

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02915

研究課題名(和文) EGFRvIII特異的CAR発現iPS由来NK細胞を用いた膠芽腫治療の基盤的研究

研究課題名(英文) Basic study of CAR-NK cell therapy derived from iPS cells.

研究代表者

中瀬 裕之(Nakase, Hiroyuki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10217739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：GFRvIII-CAR-iPSC について多能性幹細胞としての特性、染色体・ゲノム DNA の損傷について解析を行った。EGFRvIII-CAR-iPSC の品質確認として、EGFRvIII-CAR-iPSC に関して、多能性解析、NOGマウスを用いて奇形腫形成能も確認した。また、G-band 法による染色体分析、次世代シーケンサーによるゲノム DNA 解析により機能的変異、挿入・欠失、コピー数変異、構造変異を認めず、安全性も確認した。現在、EGFRvIII-CAR発現iPS-NK に関して、in vitro/in vivo における膠芽腫に対する抗がん効果と安全性の評価を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果は、iPSC から EGFRvIII 特異的 CAR 発現 NK を大量に準備することが可能で、off-the-shelf の NK 細胞免疫療法の開発として、難治性悪性腫瘍である膠芽腫に対する有力な新規併用療法の1つとなる可能性があり、創造性に富んだ研究であると考えられる。CAR 発現 NK (CAR-NK) は CAR-T より安全性が高い可能性がある。不均一で多様性の強い細胞集団である膠芽腫に対して、安全で高い治療効果を期待できる CAR-NK はより有用な抗がん免疫細胞であると考えられる。本研究の成果は、予後不良の膠芽腫に対する新規併用療法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We established human iPSC derived from human peripheral blood T cells by episomal vector mixture expressing six genes (OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, and dominant negative mouse p53), and transduced the EvCAR gene by lentivirus vector. The EvCAR-iPSC expressed EvCAR and stem cell markers (NANOG, OCT3/4, SSEA4, TRA-1-60). Matrigel-suspended EvCAR-iPSC formed teratoma in NOG mice subcutaneously. Whole-genome analysis revealed that the EvCAR-iPSC harbored T cell receptor recombination and seven non-synonymous heterozygous mutations. The EvCAR transgenes were inserted into the introns of the CLBP, TMEM132D, and PSMF1 genes. Next, we induced EvCAR-NKC via spin embryoid body (EB) culture. The established EvCAR-iPSC were cultured in APEL 2 medium containing SCF, VEGF, BMP4, and Y-27632 in 96-well round-bottom plates for 10 days to form EB. The EBs included 37.5% CD34/CD43-positive hematopoietic stem/progenitor cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：膠芽腫 iPSC CAR 遺伝子 Natural killer cell

## 1 . 研究開始当初の背景

Cancer immunotherapies such as immune checkpoint blockade, adoptive T cell therapy, and chimeric antigen receptor (CAR) therapy, which rely on the targeted destruction of cancer cells, might be a promising alternative for treating glioblastoma (GBM). CAR, which consists of the antigen-binding domain of the antibody and a signal transduction domain, enhances the anti-tumor activity of immune effector cells.

Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) is the most common variant of EGFR detected in 50% of all EGFR-amplified GBMs and is rarely observed in normal tissue. Although EGFRvIII is considered a promising target of CAR, clinical trials of EGFRvIII-targeting CAR (EvCAR)-expressing T cells for GBM have reported, it failed to inhibit progression due to the loss of EGFRvIII on the treated GBM cells. Therefore, immune cells that target plural antigens, and not singular antigens, are required for eradicating GBM.

Natural killer cells (NKC) recognize GBM cells via several activating and inhibitory receptors, and kill GBM cells. EvCAR might enhance NKC-mediated killing against EGFRvIII-expressing GBM cells. However, it is challenging to induce CAR-expressing NKC (CAR-NKC) because of the difficulty of gene transfer to primary human NKC, even with lentiviral vector. However, it is relatively easy to transduce exogenous genes into induced pluripotent cells (iPSC) by lentivirus vector. If CAR-NKC can be induced from EvCAR-transduced iPSC (EvCAR-iPSC), it would be possible to obtain EvCAR-NKC as necessary.

## 2 . 研究の目的

The aim of this study is to induce EvCAR-iPSC-derived NKC for GBM therapy. And, we would like to show that EvCAR-iPSC-derived NKC could be an “off-the-shelf” cell-based drug for anti-GBM immunotherapy.

## 3 . 研究の方法

We established human iPSC derived from human peripheral blood T cells by episomal vector mixture expressing six genes (OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, and dominant negative mouse p53). The next stage we transduced the EvCAR gene by lentivirus vector, and showed that the EvCAR-iPSC expressed EvCAR and stem cell markers (NANOG, OCT3/4, SSEA4, TRA-1-60). Furthermore, it was confirmed that matrigel-suspended EvCAR-iPSC formed teratoma in NOG mice subcutaneously. Whole-genome analysis was also carried out to confirm that the EvCAR-iPSC harbored or not T cell receptor recombination or any mutations.

The EvCAR transgenes were inserted into the introns of the CLBP, TMEM132D, and PSMF1 genes. Next, we induced EvCAR-NKC via spin embryoid body (EB) culture. The established EvCAR-iPSC were cultured in APEL 2 medium containing SCF, VEGF, BMP4, and Y-27632 in 96-well round-bottom plates for 10 days to form EB. The EBs included 37.5% CD34/CD43-positive hematopoietic stem/progenitor cells.

