

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16439

研究課題名(和文) iPS細胞由来CAR-T細胞を用いた固形がんに対する傷害機能向上技術の開発

研究課題名(英文) Development of the killing function of iPSC derived CAR-T cell for solid tumor.

研究代表者

三嶋 雄太 (Mishima, Yuta)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80770263

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)：本研究では、固形がんを治療するための免疫細胞機能向上を目的に(1)標的のがん細胞に対して向かっていく能力[遊走性/浸潤性]、(2)がん細胞を攻撃する能力[傷害性]、(3)自分の分身を増やす能力[増殖性]の3つの能力を向上させる重要な遺伝子を探すために、これらの3つの能力に差のある細胞を選り分ける事のできるこれまでにないデバイスの開発を行った。また、その技術が本当に能力に差のある免疫細胞を選り分けることができるのかを、実際のがん細胞を使って確かめることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では独自に研究代表者らが開発した3つの新規技術「マイクロ流体デバイスを用いた運動機能による細胞選別方法」、T細胞と腫瘍組織との相互作用がin vitroでイメージング可能な「Tumor-on-a-chip」、iPS細胞由来CAR-T細胞(CAR-iPS-T細胞)作製技術」をツールとして用いることにより、固形がんにおけるT細胞の遊走能力や浸潤能力の制御メカニズムの解明に取り組む。今回、免疫細胞を標的細胞への遊走性で選り分けることのできるこれまでにないデバイスの開発に成功した。これにより選別された免疫細胞を用いて、抗腫瘍効果に影響を及ぼす因子のスクリーニングができる可能性を拓いた。

研究成果の概要(英文)：This investigation sought to identify crucial genes that enhance three fundamental capabilities associated with immune cells, namely (1) migration/invasion, which refers to the ability to move toward target cancer cells, (2) injury, which denotes the capacity to attack cancer cells, and (3) proliferation, which pertains to the ability of cells to multiply themselves. This project aims to enhance immune cell function to treat solid tumors. To achieve this aim, I have developed a groundbreaking device capable of isolating cells that exhibit variations in these three capacities. Moreover, I have successfully validated the efficacy of the technology in isolating immune cells with diverse abilities by utilizing actual cancer cells.

研究分野：腫瘍免疫学、幹細胞学

キーワード：がん免疫治療 IPS細胞 CAR-T細胞治療 マイクロ流体デバイス 免疫細胞分化 AI画像解析

1. 研究開始当初の背景

近年、がん免疫療法の分野において、抗原を特異的に認識するキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) を導入した T 細胞によるがん免疫細胞療法 (CAR-T 細胞療法) が、これまで難治であった症例に対しても有効性が示されており (N Engl J Med 377:2531, 2017)、血液がんにおいては完全寛解を含む劇的な効果が報告されている (Science 359:1361, 2018)。CAR-T 細胞に関連した臨床試験の NIH データベース登録数は 430 を超えており、世界的にも多くの製薬企業、バイオテクノロジー企業が参入する領域となっている。本邦においては 2019 年に血液がんを対象にした CAR-T 細胞療法が初の保険適用となった。しかしながら一方で、固形がんに対する CAR-T 細胞療法における効果は未だに限定的であり、血液がん以外のがんを標的とした治療法に関しては克服すべき課題が多い (Cell Death Dis 9:282, 2018)。

2. 研究の目的

一つ一つの細胞として体内を循環している血液がんに対し、固形がんは特定の箇所には局在し、特殊な細胞集団を形成して塊として存在している。がん微小環境と呼ばれるこの環境が免疫細胞抑制的に働き、免疫細胞療法の抗腫瘍効果を減弱させていると考えられている (Science 348:74, 2015)。そのため、免疫細胞が固形がんにおいて抗腫瘍効果を示すためには、腫瘍組織近傍まで血管内を遊走し、がん組織内に浸潤、抗原を正しく認識し、抗原感作刺激により増殖した後、がん細胞に対して傷害作用を発揮する必要がある。キメラ抗原受容体の発明と応用は、抗原を正しく認識し、傷害作用を強力、かつ特異的に発揮させるために画期的なものであったが、CAR-T 細胞療法の効果が血液がん領域にほぼ限定的であることから、固形がんに関して効果を発揮するためには遊走、浸潤能力に関する能力の向上が必要と考えられる。そこで本研究では、研究代表者らがこれまでに開発した新規技術を用いて、固形がんにおける免疫 T 細胞の腫瘍への遊走能力や浸潤能力がいかんして制御されているか、そのメカニズムと細胞傷害性効果との関係をより詳細に明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では独自に研究代表者らが開発した 3 つの新規技術

