

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07641

研究課題名(和文) 固形腫瘍の腫瘍微小環境改善を目指した複合的遺伝子改変T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of combinatorial CAR-T cell therapy improving immunosuppressive tumor microenvironment

研究代表者

柳生 茂希 (Yagyu, Shigeki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10572547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CAR-T細胞療法において、免疫抑制的な腫瘍微小環境におけるCAR-T細胞の免疫疲弊を防止、CAR-T細胞療法の効果を向上させる事が可能な分子標的薬との併用療法について検討を行った。神経芽腫担がんマウスを用いた検討で、GD2-CAR-T細胞単独投与群に対して、Trametinib+GD2-CAR-T細胞併用群では、CAR-T細胞の過剰な活性化と疲弊が抑制され、相乗的な抗腫瘍効果を認めた。この相乗効果は、腫瘍細胞のRaf/MAPK経路関連遺伝子異常の有無に関わらず認められた。現在、ALK阻害剤である AlectinibとGD2-CAR-T細胞との併用効果についても検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の応用が期待されているが、CAR-T細胞療法の効果を向上させるためには、さらなる遺伝子改変や併用療法の開発が望まれている。本研究は、すでに他疾患で承認されているRaf/MEK阻害剤が、CAR-T細胞の過剰活性化と疲弊を抑制することで相乗的な効果を発揮することを明らかにした。今後、神経芽腫に対してGD2-CAR-T細胞療法が臨床応用されていく中で、分子標的薬との併用療法が有望であることが証明された点で学術的、社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To enhance the efficacy of CAR-T cell therapy for solid tumors, it is important to suppress immunosuppressive mechanisms by the tumor microenvironment. In this study, we investigated the potential of molecularly targeted drugs and combination therapies to prevent CAR-T cells from being exhausted by the immunosuppressive tumor microenvironment and to improve the efficacy of CAR-T cell therapy. A synergistic antitumor effect was observed in the trametinib plus GD2-CAR-T cell combination therapy group compared to the GD2-CAR-T cell monotherapy group in neuroblastoma-bearing murine xenograft model, regardless of the mutation status of Raf/MEK pathway. These results suggest that trametinib suppresses excessive activation and exhaustion of CAR-T cells and synergistically enhances antitumor effects of GD2-CAR-T cells. Based on these findings, the efficacy of alectinib, an ALK inhibitor, in combination with GD2-CAR-T cells in ALK-mutant neuroblastoma is also being investigated.

研究分野：遺伝子細胞療法

キーワード：CAR-T細胞 固形腫瘍 免疫疲弊 神経芽腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性腫瘍の新規細胞免疫療法として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がもつ T 細胞受容体 (TCR) に対して遺伝子改変を加え、直接的かつ選択的に腫瘍細胞を CTL に認識させ、抗腫瘍効果を発揮するという遺伝子改変キメラ抗原受容体 T 細胞 (chimeric antigen receptor T cell; CAR-T) 療法が開発されてきた。すでに、CD19 陽性 B 細胞系腫瘍を対象とした臨床試験で高い有効性が示されたが、固形腫瘍では未だ実用には至っていない。その理由として、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞は免疫抑制的な腫瘍微小環境の影響により、分化、免疫疲弊を起こしやすく、抗腫瘍効果が減弱するためであると考えられている。そのため、さらなる抗腫瘍効果を期待して臨床応用するためには、

- ① 作成した CAR-T 細胞が、体内で抗原刺激による増殖が可能となるように memory T cell phenotype を保持していること、
 - ② CAR-T 細胞作製が簡便かつ安価であること、
 - ③ 予期せぬ副作用が少ない CAR-T 細胞であること、さらには、
 - ④ CAR-T 細胞療法の機能不全を惹起する免疫疲弊が生じにくいさらなる改善や併用療法の開発を行うこと
- が必須と考えられている。

