

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02347

研究課題名(和文) 犬悪性メラノーマの根絶を目指した新たな遺伝子組換え免疫細胞療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel CAR-T therapy for canine melanoma

研究代表者

水野 拓也 (Mizuno, Takuya)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90398826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬の口腔内メラノーマは悪性度の高い腫瘍であり、有効な全身療法が確立されていない。本研究の目的はこの口腔内メラノーマに対して有効な免疫細胞療法(CAR-T細胞療法)を確立すること、また犬のCAR-T細胞療法として効率や効果などの細かな条件検討を行うことで、犬のCAR-T細胞療法の基盤的技術を確立することであった。

口腔内メラノーマ特異的CAR-Tの作製については残念ながら得られた遺伝子発現プロファイルからよいものを作ることができなかったが、犬のCAR-T細胞を作製する上での条件検討は十分にでき、その有効性をマウスにおいて証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、犬の悪性腫瘍に対する免疫細胞療法としてCAR-T細胞を用いる上での基礎となる情報として非常に重要である。犬のCAR-T細胞療法は、まだ未開拓分野であり、世界的にも着手しているグループは少ない。今回得られた情報をもとにさらに改良をすることにより、犬の悪性腫瘍に対するCAR-T細胞療法が臨床の現場で使用できるようになり、新たな治療オプションとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Canine oral melanoma is a highly malignant tumor for which no effective systemic therapy has been established. The purpose of this study was to establish an effective immune cell therapy (CAR-T cell therapy) for oral melanoma and to establish a basic technology for CAR-T cell therapy in dogs by examining detailed conditions such as efficiency and effectiveness of CAR-T cell therapy in dogs.

Unfortunately, we were not able to produce a good CAR-T specific for oral melanoma based on the gene expression profile we obtained, but we were able to examine the conditions for the production of canine CAR-T cells and prove their efficacy in mice.

研究分野：獣医内科学

キーワード：犬 がん CAR-T 免疫細胞療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

人の悪性腫瘍の治療として古くから行われている免疫細胞療法のなかで、1980年代に実施されていた活性化リンパ球療法や LAK 療法は十分な効果が認められなかった。1990年代から2000年にかけて実施された腫瘍浸潤リンパ球療法は、外科手術により切除した腫瘍組織に浸潤する細胞傷害性リンパ球を増殖して用いるため著しい効果を認めたが、腫瘍組織から患者ごとに腫瘍に浸潤するリンパ球を分離し、腫瘍特異性もつもののみを増殖、選別する必要があったため、現実的に実施するのが煩雑であることが問題であった。最近になって最も注目されているキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞) 療法は、患者の末梢血液から採取した通常のリンパ球に、キメラ抗原受容体遺伝子 (腫瘍に対して特異的に作用する抗体の可変領域由来遺伝子とリンパ球の増殖および活性化能を付与する遺伝子コンストラクト) を導入することで作製した遺伝子組換え細胞を用いて行う免疫細胞療法である。患者ごとに末梢血リンパ球を用いて CAR-T 細胞を作製する必要はあるものの、血液系腫瘍に対するその目覚ましい効果 (難治性白血病の治療率 90%以上) のため現在世界中で 150 以上の臨床試験が実施されている上、2017 年 8 月には FDA によって人の白血病に対して初めてその治療法が認可された。一方、固形腫瘍に対しては、それら投与した細胞がうまく遊走しないなどの問題点もあり、十分な効果が得られていない。

一方、犬の悪性腫瘍の治療において、CAR-T 細胞療法は未だ確立されていない。さらに悪性メラノーマのような悪性度が高い難治性腫瘍に対して本治療法を用いることができれば大幅な予後の改善につながることを期待される。

2. 研究の目的

犬の CAR-T 細胞療法に本格的に着手しているのは、申請者の知る限り、ペンシルバニア大学、テキサス A&M 大学と申請者のみである。しかし細かな条件の検討、真に有用な犬の CAR-T 細胞の検討については実施されていない。したがって本研究の目的は、犬の CAR-T 細胞の作製方法を詳細に検討し確立すること、犬の悪性メラノーマに対して有効な CAR-T 細胞療法を確立することである。

3. 研究の方法

症例由来腫瘍組織 山口大学動物医療センターに来院した口腔内メラノーマの症例犬より検査および手術目的で採取された腫瘍組織の一部を飼い主の同意のもと保存し、症例由来腫瘍組織として用いた。

