

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03532

研究課題名(和文) 腫瘍溶解ウイルスを用いた横紋筋肉腫に対するCAR-T細胞療法補完システムの開発

研究課題名(英文) Development of CAR-T cell therapy complementary system for rhabdomyosarcoma using oncolytic virus

研究代表者

細井 創 (Hosoi, Hajime)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：20238744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：当初CAR-T療法を強化する腫瘍溶解性アデノウイルス(OAd)の開発を目指したが、OAd作製の必須のプラスミドの入手が大幅に遅れ、計画の遂行が困難となった。そこで小児がん特に予後不良なラブドイド腫瘍(RT)を治療標的とするOAd(X-OAd)を開発し、抗腫瘍効果を示す方針とした。RT細胞株における遺伝子Xの発現は正常組織と比較して4～400倍高く、またRT細胞株における遺伝子Xのプロモーター活性は高値であった。in vitroで、遺伝子Xの発現が高い細胞株においてX-OAdは複製能・殺細胞能を示した。またマウスモデルで、X-OAdの投与により腫瘍壊死が誘導され、有意に腫瘍の成長を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回小児がんの中で特に予後不良なRTを治療標的とするOAd(X-OAd)を開発し、in vitro、in vivoにおいて直接的な抗腫瘍効果を明らかにした。遺伝子XをRTの治療標的とした研究は今までなく、新規性・独自性に富む。今回得られた知見を発展させることで、将来的に難治性、再発性RT患者に投与することで寛解期間延長や治癒につながる可能性があり、臨床応用面でも優位性が高いと考える。また遺伝子XはRTだけでなく成人の癌(胃癌、肝がん、精巣がん、卵巣がんなど)においても幅広く高発現しており、X-OAdによる治療は他の癌腫への展開が可能で、非常に潜在能力を秘めた研究と考える。

研究成果の概要(英文)：We initially aimed to develop an oncolytic adenovirus (OAd) to enhance CAR-T therapy, but the acquisition of the essential plasmid for OAd production was significantly delayed, making it difficult to proceed with the original plan. Therefore, we shifted our focus to the development of an OAd specifically targeting pediatric cancers, particularly refractory rhabdoid tumor (RT), with the intention of demonstrating its anti-tumor effects. The expression of gene X in RT cell lines was found to be 4 to 400 times higher compared to normal tissues, and the promoter activity of gene X in RT cell lines was also significantly elevated. In vitro studies showed that X-OAd exhibited replication and cytotoxicity specifically in cell lines with high expression of gene X. Furthermore, in a mouse model, administration of X-OAd induced tumor necrosis and significantly suppressed tumor growth.

研究分野：小児がん

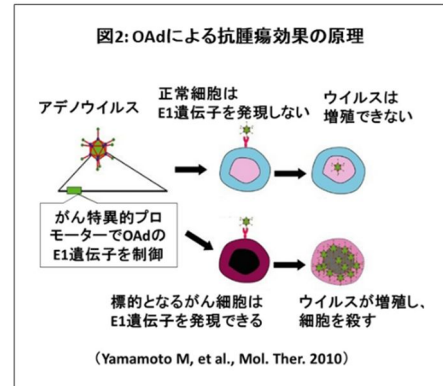
キーワード：腫瘍溶解性アデノウイルス 小児がん

1. 研究開始当初の背景

【概要】

研究の学術的背景

小児がんの治療成績は改善しつつあるが、いまだに特定の癌腫や、進行例や転移例は予後不良である。RMSは小児で最も頻度の高い軟部悪性腫瘍で、集学的治療が施行されるものの、転移例や再発例は未だに5年生存率が30%以下と極めて予後不良であり、従来の治療強化もその副作用の点から限界である。この状況を打開するため、我々はRMS細胞にmyogenin (MYOG)が高発現していることに着目し、先行研究において、ウイルス増殖に必須のE1遺伝子をMYOGプロモーターにより制御し、横紋筋肉腫細胞中で特異的に増殖・殺傷するOAdを開発した(Transl Oncol. 2021)。



