

令和 6 年 3 月 25 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03759

研究課題名（和文）生体内でキメラ抗原受容体T細胞機能を制御する細胞製剤の開発

研究課題名（英文）Cell preparation regulating the in vivo function of CAR-T cells

研究代表者

植村 靖史（Uemura, Yasushi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：40364781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：マウス由来の遺伝子改変細胞からサイトカイン依存的に増殖するミエロイド細胞（pMC）を構築した。これを基盤として、T細胞が認識する抗原（トリオボアルブミン：OVA）を発現するpMC（pMC-OVA-Venus）を樹立した。OVA特異的T細胞（OT-I T細胞）とpMC-OVA-VenusをOVA発現担がんマウスに投与したところ、OT-I T細胞単独投与したものよりもがんの成長を抑制した。また、T細胞のIL12受容体架橋シグナルを送達するシステムを導入することにより、抗腫瘍効果が向上して、臨床応用への期待が持てる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、「がん特異性」を人為的に賦与したT細胞を投与することにより、「がん」の免疫学的排除を誘導するキメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞）療法が開発され、血液腫瘍の患者で極めて高い奏効率が示されている。ところが、固形がんに対しては、十分な効果を発揮できていないのが現状である。T細胞応答を制御する細胞製剤を補充投与することで、体内の抗原特異的T細胞を増幅・維持して有効性を向上させることができた。本研究の成果は、生体内でCAR-T細胞応答を制御する新たな医療技術の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cytokine-dependent proliferating myeloid cells (pMC) were constructed from genetically engineered cells derived from mice. OVA-specific T cells (OT-I T cells) and pMC-OVA-Venus were administered to OVA-expressing tumor-bearing mice, and the result showed that OVA-specific T cells (OT-I T cells) and pMC-OVA-Venus inhibited cancer growth better than OT-I T cells alone. In addition, introduction of a cross-linking signal delivery system to the IL12 receptor of T cells enhanced the anti-tumor effect and showed promising results for clinical application.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん 免疫療法 人工多能性幹細胞 キメラ抗原受容体 樹状細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞療法が B 細胞性血液腫瘍の患者で極めて高い奏効率が示されている。しかしながら、「がん患者」の 90 %以上を占める「固形がん」においては、投与後の CAR-T 細胞が持続的な効果を発揮できず、十分な治療成績に繋がっていないのが現状である。

その要因として、CAR-T 細胞は固形がんへの指向性とがん組織浸潤能が低いこと、免疫チェックポイント分子との相互作用による疲弊化、がん抗原消失による免疫逃避などが挙げられる。

今日の CAR-T 細胞療法が抱える問題を克服する為に、国内外の施設で様々な技術開発が進められている。その多くは、CAR-T 細胞そのものの遺伝子改変 (シグナル制御・CAR 構造の改変・液性因子産生能賦与、ケモカイン受容体の発現など) や免疫チェックポイント阻害剤との併用である。

本邦では CAR-T 細胞機能を維持するとともに、がんに対する 2 次的免疫応答を惹起する方法 (玉田ら, Nat Biotechnol. 36:346-351, 2019) CAR-T 細胞のゲノム編集により、長期間に渡って疲弊化を防ぎ、メモリー機能を向上させる方法 (籠谷ら, Blood. 139:2156-2172, 2022) および、若返りを果たした T 細胞 (iPSC 由来 T 細胞) を基盤とする CAR-T 細胞 (金子ら, Nat Biomed Eng. 7:24-37, 2023.) が開発され、実用化が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、特定の細胞の機能修飾により、CAR-T 細胞を生体内で増幅・維持する細胞製剤を開発して、固形がんに対する CAR-T 細胞療法の有効性を向上させ、患者の生命予後の改善に資することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 増殖ミエロイド細胞 pMC-OVA-Venus (pMC-OVA-Venus) の作製

