

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02780

研究課題名(和文)革新的麻疹ウイルスベクターを用いた強力な安価な新規CAR-T療法の開発

研究課題名(英文) Development of evolutionary gene modified T cell transfusion therapy using novel and self-developed measles viral vector

研究代表者

谷 憲三郎 (Tani, Kenzaburo)

東京大学・定量生命科学研究所・博士研究員

研究者番号：00183864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：既存治療不応リンパ性悪性腫瘍に対する新規治療法の開発が必須であり、CAR-T療法は有効であるが、製造期間の短縮化ならびにCAR-T療法の抗腫瘍効果の増強が喫緊の課題である。これらを背景に、本研究の目的は、オンコレトロウイルスやレンチウイルスベクター(LV)より短期間製造可能で安全な麻疹ウイルス(MV)ベクターを用いて、抗腫瘍効果増強可能なMet分解酵素(METase)発現新規CAR-T細胞療法の開発である。本研究期間中に、LVベクターを用いてIAP阻害物質Birinapantと、METase搭載CAR-T細胞の併用による抗腫瘍効果の増強効果をin vitroで明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児ALLでは既存療法での長期生存は90%以上となっているが、最終的には15-20%が治療不応となる。また成人ALLでは既存療法での長期生存は35-45%と不良であり、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫では30-50%の患者の長期生存が得られず、30%が再発、20%が治療不応となっている。これら患者への新規治療法導入が必須であり、CAR-T療法はその有望な治療法の1つであるが、本技術が更に広範な悪性腫瘍患者に貢献できるためには、製造期間の短縮化と抗腫瘍効果の増強が重要である。MVベクターを用いたMETase発現新規CAR-T細胞療法は同課題の解決法となり得、学術的のみならずその社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：The development of new therapeutic modality to treat refractory B cell lymphoid malignancies is imminently important and CAR-T therapy is one of the potent candidates. Current CAR-T therapy, however, requires shortening of its production period and reinforced antitumor effects. The purpose of this study is the development of novel CAR-T therapy using measles virus(MV) vector which would shorten the production period more than currently used oncoretrovirus (RV) or lentivirus(LV) vector and potentiate antitumor effects using methionine catabolic enzyme of METase gene. During this research period, we could successfully demonstrate that the combination of apoptosis inhibitory reagent of Birinapant and CAR-T cells lentivirally-expressing METase remarkably enhanced antitumor effects of METase in vitro.

研究分野：遺伝子細胞治療学、免疫治療学

キーワード：リンパ性悪性腫瘍 CAR-T療法 キメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞療法 麻疹ウイルスベクター レンチウイルスベクター オンコレトロウイルスベクター メチオニン分解酵素 METase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性腫瘍に対する免疫治療は長足の進歩を遂げ、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬 (ICB) や、CAR-T 療法が臨床に導入されてきており、それぞれにおいて明確な臨床効果が期待できるまでになっている。しかし一方で長期的に臨床効果が得られている患者割合は必ずしも多くなく、既治療非小細胞肺癌患者に対する ICB・Nivolumab の 4 年全生存率は 14% (Antonia SJ et al. Lancet Oncol. 20:1395-1408, 2019)、再発 ALL (急性リンパ性白血病: acute lymphoblastic leukemia) 患者に対する CAR-T 療法の平均全生存期間は 12.9 ヶ月 (Park JH. et al. N Engl J Med. 378:449-459, 2018) が現状である。今後長期生存者数を増やすためには、患者体内における抗腫瘍免疫効果のさらなる増強とその維持が極めて重要と考えられる。その目的のために、前者では各 ICB の併用が、後者では CAR-T 療法と同種造血幹細胞移植療法との併用等が試みられ、比較的良好な臨床試験成績が報告されてきているものの、患者への身体的負担が大きい。さらには高額な治療法の組合せのため将来的に医療費の高額化を招き、本邦の医療保険制度を大きく圧迫する可能性が強く懸念される。我々はこれまで宿主ゲノムへの挿入のない安全性の高い麻疹ウイルス (MV) の遺伝子治療用ベクターとしての可能性を検討してきており、最近ヒト iPS 細胞の樹立に成功した (Hiramoto T et al. Mol Ther. 28:129-141, 2020)。本研究中に『MV ベクターを用いることでサイトカイン非刺激状態のナイーブリンパ球に対して高効率に遺伝子導入が可能である』という大変魅力的な特性を見出した。これらの学術的背景をもとに、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「MV を用いることでオンコレトロウイルス (RV) やレンチウイルス (LV) に比べて CAR-T 細胞を簡便かつ短期間に作製する方法を開発し、それを用いることで安価で安全性と抗腫瘍効果に優れた新たな CAR-T 療法を臨床に展開できないか?」ということである。

