

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15702

研究課題名(和文) 固形腫瘍に対する遺伝子改変T細胞と腫瘍溶解ウイルスによる複合免疫療法の開発

研究課題名(英文) Combining oncolytic virus with genetically modified T cell therapy for the treatment of cancer

研究代表者

齋藤 章治 (Saito, Shoji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：10623762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：CAR-T細胞については、培養法の改良を行い、培養効率の改善を認めた。樹立したCAR-T細胞は、良好なT細胞表面形質を示し、PD1等のT細胞疲弊マーカーをほとんど発現していないことを示した。また腫瘍溶解ウイルスの代替技術として、腫瘍選択性ナノ粒子の開発に取り組んだ。このナノ粒子は腫瘍細胞に効率よく取り込まれる一方、正常細胞にはほとんど取り込まれなかった。またナノ粒子に、発光mRNAを導入し、腫瘍細胞と共培養したところ、腫瘍細胞において高効率に発光活性がみられることが分かった。今後は、このナノ粒子を用いて、腫瘍細胞を遺伝子改変し、CAR-T細胞の抗腫瘍効果を向上させるような取り組みを進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PiggyBac法を用いたCAR-T細胞の培養法については顕著な改良が得られ、改良型CAR-T細胞単独もしくは腫瘍溶解ウイルス療法を組み合わせることで、難治性がんに対する革新的な治療法開発につながることを期待される。また、本研究では、腫瘍溶解ウイルスに代わる全く新しい腫瘍細胞遺伝子改変の技術を開発した。本研究で開発した腫瘍選択性ナノ粒子を用いて、腫瘍に選択的に治療遺伝子を導入する治療戦略は、単独もしくはCAR-T療法との併用により、がんに対する革新的な治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We sought to optimize the generation method of X-antigen specific CAR-T cells. By modifying the types of feeder cells and the schedule of stimulation and cytokine supplementation, we successfully improved the efficiency of CAR-T generation. The generated CAR-T cells exhibited a naive / stem cell memory-like phenotype and minimally expressed T cell exhaustion markers, such as PD1. We have switched the oncolytic viruses to nanoparticle to deliver target genes to tumor cells for future clinical applications. We have developed a novel nanoparticle that can selectively enter tumor cells but not normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). When these nanoparticles were loaded with firefly luciferase(ffLuc) mRNA, they could efficiently deliver mRNA to the tumor cells, with enhanced luciferase activity, but they minimally delivered ffLuc mRNA to PBMCs. Now, we are further investigating these nanoparticles to deliver target mRNA to modify tumor cells to express X antigen.

研究分野：小児血液がん

キーワード：がん免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

治療の進歩にもかかわらず、難治性小児がんの治療成績は今なお不良であり、新規治療法の開発は喫緊の課題である。難治性悪性腫瘍に対する治療法として、近年がん抗原に特異的な人工 T 細胞受容体 (キメラ抗原受容体; Chimeric antigen receptor: CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法が注目されている。CAR を発現させた T 細胞 (CAR-T 細胞) は、高感度・高特異度に腫瘍細胞に結合し、細胞障害活性を発揮する (図 1)。なかでも B 細胞性血液腫瘍に対する CD19 抗原特異的 CAR-T 細胞療法は、海外の臨床試験で劇的な臨床的効果が証明され注目された。申請者らのグループは、低コストで安全性も高い piggyBac 遺伝子導入法によって作成した CD19 抗原特異的 CAR-T 細胞療法を開発し (齋藤-科研 H24-25 年、Saito et al. *Cytherapy* 2014) 国内での臨床試験を平成 30 年から実施する予定である。

CAR の標的抗原は遺伝子組み換え技術により自由に変えられるため、当初は固形腫瘍に対しても治療効果が期待されていた。しかし、固形腫瘍は標的がん抗原の発現が弱い上、腫瘍局所では強力な抑制性の免疫機構も働いているため、CAR-T 細胞が本来の殺細胞機能を発揮できておらず、これまでの臨床試験でも十分な臨床効果は得られていないのが現状である。

腫瘍溶解ウイルスは、腫瘍細胞内で特異的に増殖複製 (replication) するように遺伝子改変がなされたウイルスの総称で、正常細胞では増殖複製できないため、腫瘍細胞に特異的な殺細胞効果を有する。固形腫瘍に対する腫瘍溶解ウイルス療法は、これまでの臨床試験で安全性は証明されているが、臨床効果が限られていることが課題であった。申請者は米国留学中、腫瘍溶解ウイルスが、殺腫瘍細胞効果に加え、腫瘍局所の抑制性免疫状態を解除することで、腫瘍局所で T 細胞を活性化させる効果を有することを見出した。また、遺伝子改変操作も比較的容易であり、ウイルスベクター内に T 細胞活性化因子など任意の遺伝子配列を組み込むことも可能である。

本研究では、腫瘍溶解ウイルスと CAR-T 細胞を併用することで、両者の利点を組み合わせた相乗的な抗腫瘍効果の誘導を目的としている。本研究ではさらに、腫瘍溶解ウイルスを利用して腫瘍細胞に人工的に標的抗原を提示させることで、CAR-T 細胞の腫瘍細胞認識能を高め、さらなる抗腫瘍効果の増強を狙う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍溶解ウイルスと CAR-T 細胞を組み合わせた、難治性固形腫瘍に対する新規の複合免疫療法を開発することである。固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法は、これまで十分な臨床効果を得ることが難しかった。このため、新規がん抗原を標的とした CAR-T 細胞や、腫瘍局所でも機能を維持できる CAR-T 細胞の開発が現在米国を中心に進められている。しかし、これらの取り組みはすべて、腫瘍細胞が本来有するがん抗原を CAR-T 細胞の標的としている。本研究では腫瘍溶解ウイルスを利用して腫瘍細胞に人工抗原を提示させ、CAR-T 細胞がこの人工抗原を認識することで、抗腫瘍効果に結びつける戦略をとっている。このような取り組みはこれまでなく、実現すれば難治性悪性腫瘍に対する画期的な治療法につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究では、前臨床実験モデルを用いて以下のことを明らかにする(図2)。

人工腫瘍抗原(X)発現-腫瘍溶解ウイルスベクターを作製し、

感染した腫瘍細胞に人工腫瘍抗原(X)を発現させることを示す。

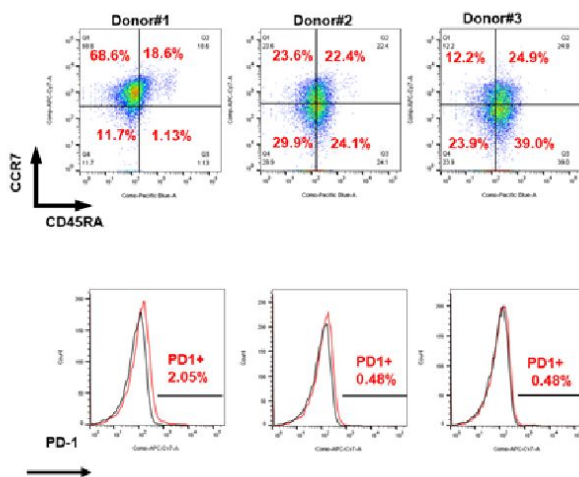
人工腫瘍抗原(X)特異的 CAR-T 細胞が、ウイルス感染によって人工抗原(X)を発現した腫瘍細胞を、特異的に殺傷することを示す(in vitro)

上記腫瘍溶解ウイルスと CAR-T 細胞の併用により、相乗的な抗腫瘍効果が誘導されることを、担癌マウスモデルを用いて証明する。

### 4. 研究成果

X 抗原特異的 CAR-T 細胞については、培養法の改良を行った。具体的にはフィーダー細胞の変更と刺激方法、刺激及びサイトカイン添加のタイミングを改良することにより、CAR 遺伝子導入効率の改善および、最終 CAR 陽性 T 細胞産物の細胞数の増加を得ることができる培養法を確立した。樹立した CAR-T 細胞は、比較的幼弱な表面形質を示す上、PD1、TIM3、LAG3 などの T 細胞疲弊マーカーをほとんど発現していないことを示した(図1)。また、X 抗原を発現する腫瘍に対し、in vitro 共培養実験において特異的な抗腫瘍効果が得られることを示した。

