

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16869

研究課題名（和文）小児悪性固形腫瘍に対するCAR-T療法の新規開発—iPS細胞の利点を生かして—

研究課題名（英文）Development of CAR-T cell therapy for pediatric solid malignancy using advantages of induced pluripotent stem cells

研究代表者

渡辺 紀子（Watanabe, Noriko）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50526176

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：小児の悪性固形腫瘍に発現するCD99を標的として、遺伝子操作性に優れるヒトiPS細胞をプラットフォームとする新規CAR-T療法の研究システムを作ることを目的とした。当研究室で予め作製した抗CD99CARを、ドナー血T細胞より樹立したヒトiPS細胞へ導入、iPS細胞をT細胞へ分化誘導した。誘導後、CD99の強発現が見られた為、CD99をノックダウンし分化誘導を行ったが、分化効率が低下し、抑えたはずのCD99の発現が徐々に出現した。更に、研究過程で、抗CD99CARのCD99への親和性が確認できず、立体構造に問題が生じていることが判明した。構造を変えて改良を試みたが、改善することは困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今のがん免疫療法の隆盛は、免疫チェックポイント阻害薬ならびにCAR-T療法の成功に拠るところが大きい。本研究は、CD99を標的とする今までにないCAR-T療法の開発を最終目標として、そのための実験システムを構築することを目的とした。CD99は小児の悪性固形腫瘍の3割程度に発現がみられる膜糖蛋白であり、標的分子として相応しいものと考えたが、当研究室で作製した抗CD99CARは、立体構造の問題点を克服することが出来ず、目的とした実験システムの構築に至ることは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to create a research system for a novel CAR-T therapy targeting CD99, which is frequently expressed in pediatric malignant solid tumors, using human iPS cells as a platform with excellent genetic manipulation properties. Anti-CD99 CARs were introduced into human iPS cells established from donor blood T cells, after that, induced into T cells. However, as strong expression of CD99 was observed in induced T cells, differentiation was performed after knockdown of CD99, but the differentiation efficiency decreased and CD99, which was supposed to be suppressed, was gradually expressed. Furthermore, during the research process, the affinity of the anti-CD99 CAR to CD99 could not be confirmed, and it was found that there was a problem with the three-dimensional structure of anti-CD99 scFv. We attempted to improve the structure, but were unable to make improvements.

研究分野：人体病理学

キーワード：CD99 CAR iPS細胞 T細胞分化 小児悪性固形腫瘍

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

キメラ抗原受容体(Chimeric Antigen Receptor: CAR)-T療法は、腫瘍を認識する人工的受容体をT細胞に発現させて腫瘍を攻撃させるがん免疫療法である。抗CD19CAR-T療法は、2019年に保険収載された優れたがん免疫療法であるが、他の標的分子の追従が見られないのは、有効な研究システムが無いことではないかと考え、遺伝子操作性に優れるヒトiPS細胞をプラットフォームにすることを考えた。

### 2. 研究の目的

CD99は小児の悪性固形腫瘍の約3割に発現する膜糖蛋白である( )。抗CD99CAR-T療法の開発を最終目標として、本研究では、ヒトiPS細胞をプラットフォームとする研究システムを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗CD99CARのヒトiPS細胞への導入

研究代表者が所属する研究室では、以前に、抗CD99抗体の可変領域のアミノ酸配列情報から、抗CD99scFvにCD28と4-1BBのT細胞受容体共刺激分子を組み込んだ第3世代型CARを作製していた。これを、予め作製しておいたドナー血T細胞由来のヒトiPS細胞へ、レンチウイルスにて導入した。比較として、同じドナー血のT細胞への導入も行った。

#### (2) iPS細胞からT細胞への分化誘導

京都大学iPS細胞研究所の金子研究室の協力を得て、ヒトiPS細胞をT細胞へ分化誘導した。まず、未処理のドナー血T細胞由来iPS細胞を、金子研究室のフィーダー法のプロトコルで誘導した。その後、新しくノンフィーダー法が公表されたため、ノンフィーダー法でも試みた。

#### (3) CD99ノックアウトiPS細胞のT細胞への分化誘導

CD99shRNAをレンチウイルスにて導入してCD99ノックダウンiPS細胞株を作製し、上記のフィーダー法にてT細胞へ分化誘導した。

#### (4) 分化誘導中のCD99 isoform解析

iPS細胞からT細胞への分化過程は、造血幹細胞期、胸腺double positive期、CD8 single positive期に分けることが出来る。各期の細胞を採取し、RT-PCR法とWB法にてCD99のisoform(Typeと )の発現をみた。