アデノウイルスは高い遺伝子導入効率を示す一方、染色体に組み込まれず単独で存在するので、がん化のリスクが低く、非常に安全性・利便性が高い。また OAd に目的の遺伝子を導入することで任意のタンパク質を発現させることも可能である。

さらに、平成 29 年-31 年 JSPS 科学研究費基盤研究(B)の成果から、我々は RMS 細胞を特異的に認識し、殺細胞作用を示す CAR-T 細胞を開発している。そこで、今回 OAd にエフェクターサイトカインを分泌させることで、RMS 特異的 CAR-T 細胞を局所で活性化し、直接的な抗腫瘍効果を高めることを着想した。

また我々は、平成 22, 29 年 JSPS 科学研究費基盤研究(B)の成果から、胞巣型 RMS (aRMS) に特徴的な PAX3-FOXO1 融合遺伝子発現を特異的に抑制する shRNA shPF を開発し、核酸医薬としての可能性を示した。shPF を腫瘍組織に集積する性質を持つ hMSC に遺伝子導入し遺伝子治療を行ったが、一定の効果は示したものの、その効率は改善の余地のある結果であった。そこで、この核酸医薬の治療効果をより強力な形で応用するため腫瘍局所の微小環境に注目した。腫瘍の周囲には制御性 T 細胞 (Treg) が存在しており、免疫療法を阻害していることが知られている。そこで、遺伝子改変した OAd を用いて腫瘍局所の核酸治療により Treg のマスター遺伝子である Foxp3 の発現を抑制することで、間接的に抗腫瘍効果を高めることができると着想した。

本研究では、我々の研究を発展させる形で、エフェクターサイトカインを分泌し、CAR-T 細胞を活性化させる OAd を開発することで RMS に対する特異的 CAR-T 細胞治療の効果を強化するとともに、sh-Foxp3 を分泌し Treg の機能を低下させる OAd を開発し、さらにこれらを組み合わせることで、より効果的な抗腫瘍作用を発揮する複合的細胞遺伝子治療法を開発することを目的とする。

2. 研究の目的

CAR-T 細胞を、サイトカインを用いて活性化する試みは以前からなされてきた。In vitro では活性化 CAR-T 細胞はより効果的に殺細胞能を示すが、in vivo においてサイトカインを全身投与することはサイトカイン放出症候群 (CRS) を誘発するため臨床応用は難しい。我々は、遺伝子治療製剤として、近年注目を浴びている OAd を遺伝子改変し、MYOG プロモーターによ

り増殖する OAd を作成し、これが in vivo においても RMS に特異的に増殖・殺傷することを明らかにした。OAd にサイトカインを産生させることで、RMS の腫瘍局所でのみ CAR-T 細胞を活性化でき、抗腫瘍効果を高めつつ、全身への副作用を軽減できると考える。予備実験では、我々は OAd に IFN を分泌させることに成功しており、同様の技術を用いてエフェクターサイトカインを分泌する OAd の開発を目指す。

また、hMSC を用いたデリバリーシステムでは不十分であった局所における核酸治療を強化できることも、OAd 開発の魅力である。Treg は免疫抑制細胞で、がん細胞の「免疫逃避」にも関与し、抗腫瘍免疫応答を抑制する。腫瘍局所では末梢血に比べて effector Treg が多く、Treg の免疫抑制機構として、Treg の CTLA-4 による APC の成熟抑制、抑制性サイトカイン (TGF- $\beta$ 、IL-10 など) の分泌などが知られている。Foxp3 は Treg のマスター転写因子であり、Treg の分化・機能発現・分化状態の維持すべてにおいて必須の役割を担う。Foxp3 の発現は Treg に特異的で、Sh-Foxp3 により Treg の抗腫瘍免疫能は低下する。我々は、Treg が核酸医療の治療標的になり得ると考え、sh-Foxp3 を分泌する OAd の開発を目指す。

これらの OAd 併用による エフェクターサイトカインを介した CAR-T 細胞活性化、sh-Foxp3 を介した Treg の抑制を組み合わせた「**がんに対する複合的細胞遺伝子治療**」の開発はこれまでに例を見ず、革新的であり、極めて独創的な新規細胞遺伝子治療のプラットフォームとなることが期待できる。

### 3. 研究の方法

#### 1) CAR-T 細胞を活性化させるエフェクターサイトカイン分泌型 OAd の開発

各エフェクターサイトカイン遺伝子分泌 OAd をヒト線維芽細胞、横紋筋肉腫に感染させ、培地内に分泌されたサイトカインを ELISA 法で測定する。続いて産生されたサイトカインで CAR-T 細胞が活性化をフローサイトメーターにより確認する。In vitro における、エフェクターサイトカイン分泌型 OAd の併用による、CAR-T 細胞の殺細胞能の変化を評価する。

#### 2) 抗腫瘍核酸を搭載した sh-Foxp3 分泌型 OAd の開発

Sh-Foxp3 を遺伝子導入した OAd をヒト線維芽細胞、横紋筋肉腫細胞に感染させ、それぞれの培地からエクソソームを抽出し、sh-Foxp3 含有量を評価する。In vitro において、sh-Foxp3 分泌型 OAd の併用による、ヒト Treg の産生する抑制性サイトカイン分泌量の変化を評価する。

#### 3) CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を最大限に高める、“Armed-OAd”併用遺伝子細胞治療の開発

1)、2)により作成された機能付随型 OAd および RMS 特異的 CAR-T 細胞療法を組み合わせることによる相乗効果を、NSG マウスモデルを用いて評価する。エフェクターサイトカイン産生 OAd を腫瘍内投与し、その後に経静脈的投与した CAR-T 細胞の活性をフローサイトメーターおよび、抗腫瘍効果で評価する。同様に sh-Foxp3 分泌型 OAd を腫瘍内投与し、ヒト Treg、続いて CAR-T 細胞を経静脈的投与し、抗腫瘍効果を評価する。最終的にそれぞれの併用による抗腫瘍効果を腫瘍径の計測、ならびに腫瘍内の免疫染色で評価する。

### 4. 研究成果

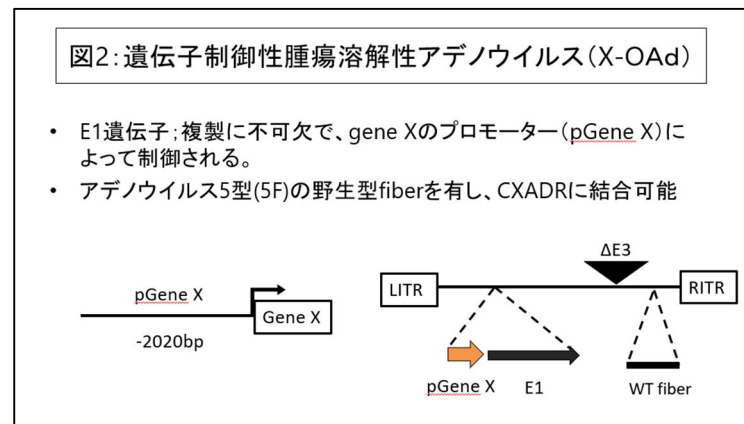
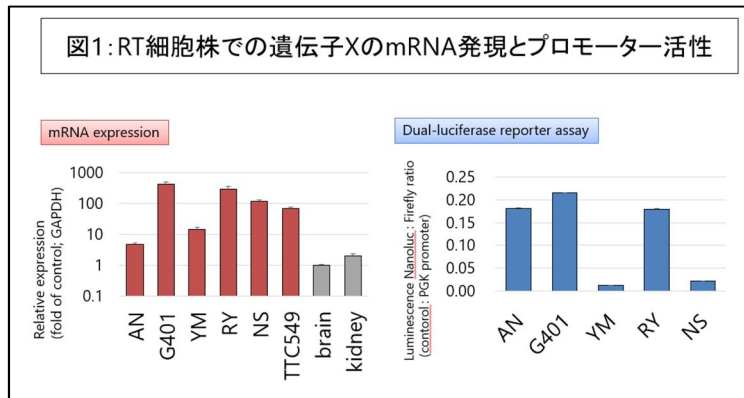
本研究期間中、新型コロナの影響により米国から Armed-OAd 作製に関わる重要なプラスミドの到着が大幅に遅れ、また届いた後も相同組み換えが予定通り進まず、計画の大きな変更を余儀なくされた。Armed-OAd がない状況では、CAR-T との相乗効果の検証が困難であるため、プロモ