RNA seq 上記腫瘍組織より常法に基づき RNA を採取し、TAKARA において次世代シーケンサーにより RNAseq 解析を行った。

細胞株および末梢血単核球 犬のメラノーマ腫瘍細胞株としては中川貴之博士、Jamie Modiano 博士より分与いただき、10%FBS 加 RPMI160 培地で培養した。末梢血単核球については、供血目的で飼育している健常ビーグルより全血を採取後、常法により Lymphoprep を用いて末梢血単核球 (PBMC) を分離した。

フローサイトメトリー Sakai et al. (Vet Comp Oncol. 2020) に記載の方法によって実施した。

免疫染色 Sakai et al. (Vet Comp Oncol. 2020) に記載の方法によって実施した。

CAR-T 細胞の作製 Sakai et al. (Vet Comp Oncol. 2020) に記載の方法によって実施した。

腫瘍移植マウスモデル Hwang et al. (Vet Comp Oncol. 2016) に記載の方法をもとに改変実施した。

4. 研究成果

(1) 犬口腔内メラノーマの RNA seq 解析 犬口腔内メラノーマにおいて腫瘍を攻撃するために浸潤している細胞傷害性リンパ球の浸潤・遊走に関与する分子を同定するために、症例より採取した腫瘍組織を用いて RNAseq を実施した (図 1)。その結果、いくつかのケモカインやサイトカインを含め、腫瘍浸潤リンパ球の浸潤・遊走に関与する可能性のある分子が同定できた (未発表データであるためここでは細かなデータを示さない)。これらの分子について、実際のメラノーマ症例由来腫瘍組織を用いた RT-PCR によりそれらの発現を検討したところ、共通して同定できる浸潤・遊走に関連する分子を同定することができなかった。このことは今回用いている症例について、犬種や病理組織像などがすべてに共通しているわけではないことから、症例におけるばらつきによるものである可能性が示唆された。これはさらに多くの症例を追加することで、同定できる可能性がある。

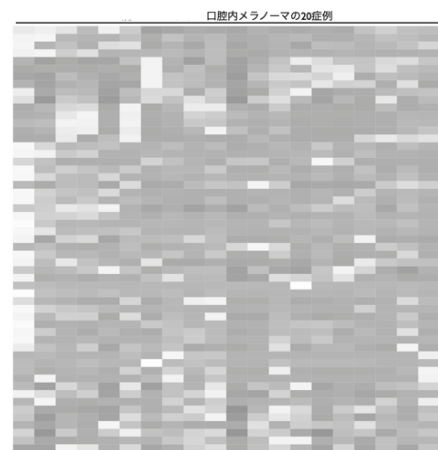


図 1 口腔内メラノーマ 20 例を用いた RNA seq 解析によるケモカインやサイトカイン遺伝子の発現検討

(2) 犬メラノーマ特異的抗体の解析 以前に我々が独自に単離した犬メラノーマ細胞株に特異的な 5 種類の抗体について、それらの犬メラノーマに対する特異性について検討を行った。まずすべての抗体が 10 種類の犬メラノーマ細胞株に対して反応性を示した (図 2)。また犬メラノーマ由来腫瘍組織に対する反応性については、抗体 A, C, E については多くの症例で反応性を示した (図 3, 表)。そのなかから 3 種類について犬の末梢血単核球および正常組織に対する反応性を検討したところ、正常組織に対する反応性は認められなかったが、PBMC に対してはすべての抗体が反応してしまった (data not shown)。本来ここで同定された抗体を CAR-T の V 領域コンストラクトとして用いる予定であっ

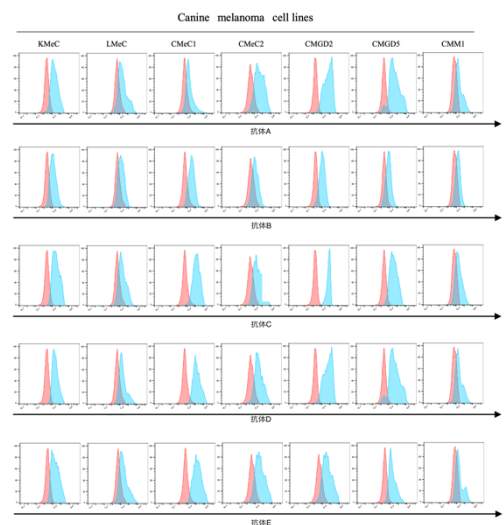


図 2 口腔内メラノーマ細胞株を用いたメラノーマ特異的モノクローナル抗体による反応性の検討 (7 細胞株の結果のみを示す)

