

2025 年 10 月 29 日
東京医科大学

第二世代 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果分子メカニズムを解明
～CAR-T 細胞の機能的な違いと治療法選択の理解に期待～

【概要】

東京医科大学(学長:宮澤啓介/東京都新宿区)免疫学分野 横須賀忠主任教授、竹内新准教授、大学院医学研究科博士課程 西川哲史医師、皮膚科学分野 原田和俊主任教授を中心とする研究チームは、超解像イメージング法を用い、T 細胞に必須な共刺激受容体^{*1} CD28 を導入 した第二世代キメラ抗原受容体(CAR)-T 細胞の抗腫瘍効果の分子メカニズムを解明しました(図1)。この研究は日本学術振興会科学研究費補助金等の支援の下で行われ、研究成果は国際科学誌 *Communications Biology* のオンライン版に 2025 年 10 月 29 日付けで掲載されました。この成果によって、複数種ある第二世代 CAR-T 細胞からの治療法選択と、次世代 CAR-T 細胞のデザイン創出の研究基盤構築が期待されます。

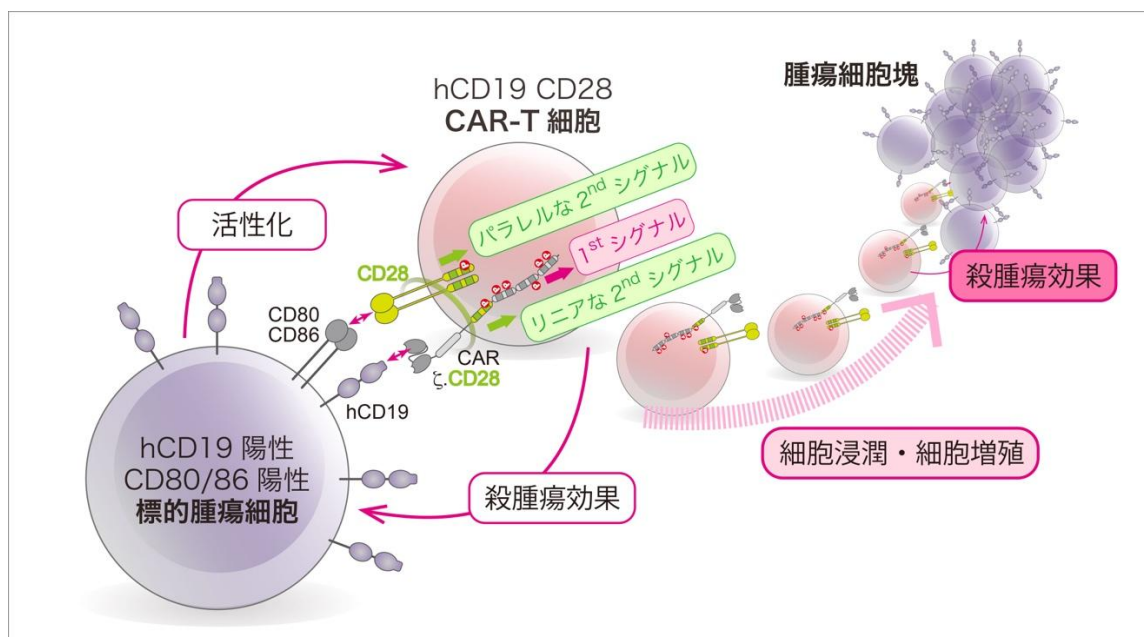


図 1 第二世代 CAR-T 細胞の殺腫瘍効果の分子メカニズム

【本研究のポイント】

- CAR-T 細胞はシグナルユニット「CAR マイクロクラスター」を形成し殺腫瘍効果を発揮することが示されました。
- 第二世代 CD28 ζ .CAR に組み込まれている CD28 は、マイクロクラスターを介して NF- κ B 経路という独自の活性化信号を増強しました。
- 第二世代 CD28 ζ .CAR の細胞表面にも CD28 が発現しており、CD28 マイクロクラスターを介してさらに NF- κ B 経路活性化信号が増強されました。
- CD28 によって活性化信号が増強したことで、第二世代 CD28 ζ .CAR-T 細胞がより腫瘍に浸潤し増殖を抑えることが、担癌マウスモデルを用いた実験から明らかになりました。

【研究の背景】

免疫チェックポイント阻害(immune checkpoint blockade : ICB)療法の登場により、これまでのがん治療の選択肢が劇的に広がりました。同時に、キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor : CAR)-T 細胞療法や二重特異性抗体療法など、他のがん免疫療法も飛躍的に進歩しています。免疫細胞の中でも、直接腫瘍細胞に接着して殺すことができるリンパ球:T 細胞は、どのがん免疫療法でも主役となっています。