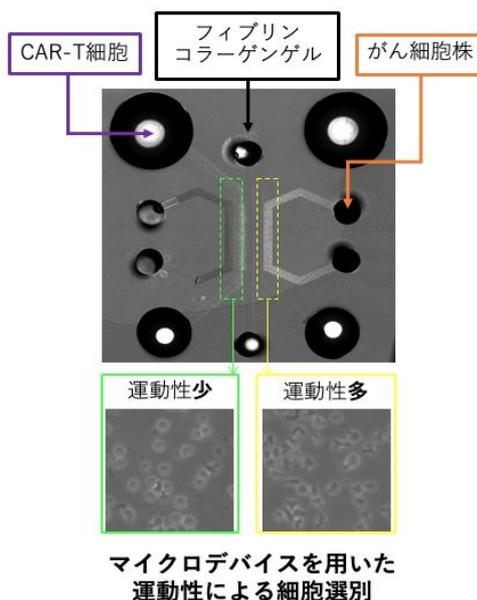
- (1) マイクロ流体デバイスを用いた運動機能による細胞選別方法
- (2) T 細胞と腫瘍組織との相互作用が *in vitro* でイメージング可能な「Tumor-on-a-chip」
- (3) iPS 細胞由来 CAR-T 細胞 (CAR-iPS-T 細胞) 作製技術

をツールとして用いることにより、固形がんにおける T 細胞の遊走能力や浸潤能力の制御メカニズムの解明に取り組む。また、それらの運動機能を制御し、抗腫瘍効果に影響を及ぼす因子をスクリーニングにより同定する。得られた候補因子を用いて実際に T 細胞の固形がんにおける抗腫瘍効果を向上させることが可能か *in vitro* において検討に取り組む。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスを用いた T 細胞の標的に対する遊走能力の違いによる機能スクリーニングを確立した。また、遊走能力の高い細胞集団と低い集団から RNA を抽出し、遺伝子発現の違いを解析し、集団間で発現量に差のある遺伝子群のリストを明らかにした。

具体的には、等しく抗原刺激を受けた活性化 T 細胞集団において、運動性の高い T 細胞と低い T 細胞が確認されるが、その集団を選別する系を構築した。(図 1) 運動性が高く障害能力が高い T 細胞に優位に発現している遺伝子群から、実際に遊走能力や浸潤能力に影響を与え、固形がんにおける、免疫細胞療法の抗腫瘍効果を向上させることができる可能性の高い遺伝子をスクリーニングした。(細胞群間の遺伝子発現プロファイルを取得し、そこから差のある遺伝子群の抽出を行い、発現変動解析 (Differential Expressed Genes: DEG) を行うことにより細胞傷害性、または遊走性の能力を増強させる可能性のある遺伝子群を特定した。)



(2) (1)で構築したマイクロデバイスによって選別されたT細胞群、すなわち運動性の高いT細胞と低いT細胞では、標的細胞に対する実際の傷害能力に差があることを独自の評価系を構築して確認することができた。(図2)