#### (5) 抗CD99CARの立体構造解析と改良の試み

東京大学工学部の津本研究室の協力を得て、抗CD99scFvを精製し解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗CD99CARはヒトiPS細胞には容易に導入される

iPS細胞では30%前後に導入がみられた一方で、T細胞には導入促進薬を併用しても殆ど導入されず、iPS細胞を利用することの有用性が示された。しかしながら、導入確認マーカーのGFAPとMycTagで乖離が生じたことから、抗CD99CARの立体構造について見直しが必要となった。

#### (2) iPS細胞由来T細胞はCD99を発現する

フィーダー法にてドナー血T細胞より樹立したiPS細胞はT細胞へ分化した。しかしながら出来たT細胞は全てCD99陽性を示し、CD99CAR導入にて互いを攻撃し合う懸念が生じたため、CD99ノックアウト株を作成して、同様に分化誘導を行うことにした。

#### (3) CD99を抑制するとT細胞への分化効率が落ちる

分化誘導35日目のCD3陽性細胞出現率は、T細胞への分化効率を反映する。未処理iPSでは約13%であった一方で、CD99ノックアウトiPSでは約4%と低く、また、それまで殆ど見られなかったCD99発現がわずかに見られた(図1)。最終段階である48日目では、CD99ノックアウトiPSのCD99発現は急激に増え、50%近くに見られた。また、未処理iPSに比べ、CD8陽性率が低く、質の低下も懸念された(図2)。

#### (4) CD99発現はT細胞への分化誘導過程で必然的に生じる

CD99 isoform解析にて、胸腺double positive期にあたる時期にCD99 TypeとTypeが同時にみられ、これは文献的に報告されている( )正常なT細胞分化過程にみられるCD99 isoform発現と同様であった。従って、CD99はT細胞分化に必要な要素である可能性が示唆された。

#### (5) 抗CD99CARは立体構造が原因でCD99を認識できなかった

抗CD99scFvを精製し解析したところ、凝集体を形成しているものと考えられ、そのためにCD99を認識できないものと推測された。重鎖と軽鎖を入れ替えた抗CD99scFvを作製したが、やはり凝集体を形成する結果であった。それらを凝集体のままCD99発現細胞に添加して親和性を見たが、残念ながら確認されなかった。

