

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04230

研究課題名(和文)横紋筋肉腫に対するエクソソームデリバリーシステムを用いた新規細胞遺伝子治療の開発

研究課題名(英文)A novel cell and gene therapy for human rhabdomyosarcoma using exosome delivery system

研究代表者

細井 創 (Hosoi, Hajime)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20238744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト間葉系幹細胞(MSC)にレンチウイルスベクターでPAX3-FOXO1発現を抑制するshRNA(shPF)を遺伝子導入し、shPF内包exosome発現MSCを作成した。横紋筋肉腫肺転移マウスモデルを作成し、マウス尾静脈より、shPF-MSCを投与したところ抗腫瘍効果を示した。小児悪性軟部肉腫に高発現するEPHB4受容体に対して、EPHB4を特異的に認識し、殺傷することができるキメラ抗原受容体T細胞(EPHB4-CAR-T細胞)を開発した。EPHB4-CAR-T細胞はPF発現に関わらず胞巣型横紋筋肉腫担がんマウスの腫瘍増殖を強力に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児悪性軟部腫瘍に対する複合的な遺伝子細胞治療の開発が急務である。我々は、PAX3-FOXO1融合遺伝子を発現する予後不良な胞巣型横紋筋肉腫に対して、PAX3FOXO1遺伝子発現調整が可能なエクソソームを分泌する間葉系幹細胞、さらには、横紋筋肉腫細胞に高発現するEPHB4受容体を標的とするCAR-T細胞を開発した。将来的には本研究成果を臨床応用するために、非臨床試験を実施していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We have developed mesenchymal stromal cells which were genetically engineered to express shRNA that could reduce the expression of PAX3-FOXO1 fusion gene(shPF-MSC). We infused the shPF-MSC into rhabdomyosarcoma (RMS) bearing immunodeficient mice via tail vein, and confirmed antitumor efficacy of these cells. We also developed chimeric antigen receptor T cells that redirected to EPHB4 molecules in RMS. The CAR-T cells exhibited a dominant stem cell memory fraction and low PD-1 expression after the 14 days expansion. The CAR-T cells presented strong and sustained inhibitory activity against the RMS cells even in multiple tumor challenges. Furthermore, in the in vivo experiment, The CAR-T cells also suppressed tumor growth in RMS xenograft-bearing mice. A nonclinical safety study on PB-EPHB4 CAR-T cell therapy targeting the EPHB4 positive tumors is underway, aiming future clinical trials in Japan.

研究分野：横紋筋肉腫

キーワード：CAR-T細胞 横紋筋肉腫 免疫疲弊 ヒギーバックトランスポゾン 融合遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児期、青年期(AYA 世代)に好発する、PAX3-FOXO1 融合がん遺伝子を発現する胞巣型横紋筋肉腫(aRMS)は、極めて予後不良な高悪性度がんであり、従来の抗がん剤や手術、放射線療法に替わる新規治療法の開発が渴望されている。我々は、平成 22 年科研費基盤研究(B)で、aRMS の PAX3-FOXO1 融合がん遺伝子発現を抑制し、造腫瘍性、細胞増殖、転移を抑制できる shRNA(shPF)を開発した。核酸医薬は生体内では非常に不安定であり、shPF を治療薬として臨床応用するためには、shPF を腫瘍組織内に安定した状態で輸送する必要がある。我々は、平成 24 年科研費挑戦的萌芽研究で、shPF をヒト線維芽細胞に遺伝子導入すると、線維芽細胞が shPF を内包する exosome(shPF-exosome)を分泌し、PAX3-FOXO1 融合がん遺伝子発現を抑制することを発見し、exosome が核酸医薬の輸送因子になる可能性を見出した。そこで、exosome が血液中でも分解を受けずに安定しており、RMS 細胞にも取り込まれることに注目し、1) shPF-exosome は aRMS の細胞遺伝子治療製剤として応用できると考えた。

さらに我々は、aRMS 細胞を特異的に認識し、殺細胞効果を有する人工キメラ抗原受容体 T 細胞(CAR-T 細胞)を開発し、T 細胞と抗原提示細胞は免疫学的シナプスを介して exosome を伝達することを応用して、3) CAR-T 細胞が shPF-exosome を分泌するように遺伝子改変することで効率よく exosome を腫瘍組織にデリバリーできると着想した。

### 2. 研究の目的

本研究は、我々のこれまでの JSPS 科学研究をさらに発展させ、難治性・高悪性度がんの一つである融合がん遺伝子陽性 aRMS をモデルに、がん細胞の増殖を阻止する核酸医薬搭載型 exosome とこの exosome を分泌する細胞製剤を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 抗腫瘍核酸を搭載した exosome(shPF-exosome)の作成と抗腫瘍効果の評価

shPF を遺伝子導入したヒト線維芽細胞から exosome を抽出し(shPF-exosome)、exosome 内の shPF 含有量を評価する。shPF を担癌マウスに投与し、抗腫瘍効果を評価する。

