

令和 5 年 5 月 24 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：20K07679

研究課題名（和文）CD19発現型AdVとCD19 CAR-T細胞を組み合わせた遺伝子細胞治療戦略

研究課題名（英文）Gene and cell therapy combining CD19-expressing adenovirus and CD19 CAR-T cells

研究代表者

吉田 秀樹（Yoshida, Hideki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10643546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：CD19-Rh30の作成：CD19を組み込んだトランスポゾンプラスミドをエレクトロポレーション法でRh30に導入した。puromycinにてセレクションを行い、フローサイトメトリーによりCD19が安定して発現していることを確認した。CD19-Rh30とCD19 CAR-Tとの共培養：作成したCD19-Rh30とCD19 CAR-Tの共培養（E:T= 1:1）したところ、CD19-Rh30はDay 3のフローサイトメトリーで全滅した。一方野生型のRh30では同じ条件で全て生存していた。これらはいずれも再現性をもって確認できた。CD19-OAdの開発は継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、CD19を強制発現させたRh30をCD19 CAR-Tで殺傷することに成功した。将来的にCD19陰性腫瘍細胞を「CD19陽性化」させることで既存のCD19 CAR-T細胞療法の抗腫瘍効果を他の癌腫にも有効に活用するとともに、新たなCAR-T細胞製剤開発の不要なコストを大幅に削減することにつながる足がかりを得た。

研究期間中、新型コロナウイルスの影響により米国からウイルス作製における重要なプラスミドが届かず、作製が大幅に遅れるアクシデントがあったが、「ウイルスによる遺伝子療法」とCAR-T細胞の併用にという我々の研究は、学術的にも独自性・創造性が高く、かつ臨床への応用が急務な課題であると確信する。

研究成果の概要（英文）：Preparation of CD19-Rh30: Transposon plasmids incorporating CD19 were introduced into Rh30 by electroporation, selection was performed with puromycin, and stable expression of CD19 was confirmed by flow cytometry. Co-culture of CD19-Rh30 with CD19 CAR-T: When CD19-Rh30 and CD19 CAR-T were co-cultured (E:T=1:1), CD19-Rh30 was completely destroyed by flow cytometry on Day 3. On the other hand, all wild-type Rh30 cells survived under the same conditions. Development of CD19-OAd is ongoing.

研究分野：腫瘍溶解性アデノウイルス

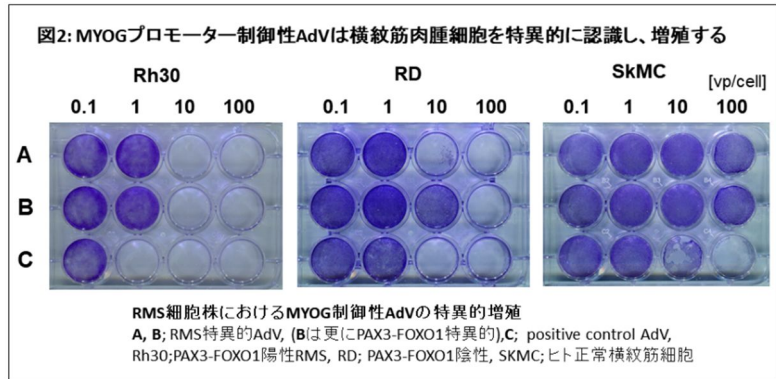
キーワード：腫瘍溶解性アデノウイルス CAR-T CD19 横紋筋肉腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

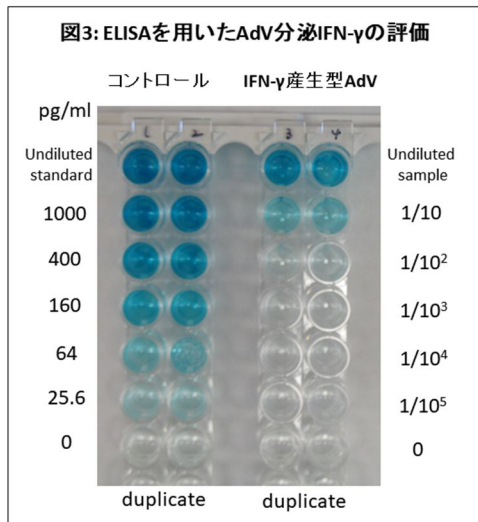
アデノウイルスはエンベロープをもたない約 35kb サイズの二重鎖 DNA ウィルスで、C 群に属する 5 型は最も構造解析がなされ、多くの遺伝子治療臨床研究に使用されてきた。その特徴として、多くの細胞腫に高い遺伝子導入効率を示すこと、分裂・非分裂細胞のいずれにも導入可能であること、

比較的大きな遺伝子 (最大 8kb) が導入可能であること、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いこと等が挙げられ、非常に安全性・利便性の高いベクターである。AdV の選択的特異性を高める方法の一つがウィルス遺伝子の転写に必須である E1 gene の発現をがん特異的プロモーターで制御することである。(Yamamoto et al. Mol. Ther. 2010)。研究代表者はミネソタ大学留学中に、小児がんを代表する横紋筋肉腫に対する特異的プロモーター制御 AdV を開発し、既に報告済みで (図 2)。また AdV は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ができる。実際、我々は AdV に IFN- $\gamma$  を



