

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07268

研究課題名(和文)腫瘍微小環境中の細胞内シグナルを制御する次世代型キメラ抗原受容体T細胞の開発

研究課題名(英文)Development of next generation chimeric antigen receptor T cells that regulate intracellular signaling in the tumor microenvironment

研究代表者

安達 圭志 (ADACHI, Keishi)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40598611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、より効果的に抗がん作用を発揮する次世代型キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)発現T細胞を用いた、新たながん治療法を創出することを目指し、以下の成果を得た。

1) 抗核抗体の特徴を利用し、細胞内シグナル分子に対する阻害抗体や阻害蛋白と、抗核抗体の一本鎖抗体とをリンカーで繋いだ人工タンパクをデザインし、これらを一細胞に同時に発現するCAR-T細胞を作成した。2) 人工タンパクとCARは、デザイン通りに一細胞に同時に発現することを確認した。3) 複数のマウスがん細胞株上、抗核抗体の細胞内移行に必要とされる核酸トランスポーターの発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T細胞療法の臨床試験は欧米や中国を中心に進行しており、米国では2017年8月に、我が国では2019年3月に、血液悪性腫瘍を対象として承認を受けた。しかし我が国は、臨床試験の件数で欧米や中国に大きく水をあけられている。現在のCAR-T細胞療法が抱える『固形がんに対して有効性が乏しいこと』などの問題点を克服することで、現状を打破してグローバルスタンダードとなりうる我が国発の次世代型CAR-T細胞療法を開発することは喫緊の課題である。今回、がん組織内に形成される免疫抑制環境を克服するこれまでにない手段として、抗核抗体の細胞膜透過能を利用した細胞内分子の制御を考えつき、本研究課題を申請した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project is to generate a novel cancer therapy using the next generation chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cell that exerts anti-cancer effects more effectively than the conventional one. So far, the following results have been obtained; 1) The construct for the next generation CAR-T cell with which a CAR specific to a tumor antigen and an artificial protein consisting of an inhibitory molecule against an intracellular signaling molecule and a single-chain Fv of antinuclear antibody linked by a linker could be concomitantly expressed was designed. 2) The next generation CAR-T cells simultaneously expressed the CAR and the artificial proteins as intended. 3) The expression of a nucleic acid transporter which is required for transmembrane translocation of the antinuclear antibodies was confirmed on several murine cancer cell lines with flow cytometry.

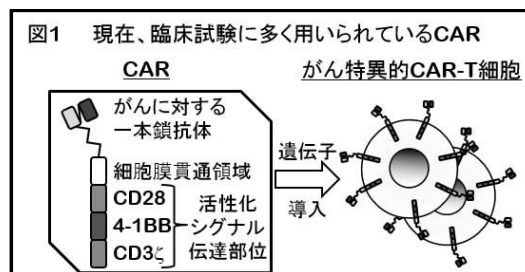
研究分野：免疫学

キーワード：抗核抗体 CAR-T細胞 概念実証実験 がん

1. 研究開始当初の背景

1981年以降、我が国ではがんが死亡原因の一位となっている。2016年の全死亡者に占める割合は28.5%であり、全死亡者の約3.5人に1人が、がんで死亡したことを意味している。また、がん患者の診断や治療に費やされる医療費は著しく増大し、日本経済を圧迫する一因ともなっており、がんに対する優れた診断技術の確立および効果的な治療法・再発予防法の開発が求められている。

従来の外科療法・化学療法・放射線療法では治療が困難な難治がんや進行がんに対する治療法として、免疫療法の基礎研究・臨床開発が活発に行われており、免疫チェックポイント阻害剤の上市・適応拡大など、進展がめざましい。さらに、CARを遺伝子導入したT細胞を移入するCAR-T細胞療法が極めて有望な技術として注目されている。CARとは、がんの細胞表面抗原に特異的な一本鎖抗体とT細胞活性化に関わる分子のシグナル伝達領域を組み合わせた抗原受容体である(図1)。