#### 1) shPF-exosome をデリバリーする間葉系幹細胞(MSC)の作成と抗腫瘍効果の評価

shPF を遺伝子導入した MSC を担癌マウスに経尾静脈的投与し、MSC が腫瘍組織に集積し、shPF-exosome を放出することで抗腫瘍効果を発揮するか評価する。

#### 2) shPF-exosome をデリバリーする aRMS 特異的人工キメラ抗原受容体 T 細胞(CAR-T 細胞)の作成と抗腫瘍効果の評価

shPF を遺伝子導入した aRMS 特異的 CAR-T 細胞を担癌マウスに経尾静脈的投与し、CAR-T が腫瘍組織に集積し、shPF-exosome を放出するかをみることで抗腫瘍効果を評価する。

### 4. 研究成果

ヒト線維芽細胞にレンチウイルスベクターで shPF を遺伝子導入し、shPF 安定発現細胞株を作成した。培養上清より、exosome を回収することで、shPF 内包 exosome を作成した。shPF-exosome をヒト横紋筋肉腫細胞株 Rh30 に添加することで、Rh30 で高発現する PAX3-FOXO1 遺伝子発現が抑制されることを証明した。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に shPF を遺伝子導入し、shPF 安定発現細胞株を作成した。培養上清より、exosome を回収し、この exosome が 1 と同様に Rh30 細胞の PAX3-FOXO1 遺伝子発現を抑制することを確認し、作成した MSC が shPF を内包する exosome を安定分泌していることを確認した。Rh30 細胞を免疫不全マウスの尾静脈から投与することで、横紋筋肉腫肺転移マウスモデルを作成した。マウス尾静脈より、shPF-MSC を投与し、経時的に腫瘍サイズを観察することで、shPF-MSC の抗腫瘍効果を評価したところ、腫瘍の縮小が観察された。