CAR-T 細胞療法は、患者さんから採取したリンパ球を増幅して戻す「養子免疫療法」の進化形です。腫瘍抗原を認識する外側の抗体部分と、T 細胞の中に腫瘍の情報を伝える細胞内の部分との、コンバインした受容体 CAR を、患者さんから採取した T 細胞に遺伝子導入し、それを患者さんに戻します。(養子に出され)戻された CAR-T 細胞は、患者さんの体内で、腫瘍細胞を認識し、直接殺します。

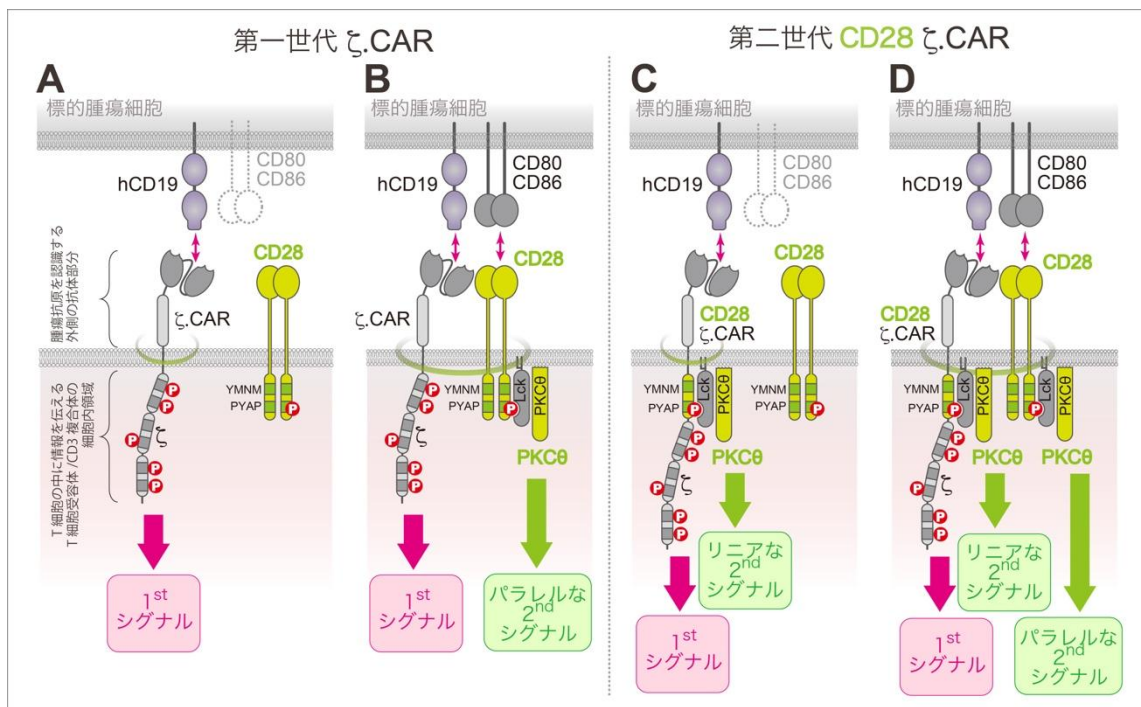


図2 第一世代および第二世代 CAR と CD28 を介したセカンドシグナル

最初に開発された CAR は第一世代と呼ばれ、細胞内に T 細胞受容体(T cell receptor : TCR) /CD3 複合体の細胞内領域(CD3 ζ 鎖)のみが使われました(図2 左)。しかし TCR/CD3 からのみの

信号(これを「1st シグナル」といいます)が単独で入ると、T 細胞は細胞死を起こしてしまいます。これを回避するため、CD28 や 4-1BB などの共刺激受容体を CD3ζ鎖に直列(リニア)に繋いだ CAR が開発され、第二世代の CAR として現在の治療法の大部分を占めています。共刺激受容体からの信号(「2nd シグナル」といいます)が、第二世代の CAR-T 細胞を細胞死から守り、より強力な殺腫瘍効果を誘導します(図2 右)。

現在、日本で承認されている CAR には、B 細胞性白血病/リンパ腫の抗原となる CD19 を標的としたチサゲンレクルユーセル(キムリア®)、リソカブタゲンマラルユーセル(ブレヤンジ®)、アキシカブタゲンシロルユーセル(イエスカルタ®)や、B 細胞成熟抗原(B-cell maturation antigen : BCMA)を標的としたシルタカブタゲンオートルユーセル(カービクティ®)、イデカブタゲンビクルユーセル(アベクマ®)があります。一方で、各種 CAR にも寛解後の再発の可能性や、固形腫瘍に対して有効性が限られるなど、課題も残されています。より優れた殺腫瘍効果を得るための工夫として、他の共刺激分子の選択も重要な要素であり、新たな CAR のデザインとして研究されています。