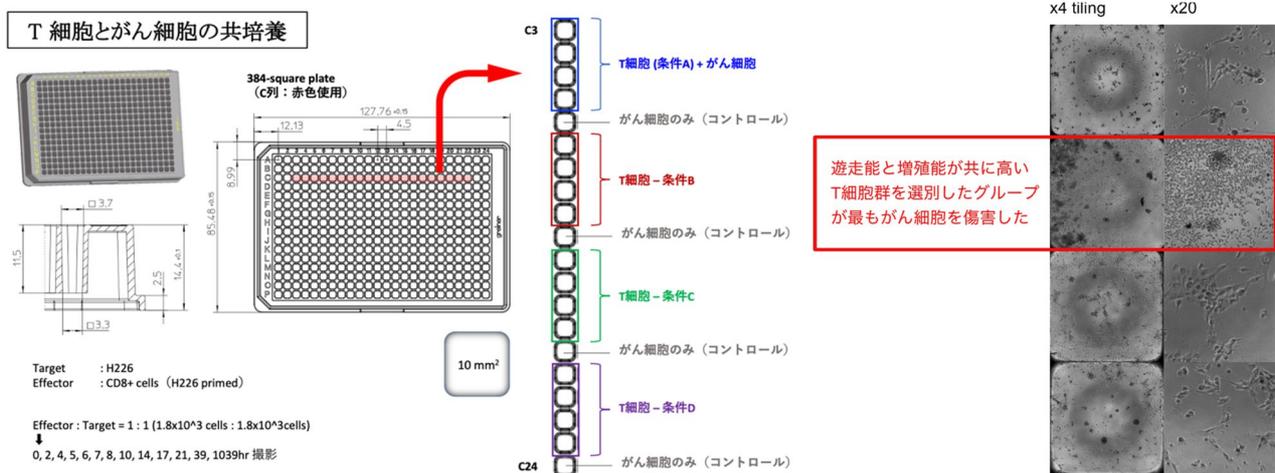


図 2

(3) (2)で選別したT細胞の細胞傷害時における動態をマイクロデバイス上で詳細に長時間解析するための光学的なシステムの検討が進捗した。本プロジェクトで目指す解像度でT細胞の動きを高精細に捉えるためには、蛍光を使った共焦点顕微鏡によるタイムラプス撮影が必要であった。しかしながら、活性化されたT細胞ほど活発に動き回るため、高倍率、高感度を維持しつつ広範囲にタイムラプス撮影するためには、できる限り高速の撮影が必要であり、同時に低侵襲性の光源と最低限の曝露時間を最適化させる必要があった。そのため、その最適条件を検討すべく、スピニングディスクタイプの共焦点顕微鏡を選定し、AO/PI溶液中で細胞の動きと生死判定を同時に行うことで、T細胞の動きを長期間タイムラプスで補足するための条件の最適化をおこなえるシステム構築に取り組んだ。現在、時間あたりのフレーム数や露光時間やレーザー強度の違いにより、撮影により生じる毒性をAO/PI色素の蛍光強度により検出できる系の構築に成功した。今後、T細胞をもっとも低毒生活長時間(24hr以上)撮像し続けるための条件の探索をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takei Hisashi, Coelho Silva Juan Luiz, Tavares Leal Cristina, Queiroz Arantes Rocha Adriana, Mantello Bianco Thiago, Welner Robert S., Mishima Yuta, Kobayashi Ikei S., Mullally Ann, Lima Keli, Machado Neto Joao Agostinho, Kobayashi Susumu S., Lobo de Figueiredo Pontes Lorena	4. 巻 113
2. 論文標題 Suppression of multiple anti apoptotic BCL2 family proteins recapitulates the effects of JAK2 inhibitors in JAK2V617F driven myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 597-608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15210	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 Iriguchi Shoichi, Yasui Yutaka, Kawai Yohei, Arima Suguru, Kunitomo Mihoko, Sato Takayuki, Ueda Tatsuki, Minagawa Atsutaka, Mishima Yuta, Yanagawa Nariaki, Baba Yuji, Miyake Yasuyuki, Nakayama Kazuhide, Takiguchi Maiko, Shinohara Tokuyuki, Nakatsura Tetsuya, Yasukawa Masaki, Kassai Yoshiaki, Hayashi Akira, Kaneko Shin	4. 巻 12
2. 論文標題 A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20658-3	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 Hiroaki, Zhang Rong, Kobayashi Tsuyoshi, Hagiya Yuichiro, Tsukamoto Hirotake, Liu Tianyi, Iwama Tatsuki, Yamamoto Masateru, Lin Chiahsuan, Nakatsuka Ryusuke, Mishima Yuta, Watanabe Noriko, Yamada Takashi, Senju Satoru, Kaneko Shin, Idiris Alimjan, Nakatsura Tetsuya, Ohdan Hideki, Uemura Yasushi	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 三嶋雄太	4. 巻 41巻2号
2. 論文標題 がん免疫細胞療法のT細胞評価を可能とするチップ技術の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 真の実臨床応用をめざした再生医療2023	6. 最初と最後の頁 94-100
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 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuta Mishima, Shin Kaneko and Yu-suke Torisawa
2. 発表標題 Modeling of Tumor-on-a-Chip using HLA edited iPS cell-derived vascular endothelial cells for cancer immune cell therapy
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Mishima, Masazumi Waseda, Hitomi Takakubo, Chihiro Mori, Emi Sano, Wang Bo, Tatsuki Ueda, Shoichi Iriguchi, Yuka Ozaki, Shin Kaneko, Yu-suke Torisawa
2. 発表標題 MODELING CANCER IMMUNOTHERAPY IN A PERFUSABLE 3D VASCULARIZED TUMOR-ON-A-CHIP USING HLA-KO UNIVERSAL HUMAN IPSC-DERIVED ENDOTHELIAL CELLS
3. 学会等名 ISSCR 2020 Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三嶋 雄太、早稲田 真澄、高久保 瞳、森 千寿、佐野 絵美、王 博、上田 樹、金子 新、鳥澤 勇介
2. 発表標題 がん免疫細胞療法の評価を目的としてiPS細胞由来血管内皮細胞を用いたTumor-on-a-Chipの開発
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------