研究代表者は、平成 28 年度科学研究費基盤研究 C の助成を受けて、EPHB4 受容体高発現腫瘍に対して特異的に殺傷することができる新規 CAR-T 細胞を開発した (PCT/JP2017/43729)。さらに、ピギーバックトランスポゾンによる非ウイルス遺伝子改変法で、極めて効率よく CAR-T 細胞を製造する方法を開発した (PCT/JP2019/029942)。本方法で製造した CAR-T 細胞は、現在市販されているウイルス遺伝子改変 CAR-T 細胞と比較して、memory T 細胞分画優位あり抗腫瘍効果が高いこと、また、CAR-T 細胞作製が簡便かつ費用が安価であり、上述の①、②を満たす理想的な性質を有している。

我々の先行研究の結果から、我々の開発した CAR-T 細胞は極めて理想的な形質をもつが、固形腫瘍を標的とする際には、さらに上述の③、④を克服する必要がある。現在まで、予期せぬ副作用の軽減や免疫疲弊の回避のために様々な工夫が報告されているが、いずれも臨床応用には至っていない。我々は、先行研究の結果から、すでに CAR-T 細胞における免疫逃避機構や CAR-T 細胞の異常活性化に関わる分子機構を解明している。本研究では、これらの新規知見を用いて、CAR-T 細胞の効果と安全性を高める新規遺伝子改変や分子標的薬との併用療法を開発することを目的とする。

CAR-T 細胞製剤はその殆どが欧米からの報告であるが、現在まで、非ウイルス遺伝子改変法による理想的な形質を有した CAR-T 細胞の報告はなく、また、固形腫瘍を標的とするための免疫抑制的な分子機構の解明とそれに基づいた併用療法の開発に関する報告は少なく、我々の手法は学術的にも極めて独自性が高く、かつ解明が急務な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が平成 29 年度基盤研究 C で、世界に先駆けて開発した memory T 細胞の性質を有する非ウイルス遺伝子改変 CAR-T 細胞製剤を難治性固形腫瘍治療に臨床応用するために、さらなる遺伝子改変や併用療法の開発を行うことを主目的とする。

具体的には、研究期間内に以下の 2 点を明らかにし、臨床応用への橋渡しを行う。

- ①腫瘍微小環境による免疫逃避機構出現を回避させる事が可能な分子標的薬と、CAR-T 細胞による複合的な遺伝子改変細胞療法の開発
- ②Off target 効果による予期せぬ有害事象出現時に、CAR-T 細胞による細胞傷害を完全に停止させるためのセーフガードシステムの開発

3. 研究の方法

本研究では以下の研究方法に基づいて研究を遂行する。

- ①非ウイルス遺伝子改変法による CAR-T 細胞の作成
健康人ドナーより採取した末梢血単核球に、CAR 遺伝子、ピギーバック転移酵素をそれぞれ有するプラスミドベクターを遺伝子導入し、これを自己末梢血単核球由来遺伝子改変フィーダー細胞とともに 14 日間培養を行うことで CAR-T 細胞を作製する。研究代表者らは既に CD19、GD2、HER2、EPHB4 をはじめ多種多様な抗原を認識できる CAR-T 細胞が作製可能であることを確認している (特許出願済、PCT/JP2019/029542)。

②CAR-T 細胞と腫瘍細胞との共培養系における免疫抑制性因子の解析と治療への応用
一例として GD2 を特異的に認識し、殺傷する GD2-CAR-T 細胞の実験例を示す。GD2 を高発現している神経芽腫細胞株と、我々が作成した GD2-CAR-T 細胞を、細胞比 1:1、サイトカイン比存在下で 24 時間共培養する。培養後腫瘍細胞、CAR-T 細胞をそれぞれマグネットビーズで分取する。腫瘍細胞より total RNA を抽出し、網羅的シーケンス解析とパスウェイ解析を行うことで、共培養下で惹起される腫瘍側の免疫抑制性因子の発現機構を解析する。すでに、腫瘍細胞に発現する免疫抑制因子の発現に関わる分子機構とその阻害剤候補 A を同定しており、GD2-CAR-T 細胞と分子標的薬 A の併用により、相乗的に抗腫瘍効果が見られることを見出しているが、本研究では、その他の分子機構とこれらに関連する分子標的薬候補のスクリーニングを進め、in vitro、in vivo での併用効果を検討する。