たが、これら抗体の PBMC への反応性が明らかになったため、CAR-T として用いるには、副作用が懸念され、そのためにこれら抗体を用いたメラノーマの治療という点では断念せざるを得なくなった。

Canine tumor specimens	No. of positive samples/total samples				
	抗体A	抗体B	抗体C	抗体D	抗体E
Malignant melanoma	6/8	0/6	5/8	1/6	6/8

(3) 犬 CAR-T 細胞の作成および *in vitro* での解析

(1)-(2)における結果より、当初予定していた犬メラノーマに対する CAR-T 細胞としての特異性が十分ではないことが明らかとなった。したがって犬メラノーマに対する CAR-T 細胞としての計画を変更せざるを得なくなった。しかしより効果的な犬 CAR-T 細胞を作製するための培養条件などの検討は犬においてこれまで十分に実施されておらず、犬においてより良質な CAR-T 細胞を作製するための条件を検討することは、本プロジェクトのもう一つの目的であるため、我々がこれまでに解析をすすめていた犬 CD20 分子に対する抗体を用い、CD20 分子を CAR-T の作製のためのモデル抗原として用い、その作製方法についての詳細な検討を行った。

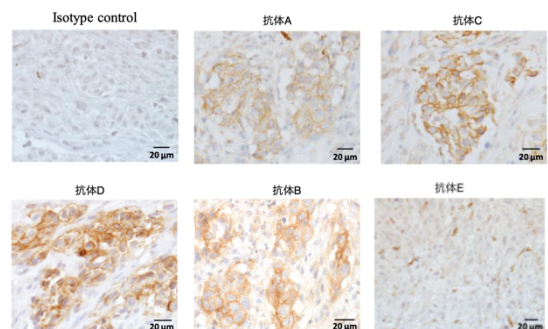


図 3 口腔内メラノーマ症例由来組織を用いたメラノーマ特異的モノクローナル抗体による反応性の検討 (1 症例の例、まともは表)

まず犬の CAR-T を作製するための遺伝子導入効率を最大化するための PBMC の刺激方法につい

て検討を行った。また同時に得られた CAR-T 細胞のメモリー細胞表現型の解析、疲弊化マーカーの解析も行った。第 2 世代および第 3 世代 CAR-T の比較、刺激として、PHA, PHA と人工抗原提示細胞を用いたもの、抗 CD3 抗体もしくは抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用いた刺激、PHA に IL-15 または IL-21 を加えた培養条件などの検討を行った。これら様々な条件の組み合わせで検討を行ったが（一部を図 4 に示す）、第 2 世代および第 3 世代は大きくかわらず、結果的に PHA 刺激のみによる培養が一番よい CAR-T が作製できることが明らかとなった。また、同時に行った CD20 陽性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性および上清に産生された IFN γ の測定については、CD3 刺激の方がより強い傾向にあったが PHA 刺激でも十分強い活性が得られた（図 5）。また CAR-T 細胞作製の際の細胞の増殖も重要な要素であるが、刺激による差よりも用いたドナー犬による差のほうが大きいことがわかった（図 6）。このことより得られた CAR-T 細胞の培養条件により、犬の悪性腫瘍の治療に使用可能な CAR-T 細胞が作製できたと考えられた。

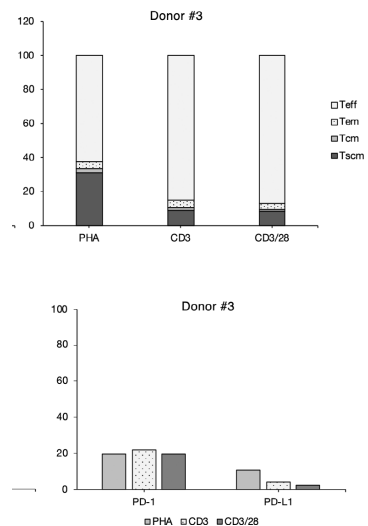


図 4 培養条件による CAR-T 細胞のメモリー細胞表現型の解析および疲弊化マーカーの解析 (犬 3 の結果を示す)