2. 研究の目的

小児 ALL では既存療法による長期生存率は 90% 以上となっているが、最終的には 15~20% の患者が治療不応となる。また成人 ALL では既存療法による長期生存率は 35~45% と不良であり、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫では 30~50% の患者が 1 次治療による長期生存が得られず、30% が再発、20% が治療不応となっている (Au Sahra et al, The Oncologist. 24:1-7, 2019)。これら患者への新たな治療法の導入が必須であり、近年これらのうち CD19 陽性造血器腫瘍を標的化できる CAR-T 療法の高い有効性が報告された。本邦でも同製剤が 2019 年に承認され、さらに類似の 2 剤が希少疾病用再生医療等製品に指定されているが、以下の 3 点が大きな問題となっている。即ち、CAR-T 細胞製造には平均 45 日を要するため期間中に原病や合併症が増悪し、治療を受けられない例がある、リンパ球への CAR 遺伝子導入低効率や輸注後の体内 CAR-T 細胞増幅不良例がある、副作用としてサイトカイン放出症候群 (CRS) や中枢神経障害が発生する、などである。最近 に伴い治療抵抗性クローンが出現する可能性が指摘されている (Shah NN, Fry TJ. Nature Rev Clin Oncol. 16:372-385, 2019)。一方 に関しては既にインターロイキン 6 抗体の有効性が示されていることから、本研究では の解決に注力した研究を行う。現在、リンパ球への CAR 遺伝子導入ベクターとしては RV ベクター又は LV ベクターが使用されているが、本問題の克服には、輸注後の体内増殖能と持続能に優れる未成熟 T 細胞に迅速かつ高効率に遺伝子導入ができる革新的ベクターの開発が望まれる。これらの条件を満たすベクターとして、我々がこれまでに開発を進めてきた MV ベクターが有望であると考えられる。我々はこれまで、麻疹ウイルスワクチン株 (MV-Edm) を用いた分節型麻疹ウイルス (MV) ベクターを開発してきた (Mol Ther. 28:129-141, 2020)。この MV ベクターを基本に被遺伝子導入細胞における低細胞傷害性、低免疫原性が期待でき、将来的には複数回投与も見込める F 遺伝子欠損 MV (MV Δ F) ベクターや F \cdot H 遺伝子欠損 MV (MV Δ FH) ベクターを開発してきており、現在その感染力価を上げるための検討を実施中である。以上を背景に、**本研究の目的は従来の LV よりも簡便かつ安全で抗腫瘍効果に優れた MV による CAR-T 療法を開発することである。**

一方、癌細胞はメチオニン (Met) 要求性が高いことが知られており、その原因は蛋白合成に加え、多くの癌で認められる DNA やヒストンのメチル化に Met が必要なためである。最近、Met 欠乏食や遺伝子組換え Met 分解酵素 (METase) が抗癌剤や放射線照射による抗腫瘍効果を増強することが報告された (Gao X. et al, Nature 572:397 - 401, 2019)。我々は種々の ALL 細胞に対する Met 欠乏効果を検討したところ、細胞増殖抑制のみならず細胞死も誘導する一方で、正常造血前駆細胞への影響はより少ないものであった。また、細胞に METase を強制発現させたところ、顕著に細胞増殖を抑制させることが明らかとなった。そこで、**本研究では CAR-T 非認識腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果誘導を目的に、METase 遺伝子発現 CAR-T 療法の開発も試みる。**

MV ベクターは我々が独自に日本にて開発してきた新規ベクターであり、現在タカラバイオ社を介して新規ヒト iPS 細胞樹立用ベクターとして販売計画中である。また METase の CAR-T 療法への応用はこれまで無く、本研究の成果次第では特許出願も十分に可能である。以上のように、我々の研究はこれまでの研究成果を基盤としてそれをさらに進化発展させるものであり、独創性の高い研究であると考えられる。