産生させることに成功し、この技術を確立している (図 3)。2010 年以降、米国において CD19 抗原を標的とした多数の CAR-T 細胞療法に関連した臨床試験が行われ、慢性白血病、成人および小児の急性リンパ性白血病、B 細胞性非ホジキンリンパ腫といった様々な再発・治療不応性の B 細胞性血液腫瘍に対して高い奏効率が報告された。固形腫瘍においても、現在 GD2、HER-2、CEA、CD133、Mesothelin など様々な表面抗原を標的とした CAR-T 細胞の開発が進められているものの、未だ有用な標的を見いだせていないがん腫も多い。また標的抗原ごとに CAR-T 細胞製剤を開発することが余儀なくされ、結果的に生産コストが非常に高いものとなっている。

これらのことを鑑み、治療対象となるがん細胞の表面にある抗原を探求し、特異的に認識・殺傷する CAR-T 細胞製剤を種類ずつ作成する従来の方法とは逆の発想で、AdV を用いて CD19 抗原を腫瘍細胞表面に強制的に発現させることで、本来 CD19 陰性の腫瘍細胞であっても既存の CD19 CAR-T 細胞療法によって抗腫瘍効果が得られると考えるに至った。



## 2. 研究の目的

【目的】AdV により CD19 陰性腫瘍細胞を「CD19 陽性化」させ、既存の CD19 CAR-T 細胞療法の抗腫瘍効果を他の癌腫にも有効に活用するとともに、新たな CAR-T 細胞製剤開発の不要なコストを大幅に削減する。

CAR-T 細胞療法は血液腫瘍での目覚ましい成果とは裏腹に、固形腫瘍ではその効果は限定的である。手術で摘出できない、あるいは摘出すると機能的に重大な後遺症を残す場合、化学療法や放射線治療が選択肢に挙がるが、これらが十分な効果を示さないことは臨床においてしばしば直面する悩ましい問題である。

我々は、この状況を克服する一つの方法として遺伝子発現型 AdV と、CD19 CAR-T 細胞を組み合わせることに着目した。「ウイルスによる遺伝子療法」と CAR-T 細胞の併用によるがん治療の報告は少なく、また既存の製剤を使用できることから、我々の研究は学術的にも独自性・創造性が高く、かつ臨床への応用が急務な課題であると考える。

### 3. 研究の方法

上記の背景や研究成果をもとに、以下の研究方法に基づいて研究を遂行する。

#### CD19 安定発現細胞株 (CD19-Rh30) の作製

CD19 をクローニングし、組み込んだ pcDNA3.1 プラスミドをリポフェクションして Rh30 に導入する。puromycin にてセレクションを行い、フローサイトメトリーにより CD19 が発現していることを確認する。

#### CD19 CAR-T の「CD19 陽性化」腫瘍に対する抗腫瘍効果の確認

作製した CD19-Rh30 と CD19 CAR-T を様々な E : T 比で共培養を行う。具体的には Day -1 に Rh30 をプレートに播種し、Day 0 に CD19-CAR-T cell を添加、Day 3 にフローサイトメトリーを行う。Rh30 の WT と CD19-Rh30 を比較することで抗腫瘍効果を評価する。

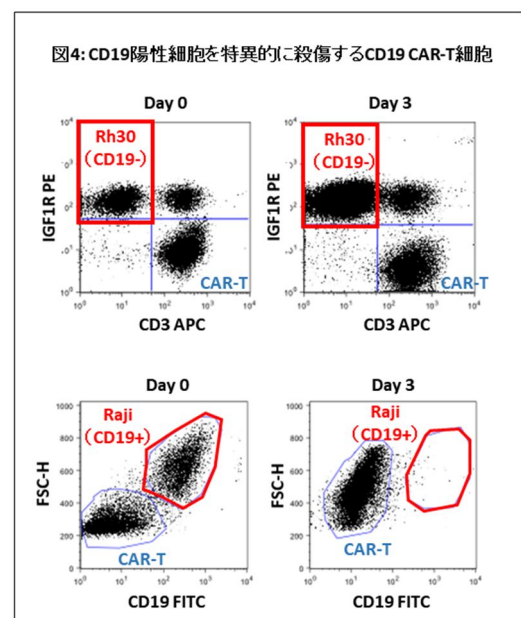
#### CD19 発現型遺伝子改変 AdV の開発

pShuttle ベクターの発現カセットに CD19 の細胞外分子を遺伝子導入し、pTG3602 アデノウイルス構造プラスミドを大腸菌 (BJ5183 株) に同時に形質転換し、相同性組換えを誘発することにより、目的遺伝子を含む発現カセットを AdV のゲノム内へ移行させる。構築された組換え AdV を、ヒト線維芽細胞にインフェクションし、遺伝子組換えアデノウイルスを生産する。作成された遺伝子組換えアデノウイルスをヒト線維芽細胞 (CD19 陰性; 感染効率高い) 横紋筋肉腫細胞株 (CD19 陰性; 感染効率低い) に感染させ、細胞表面の CD19 の発現をフローサイトメトリーで評価する。