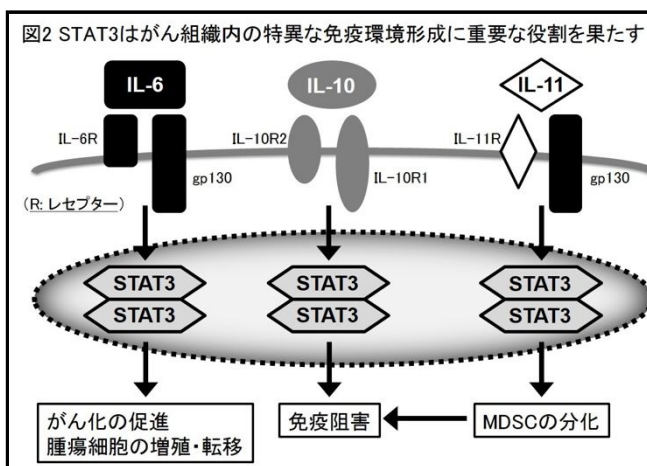
現在、欧米や中国を中心に臨床試験が進行しており、白血病やリンパ腫などの血液系悪性腫瘍などに対して優れた治療効果が報告されている。その結果、2017年8月、米国食品医薬品局は世界で初めて急性リンパ性白血病に対するCAR-T細胞療法を承認した。しかし、現在のCAR-T細胞療法は完成されたものではなく、さらなる発展のためには克服すべき問題点も指摘されており、特に以下の2点は極めて重要な課題となっている。

- ・ 血液系悪性腫瘍に対しては顕著な有効性を示す一方、固形がんに対しては効果が乏しい
- ・ マウスモデルにおいて固形がんに対して治療効果を発揮した場合でも、大量のCAR-T細胞投与が必要

2. 研究の目的

【何故STAT3に着目するのか】

現状のCAR-T細胞が固形がんに対して有効に機能しない要因として、がん組織内で形成される特異な免疫環境がある。サイトカインのシグナル伝達および転写はSTAT(シグナル伝達兼転写活性化因子)ファミリーに属する分子を介して行われる。その活性化は通常一過性であるが、多くのがん種では恒常的なSTAT、特にSTAT3の活性化が報告されている(図2)。代表的な炎症性サイトカインであるIL-6のシグナルはSTAT3を介して伝達されるが、持続的な炎症が細胞のがん化要因となるだけでなく、腫瘍細胞の増殖、転移にもIL-6の関与が知られている。一方、がん微小環境内は免疫学的に極めて抑制的であり、がん組織内に浸潤してきたT細胞などの免疫細胞群の機能を顕著に阻害する。腫瘍細胞や周囲のストローマ細胞から過剰に産生される抑制性サイトカインIL-10のシグナル伝達も、STAT3を介して行われる。また、がん組織内に多数存在し、免疫阻害メカニズムとして重要な役割を果たす細胞群に骨髄由来抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cells: MDSC)があるが、IL-11/STAT3経路の活性化がMDSCの分化に深く関与していることが報告されている。以上のような理由から、STAT3は固形がんにおける有望な治療標的であると考えられる。



【独創的なSTAT3阻害メカニズム】

臨床試験で用いられているSTAT3阻害剤の多くは、生体内では合成できない低分子の人工化合物である。本研究ではこのようなアプローチとは異なり、従来にはないコンセプトに基づいてSTAT3阻害分子を設計し、CAR-T細胞に搭載することで治療効果の向上を目指す。

STAT3は細胞質内/核内に存在する。通常、高分子である阻害抗体は細胞膜を通過できないため、抗体を用いて細胞質内/核内の分子を制御することは困難である。しかし、lupus患者に検出される抗核抗体は細胞膜を通過し、核に対して反応することが知られている。そこ

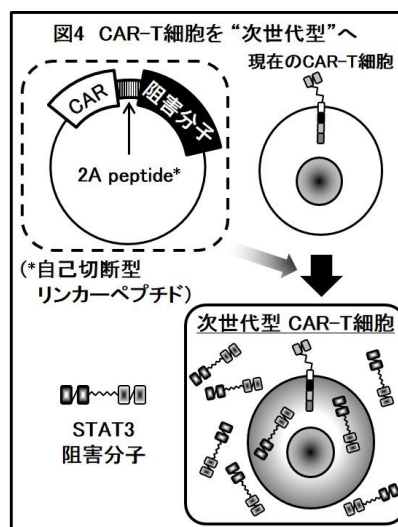
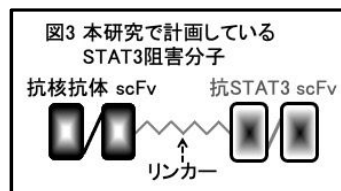
でこの抗核抗体の特徴を利用して細胞質内 / 核内に送達可能な STAT3 阻害分子をデザインし、その阻害分子を産生する CAR-T 細胞を作製して治療に応用する。

lupus モデルマウス由来の抗核抗体から作製された一本鎖抗体 (scFv) はマウスやヒトの細胞株に対して *in vitro* および *in vivo* 実験系において細胞膜透過能を示す。さらに核内に移行した後、約 4 時間で大部分が分解されるとされており、安全面でも優れた特徴を有していることから、本研究ではこの抗核抗体の scFv を利用する。