今回協同研究チームでは、CAR-T 細胞自身にも内在性の CD28 が発現していることに注目し、そこから発信される「パラレル(並列的)」な 2nd シグナルと、第二世代 CD28ζCAR から直接発信される「リニア(直列的)」な 2nd シグナルによって制御される CAR-T 細胞の殺腫瘍効果の違いを検討しました(図2)。

実験は、独自で開発した超解像顕微鏡システムを用い、CAR-T 細胞を 1 細胞ずつ 1 分子レベルで画像化ができるイメージング法で行いました。T 細胞は標的とする腫瘍細胞を見つけると接着し、「免疫シナプス」と呼ばれる細胞-細胞接着面を作ります。免疫シナプスには、腫瘍抗原を認識した TCR 数十個集まった「TCR マイクロクラスター」が 200~300 個形成され、腫瘍抗原の認識と腫瘍細胞の殺傷を行う活性化ユニットとして機能します。つまり TCR マイクロクラスターが T 細胞の機能を決定しているわけです。この微小な構造をより詳細に解析するため、協同研究チームでは、腫瘍細胞の細胞膜を模倣した支持脂質二重膜(Glass-supproted lipid bilayer : SLB)と 1 細胞 1 分子観察が可能な超解像顕微鏡を用いた高度な分子イメージング技術を用いました(Yokosuka *et al.*, *Nature Immunology*, 2005)(図3)。

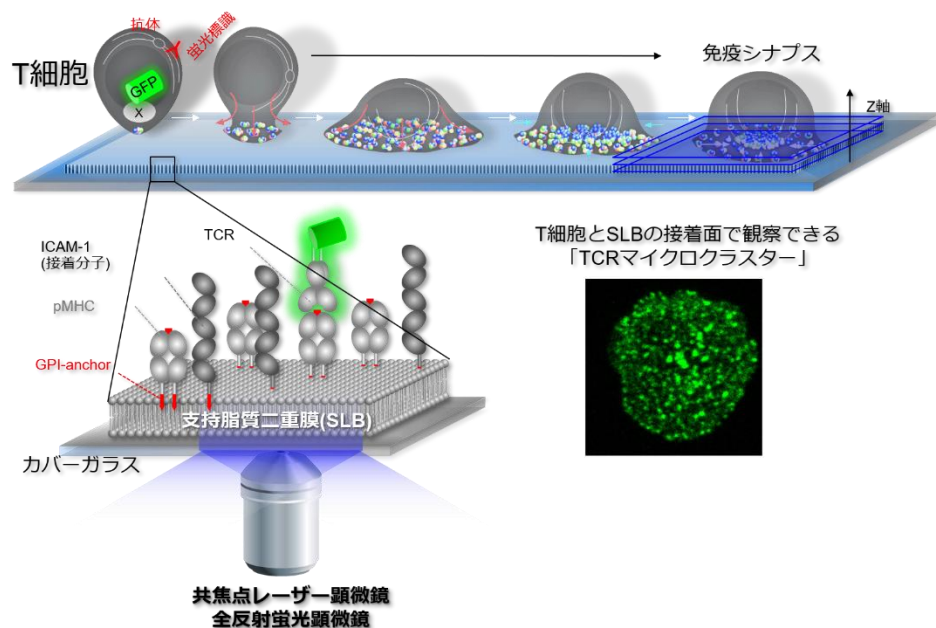


図3 支持脂質二重膜(SLB)と超解像顕微鏡を用いた分子イメージングシステム

共刺激受容体 CD28 は、腫瘍細胞や抗原提示細胞に発現しているリガンド CD80 および CD86 と結合し、T 細胞の増殖や生存に必須の 2nd シグナルを惹起し、免疫シナプスでは TCR と同様に凝集し CD28 マイクロクラスターとなります。さらに CD28 マイクロクラスターは TCR マイクロクラスターと重なることで、協力的に 2nd シグナルを伝えています。今回協同研究チームは、CAR-T 細胞が腫瘍抗原 ヒト(h)CD19 との結合を機に、CAR の凝集体「CAR マイクロクラスター」を形成すること、第二世代の CAR では CAR 内の CD28 を介して CD28-CAR マイクロクラスターから「リニア」な 2nd シグナルを発信すること、さらに CAR-T 細胞に発現している CD28 が腫瘍細胞上の CD80/CD86 と結合することで CD28 マイクロクラスターとなり「パラレル」な 2nd シグナルを発信することを明らかにしました。このような分子の動態は、1st 2nd シグナルの強弱や相互作用を評価することに繋がり、CAR-T 細胞の殺腫瘍効果の判定や次世代 CAR-T 細胞の創出に結びつくと考えます。

【本研究で得られた結果・知見】

まず、腫瘍抗原を認識できる T 細胞と腫瘍細胞を用いて、細胞-細胞接着面に集まるシグナル伝達分子を観察しました。CD28 下流の代表的なシグナル伝達系として、①グルコース受容体などでも重要な PI3K-Akt-mTOR 経路と、②がん化などに関わる活性化シグナル PKCθ-NF-κB 経路が知られています。CD28 を発現する T 細胞と CD80 を発現する腫瘍細胞を接着させると、それら細胞-細胞接着面には PI3K の触媒ユニット:p110δではなく(図4A 右)、NF-κB 経路の上流に位置する非典型プロテインキナーゼ PKCθが顕著に集積しました(図4A 左)。より詳細な分子の挙動を観察するため、SLB を腫瘍細胞の疑似膜として用い、T 細胞-SLB の接着面を観察すると、PKCθ(緑)は TCR(赤)-CD28(水色)マイクログラスターと重なることがわかりました(図4B 左)。接着後 20 分を経過しても、TCR と CD28 と PKCθは免疫シナプスの中心部に残り、この現象は 2nd シグナルとしての NF-κB 経路の「持続」を意味しています(Yokosuka *et al.*, *Immunity*, 2008)(図4B 右)。

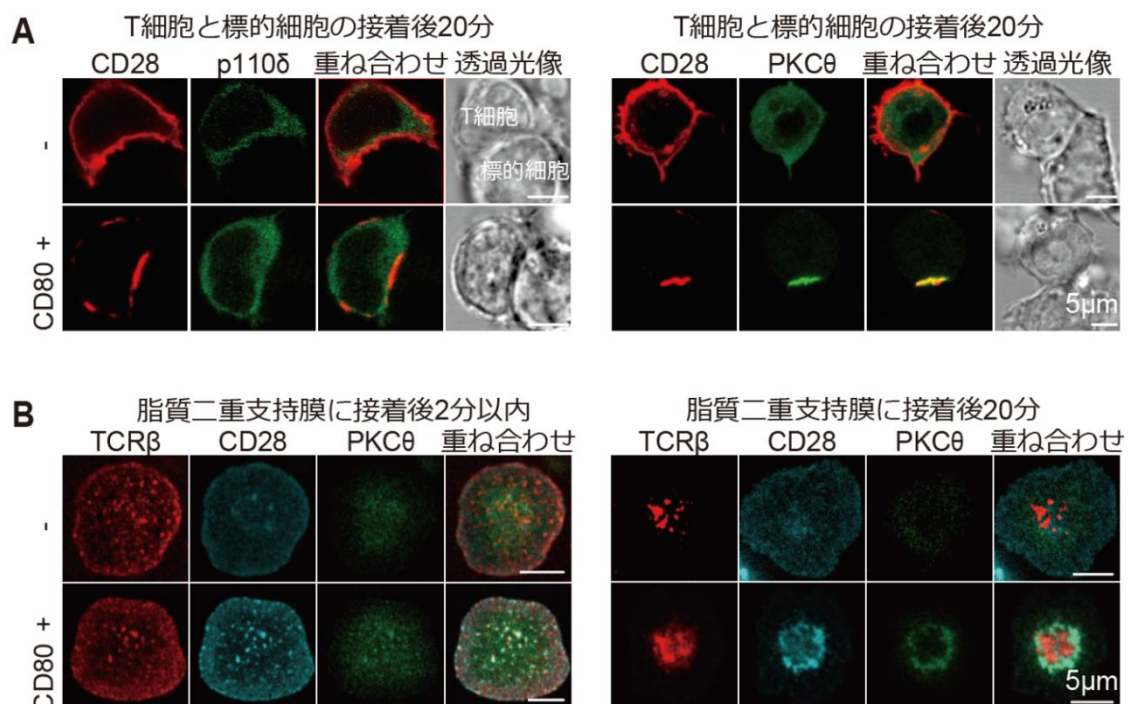


図4 CD28-CD80 結合により細胞-細胞接着面に集積する PKCθ

次に、B 細胞性腫瘍を標的とした、抗 hCD19 抗体の抗原結合部位に CD28 と CD3 ζ 鎖の細胞内領域を連結させた hCD19-CD28 ζ CAR を T 細胞に遺伝子導入し、hCD19 を発現させた SLB との接着面での CAR の挙動を観察しました。CAR は hCD19 との接着により、SLB との接着面上で CAR マイクロクラスターを形成しました(図5A)。