## 4 . 研究成果

We established EvCAR-iPSC. The EvCAR-iPSC harbored seven heterogenous mutations compared to primary human T cells prior to induction. The EvCAR transgenes were inserted into three introns of the EvCAR-iPSC genome. The findings indicate that any mutations and insertions affecting tumorigenesis were not detected in the EvCAR-iPSC. We successfully induced EvCAR-iPSC-derived EvCAR-NKC, but less frequently. The selection of highly NKC-producible iPSC clones is required to obtain the amount of cells that can be used in clinical trials. Further, there is a need to evaluate the anti-tumor effects of the EvCAR-NKC against GBM, which is ongoing. In any time, the EvCAR-iPSC-derived NKC might provide a safe “off-the-shelf” NKC-based immunotherapy for GBM.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakazawa T, Nishimura F, Matsuda R, Nakamura M, Nakase H et al.   | 4. 巻<br>9               |
| 2. 論文標題<br>Effect of CRISPR/Cas9-Mediated PD-1-Disrupted Primary Human Third-Generation CAR-T Cells Targeting EGFRvIII on in vitro Human Glioblastoma Cell Growth | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Cells   | 6. 最初と最後の頁<br>998-1017  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/cells9040998   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Sugimoto T, Matsuda R, Nakase H et al.  | 4. 巻<br>132             |
| 2. 論文標題<br>Linac-Based Fractionated Stereotactic Radiotherapy with a Micro-Multileaf Collimator for Brainstem Metastasis.   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>World Neurosurg   | 6. 最初と最後の頁<br>e680-e686 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.wneu.2019.08.049   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Tanaka Y, Nakazawa T, Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Nakase H et al.   | 4. 巻<br>14              |
| 2. 論文標題<br>Ex vivo-expanded highly purified natural killer cells in combination with temozolomide induce antitumor effects in human glioblastoma cells in vitro   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One  | 6. 最初と最後の頁<br>e0212455  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0212455   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Murakami T, Nakazawa T, Nishimura F, Nakamura M, Matsuda R, Nakase H et al.   | 4. 巻<br>38ページ           |
| 2. 論文標題<br>Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Anticancer Res  | 6. 最初と最後の頁<br>5049-5056 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.21873/anticancerres.12824   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Omoto K, Matsuda R, Nakazawa T, Nishimura F, Nakamura M, Nakase H et al.  | 4. 巻<br>25            |
| 2. 論文標題<br>Expression of peptide transporter 1 has a positive correlation in protoporphyrin IX accumulation induced by 5-aminolevulinic acid with photodynamic detection of non-small cell lung cancer and metastatic brain tumor specimens originating from non-small cell lung cancer | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Photodiagnosis Photodyn Ther  | 6. 最初と最後の頁<br>309-316 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.pdpdt.2019.01.009   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 3件/うち国際学会 6件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakase H, Nishimura F et al  |
| 2. 発表標題<br>Strategic planning using virtual reality simulation in neurosurgical operations  |
| 3. 学会等名<br>Second International and Seventh Annual Conference of Nepalese Society of Neurosurgeons In collaboration with World Federation of Neurosurgical Societies (招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nakase H, Nishimura F et al   |
| 2. 発表標題<br>Comprehensive neurosurgical management for Deep-seated brain AVMs                 |
| 3. 学会等名<br>The 14th Korea-Japan Joint Conference on Surgery for Cerebral Stroke (招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakase H   |
| 2. 発表標題<br>The strategic planning using virtual reality simulation in spine surgery         |
| 3. 学会等名<br>4th International Society of Minimally Invasive Neurosurgery(ISMINS)(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakazawa T, Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Nakase H et al.  |
| 2. 発表標題<br>Establishment of an efficient ex-vivo expansion method for highly purified human natural killer cells and evaluation of their antitumor activity on glioblastoma |
| 3. 学会等名<br>Keystone Symposia (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nakazawa T, Nishimura F, Matsuda R, Nakamura M, Nakase H et al.   |
| 2. 発表標題<br>Capability of dendritic cells loaded with induced-pluripotent stem cells to induce cancer-responsive T cells from a donor with HLA class I-A33 alleles in vitro |
| 3. 学会等名<br>European Association for Cancer Research (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakazawa T, Nakamura M, Matsuda R, Nishimura F, Nakase H et al.  |
| 2. 発表標題<br>Antitumor effects of minodronate, a third-generation nitrogen-containing bisphosphonate, in synergy with T cells in human glioblastoma in vitro and in vivo. |
| 3. 学会等名<br>American Association for Cancer Research (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 中村 光利<br><br>(Nakamura Mitsutoshi)<br><br>(00305715) | 奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員<br><br><br><br>(24601) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 中澤 務<br><br>(Nakazawa Tsutomu)<br><br>(00772500)    | 奈良県立医科大学・医学部・研究員<br><br><br><br>(24601)  |    |
| 研究分担者 | 松田 良介<br><br>(Matsuda Ryosuke)<br><br>(60453164)    | 奈良県立医科大学・医学部・学内講師<br><br><br><br>(24601) |    |
| 研究分担者 | 西村 文彦<br><br>(Nishimura Fumihiko)<br><br>(70433331) | 奈良県立医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(24601)   |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |