

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16799

研究課題名(和文)がん細胞から分泌されるT細胞の機能抑制因子の同定

研究課題名(英文)Identification of secretion from cancer cells to suppress T-cell function

研究代表者

長谷川 加奈 (Hasegawa, Kana)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20777370

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):がんの免疫療法の一つであるキメラ抗原受容体-T細胞療法(CAR-T細胞療法)が、その有効性を示しているのは今のところ血液がんに対してのみで、固形がんに対して有効なCAR-T細胞は存在していない。固形がんに対するCAR-T細胞の開発が進まない最大の原因は、がんの特異性の高い細胞表面抗原の欠如にある。我々は、以前に単離した骨髄腫特異的抗体R8H283が、1)肺がんなど、他のがん種にも結合すること、2)さらに、抗原タンパクを発現している皮膚や大腸などの正常組織には結合しないことを見出した。そこで、R8H283からCARの構築を作製し、R8H283 CAR-T細胞の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キメラ抗原受容体-T細胞療法(CAR-T細胞療法)は、血液がんに対して効果を発揮しているが、一方で固形がんに対しては有効なCAR-T細胞療法は未だ存在していない。固形がんに対するCAR-T細胞の開発が進まない最大の原因は、がんの特異性の高い細胞表面抗原の欠如にある。我々は、以前に単離した骨髄腫特異的抗体R8H283が、1)肺がんなどの他のがん種にも結合すること、2)さらには、抗原タンパクを発現している皮膚や大腸などの正常の組織には結合しないことを見出した。これらの結果は、R8H283が固形がんに対するCAR-T細胞研究に役立つ可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文):CAR-T cell therapy have been already demonstrated efficiency to hematological malignancy as shown by CD19 CAR-T cell to B-cell leukemia/lymphoma. However, their efficacy in solid tumor treatment has not yet been supported. The hurdle which hampers development of solid tumor CAR T cell therapy is lack of appropriate target antigen. We found that R8H283 we previously identified as a novel multiple myeloma-specific monoclonal antibody bound to cancer cells from a part of lung cancer patients. In addition, R8H283-positive cells were not detected in normal tissue of skin and colon by immunohistochemistry, despite the expression of protein itself R8H283 recognized as an antigen. Then, CAR constructs derived from R8H283 were generated and transduced into T cells. The function of R8H283 CAR-T cells was analyzed.

研究分野:がん免疫

キーワード:CAR-T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの免疫療法の一つであるキメラ抗原受容体 T 細胞療法 (CAR-T 細胞療法) は、がん細胞に特異的に発現する細胞表面抗原に対する抗体の抗原認識部位と、T 細胞受容体の細胞内ドメインである CD3 と、CD28 などの共刺激分子を直鎖状に融合させた CAR を、患者由来の T 細胞に導入し CAR-T 細胞を作製した後、それを患者の体内に戻すというものである。研究開始当初、我々は、多発性骨髄腫に特異的に発現する活性型インテグリン β 7 を標的とする CAR-T 細胞が、骨髄腫細胞に対して強い細胞傷害活性を示すことを明らかにしていた (Hosen N., Matsunaga Y, Hasegawa K. et al., *Nature medicine*, 23:1436-1443, 2017)。しかしながら、CAR-T 細胞がその有効性を示しているのは今のところ血液がんに対してのみで、固形がんに対して有効な CAR-T 細胞は存在していなかった。そのため、CAR-T 細胞研究においては固形がんにも有効な CAR-T 細胞の開発が世界的競争となっており、我々もそれに挑もうと考えた。固形がんを排除するためには、治療抵抗性の機序の理解とその制御が不可欠である。

固形がんに対する CAR-T 細胞の開発が進まない最大の原因は、がんの特異性の高い細胞表面抗原の欠如にある。我々はそのような抗原の候補として CD98 heavy chain (hc) 中に形成される conformational epitope とそれを認識する抗体を既に得ていた。

2. 研究の目的

目的 1 : 骨髄腫細胞の皮下移植モデルを用いた CAR-T 細胞治療実験系の確立とそれを用いた治療抵抗性の機序の解明

CAR-T 細胞療法に対する治療抵抗性の機序を解析するための in vivo 実験モデルを確立し、その機序を解明することを目指した。

目的 2 : 骨髄腫細胞特異的抗 CD98hc 抗体 R8H283 の固形がんにおける特異的結合の検討

以前に我々が独自で作製した骨髄腫特異的抗 CD98hc 抗体 R8H283 の固形がんおよび正常臓器に対する結合を検討する。

目的 3 : R8H283 由来 CAR-T 細胞の開発

R8H283 由来の CAR-T 細胞を作製し、固形がん細胞に対する抗腫瘍効果を in vitro、および in vivo で検討する。

3. 研究の方法

目的 1 : 骨髄腫細胞の皮下移植モデルを用いた CAR-T 細胞治療実験系の確立とそれを用いた治療抵抗性の機序の解明

骨髄腫細胞である RPMI8226 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植しておき、様々なタイミングで MMG49 CAR-T 細胞を投与し、その効果を検討し、効果不十分の場合にはその機序を検討することとした。

目的 2 : 骨髄腫細胞特異的抗 CD98hc 抗体 R8H283 の固形がんにおける特異的結合の検討

正常組織の免疫染色を行い、CD98hc タンパクの発現と、R8H283 の結合を検討する。さらに、固形がんとその周辺の正常部分の手術検体を用いて、フローサイトメトリーにより CD98hc タンパクの発現と、R8H283 の結合を検討する。

目的 3 : R8H283 由来 CAR-T 細胞の開発

R8H283 の可変部の配列と、CD28、4-1BB などの共刺激分子、T 細胞受容体の細胞内ドメインである CD3 を、overlapping PCR により直鎖状につなぎ、レトロウイルスベクターに組み込む。複数種類の CAR の構築を作製し、T 細胞に導入した後、細胞増殖などを解析し、最良の構築を選択する。そのようにして選択された構築を導入された R8H283 CAR-T 細胞を用いて、固形がん細胞に対する抗腫瘍効果を in vitro、および in vivo において検討する。

4 . 研究成果

目的 1 : 骨髄腫細胞の皮下移植モデルを用いた CAR-T 細胞治療実験系の確立とそれを用いた治療抵抗性の機序の解明

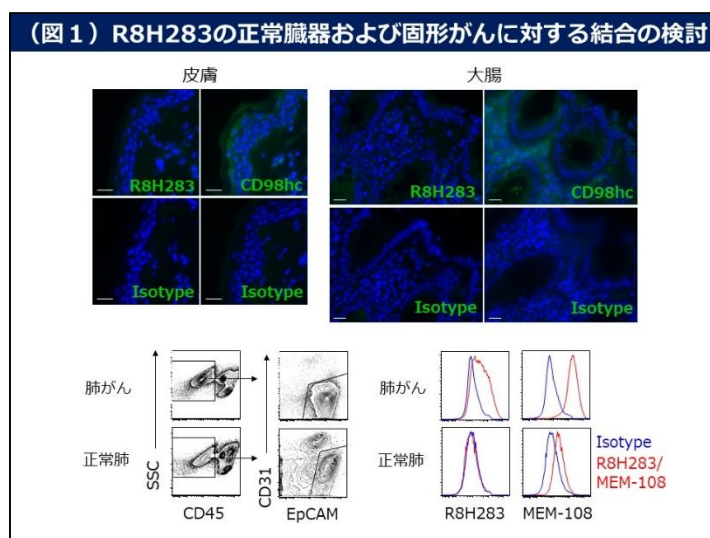
RPMI8226 細胞などの骨髄腫細胞を皮下に移植しておいた免疫不全マウスに我々の開発した活性型インテグリン $\beta 7$ を標的とした CAR-T 細胞(MMG49 CAR-T 細胞)の投与を行うと、腫瘍は完全に消失する。しかし、投与する細胞数は変えずに、投与時期を遅らせていき、腫瘍が非常に大きくなってから CAR-T 細胞の投与を行った場合には、腫瘍の完全な消失には至らない。残存した腫瘍において標的抗原である活性型インテグリン $\beta 7$ の発現は保たれているので、腫瘍側の免疫逃避が効果不十分の原因ではなく、CAR-T 細胞が腫瘍微小環境内で疲弊し増殖・機能しないことが腫瘍残存の原因と考えられた。

そこで、その機序を探索する方向で、研究を進める予定であったが、我々が以前に単離していた新規抗 CD98hc 抗体 R8H283 についての思いがけない発見から研究の方向性を転換し、研究目的を上記の目的 2 , 3 へと転換した。

目的 2 : 骨髄腫細胞特異的抗 CD98hc 抗体 R8H283 の固形がんにおける特異的結合の検討

固形がんに対する CAR-T 細胞療法の効果不十分の原因の解明には、固形がんに対する CAR-T 細胞が必要であると考え、以前に多発性骨髄腫特異的抗体として単離した R8H283 抗体に着目し、まず、固形がんおよび正常臓器に対する R8H283 の結合を検討することにした。

R8H283 は抗原として CD98hc を認識しているが、組織の免疫染色により CD98hc タンパクの発現が認められた皮膚や大腸において、R8H283 陽性細胞は認められなかった。さらに、フローサイトメトリーによる解析において、大腸や肺の正常細胞には結合しないが、肺がん細胞には結合することが明らかとなり、R8H283 由来の CAR-T 細胞を固形がんモデルでの治療に用いることにした(図 1)。

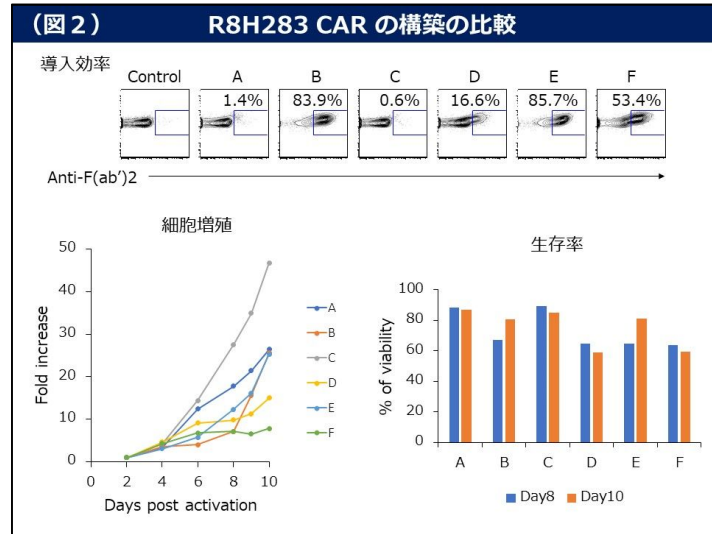


目的 3 : R8H283 由来 CAR-T 細胞の開発

次に、R8H283 由来の CAR をヒト T 細胞に発現させるためのベクターを作製した。共刺激分子として CD28 や 4-1BB を用いるなど、複数種類の構築を作製し、それを T 細胞に導入した場合の、CAR の導入効率および、CAR-T 細胞の生存・増殖を解析した。その結果から生存率と増殖が最も良い構築を選択し、以後の R8H283 CAR-T 細胞の作製に用いることに

した(図2)。

肺癌細胞株である A549 に対して R8H283 の結合が見られたので、A549 を用いて in vitro、および in vivo における R8H283 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の検討を行うための予備的検討を現在行っている。



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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------