hCD19-CD28 ζ CAR-T 細胞は、SLB との接着面を広げながら拡大し、その接着面にはhCD19-CD28 ζ CARの凝集塊「CAR マイクロクラスター」が次々に形成され、60 秒後に最大限に広がると CAR マイクロクラスターは求心性の移動を始め、免疫シナプスの中心部に集積しました(図5A)。さらに、細胞内領域に CD3 ζ 鎖のみを用いた第一世代の ζ CAR、そして第二世代の CAR でも CD28 の代わりに別の共刺激受容体 4-1BB を用いた 4-1BB ζ CAR でも、マイクロクラスターの形成と挙動は同等でしたが、PKC θ は CD28 ζ CAR のみに集まり、CD28 下流のシグナル伝達分子としての特異性が示されました(図5B,C)。この結果は、CAR から直接的な 2nd シグナル、つまり「リニア」な 2nd シグナルが伝わったことを示します(図2C)。

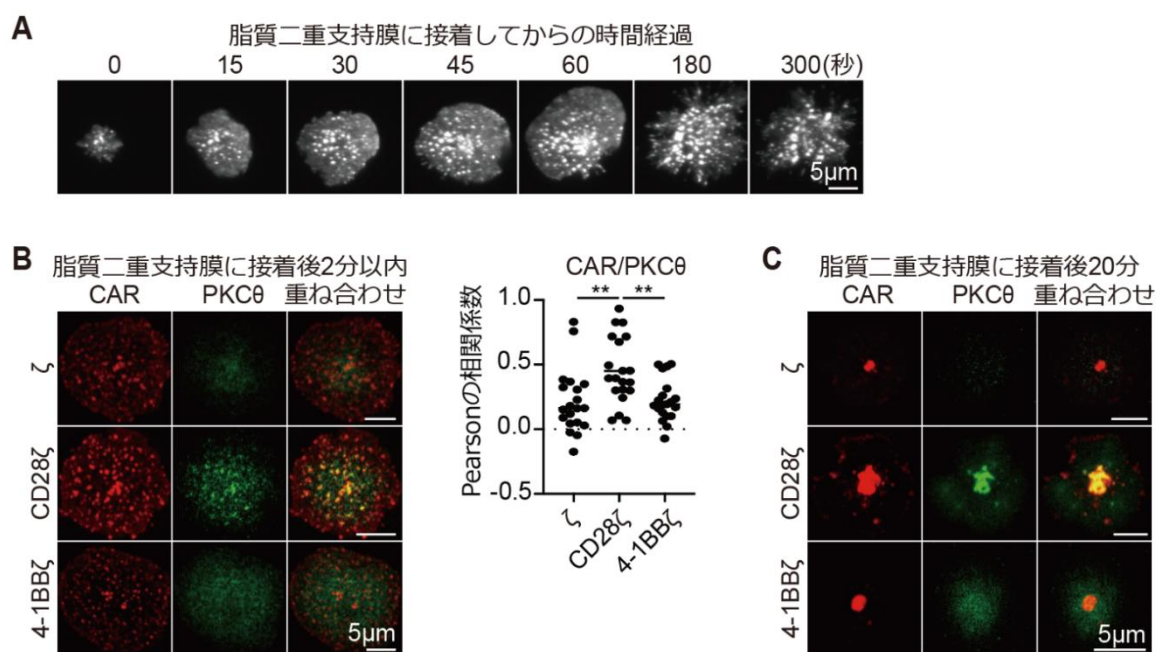


図5 hCD19-CD28 ζ CAR のマイクロクラスターと挙動を同じくする CD28 下流のキナーゼ PKC θ

次に、CAR-T 細胞に発現している T 細胞内在性の CD28 が、リガンドである CD80/CD86 と結合したときの「パラレル」な 2nd シグナルの動きを、CAR と並行して観察しました。SLB 上に CD80 が存在しない場合、hCD19 との結合による CAR(赤)のマイクロクラスターは可視化できますが、CD80 が存在すると CD28(緑)も凝集し、CAR マイクロクラスターと重なり黄色になります(図6)。この結果は、CAR の 1st シグナルと、CD28 の「リニア」な 2nd シグナルが融合していることを示唆しています。