小児悪性軟部肉腫に高発現する EPHB4 受容体に対して、EPHB4 を特異的に認識し、殺傷することができるキメラ抗原受容体 T 細胞(EPHB4-CAR-T 細胞)を開発した。 EPHB4-CAR-T 細胞を最適化するために、適切なスパーサー、共刺激因子の検討を行った。その結果、非ウイルス遺伝子改変法 で EPHB4-CAR-T 細胞を作製した場合には良好な細胞増殖と抗腫瘍効果を得た。また、EPHB4-CAR-T 細胞作製の際の培養方法について最適化した。我々の検討により、自己末梢血単核球由来の遺伝子改変フィーダー細胞を用いることで、およそ 14 日間で、ドナー特性によらず、良好な CAR 発現率(60% 以上)、細胞増殖率(5 倍以上)を得ることができた。さらに、本培養法で CAR-T 細胞を作成した場合、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果と相関するナイーブ/ステムセルメモリー型 T 細胞分画優位になることが明らかとなった。胞巣型横紋筋肉腫に高発現し、悪性度や免疫逃避に関わる、PAX3-FOXO1 遺伝子(PF) を特異的に発現抑制する siRNA(siPF)で PF 陽性横紋筋肉腫を処理したところ、PF の発現が強力に抑制されることを確認した。また、siPF で処理した横紋筋肉腫細胞と未処理の横紋筋肉腫細胞を IFN $\gamma$  で刺激したところ、未処理の横紋筋肉腫では PD-L1 が誘導されたにもかかわらず、siPF で処理した横紋筋肉腫では PD-L1 の誘導が抑制された。一方で、siPF で処理した横紋筋肉腫細胞と未処理の横紋筋肉腫細胞を EPHB4-CAR-T 細胞とともに共培養したところ、いずれの横紋筋肉腫細胞にも強力な抗腫瘍効果を示した。また、このときの IFN $\gamma$  放出を測定したところ、いずれの共培養上清からも、高濃度の IFN $\gamma$  が認められたことから、CAR-T 細胞は、PF の発現に関わらず強力な抗腫瘍効果を示すと考えられた。担がんマウスを用いた検討でも、EPHB4-CAR-T 細胞は胞巣型横紋筋肉腫担がんマウスの腫瘍増殖を強力に抑制した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nakagawa N, Kikuchi K, Yagyu S, Miyachi M, Iehara T, Tajiri T, Sakai T, Hosoi H.                        | 4. 巻<br>512           |
| 2. 論文標題<br>Mutations in the RAS pathway as potential precision medicine targets in treatment of rhabdomyosarcoma. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochem Biophys Res Commun.   | 6. 最初と最後の頁<br>524-530 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2019.03.038   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Nitta Y, Miyachi M, Tomida A, Sugimoto Y, Nakagawa N, Yoshida H, Ouchi K, Tsuchiya K, Iehara T, Konishi E, Umeda K, Okamoto T, Hosoi H. | 4. 巻<br>512         |
| 2. 論文標題<br>Identification of a novel BOC-PLAG1 fusion gene in a case of lipoblastoma.   | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Biochem Biophys Res Commun.   | 6. 最初と最後の頁<br>49-52 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2019.02.154.  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tomoyasu C, Kikuchi K, Kaneda D, Yagyu S, Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Sakai T, Hosoi H.                     | 4. 巻<br>41            |
| 2. 論文標題<br>OBP-801, a novel histone deacetylase inhibitor, induces M phase arrest and apoptosis in rhabdomyosarcoma cells. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Oncol Rep.   | 6. 最初と最後の頁<br>643-649 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3892/or.2019.6997.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yagyu S, Morita D, Tanaka M, Kikuchi K, Iehara T, Nakazawa Y, Hosoi H                               |
| 2. 発表標題<br>Development of chimeric antigen receptor T cell therapy for human rhabdomyosarcoma.                 |
| 3. 学会等名<br>The 2nd International Cancer Research Symposium of Training Plan for Oncology Professionals. (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>細井 創                                |
| 2. 発表標題<br>日本横紋筋肉腫研究グループ第1期臨床試験の結果と第2期臨床試験の戦略. |
| 3. 学会等名<br>第60回日本小児血液・がん学会学術集会                 |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>Kikuchi K, Hosoi H  |
| 2. 発表標題<br>横紋筋肉腫に対する新たな治療戦略    |
| 3. 学会等名<br>第60回日本小児血液・がん学会学術集会 |
| 4. 発表年<br>2018年                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nakagawa N, Kikuchi K, Yagyu S, Iehara T, Sakai T, Hosoi H. |
| 2. 発表標題<br>横紋筋肉腫に対する新規 RAF/MEK デュアル阻害剤の検討                              |
| 3. 学会等名<br>第60回日本小児血液・がん学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>細井 創                    |
| 2. 発表標題<br>横紋筋肉腫の標準的治療とわが国の臨床研究の現況 |
| 3. 学会等名<br>第2回日本サルコーマ治療研究会学術集会     |
| 4. 発表年<br>2019年                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>菊地 顕, 友安千紘, 中村加世子, 柳生茂希, 宮地 充, 勝見良樹, 土屋邦彦, 家原知子, 酒井敏行, 細井 創 |
| 2. 発表標題<br>横紋筋肉腫における新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤OBP-801の抗腫瘍効果.                    |
| 3. 学会等名<br>第121回日本小児科学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>安田 誠, 吳本年弘, 村上賢太郎, 乾 隆昭, 大江絵里, 宮地 充, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創, 平野 滋. |
| 2. 発表標題<br>成人鼻副鼻腔横紋筋肉腫4症例の治療経験.   |
| 3. 学会等名<br>第57回日本鼻科学会総会・学術講演会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Tanaka M, Nakazawa Y.  |
| 2. 発表標題<br>Function, phenotype, and tonic signaling of GD2-CART cells using piggyBac transposon gene transfer. |
| 3. 学会等名<br>5th piggybac CART meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakamura K, Yagyu S, Morita D, Kikuchi K, Iehara T, Hosoi H, Nakazawa Y.                         |
| 2. 発表標題<br>Chimeric Antigen Receptor T cells redirecting EPHB4 for the Treatment of Human Rhabdomyosarcoma. |
| 3. 学会等名<br>第2回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>柳生茂希, 中村加世子.                      |
| 2. 発表標題<br>CAR-T細胞療法と免疫逃避 - GD2-CAR-T細胞での検討- |
| 3. 学会等名<br>第5回信州CARTミーティング                   |
| 4. 発表年<br>2017年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Kikuchi K, Iehara T, Hosoi H, Nakazawa Y.                         |
| 2. 発表標題<br>Chimeric Antigen Receptor T cells redirecting EPHB4 for the Treatment of Human Rhabdomyosarcoma. |
| 3. 学会等名<br>第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Kikuchi K, Iehara T, Hosoi H, Nakazawa Y.                         |
| 2. 発表標題<br>Chimeric Antigen Receptor T cells redirecting EPHB4 for the Treatment of Human Rhabdomyosarcoma. |
| 3. 学会等名<br>第59回日本小児血液がん学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                            | 備考 |
|-----------|--|--|----|
| 研究<br>分担者 | 柳生 茂希<br><br>(Yagyu Shigeki)<br><br>(10572547) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教<br><br><br><br>(24303) |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 家原 知子<br>(Iehara Tomoko)<br>(20285266)  | 京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授<br><br>(24303)  |    |
| 研究分担者 | 菊地 顕<br>(Kikuchi Ken)<br>(40453104)     | 京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教<br><br>(24303) |    |
| 研究分担者 | 宮地 充<br>(Miyachi Mitsuru)<br>(40584983) | 京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教<br><br>(24303)   |    |