C57BL/6 マウスの pMC は、以前に報告した方法で構築した (Cancer Immunol Res. 2015 Jun;3(6):668-77. Doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0117)。トリオポアルブミン (OVA) - Venus を発現する pMC (pMC-OVA-Venus) は、OVA-Venus 発現レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入して作製した。膜結合型 IL12 を発現する pMC-OVA-Venus (pMC-OVA-Venus-mIL12) は、pMC-OVA-Venus にレンチウイルスベクターを用いて膜結合型 IL12 遺伝子を導入して作製した。遺伝子導入細胞は、Venus、あるいは、IL12 の発現を指標にセルソーターで分離した。

#### (2) 遺伝子発現コンストラクト

膜結合型 IL12 あるいは OVA の合成 cDNA (GenScript) を CSII-EF-MCS あるいは CSII-EF-MCS-IRES-Venus (理研バイオリソースセンター) のマルチクローニングサイト (MCS) に挿入して発現コンストラクトを作製した。

#### (3) 組換えレンチウイルスの作製

293T 細胞に、パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp) Envelope/Rev プラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev) および発現プラスミドを遺伝子導入した。48 時間後、水疱性口内炎ウイルス G 糖タンパク質 (VSV-G) で偽型化した HIV-1 ベースのレンチウイルスベクターを含む上清を採取して濃縮した。

#### (4) サイトカイン依存性細胞増殖能の評価

培地のみ (コントロール) GM-CSF (30 ng/mL)、M-CSF (50 ng/mL)、あるいは、GM-CSF と M-CSF の両者を加えた条件で培養を開始した。0, 1, 2, 3, 4 日目に MTT 試薬を加えて 4 時間後、各ウェルに DMSO を添加して 570 nm の吸光度を測定した。

#### (5) フローサイトメトリー

pMC-OVA-Venus、あるいは、pMC-OVA-Venus-mbIL12 は、Venus、あるいは、IL12 の発現を指標に純度をフローサイトメトリーで確認した。細胞表面マーカーの発現は以下の蛍光標識抗体を用いて評価した。Anti-mouse H-2Kb/Db Ab, anti-mouse I-A/E Ab, anti-mouse CD40 Ab, anti-mouse CD80 Ab, anti-mouse CD86 Ab, anti-mouse CD11b Ab, anti-mouse CD11c Ab, anti-mouse CD33 Ab, anti-mouse F4/80 Ab, anti-mouse CD205 Ab, anti-mouse IL12/23

( 6 ) 抗腫瘍効果の判定

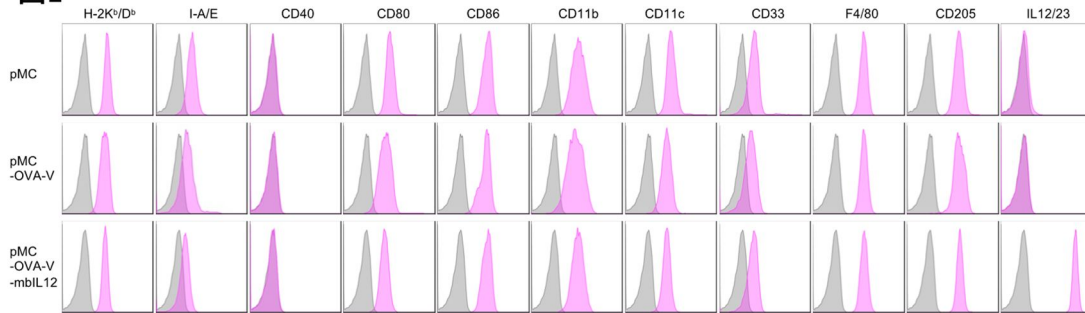
OVA 発現がん細胞 (LL/2-OVA) を移植により生着させた RAG2-KO マウスに、シクロフォスファミド (CPA) を投与して体内の白血球を除去した。その後、OT-I T 細胞を静脈内投与した。さらに、pMC-OVA-Venus (pMC-OVA-V) あるいは、pMC-OVA-Venus-mbIL12 (pMC-OVA-V-mbIL12) を図 3 に示すスケジュールで腹腔内投与した。腫瘍の長径が 20 mm に達した時点でマウスを安楽死させた。抗腫瘍効果は、腫瘍径とマウス生存により評価した。

