイロトーシス，ガスダーミン，免疫毒素

緒　言

PD1/PDL1、CTLA4 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤や、CD19、BCMA を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞（CAR-T）療法などのがん免疫療法の発展により、悪性腫瘍の治療成績は向上してきたが、一部の血液腫瘍を除き、固形腫瘍においては奏効率が低く、再発率も高いのが現状である［1］。持続的な抗腫瘍効果が得られない主な原因の一つとして、腫瘍周囲の免疫抑制性の微小環境が挙げられ、様々な免疫抑制性細胞が腫瘍免疫応答活性を阻害し、有効性を減弱させている［2］。中でも腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage：TAM）は腫瘍内に豊富に存在し、様々なサイトカイン、ケモカイン産生などを通じて免疫抑制環境の誘導のみならず、血管新生、上皮間葉転換、がん幹細胞性の維持、遠隔転移をも司る［3］。そのため、がん免疫療法の効果を高めるには TAM による免疫抑制シグナルの解除が重要であり、これまでに TAM を腫瘍微小環境から排除する手法が広く研究されており、CSF1R を標的とした TAM の除去や、CCR2 などのケモカインを介した腫瘍局所への遊走の阻害が効果を示しており、臨床試験が進められている。

近年、主にマクロファージにおいて、アポトーシスと異なり、ガスダーミン D（GSDMD）という因子を介して炎症性の細胞死を引き起こすパイロトーシスと呼ばれる細胞死のメカニズムが明らかになってきた［4］。細胞内の細菌感染などを契機として炎症性カスパーゼが活性化され、GSDMD が切断されて活性化型が遊離することで、GSDMD が重合して細胞膜に孔を形成する。こうして出来た孔から、細胞が IL-1 や IL-18 などの様々な炎症誘導因子を放出しながら細胞死に陥ることで、周囲の炎症を惹起する。従ってこの生理反応を応用し、TAM にパイロトーシスを誘導することが出来れば、TAM の除去による免疫抑制シグナルの排除に加えて、腫瘍内に炎症を惹起することによって内在性免疫細胞の浸潤を促進し、抗腫瘍活性を増強することが期待でき、CAR-T 療法や免疫チェックポイント阻害剤の効果を高めることが可能となる。ガスダーミンのがん治療への応用に関して、ナノ粒子を用いて腫瘍内にガスダーミンを取り込ませる手法が報告されている［5］。この論文によると、パイロトーシスで細胞死に陥る腫瘍細胞自体は 15%程度であるが、それによって炎症が惹起され、免疫細胞が活性化されることによって腫瘍全体の増殖を抑制できることを示しており、ガスダーミンによる抗腫瘍免疫の賦活化という治療戦略の有望性を示唆する結果である。本研究では、より生理的にパイロトーシスを起こしやすく、炎症を惹起しやすい TAM を標的とした戦略を立てる。

標的細胞特異的に目的の分子を導入する手法として、抗体薬物複合体が広く普及している［6］。これは主に腫瘍特異的に発現している抗原を標的とした抗体に薬物を結合させることにより、腫瘍細胞に薬物を取り込ませることで効果を発揮する。この手法を応用して、TAM 特異的な表面抗原である CD163 に対する抗体に活性化型 GSDMD を結合させることで TAM に特異的にパイロトーシスを誘導することが可能となると考えられる。加えて、この抗体-GSDMD 複合体を免疫チェックポイント阻害剤、CAR-T 細胞療法と組み合わせることで、さらなる相乗効果を生み出すことを狙う。

*現在の所属：慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 がん免疫研究部門

方　法

1. 抗体-GSDMD 複合体の設計

CD163 抗体と GSDMD の活性化型をリンカーで結合し、TAM に取り込まれた後に活性化型の GSDMD が抗体から遊離するように、抗体との間にフューリン切断サイトを挿入し、TAM 内のフューリンによって切断されるように設計した。

CAR	P2A	Ig κ signal peptide	Anti-CD163-Ab scFv	linker	Furin cleavage site	GSDMD active form

2. *in vitro* でのパイロトーシス誘導の検証

抗体薬物複合体を、CD163 を遺伝子導入した白血病細胞株 K562 に添加して細胞毒性を見るとともに、パイロトーシスの指標として細胞が放出する LDH の量を測定する LDH-Glo cytotoxicity assay を行って評価した。

3. 抗体-緑膿菌毒素複合体の機能評価

GSDMD の代わりに、緑膿菌毒素（PEA）由来の PE40、PE24 を用いて、CD163 抗体と連結させた免疫毒素を作製した。CD163 を遺伝子導入した K562 およびヒトマクロファージに添加して細胞毒性を評価した。

結　果

1. 抗体-GSDMD 複合体の機能評価

抗 CD163 抗体-GSDMD 複合体を、CD163 を遺伝子導入した K562 に添加して 48 時間後に細胞毒性を評価したが、明らかな細胞傷害活性を認めなかった（図 1a）。また、培養上清を用いて LDH-Glo cytotoxicity assay を行ったが、GSDMD によるパイロトーシスの誘導は確認できなかった（図 1b）。