3. 研究の方法

1) CD19CAR 発現 MV F、MV FH (MV F、MV FH-CAR) および LV (LV-CAR) の作製：

既所有の第 2 世代 CD19 CAR 遺伝子を MV に挿入して MV F 及び MV FH-CAR プラスミドを作製し、MV rescue plasmid と共に BHK/T7-9 細胞にトランスフェクションし、48 時間以降に F 及び H 発現 Vero 細胞と共培養し、上清および細胞溶解液を貯蔵ベクターとして凍結保存した。一方、LV-CAR の作製には LV プラスミドの EF1 プロモーター直後に上記 CD19 CAR 遺伝子を挿入して LV-CAR プラスミドを作製し、パッケージングプラスミドと共に 293T 細胞にトランスフェクションした。回収上清を濃縮し、貯蔵ベクターとして凍結保存した。

2) 分泌型メチオニン分解酵素の作製：

Pseudomonas putida 由来の METase 遺伝子の N 末端に分泌シグナルである Secrecon を付与し分泌型 METase を作製した。293T 細胞に分泌シグナルを付与した METase、分泌シグナルを付与していない METase を発現させ、培養液上清、および細胞内の METase 活性を測定した。

3) METase 搭載 CAR-T 細胞の作製

実験系をより迅速に進める目的で、一旦メチオニン分解酵素搭載 CAR-T 細胞を LV ベクターを用いてヒト T 細胞に分泌シグナルを付与したメチオニン分解酵素遺伝子と CAR 遺伝子を導入した。両遺伝子は P2A 配列で結合されておりプロモーターはヒト EF1 プロモーターを使用した。

4) METase 搭載 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の検討：

METase 搭載 CAR-T 細胞、およびコントロールとして EGFP 搭載 CAR-T 細胞を CD19 陰性細胞株である K562 と共に培養する。5 日後にそれぞれの細胞の PI 陽性率を FACS で測定し、METase の抗腫瘍効果、および CAR-T 細胞に対する毒性を検討した。メチオニン濃度は $3\ \mu\text{M}$ 、 $30\ \mu\text{M}$ 、 $300\ \mu\text{M}$ で検討をした。CAR-T 細胞から METase を分泌させることにより一定の抗腫瘍効果が得られるものと想定して研究を進めてきたが、予想に反して METase の抗腫瘍効果は我々の実験系では極めて限定的であることが判明した。さらに、*in vitro* の系では CD19 陰性細胞である K562 細胞に対しても、METase は微弱ながら殺傷することから、より特異性の高い方法を開発することが必須であると考えられた。このような研究結果を背景に、文献的考察を精力的かつ詳細に実施し、最終的に腫瘍特異的にアポトーシスを誘導することが報告されている IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) 阻害物質である低分子化合物 birinapant を見出すことに成功し、本剤と CAR-T 細胞を併用する方法の開発への研究方針変更が、本研究の最終目的を達成させるために最良と判断し、一部計画の再考を以下に行った。

5) IAP 阻害物質である Birinapant と METase 搭載 CAR-T 細胞の併用による抗腫瘍効果の *in vitro* の検討：

IAP 阻害剤である Birinapant と METase 搭載 CAR-T 細胞の併用効果を確認することとした。Birinapant の存在下、または非存在下でメチオニン濃度は $30\ \mu\text{M}$ とし、METase 搭載 CAR-T 細胞、およびコントロールとして EGFP 搭載 CAR-T 細胞を CD19 陰性細胞株である K562 と共に培養した。3 日後にそれぞれの細胞の PI 陽性率を測定し、METase の抗腫瘍効果、および CAR-T に対する毒性を検討した。

6) Birinapant と METase 搭載 CAR-T 細胞の併用による抗腫瘍効果の担腫瘍マウス *in vivo* モデルを用いた検討：

免疫不全 NSG マウスに $1\sim 5 \times 10^5$ 個の CD19 陰性細胞株である K562 を経尾静脈的に投与し、1 週間後に $1\sim 5 \times 10^6$ 個の CAR-T 細胞を投与し抗腫瘍効果を検討する。(別研究予算にて実施予定)