4 . 研究成果

( 1 ) pMC 構築と表面マーカー発現

pMC は、H-2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup>, I-A/E, CD80, CD86, CD11b, CD11c, CD33, F4/80, CD205 を発現し、pMC 同様に樹状細胞/マクロファージ様の表面分子発現パターンを示した ( 図 1 )。

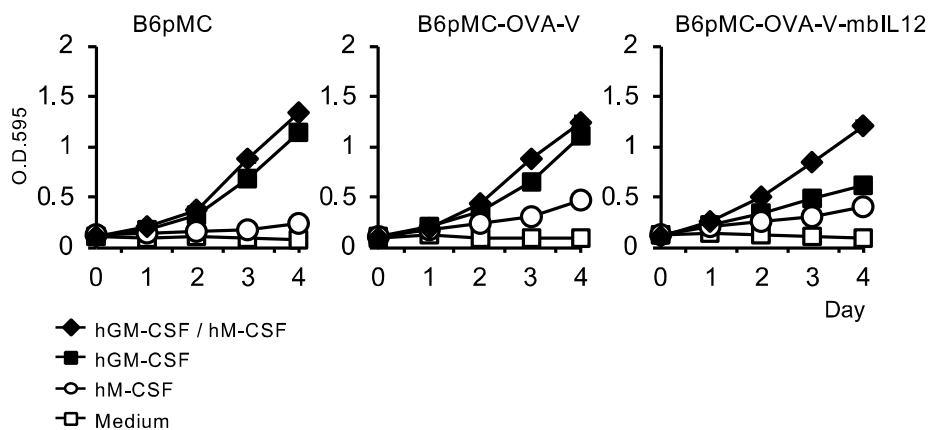
図1



( 2 ) サイトカイン依存性増殖能

pMC-OVA-V および pMC-OVA-V-mbIL12 は、GM-CSF 依存性に増殖し、この増殖は、M-CSF を添加することで更に促進した。培地に GM-CSF と M-CSF を添加して培養すると 3 ヶ月以上増殖を続けた ( 図 2 )。

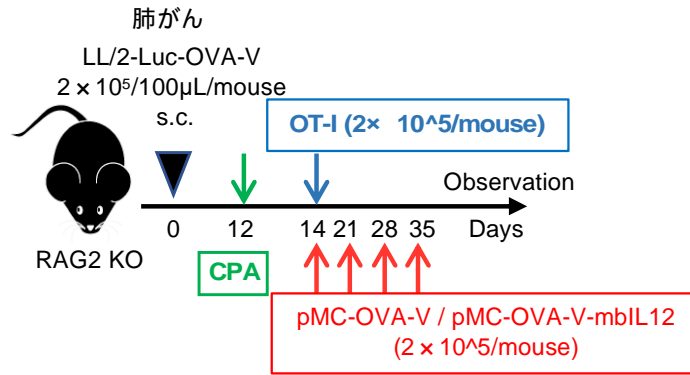
図2



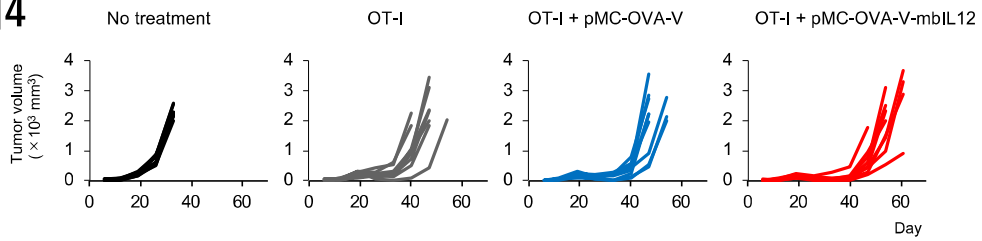
( 3 ) In vivo 有効性評価 (pMC-OVA-V-mbIL12)

OVA 発現がん細胞株 (LL/2-OVA) を生着させた RAG2-KO マウスに、シクロフォスファミド (CPA) を投与して白血球を除去後 (day 12)、OT-I T 細胞 ( $2.0 \times 10^5$ ) を投与した (day 14)、Day 14, 21, 28, 35 に pMC-OVA-V あるいは pMC-OVA-V-mbIL12 ( $2.0 \times 10^5$ ) を腹腔内投与した ( 図 3 )。OT-I T 細胞と pMC-OVA-V の両者を投与した群は、OT-I T 細胞単独投与群よりも、がんの成長を抑制した ( 図 4, 5 )。また、OT-I T 細胞と pMC-OVA-V-mbIL12 の両者を投与した群は、OT-I T 細胞と pMC-OVA-V の両者を投与した群よりも、マウスの生存を延長した ( 図 6 )。