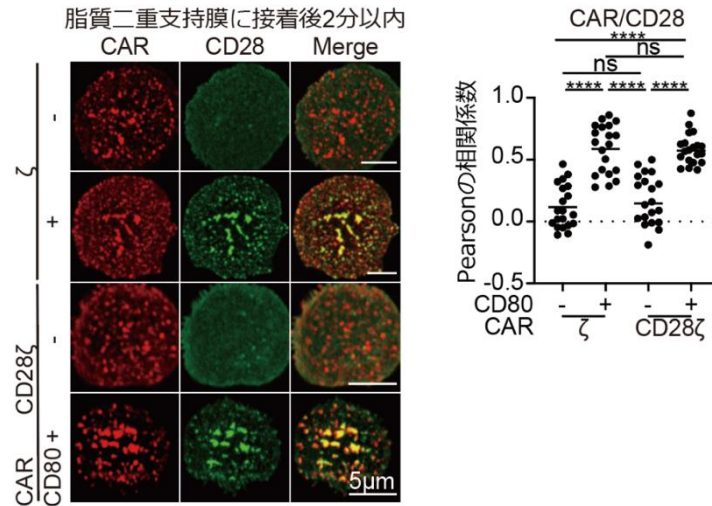


図6 CD28-CD80 結合によりクラスター化し CAR マイクロクラスターと重なる CD28

次に、CD28 下流で働く活性化分子 PKCθ(緑)を指標に、CAR(赤)および CD28 から 2ndシグナルが惹起されているかを検証しました。hCD19-ζ.CAR が腫瘍抗原 hCD19 との結合により形成されるクラスターには PKCθの信号は検出されませんが(図7A 上段)、SLB 上に CD80 があり CD28 がクラスター化する条件では(図6 2段目)、PKCθの信号が検出されています(図7A 2段目)。これは CAR-T 細胞にもともと発現している内在性の CD28 からの「平行」な 2ndシグナルと考えられます。一方、hCD19-CD28ζ.CAR マイクロクラスターには、CD28-CD80 結合がない条件下でも PKCθ