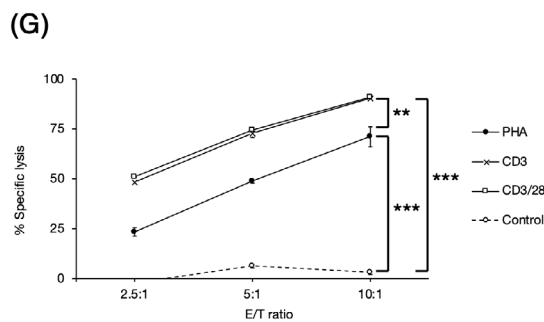


図 5 CAR-T による犬 CD20 陽性腫瘍細胞の細胞傷害活性の検討

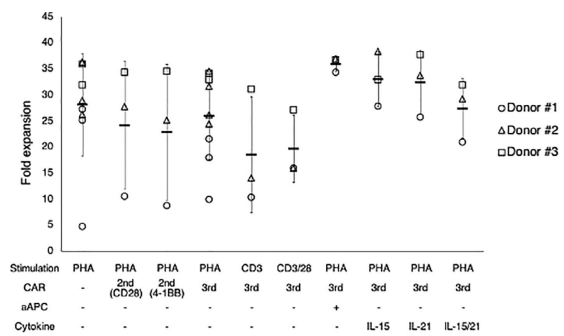


図 6 CAR-T 作製過程における増殖率の比較

(4) 腫瘍移植マウスを用いた CAR-T 細胞の効果の解析 次に CAR-T 細胞が実際に腫瘍移植マウスにおいても *in vitro* と同様に機能するかについて検討を行った。まず犬の CAR-T 細胞の効果確認のための腫瘍移植マウスモデルが確立されていなかったため、条件検討などを行った。CAR-T 細胞を投与後に投与個体で十分に CAR-T 細胞の増殖を得るためには、骨髄抑制を誘導することが必要である。そのため NOD/SCID マウスに対してシクロフォスファミドを投与し、一定期間経過後、犬リンパ腫腫瘍細胞株 CLBL-1 を移植し、腫瘍が 200mm³ になった時点で 1x10⁷ 個の CAR-T 細胞を 3 日ごとに静脈注射し、その後の腫瘍の増殖を検討した。結果については、未発表データであるので図は示さないが、コントロールとして活性化リンパ球を投与したマウスでは腫瘍の増殖は継続したのに対し、CAR-T 細胞を投与した群では腫瘍の増殖が抑えられた。このように(3)において条件検討を行った上で作製した CAR-T 細胞は腫瘍移植マウスにおいても十分効果を発揮するものであることが明らかとなった。

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 Sakai O, Igase M, Mizuno T	4. 巻 18
2. 論文標題 Optimization of canine CD20 chimeric antigen receptor T cell manufacturing and in vitro cytotoxic activity against B cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vet Comp Oncol.	6. 最初と最後の頁 739-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/vco.12602	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Mizuno T, Kato Y, Kaneko MK, Sakai Y, Shiga T, Kato M, Tsukui T, Takemoto H, Tokimasa A, Baba K, Nemoto Y, Sakai O, Igase M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of a canine anti-canine CD20 antibody for canine lymphoma treatment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68470-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sakai O, Ii T, Uchida K, Igase M, Mizuno T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment and Characterization of Monoclonal Antibody Against Canine CD8 Alpha.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother Monoclon Antib Immunodiagn Immunother	6. 最初と最後の頁 129-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2020.0002.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sakai O, Inase M, Mizuno T
2. 発表標題 Establishment of monoclonal antibody against canine CD20 chimeric antigen receptor T cells
3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialties（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai O, Nemoto Y, Mizuno T.
2. 発表標題 Generation of canine CD20 chimeric antigen receptor T cells and in vitro evaluation of cytotoxic effect on canine B cell lymphoma
3. 学会等名 Veterinary Cancer Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上美須珠、福島健太、根本有希、水野拓也
2. 発表標題 犬の悪性黒色腫細胞に対する新規モノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井治、根本有希、水野拓也
2. 発表標題 犬のB細胞性リンパ腫に対するCD20をターゲットとするCAR-T細胞の作成
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	野口 俊助 (Noguchi Shunsuke) (10701295)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今村 拓也 (Imamura Takuya) (90390682)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関