③CAR-T 細胞異常活性化に関与する分子機構の解明と治療への応用

②と同様の手法で CAR-T 細胞を分取し、網羅的シーケンス解析とパスウェイ解析を行うことで、CAR-T 細胞の活性化に関わる分子機構を解析する。先行研究の結果から、CAR-T 細胞の異常活性化に関連する分子機構の一端を見出し、分子標的薬 C の投与によって CAR-T 細胞の活性化が遮断できることが確認できたが、本研究では、その他の分子機構とこれらに関連する分子標的薬候補のスクリーニングを進め、in vitro、in vivo での効果を検討する。

4 . 研究成果

本研究では、CAR-T 細胞療法において、免疫抑制的な腫瘍微小環境における CAR-T 細胞の免疫疲弊を防ぎ、CAR-T 細胞療法の効果を向上させる事が可能な分子標的薬の探索と、併用療法の可能性について検討を行った。例として、我々が開発した GD2 特異的 CAR-T 細胞(GD2-CAR-T 細胞)を用いた。GD2 陽性神経芽腫細胞に対して、GD2-CAR-T 細胞を作用させると、抗腫瘍効果を認めるが、同時に CAR-T 細胞上に免疫疲弊マーカーである PD-1 が誘導された。Raf/MEK 阻害剤である Trametinib 存在下で神経芽腫細胞と GD2-CAR-T 細胞を共培養したところ、抗腫瘍効果は減弱するものの PD-1 誘導は抑制された。また、Trametinib は GD2-CAR-T 細胞の増殖には影響を与えなかった。一方で、神経芽腫担がんマウスを用いた検討では、GD2-CAR-T 細胞単独投与群に対して、Trametinib+GD2-CAR-T 細胞併用群では相乗的な抗腫瘍効果を認めた。この相乗効果は、腫瘍細胞の Raf/MAPK 経路関連遺伝子異常の有無に関わらず認められた。以上の結果より、Trametinib は担がんマウス内で CAR-T 細胞の過剰な活性化と疲弊を抑制し、相乗的に CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を高めている可能性が示唆された。