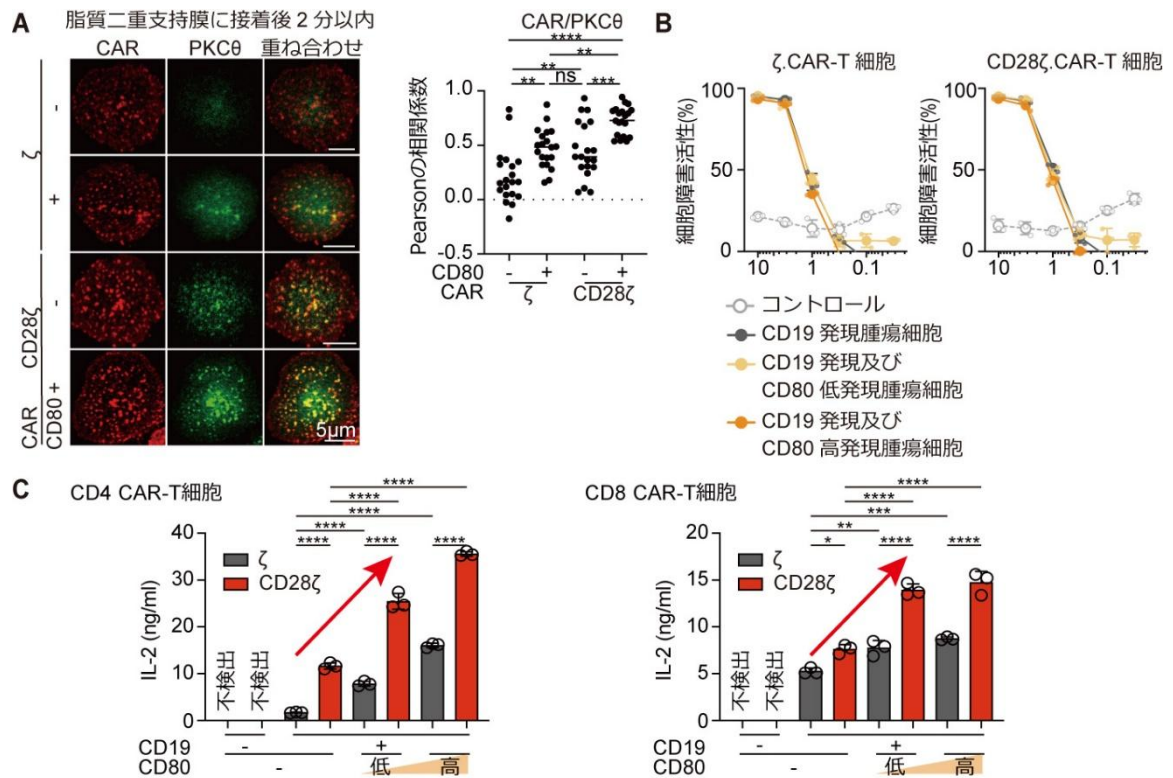


図7 リニアと平行の両方の 2nd シグナルを惹起する第二世代 CD28ζ.CAR

の信号が検出され(図7A 3段目)、CAR に組み込まれた CD28 からの「リニア」な 2nd シグナルが惹起されていること、さらに CD28-CD80 結合の存在下では、PKCθの信号は増強し(図7A 下段)、「リニア」+「パラレル」のダブルの 2nd シグナルとして増強することが観察されました(図7A グラフ)。これら 2nd シグナルが CAR-T 細胞の機能にどのように寄与するかを検証するため、まず、in vitro(試験管内)で hCD19 陽性細胞に対する殺腫瘍効果を調べましたが、ζ.CAR-T 細胞と CD28ζ.CAR-T 細胞、および hCD19 標的腫瘍細胞の CD80 発現の有無での違いはありませんでした(図7B)。つまり、hCD19-ζ.CAR-T 細胞も hCD19-CD28ζ.CAR-T 細胞も、1 つ 1 つの細胞の殺腫瘍効果は同じ、ということです。しかし、同じ条件下において、活性化の指標となるサイトカイン産生を測定すると、2nd シグナルの強弱とサイトカイン産生能とが相関することが分かりました(図7C)。

そこで協同研究チームは、in vivo(生体内)における長期的な腫瘍抑制に CD28 からの 2nd シグナルが重要性か、腫瘍移植マウスモデルを用いて検討しました。CAR-T 細胞を移入した後の腫瘍の体積は、CD80 を発現した腫瘍でより縮小し(図8A 黒○と●、赤○と●との比較)、また、CD28ζ.CAR-T 細胞移入群ではζ.CAR-T 細胞移入群よりも腫瘍体積が小さくなっていました(図8A 黒○と赤○との比較)。さらに CD80 が発現している腫瘍と CD28ζ.CAR-T 細胞移入との組み合わせは、より腫瘍の縮小が観察されました(図8A 赤●)。腫瘍組織切片の検鏡において、腫瘍に浸潤している CAR-T 細胞(緑)の数が、CD28ζ.CAR-T 細胞を移入した CD80 発現腫瘍で特に増加していました(図8B 右上段)。この結果は、2nd シグナルが増強されたことによる高い殺腫瘍効果は、腫瘍に浸潤した CAR-T 細胞に数に起因することを示唆し、臨床的に ICB 療法の予後良好例で、腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrated lymphocyte : TIL)が多くみられる知見と一致します。また、実臨床において、第二世代 CAR は第一世代に比べ複数の利点を持つことが、CAR に組み込まれた共刺激分子と、腫瘍に発現する共受容体リガンドの両方に寄与する分子メカニズムが、1 細胞 1 分子イメージング法を用いた解析から解明されたことになります。