#### CD19 発現型 AdV と CD19 CAR-T 併用による、「CD19 陽性化」腫瘍に対する抗腫瘍効果の証明)

で作成した AdV をヒト線維芽細胞および横紋筋肉腫細胞株に感染させ、CD19 CAR-T 細胞 (本研究室で開発済み; 図 4) を様々な比率で共培養し、in vitro において抗腫瘍効果をフローサイトメトリー、および xCELLigence を用いた normalized cell index により評価する。

また in vivo における CD19 発現型 AdV と CD19 CAR-T の併用治療効果の評価目的に、 $5 \times 10^6$  個の横紋筋肉腫細胞株 Rh30 細胞を 6 週齢の NSG マウス皮下に接種し、腫瘍形成後、 $3 \times 10^{10}$  vp の CD19 発現型 AdV を腫瘍内投与し、「CD19 陽性化」による CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の差を腫瘍サイズの計測により検討する。また腫瘍内への CAR-T 細胞の集積を免疫染色で評価する。



#### 4. 研究成果

##### CD19-Rh30 の作製

pcDNA3.1 を用いて遺伝子導入を試みたが、継代を繰り返すと puromycin を使用しているにもかかわらず CD19 の発現が低下していき、系として安定しなかった。そこで、CD19 を組み込んだトランスポゾンプラスミドを用いてエレクトロポレーション法で Rh30 に導入することにした。puromycin にてセレクションを行い、フローサイトメトリーを行ったところ、CD19 が発現していることが確認できた。継代後も発現が再現性をもって確認した。(図 5)

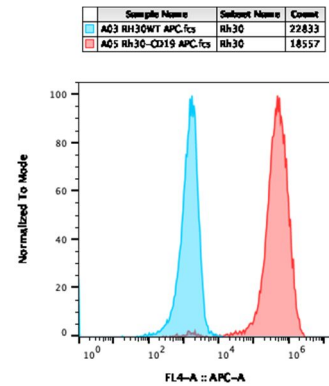
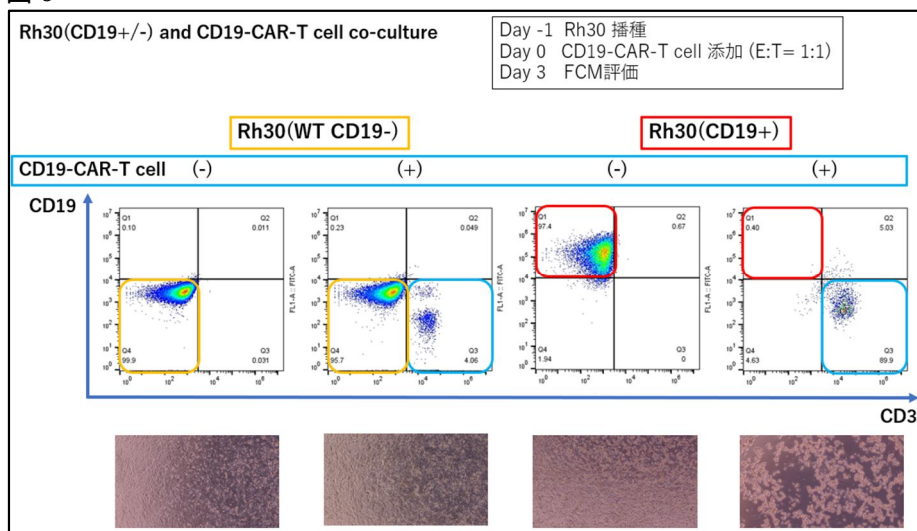


図 5

##### CD19-Rh30 と CD19 CAR-T との共培養

作成した CD19-Rh30 と CD19 CAR-T の共培養 (E:T= 1:1)したところ、CD19-Rh30 は Day 3 に全滅することをフローサイトメトリーで確認した。一方野生型の Rh30 では同じ条件で全て生存していた。これらはいずれも再現性をもって確認できた。(図 6)

図 6



CD19-OAd の開発については、本研究期間中、新型コロナの影響により米国からウイルス作製における重要なプラスミドが届かず、また届いた後も co-transformation における至適な条件設定に時間を要し、作製が大幅に遅れている。

今回、CD19 を強制発現させた Rh30 を CD19 CAR-T で殺傷することに成功した。将来的に CD19 陰性腫瘍細胞を「CD19 陽性化」させることで既存の CD19 CAR-T 細胞療法の抗腫瘍効果を他の癌腫にも有効に活用するとともに、新たな CAR-T 細胞製剤開発の不要なコストを大幅に削減することにつながる足がかりを得たと考える。

ウイルス作製に関し、作製が大幅に遅れるアクシデントがあったが、「ウイルスによる遺伝子療法」と CAR-T 細胞の併用という我々の研究は、学術的にも独自性・創造性が高く、かつ臨床への応用が急務な課題であると確信する。

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	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