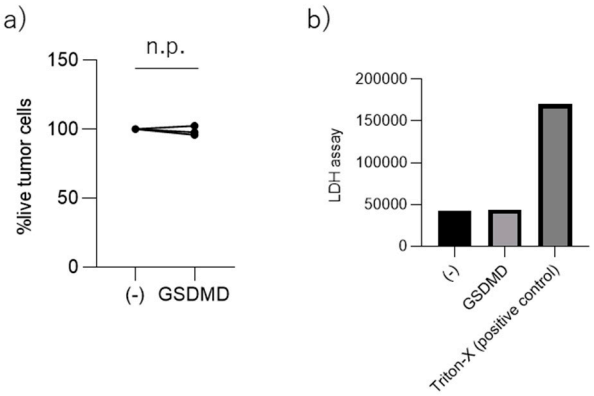


図 1. CD163 抗体-GSDMD 複合体の機能評価

a) K562-CD163 に抗体薬物複合体を添加して 48 時間後の生存能を評価した（two-tailed paired Student's *t*-test）。

b) 抗体薬物複合体添加後の培養上清を回収して LDH-Glo cytotoxicity assay を行った。

抗体薬物複合体が作用するためには、細胞内にエンドソームとして取り込まれた後、リソソームと融合して分解される前に、細胞内に放出されるリソソーム脱出が必要であるため、この機構を促進するような工夫が必要と考えられた。そこで、これまでに抗体薬物複合体として良く用いられている緑膿菌毒素由来の PE40、PE24 を用いた。

2. 抗体-緑膿菌毒素複合体の機能評価

抗 CD163 抗体-PE40、PE24 複合体を、CD163 を遺伝子導入した K562 に添加して 48 時間後に細胞毒性を評価したところ、PE40＜PE24 で有意に細胞傷害活性を認めた（図 2a）。続いて、ヒトの末梢血単核球から M-CSF を添加して 7 日間でマクロファージに分化させたのち、IL-4 を添加して M2 型マクロファージに分化させた。薬剤を添加して 48 時間後に生存能を評価したところ、PE24 で有意な細胞傷害活性を認めた（図 2b）。

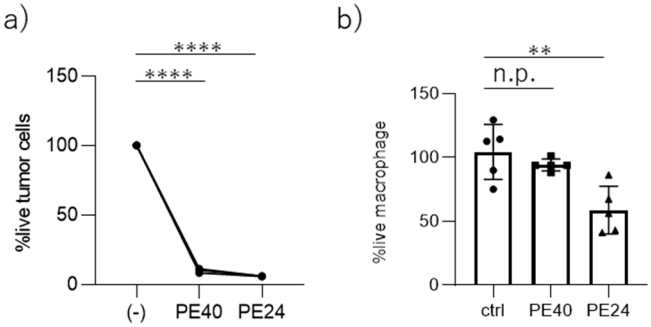


図 2. CD163 抗体-緑膿菌毒素複合体の機能評価

a) K562-CD163 に抗体薬物複合体を添加して 48 時間後の生存能を評価した（one-way ANOVA with multiple comparison test、****$p<0.0001$）。

b) M2-type マクロファージに抗体薬物複合体を添加して 48 時間後の生存能を評価した（one-way ANOVA with multiple comparison test、**$p<0.01$）。

考　察

GSDMD は通常 C 末端側が抑制的な役割を果たし、活性化型の N 末端側が遊離すると重合して細胞膜を貫通する。従って、GSDMD を免疫毒素に応用するためには、①投与前には不活性型として存在し、②細胞内に取り込まれたのちに細胞質中に放出され、③活性化型に変換されて重合する必要がある。これらの諸条件を満たすためにはさらなる構造の最適化が必要であり、機能を発揮できるような構造を引き続き探索していく。

緑膿菌毒素は以前から免疫毒素として用いられており、CD22 を標的とした moxetumomab pasudotox が hairy cell leukemia の治療薬として臨床応用されている。CD163 を標的とした免疫毒素が有意に細胞傷害活性を示しており、今後 CAR-T 細胞療法や免疫チェックポイント阻害剤との相乗効果を検証していく。

文　献

1) Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. Nat Rev Clin Oncol 2019;16(6):372-385. PMID: 30837712, DOI: 10.1038/s41571-019-0184-6

2) Bejarano L, Jordao MJC, Joyce JA. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. Cancer Discov. 2021;11(4):933-959. PMID: 33811125, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1808

3) DeNardo DG, Ruffel B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2019;19(6):369-382. PMID: 30718830, DOI: 10.1038/s41577-019-0127-6

4) Liu X, Xia S, Zhang Z, Wu H, Lieberman J. Channelling inflammation: gasdermins in physiology and disease. Nat Rev Drug Discov. 2021;20(5):384-405. PMID: 33692549, DOI: 10.1038/s41573-021-00154-z

5) Wang Q, Wang Y, Ding J, Wang C, Zhou X, Gao W, Huang H, Shao F, Liu Z. A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis. Nature 2020;579(7799):421-426. PMID: 32188939 DOI: 10.1038/s41586-020-2079-1

6) Akbari B, Farajnia S, Ahdi Khosroshahi S, Safari F, Yousefi M, Dariushnejad H, Rahbarnia L. Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. Int Rev Immunol. 2017;36(4):207-219. PMID: 28282218 DOI: 10.1080/08830185.2017.1284211