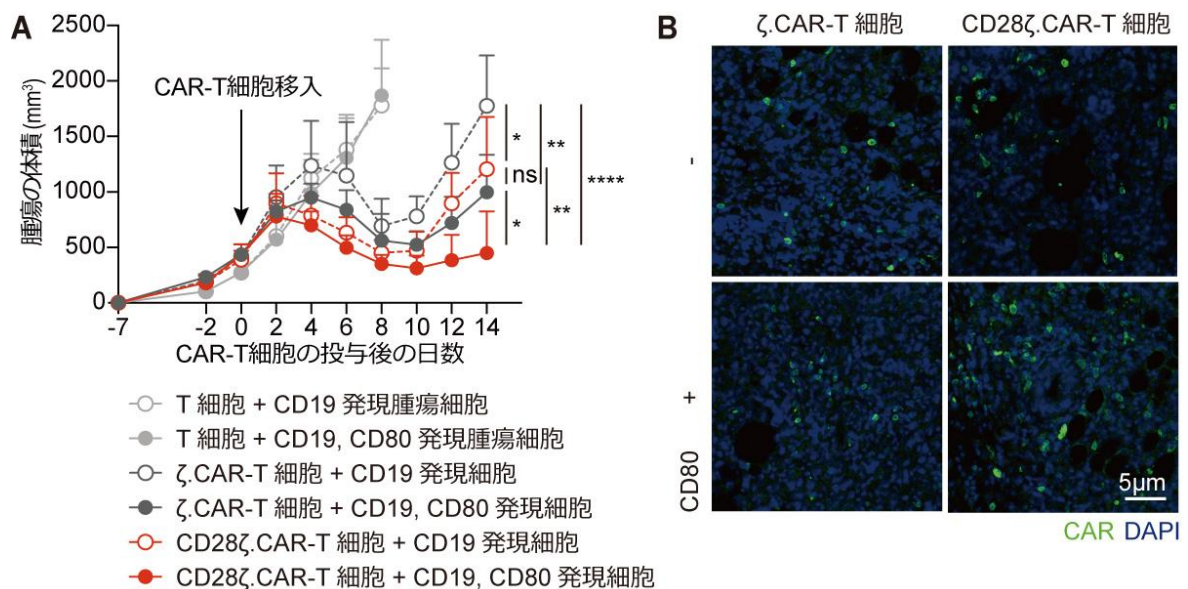


図8 担癌マウスモデルにおけるリニアとパラレルな 2nd シグナルによる協調的な腫瘍抑制

【今後の研究展開および波及効果】

分子イメージングの実験から、第二世代 CD28 ζ CAR の 2nd シグナルの本体が PKC θ -NF- κ B 経路の増強であることが分かりました。また、第一世代 ζ CAR でも、CAR-T 細胞上に発現する内在性 CD28 が CD28 ζ CAR と同等の 2nd シグナルを発信することが分かりました。この結果は、標的腫瘍細胞が CD80/CD86 陽性か陰性かによる CAR-T 細胞の殺腫瘍効果の違いを示唆し、適応患者の選択、予後予測、各種 CAR-T 細胞療法の選択など、さまざまな臨床での患者適応の多様性が想像されます。PKC θ -NF- κ B 経路の解析は生化学的な手法では難しく、分子イメージング法にアドバンテージがあります。また、CAR-T 細胞も、従来細胞傷害性 T 細胞が腫瘍を殺傷するときと同じように、免疫シナプスやマイクロクラスターを形成することが明らかになったことから、分子イメージングは CAR-T 細胞の活性化を客観的かつデジタルに評価する重要な手段となると考えられます。新規の共刺激受容体の導入や、第二世代 CAR の新規デザインを創造する機会において、また in vivo 投与実験前の機能評価など幅広い応用が期待できます。

【論文情報】

タイトル: CD28-mediated linear and parallel costimulatory signaling cooperatively regulate CAR-T cell functions via CAR-CD28 microclusters

著 者: Tetsushi Nishikawa, Arata Takeuchi*, Hiroaki Machiyama, Ei Wakamatsu, Hitoshi Nishijima, Masae Furuhashi, Hiroko Toyota, Wataru Nishi, Ryohei Matsushima, Yosuke Yoshida, Kazutoshi Harada, Tadashi Yokosuka* (*責任著者)

掲載誌名: Communications Biology

D O I : <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08906-y>

【用語の解説】

* 1: T 細胞共刺激受容体

T 細胞受容体(TCR)からの 1st シグナルが「自己は無視して非自己のみ排除する」という抗原特異性を決定するのに対して、1st シグナルの強度を増強させる T 細胞上の受容体の総称。共刺激受容体は複数あり、CD28 や ICOS などが知られ、それぞれ結合する相手方(リガンド)がある。CD28 には CD80 と CD86 の 2 つのリガンドがあり、結合することで CD28 特有の共刺激=2nd シグナルが惹起される。一方 1st シグナルを減弱する受容体群を共抑制受容体といい、PD-1 や CTLA-4 などの免疫チェックポイント分子が相当する。共抑制受容体もそれぞれにリガンドが存在し、結合することで 1st シグナルを減弱させたり、もしくは T 細胞応答を抑制したりする。

【主な競争的研究資金】

本研究は、文部科学省基盤研究(JP25113725, JP15H01194, JP16H06501, JP17H03600, JP19K22545, JP20H03536, JP23H02775, JP23H04790)、武田科学振興財団の支援を受けています。

○研究内容に関するお問い合わせ先

責任著者 横須賀忠(よこすかただし)

東京医科大学 免疫学分野 主任教授

TEL: 03-3351-6141(内線 284)

FAX: 03-3341-2941

E-mail: yokosuka@tokyo-med.ac.jp

研究室 HP: <https://tokyo-med-imm.jimdofree.com/>

○取材に関するお問い合わせ先

学校法人東京医科大学 企画部 広報・社会連携推進室

TEL: 03-3351-6141 (代表)

E-mail: d-koho@tokyo-med.ac.jp