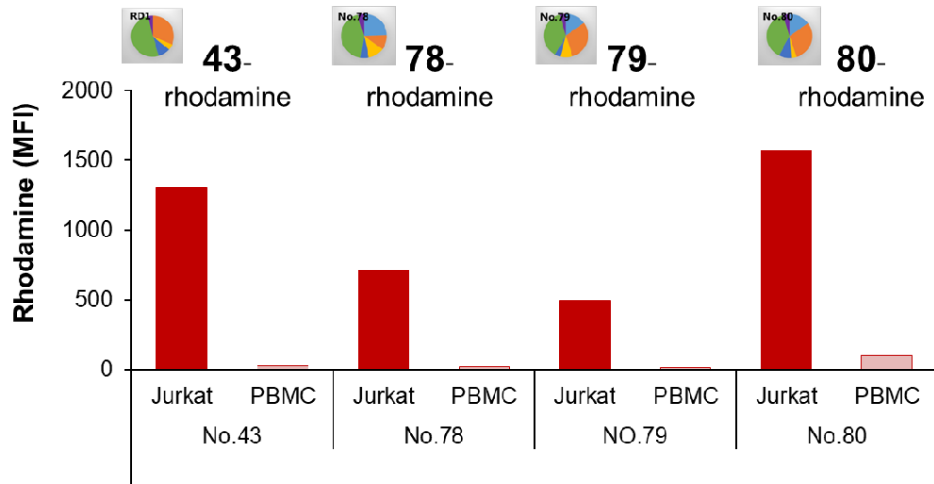
図 1



また、抗原発現腫瘍細胞株を用いて、担癌モデルを作製した。NSG マウスにX抗原陽性腫瘍を皮下注したところ、腫瘍の生着を確認できた。この担癌モデルに対して、X 抗原特異的 CAR-T 細胞を投与したところ、コントロール群と比べ有意に腫瘍を縮小させ、生存期間を延長させることが明らかとなった。また、NSG マウスにX抗原陰性腫瘍を皮下注することで、X 抗原陰性マウスモデルを樹立した。X 抗原腫瘍も NSG マウスにて生着することを確認できた。

腫瘍溶解ウイルスベクターと CAR-T 療法の併用療法の、実臨床応用へのハードルの高さを懸念し、ウイルスベクターによらない、腫瘍への遺伝子導入方法を検討した。いくつかの候補の中から、腫瘍選択性ナノ粒子による遺伝子導入技術の創出に至った。このナノ粒子は、膜の組成を調整することで、腫瘍選択的に取り込まれる性質を有している。図2のようにローダミンで標識したナノ粒子を腫瘍細胞と共培養したところ、ナノ粒子は24時間後に腫瘍に効率よく取り込まれる一方、正常末梢血単核球にはほとんど取り込まれないことが分かった。

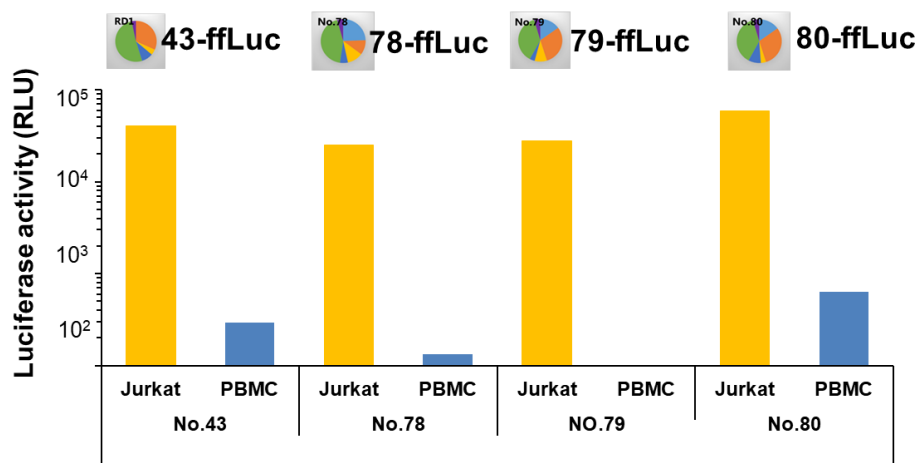
図 2



このナノ粒子に、firefly luciferase をコードする mRNA を内包した上で、腫瘍細胞と共培養した後、基質であるルシフェリンを加えてルシフェラーゼ活性を測定したところ、腫瘍細胞においては高効率にルシフェラーゼ活性がみられることが明らかになった(図3)。一方、正常細胞では、ほとんどルシフェラーゼ活性はみられず、このナノ粒子は選択的に腫瘍細胞に取り込まれ、蛍光標識 mRNA を腫瘍細胞に発現させることを可能とすることが明らかとなった。

このナノ粒子に治療遺伝子を導入すれば、腫瘍細胞に選択的に治療遺伝子を配送し、腫瘍細胞のみで治療遺伝子を発現させることが可能となる。このため、今後はこの技術を用いて、腫瘍細胞の選択的な遺伝子改変を行い、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を向上させるように取り組んでいく方針である。現在、すでにこの技術を用いてさまざまな治療遺伝子の効果を検証しているところであり、候補遺伝子のひとつでは選択的な殺腫瘍効果が得られることが明らかになった。

図 3



この結果から、今後はこのナノ粒子を用いて腫瘍選択的に治療遺伝子を導入し、腫瘍細胞を遺伝子改変したうえで、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を向上させるように取り組んでいく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shoji Saito, Ikumi Nakashima, Aiko Hasegawa, Eiichi Akahoshi, Mitsuko Ishihara-Sugano, Shigeki Yagyu, and Yozo Nakazawa
2. 発表標題 Tumor-tropic liposome-mediated therapeutic delivery of mRNA for T cell malignancies
3. 学会等名 23rd Annual meeting of American Society of Cell and Gene Therapy (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----