STAT3 を標的とする阻害分子としては、公表されている抗 STAT3 抗体の配列を利用した scFv を作製して利用する。抗 STAT3 scFv と抗核抗体の scFv をリンカーで結合させた融合蛋白をデザインし、細胞質内や核内へ送達可能な阻害分子を作製する (図 3)。これらの分子を自己切断型リンカーペプチドである 2A を介して CAR 分子と同時に T 細胞に発現させ (図 4)、がん組織を構成する細胞群や浸潤してきた免疫細胞群の細胞内で STAT3 を阻害し、微小環境中の免疫環境を制御する次世代型 CAR-T 細胞を開発する。

STAT3 ノックアウトマウスは胎生致死であることから、有害作用防止の観点から鑑みた場合、STAT3 を阻害する分子は、全身性に投与するよりもがん局所で作用させることが望ましいと考えられる。したがって、がん特異的 CAR-T 細胞に STAT3 阻害分子産生能を搭載することは、安全面においても画期的な利点となりうる。

また、『抗核抗体の性質を利用して細胞内分子を制御することにより、CAR-T 細胞の機能向上を図る』というこれまでにないコンセプトは極めて応用範囲が広い。制御性 T 細胞のマスター転写因子である FoxP3 など、様々な細胞内分子が、がん組織において重要な役割を果たすことが知られている。仮に STAT3 を標的とした研究が期待通りの結果にならなくとも、他の候補分子に標的を変更することで研究を推進することが可能であり、この点も本研究課題の大きな利点である。



3. 研究の方法

【3年間の研究計画の概要】

- (1) STAT3 阻害分子のコンストラクトをデザインし、CAR と共に T 細胞に発現させるためのレトロウイルスベクターを作製する。
- (2) マウス T 細胞を用いて CAR-T 細胞を作製し、デザインした STAT3 阻害分子の発現確認、および機能解析など、*in vitro* 系での実験を行う。
- (3) STAT3 阻害分子産生能を賦与した次世代型 CAR-T 細胞、あるいは従来型のコントロール CAR-T 細胞を、それぞれ担がんマウスモデルに移入し、*in vivo* 系において治療効果と有害事象の有無を比較検討する。
- (4) 次世代型 CAR-T 細胞の治療効果の詳細なメカニズムを解析するため、STAT3 阻害分子の標的細胞や、生体内で協調して作用する内因性免疫細胞を同定する。

4. 研究成果

抗核抗体の特徴を利用し、細胞内シグナル分子に対する阻害抗体や阻害蛋白と、抗核抗体の一本鎖抗体 (scFv) とをリンカーで繋いだ人工タンパクをデザインし、これらを産生する CAR-T 細胞を作製して治療に応用する。これまでの報告では、lupus モデルマウスの抗核抗体クローン由来の scFv (以下、L scFv とする) は、*in vitro* 及び *in vivo* 実験系において、核酸トランスポーターを介した細胞膜透過能を示していることから、本研究課題では L scFv 抗体配列を利用した。これまでに以下のことが実施された。

- (1) 概念実証試験を行うため、L scFv と組み合わせるタンパクとして C 末端に His タグと Myc タグを付加した GFP (以下、taggfp とする) を採用した。以下、L scFv とリンカーで繋いだ人工タンパクを L-taggfp と表記する。
- (2) ピコルナウイルス由来 2A ペプチドを利用し、がん抗原特異的 CAR と共に L-taggfp を一細胞に発現させるコンストラクト (以下、L-taggfp CAR とする) と、L scFv と繋がらない taggfp を発現させるコンストラクト (以下、taggfp CAR とする) も作成した。
- (3) レトロウイルスベクターを使用し、上記のコンストラクトをマウスのプライマリー T 細胞に遺伝子導入した。CAR、L-taggfp/taggfp の発現は、フローサイトメーターを用いて

確認した。

- (4) L-taggf_p/taggf_p の CAR-T 細胞外への分泌を抗 His タグ抗体と抗 Myc タグ抗体を用いた ELISA により確認した。
- (5) フローサイトメーターを用いて複数のマウスがん細胞株上の核酸トランスポーター発現を確認した。
- (6) L-taggf_p CAR と CAR の標的分子を発現するがん細胞、標的を発現しないがん細胞の3種の細胞を共培養する実験系を確立した。
- (7) 上記の共培養系を用いて、in vitro 系にて L-taggf_p が CAR の標的を発現しないがん細胞に取り込まれるかを、フローサイトメトリーにて検証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	玉田 耕治 (TAMADA Koji) (00615841)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

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