図1 分化誘導35日目の細胞をFACS解析したもの

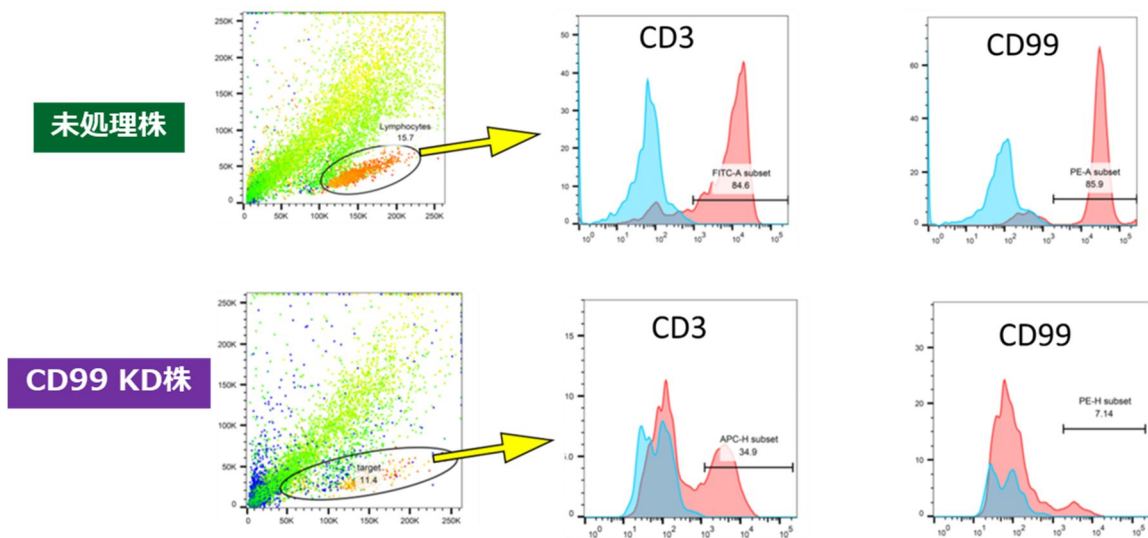
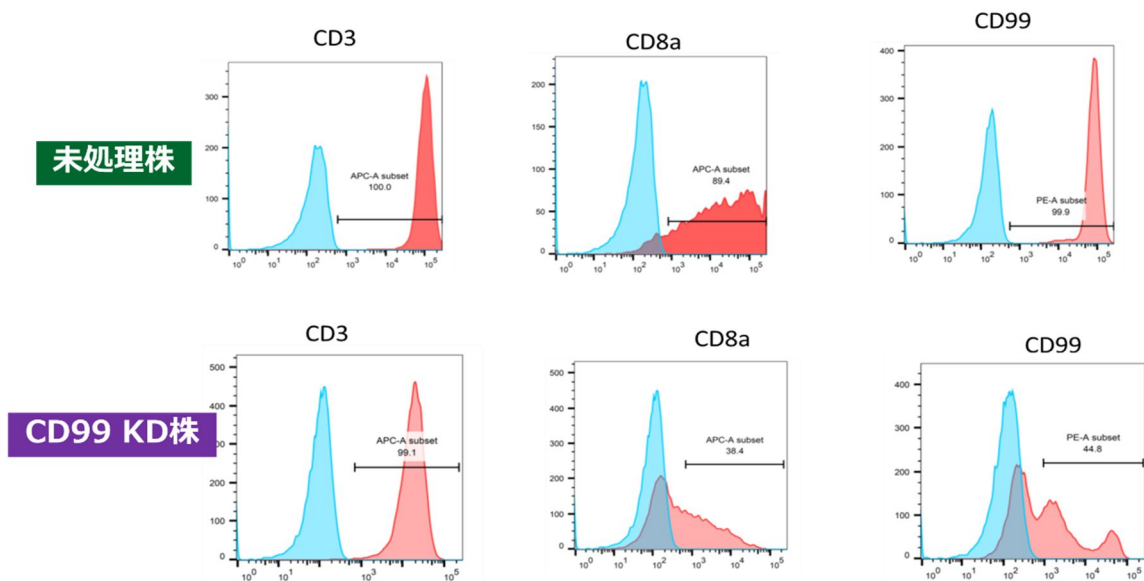


図 2 分化誘導 48 日目の細胞を FACS 解析したもの



< 引用文献 >

渡辺紀子他、小児悪性固形腫瘍における CD99 発現の網羅的検索 抗 CD99CAR-T 療法の候補  
となりうるか、第 108 回日本病理学会総会、2019 年

Alberti et al. CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes  
FASEB J. 2002 Dec;16(14):1946-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Noriko, Ohno Shin-ichiro, Sakuma Moe, Kuriwaki Mayo, Miura Mai, Kuroda Masahiko	4. 巻 100
2. 論文標題 A case report on death from acute bacterial cholangitis accompanied by von Meyenburg complexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e25526 ~ e25526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/md.0000000000025526	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 Watanabe Noriko, Kitada Kohei, Santostefano Katherine E., Yokoyama Airi, Waldrop Sara M., Heldermon Coy D., Tachibana Daisuke, Koyama Masayasu, Meacham Amy M., Pacak Christina A., Terada Naohiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from a Female Patient with a Xq27.3-q28 Deletion to Establish Disease Models and Identify Therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Reprogramming	6. 最初と最後の頁 179 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/cell.2020.0012	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 Watanabe Noriko, Umezu Tomohiro, Kyushiki Masashi, Ichimura Kayoko, Nakazawa Atsuko, Kuroda Masahiko	4. 巻 73
2. 論文標題 Optimal DNA quality preservation process for comprehensive genomic testing of pediatric clinical autopsy formalin-fixed, paraffin-embedded tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polish Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 255 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5114/pjp.2022.124492	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺紀子, 原田裕一郎, 大野慎一郎, 黒田雅彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からT細胞分化過程におけるCD99発現ならびに分化誘導に及ぼす影響
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺紀子、原田裕一郎、藤田浩二、大野慎一郎、急式政志、柿沼幹男、中澤温子、黒田雅彦
2. 発表標題 小児悪性固形腫瘍におけるCD99 isoformsの検討 患者FFPE切片を使用して
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺紀子、原田 裕一郎、大野 慎一郎、黒田 雅彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からT細胞分化過程におけるCD99 isoformの変化
3. 学会等名 第7回東京医科大学記念会館ポスター発表懇談会
4. 発表年 2020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
---------	---------