(Tomida A, Yagyu S, et al. Cancer Sci. 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Suematsu Masaya, Yagyu Shigeki, Nagao Nobuyoshi, Kubota Susumu, Shimizu Yuto, Tanaka Miyuki, Nakazawa Yozo, Imamura Toshihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 PiggyBac Transposon-Mediated CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Derived From CD45RA-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells Possess Potent and Sustained Antileukemic Function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 770132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.770132	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 Tomida Akimasa, Yagyu Shigeki, Nakamura Kayoko, Kubo Hiroshi, Yamashima Kumiko, Nakazawa Yozo, Hosoi Hajime, Iehara Tomoko	4. 巻 112
2. 論文標題 Inhibition of MEK pathway enhances the antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against neuroblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4026 ~ 4036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15074	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 Nakamura Kayoko, Yagyu Shigeki, Hirota Shogo, Tomida Akimasa, Kondo Makoto, Shigeura Tomokuni, Hasegawa Aiko, Tanaka Miyuki, Nakazawa Yozo	4. 巻 21
2. 論文標題 Autologous antigen-presenting cells efficiently expand piggyBac transposon CAR-T cells with predominant memory phenotype	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 315 ~ 324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2021.03.011	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 Kubo Hiroshi, Yagyu Shigeki, Nakamura Kayoko, Yamashima Kumiko, Tomida Akimasa, Kikuchi Ken, Iehara Tomoko, Nakazawa Yozo, Hosoi Hajime	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of non-viral, ligand-dependent, EPHB4-specific chimeric antigen receptor T cells for treatment of rhabdomyosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 646 ~ 658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2021.03.001	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 Hasegawa Aiko, Saito Shoji, Narimatsu Shogo, Nakano Shigeru, Nagai Mika, Ohnota Hideki, Inada Yoichi, Morokawa Hirokazu, Nakashima Ikumi, Morita Daisuke, Ide Yuichiro, Matsuda Kazuyuki, Tashiro Haruko, Yagyu Shigeki, Tanaka Miyuki, Nakazawa Yozo	4. 巻 10
2. 論文標題 Mutated GMCSF based CAR T cells targeting CD116/CD131 complexes exhibit enhanced anti tumor effects against acute myeloid leukaemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 1282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1282	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 Yagyu Shigeki, Mochizuki Hidemi, Yamashima Kumiko, Kubo Hiroshi, Saito Shoji, Tanaka Miyuki, Sakamoto Kengo, Shimoi Akihito, Nakazawa Yozo	4. 巻 10
2. 論文標題 A lymphodepleted non human primate model for the assessment of acute on target and off tumor toxicity of human chimeric antigen receptor T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1291	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 Kubo Hiroshi, Yagyu Shigeki, Nakamura Kayoko, Yamashima Kumiko, Tomida Akimasa, Kikuchi Ken, Iehara Tomoko, Nakazawa Yozo, Hosoi Hajime	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of non-viral, ligand-dependent, EPHB4-specific chimeric antigen receptor T cells for treatment of rhabdomyosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 646 ~ 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2021.03.001	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 Morokawa Hirokazu, Yagyu Shigeki, Hasegawa Aiko, Tanaka Miyuki, Saito Shoji, Mochizuki Hidemi, Sakamoto Kengo, Shimoi Akihito, Nakazawa Yozo	4. 巻 9
2. 論文標題 Autologous non human primate model for safety assessment of piggyBac transposon mediated chimeric antigen receptor T cells on granulocyte/macrophage colony stimulating factor receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 e1207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1207	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 Nakamura Kayoko, Yagyu Shigeki, Hirota Shogo, Tomida Akimasa, Kondo Makoto, Shigeura Tomokuni, Hasegawa Aiko, Tanaka Miyuki, Nakazawa Yozo	4. 巻 21
2. 論文標題 Autologous antigen-presenting cells efficiently expand piggyBac transposon CAR-T cells with predominant memory phenotype	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 315 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2021.03.011	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 柳生茂希
2. 発表標題 Memory-rich CAR-T cell engineering by piggyBac transposon system for solid malignancies.
3. 学会等名 第44回日本造血細胞・細胞療法学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 Memory-rich CAR-T cell engineering by piggyBac transposon system for solid malignancies.
3. 学会等名 25th ASGCT 25TH ANNUAL MEETING (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 piggyBac transposon-mediated CAR-T cells for solid tumors - A promising approach for clinical application.
3. 学会等名 International Conference on Lymphocyte Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 Lymphodepleted non-human primate model for the assessment of acute on-target/off-tumor toxicity of human CAR-T cells.
3. 学会等名 49th Annual Scientific Meeting of the Australian and New Zealand Society for Immunology, ASI 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳生茂希
2. 発表標題 Non-viral gene transfer based chimeric antigen receptor T cells for solid tumors.
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 piggyBac transposon-mediated CAR-T cells for solid tumors - A promising approach for clinical application.
3. 学会等名 The 12th JSH International Symposium 2021 in Kamakura (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 piggyBac transposon-mediated CAR-T cells - A promising and realistic approach for clinical application.
3. 学会等名 International Society of Cell Therapy 2020 Virtual. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 piggyBac transposon mediated CAR-T cells for solid tumor - A promising and realistic approach for clinical application.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yagyu S
2. 発表標題 Recent advances of CAR-T cell therapy for pediatric solid tumors.
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小澤 敬也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 240
3. 書名 いま、本格化する 遺伝子治療	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 C A R 発現免疫細胞を含む細胞集団の製造方法	発明者 柳生茂希ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/029308	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	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	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)	

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