4. 研究成果

1) CD19CAR 発現 MV F、MV FH (MV F、MV FH-CAR) および LV (LV-CAR) の作製：

抗 CD19CAR 遺伝子を搭載した F 遺伝子欠損 MV ベクターの作製に成功した。作製したウイルスベクターを F 遺伝子発現 Vero 細胞に感染させたところ MV 特有の細胞変性が認められた。次に既存の抗 CD19CAR-T 細胞療法の効果を増強するために METase 搭載 CAR-T 細胞を LV ベクターにて作成し、抗腫瘍効果を検討した。*In vitro* の系では CD19 陰性細胞である K562 細胞に対して、METase は僅かに抗腫瘍効果を示した。本研究実施過程で活性化 CAR-T 細胞は正常細胞にも関わらずメチオニン制限により障害を受け増殖が出来なくなったことから、その原因を詳細に検討した。その結果、正常細胞はメチルチオアデノシン (MTA) をメチオニンに代謝出来るが、癌細胞は代謝出来ないことが分かり、その後 MTA 存在下で CAR-T 細胞に腫瘍特異的障害活性を發揮させ得ることに成功した。

2) 分泌型 METase の作製：

分泌シグナルが付与された METase は細胞外で活性を示す一方で、細胞内ではほぼ活性を示さなかった。

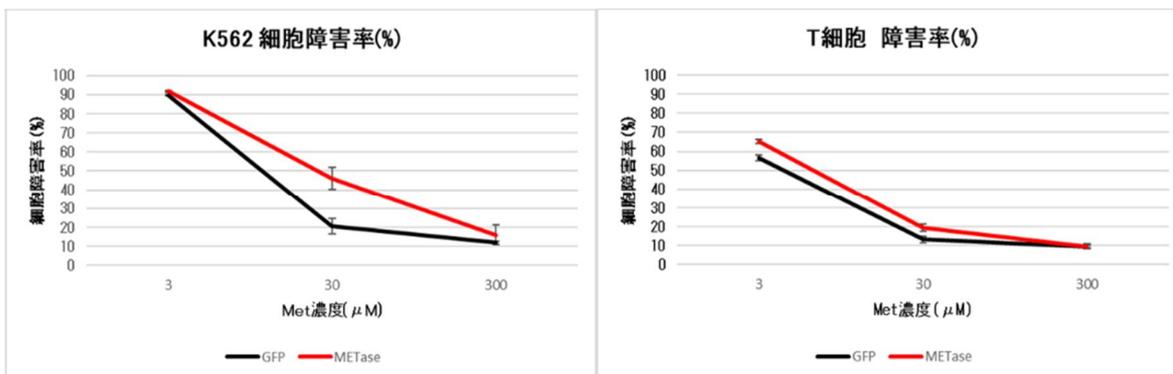
3) METase 搭載 CAR-T 細胞の作製：

ヒト T 細胞に LV ベクターを用いて METase および抗 CD19CAR 遺伝子を導入した。導入効率は概ね 70% 前後であった。

4) METase 搭載 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の検討

METase 搭載 CAR-T 細胞はメチオニン濃度が $30\ \mu\text{M}$ の場合、K562 細胞に対して一定の抗腫瘍効果を示した。一方で CAR-T 細胞に対する毒性はほぼ認められなかった (図 1)。