ーターによりOAdの増殖を制御することで、直接的な抗腫瘍効果を示す方針とした。また横紋筋肉腫を標的としたCAR-Tを使用する意義が消失したことから、研究対象を横紋筋肉腫から小児がんの中でもとりわけ予後不良であるラブドイド腫瘍 (rhabdoid tumor; RT) に変更した。

RTは脳や腎臓、軟部組織に発生する悪性腫瘍で、中枢神経に発生するものを Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) という。RTは2歳までの乳幼児に多く、全生存率 (OS) はわずか 20% ~ 30% と、予後は極めて不良である (BMC Pediatr. 2022, J Clin Oncol. 2020)。RTには未だ標準治療がなく、予後を改善し晚期障害を最小限に抑える治療法を開発することが重要である。

## 1) RT細胞における治療標的遺伝子の決定

RTで特徴的に発現するとされる3つの遺伝子の報告 (Brain Pathology, 2012) を参照に、RT細胞株、正常な脳および腎臓の組織での遺伝子 X を含む遺伝子の発現を、real time PCR を用いて比較した。RT細胞株における遺伝子 X の mRNA の発現量は、正常組織と比較して 4 ~ 400 倍高く、他の遺伝子よりも感度/特異性が高かった (図 1 左)。またルシフェラーゼアッセイを施行したところ、RT細胞株における遺伝子 X のプロモーター活性も高値を呈した (図 1 右)。また今後の臨床応用を想定し、当院で経験した 10 例の臨床症例

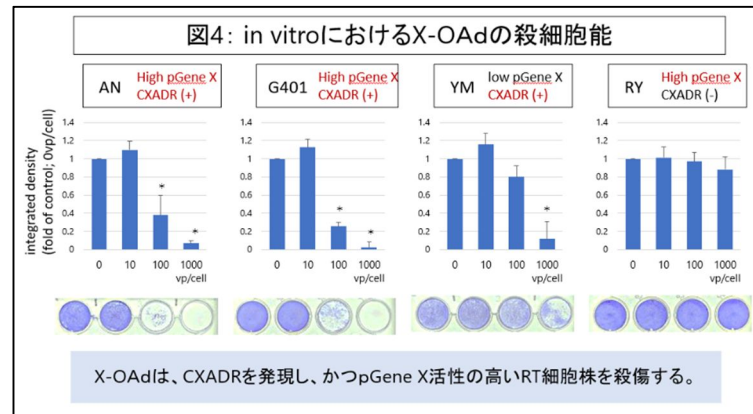
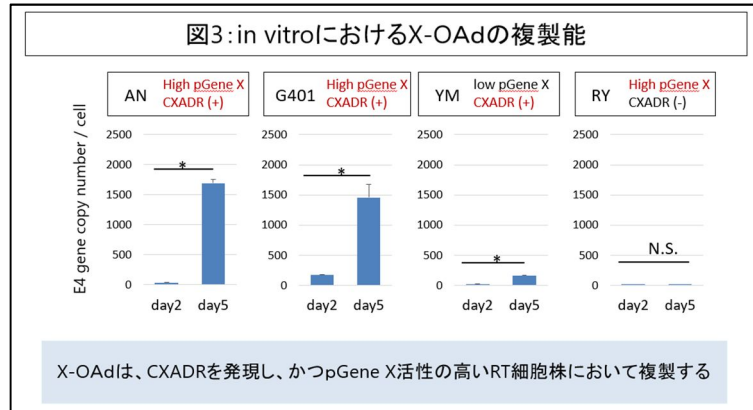