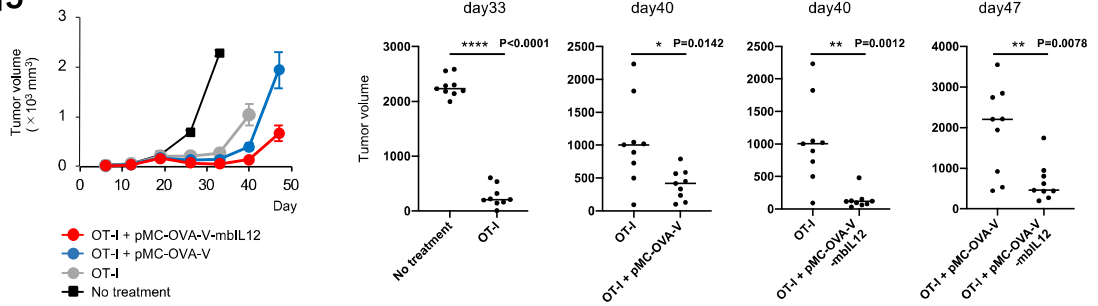
### 図3



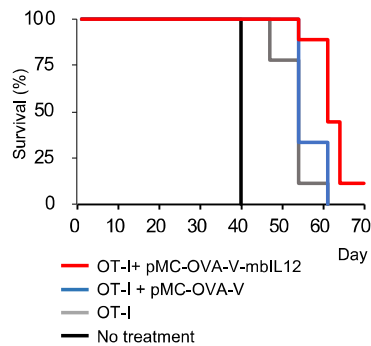
### 図4



### 図5



### 図6



Survival	P value	P value summary
No treatment vs OT-I	<0.0001	****
No treatment vs OT-I + pMC-OVA-V	<0.0001	****
No treatment vs OT-I + pMC-OVA-V-mbIL12	<0.0001	****
OT-I vs OT-I + pMC-OVA-V	0.1187	ns
OT-I vs OT-I + pMC-OVA-V-mbIL12	0.0009	***
OT-I + pMC-OVA-V vs OT-I + pMC-OVA-V-mbIL12	0.0057	**

### 考察

私達は、移入したT細胞を介した効果に限定して評価する為に、OVA 特異的T細胞受容体 (TCR )

を発現する T 細胞 (OT-I T 細胞) と T 細胞を欠損するマウス (RAG2-KO マウス) を用いた。機能的修飾により効果を向上させた pMC は、移入したがん反応性 T 細胞を生体内で維持、増幅して抗腫瘍効果が向上した。また、T 細胞の IL12 受容体を架橋するシステムを導入することにより、抗腫瘍効果がさらに向上することを見出した。一方、pMC を過剰に投与した場合には、効果が減弱したことから、T 細胞の過剰な活性化による細胞死を誘導していること等が考えられ、ヒトに応用するには投与細胞数の検討が必要と考えられる。