(図 1) METase 搭載 CAR-T 細胞の細胞障害活性

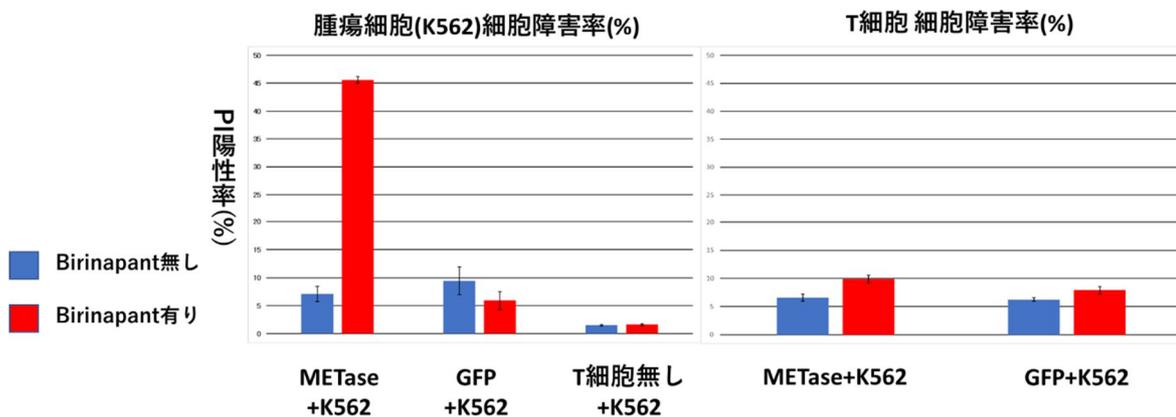


5) IAP 阻害物質である Birinapant と METase 搭載 CAR-T 細胞の併用による抗腫瘍効果の *in vitro* での検討:

Birinapant の存在下で METase 搭載 CAR-T 細胞は K562 に対して顕著な抗腫瘍効果を示した。一方で Birinapant、METase とともに CAR-T 細胞に対する毒性はほぼ認めなかった (図 2)。今後は METase 自体の抗腫瘍活性評価を目的に、CRISPER-Cas9 により CD19 遺伝子をノックアウトした NALM-6 細胞に対する抗腫瘍効果を検討する予定である。

6) Birinapant と METase 搭載 CAR-T 細胞の併用による抗腫瘍効果の担腫瘍マウス *in vivo* モデルを用いた検討: (別研究予算にて実施予定)

(図 2) Birinapant と METase 搭載 CAR-T 細胞の併用による細胞障害活性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murahashi M., Tsuruta T., Yamada K., Hijikata Y., Ogata H., Kishimoto J., Yoshimura S., Hikichi T., Nakanishi Y., Tani K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical trial of a cancer vaccine targeting VEGF and KIF20A in advanced biliary tract cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1485-1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14907.	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 -

1. 著者名 Sagara M., Miyamoto S., Itoh S., Soda Y., Tani K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Development of new oncolytic virotherapy targeting breast cancer using Coxsackievirus B3.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 81-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14753.	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 -

1. 著者名 Iwagawa T, Masumoto H, Tabuchi H, Tani K, Conklin BR, Watanabe S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Evaluation of CRISPR/Cas9 exon-skipping vector for choroideremia using human induced pluripotent stem cell-derived RPE.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gene Medicine	6. 最初と最後の頁 e3464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgm.3464. Epub 2022 Dec 4.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 児玉健、曾田泰、谷憲三朗
2. 発表標題 5-ALA combined with SFC prevents blood-withdrawal stress and LPS-induced lethality in SCD mouse models
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun Ito, Shohei Miyamoto, Miyako Sagara, Akira Sakamoto, Yasushi Soda, Hiroyuki Sakamoto, Kenzaburo Tani
2. 発表標題 Development of gene modified oncolytic coxsackievirus for clinical trial
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun Ito, Shohei Miyamoto, Miyako Sagara, Akira Sakamoto, Yasushi Soda, Tetu Akiyama, Kenzaburo Tani
2. 発表標題 Development and manufacturing of miRNA-regulated oncolytic virus for clinical trial
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 Akira Sakamoto, Keisuke Yasunari, Hiroyuki Inoue, Miyamoto Shohei, Sagara Miyako, Ito Shun, Soda Yasushi, Akiyama Tetsu, Tani Kenzaburo
2. 発表標題 A novel Echovirus 4 shows noticeable oncolytic activity against esophageal cancer
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Miyamoto Shohei, Sagara Miyako, Ito Shun, Soda Yasushi, Akiyama Tetsu, Tani Kenzaburo
2. 発表標題 A novel Echovirus 4 shows remarkable oncolytic capacity against esophageal cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 谷 憲三郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 223
3. 書名 がん免疫ペディア(吉村清編)	

〔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	曾田 泰 (Soda Yasushi) (00361618)	東京大学・定量生命科学研究所・協力研究員 (12601)	
研究 分担者	宮本 将平 (Miyamoto Shohei) (20758536)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

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