における遺伝子 X とコクサッキーアデノウイルス受容体 (CXADR) の発現を評価した。病理学的には、10 例の RT 臨床症例のうち 4 例で遺伝子 X が陽性であり、すべての症例が CXADR 陽性であった。そこで、遺伝子 X のプロモーター領域によって複製が制御される OAd (X-OAd) を作製し、in vitro および in vivo での腫瘍細胞殺傷能と抗増殖能を評価する方針とした(図 2)。

## 2) In vitroにおけるX-OAdの増殖能、殺細胞能の検討

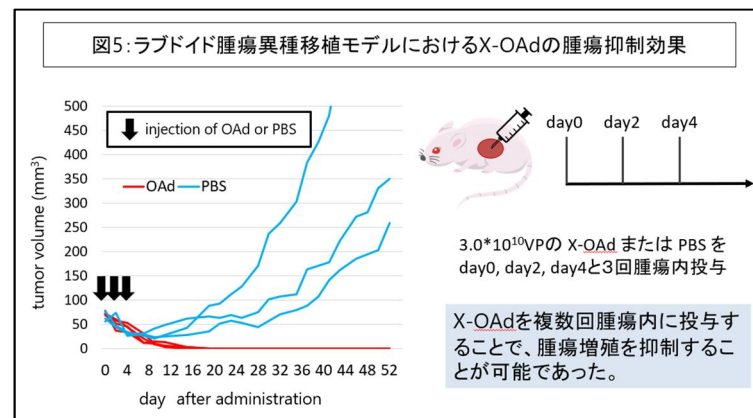
in vitroでは、AN、G401、YM、およびRYの4つの細胞株を使用して、X-OAdのウイルス増殖および殺細胞能を比較した。遺伝子Xの発現が高く、CXADRが細胞表面に存在するANおよび

G401細胞でX-OAdが増殖し、殺細胞能を示した。CXADRが存在するが遺伝子Xの発現が低いYM細胞、遺伝子Xは高発現しているが、CXADRが細胞表面に十分存在しないRY細胞ではX-OAdの複製能・殺細胞能のいずれも認められなかった。(図3、4)



### 3) In vivo における X-OAd の抗腫瘍効果の検討

最後に in vivo モデルでの抗腫瘍効果を分析するために、G401 細胞をヌードマウスの皮下に接種し、その後 X-OAd または PBS を腫瘍内に 3 回投与した。腫瘍の直径は週に 2 回測定した。X-OAd の投与により、腫瘍壊死が誘導され、PBS の投与よりも腫瘍の成長を抑制した。これは、直接的な局所的な細胞殺傷効果があることを示唆していると考えられる(図5)。



今回、小児がんの中で特に予後不良な RT を治療標的とする OAd (X-OAd) を開発し、in vitro、in vivo において直接的な抗腫瘍効果を明らかにした。遺伝子 X を RT の治療標的とした研究は今までなく、新規性・独自性に富むと考える。また今回得られた知見を発展させることで、将来的に難治性、再発性 RT 患者に投与することで寛解期間延長や治癒につながる可能性があり、臨床応用面でも優位性が高い。また遺伝子 X は RT だけでなく成人の癌 (胃癌、肝がん、精巣がん、卵巣がんなど) においても幅広く高発現しており、X-OAd による治療は他の癌腫への展開が可能で、非常に潜在能力を秘めた研究と確信する。

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
研究分担者	柳生 茂希  (Yagyu Shigeki)  (10572547)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	
研究分担者	吉田 秀樹  (Yoshida Hideki)  (10643546)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	
研究分担者	家原 知子  (Iehara Tomoko)  (20285266)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (24303)	
研究分担者	菊地 顕  (Kikuchi Ken)  (40453104)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師    (24303)	
研究分担者	中屋 隆明  (Nakaya Takaaki)  (80271633)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (24303)	

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