本研究では、RAG2-KO マウスと OT-I-T 細胞を用いて評価を行ったが、正常免疫系をもつマウスにおいては、移入 T 細胞応答による抗腫瘍効果に引き続いて、内因性がん抗原に対する 2 次的免疫応答が惹起される可能性を秘めており、更なる効果の向上が期待される。T 細胞の機能的な変化、がん組織における遺伝子発現、浸潤細胞など詳細な機構を明らかにし、臨床開発への可能性を検証したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mashima H, Zhang R, Kobayashi T, Tsukamoto H, Liu T, Iwama T, Hagiya Y, Yamamoto M, Fukushima S, Okada S, Idris A, Kaneko S, Nakatsura T, Ohdan H, Uemura Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Improved safety of induced pluripotent stem cell-derived antigen-presenting cell-based cancer immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev.	6. 最初と最後の頁 171-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2021.03.002.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Mizuhashi S, Kubo Y, Fukushima S, Kanemaru H, Nakahara S, Miyasita A, Ishibashi T, Kuriyama H, Kimura T, Masuguchi S, Zhang R, Iwama T, Nakatsura T, Uemura Y, Senju S, Ihn H.	4. 巻 102
2. 論文標題 Immune cell therapy against disseminated melanoma by utilizing induced pluripotent stem cell-derived myeloid cell lines producing interferon-beta or interleukin-15/interleukin-15 receptor alpha	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 133-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.03.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang B, Iriguchi S, Waseda M, Ueda N, Ueda T, Xu H, Minagawa A, Ishikawa A, Yano H, Ishi T, Ito R, Goto M, Takahashi R, Uemura Y, Hotta A, Kaneko S.	4. 巻 5
2. 論文標題 Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Biomed Eng.	6. 最初と最後の頁 429-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41551-021-00730-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kudo-Saito C, Ogiwara Y, Imazeki H, Boku N, Uemura Y, Zhang R, Kawano-Nagatsuma A, Kojima M, Ochiai A.	4. 巻 11
2. 論文標題 CD11b + DIP2A + LAG3 + cells facilitate immune dysfunction in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5428-5439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shen S, Wu Q, Liu J, Wu L, Zhang R, Uemura Y, Yu X, Chen L, Liu T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Analysis of human glioma-associated co-inhibitory immune checkpoints in glioma microenvironment and peripheral blood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Immunopathol Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/20587384211056505.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuriyama H, Fukushima S, Kimura T, Kanemaru H, Miyashita A, Okada E, Kubo Y, Nakahara S, Tokuzumi A, Nishimura Y, Kajihara I, Makino K, Aoi J, Masuguchi S, Tsukamoto H, Inozume T, Zhang R, Nakatsura T, Uemura Y, Senju S, Ihn H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunotherapy with 4-1BBL-Expressing iPS Cell-Derived Myeloid Lines Amplifies Antigen-Specific T Cell Infiltration in Advanced Melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041958.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Mashima H, Zhang R, Kobayashi T, Hagiya Y, Tsukamoto H, Liu T, Iwama T, Yamamoto M, Lin C, Nakatsuka R, Mishima Y, Watanabe N, Yamada T, Senju S, Kaneko S, Idiris A, Nakatsura T, Ohdan H, Uemura Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of GM-CSF-producing antigen-presenting cells that induce a cytotoxic T cell-mediated antitumor response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncoimmunology.	6. 最初と最後の頁 1814620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2020.1814620.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Shen S, Chen L, Liu J, Yang L, Zhang M, Wang L, Zhang R, Uemura Y, Wu Q, Yu X, Liu T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Current state and future of co-inhibitory immune checkpoints for the treatment of glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Biol Med.	6. 最初と最後の頁 555-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0027.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Kimura T, Fukushima S, Okada E, Kuriyama H, Kanemaru H, Kadohisa-Tsuruta M, Kubo Y, Nakahara S, Tokuzumi A, Kajihara I, Makino K, Miyashita A, Aoi J, Makino T, Tsukamoto H, Nishimura Y, Inozume T, Zhang R, Uemura Y, Senju S, Ihn H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell-derived myeloid cells expressing OX40 ligand amplify antigen-specific T cells in advanced melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pigment Cell Melanoma Res.	6. 最初と最後の頁 744-755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.12887.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda T, Kumagai A, Iriguchi S, Yasui Y, Miyasaka T, Nakagoshi K, Nakane K, Saito K, Takahashi M, Sasaki A, Yoshida S, Takasu N, Seno H, Uemura Y, Tamada K, Nakatsura T, Kaneko S.	4. 巻 111
2. 論文標題 Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1478-1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 植村靖史、福田恭子
2. 発表標題 iPS細胞由来IFN産生ミエロイド細胞を用いたがん免疫療法
3. 学会等名 日本再生医療学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福田 恭子, 植村 靖史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学 増刊	

〔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	福田 恭子 (張工イ)  (Fukuda Kyoko)  (00643719)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員    (82606)	

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