

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K07242
研究課題名（和文）次世代CAR-T細胞療法開発に応用可能なエピトープスプレディング誘導機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of epitope-spreading induction mechanism applicable to the development of the next-generation CAR T-cell therapy

研究代表者
安達 圭志（Adachi, Keishi）

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40598611
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）：現状のCAR-T細胞療法は、がんの大部分を占める固形がんに対して有効性が乏しいという問題点が指摘されており、この問題点を克服するメカニズムとしてエピトープスプレディング（ES）に着目して研究を行った。独自に開発したCARと共にIL-7とCCL19を一細胞に同時に発現する次世代型CAR-T細胞（7×19 CAR-T細胞）を担がんマウスに投与すると、腫瘍組織、腫瘍所属リンパ節双方にクロスプレゼンテーション能を有する樹状細胞が集積し、ESが誘導されて抗がん効果が発揮されることが明らかとなった。また、他系マウス由来の7×19 CAR-T細胞は宿主から拒絶されるがESを誘導し、抗腫瘍効果も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん治療において近年著しい進展をみせているものに、がん特異的キメラ抗原受容体（CAR）を遺伝子導入したT細胞を移入するCAR-T細胞療法がある。しかし現状のCAR-T細胞療法は血液がんには高い治療効果を発揮する一方、がんの大部分を占める固形がんに対しては有効性が乏しいという問題点が指摘されており、その主要原因の一つとして固形がん組織内においてCARの標的抗原の発現が時空間的に不均一であるという点が挙げられている。本研究の成果は、その抗原発現の時空間的不均一性を克服するメカニズムとしてESに着目して解析することで固形がんに対して効果的な次世代CAR-T細胞療法確立のための基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：Current CAR-T cell therapy is recognized to be ineffective against solid tumors, which account for the majority of cancers. I have focused my research on epitope-spreading (EP) as a mechanism to overcome this problem. When the next-generation CAR-T cells, which we originally engineered to simultaneously express CAR, IL-7 and CCL19 (7×19 CAR-T cells), were administered to tumor-bearing mice, dendritic cells with cross-presentation capacity accumulated in both tumor tissue and tumor-associated lymph nodes, followed by induction of EP, resulting in the potent anticancer effects. In addition, although 7×19 CAR-T cells derived from allogeneic mice were rejected by the host within nine days after the injection, they induced EP and exhibited anti-tumor effects in vivo.

研究分野：免疫学、がん免疫学、がん治療学

キーワード：エピトープスプレディング がん CAR-T細胞 IL-7 CCL19 樹状細胞 他系（アロ）

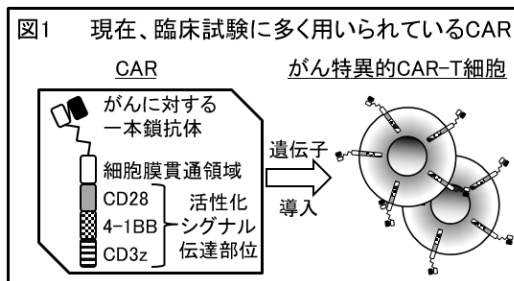
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1981年以降、我が国ではがんが死亡原因の一位となっており、2019年の全死亡者に占める割合は27.3%であった。これは、がんが全死亡者の約3.7人に1人の死因となったことを意味しており、がんに対する優れた診断技術の確立および効果的な治療法・再発予防法の開発が求められている。

近年、従来の3大標準療法では治療が困難な難治がんや進行がんに対する治療法として、免疫療法の基礎研究・臨床開発が活発に行われている。

2018年のノーベル生理学・医学賞の対象となった免疫チェックポイント阻害療法は、がん免疫療法の有効性を科学的に証明し、がん治療に大きなインパクトを与えた。さらに、CARを遺伝子導入したT細胞を移入するCAR-T細胞療法は、極めて有望な次世代の免疫療法として注目されている。CARとは、がんの細胞表面抗原に特異的な一本鎖抗体とT細胞活性化に関わる分子のシグナル伝達領域を組み合わせた受容体である(図1)。B細胞性の血液悪性腫瘍に対して高い治療効果を示し、2019年には我が国でも承認された。しかしながら、



- ・ B細胞性血液悪性腫瘍に対しては顕著な治療効果を示す一方、固形がんに対しては効果が乏しい
- ・ マウス固形がんモデルにおいて治療効果を発揮した報告でも、非常に大量のCAR-T細胞投与が必要とされており、臨床応用を考えた場合、コストの高騰や細胞調製期間の長期化などが予想される

という点は克服すべき極めて重要な課題となっている。

2. 研究の目的

【何故エピトープスプレッディングに着目するのか】

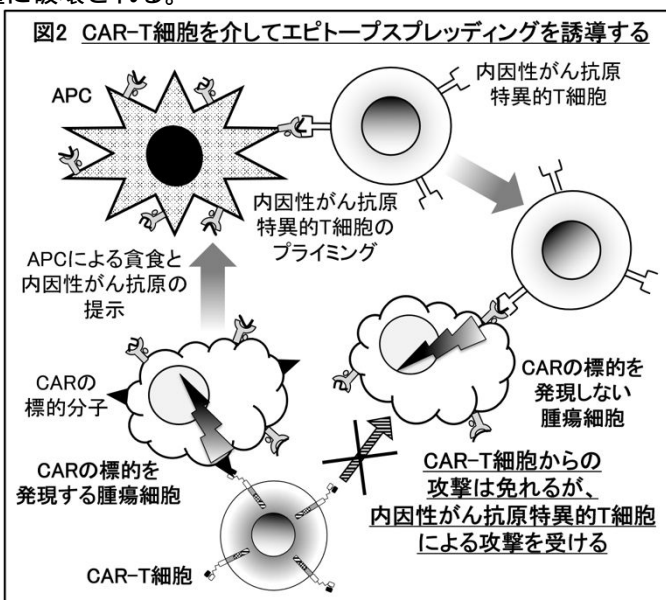
エピトープスプレッディング(ES)とは、これまで主に自己免疫疾患や慢性感染症の分野において発症および症状増悪のメカニズムとして提唱された概念であり、

『単一あるいはごく少数のエピトープに対する免疫応答が、より多くのエピトープに対する免疫応答を含むように拡大すること』

と定義される。昨今、このようなESの概念は、がん免疫療法が効果的に作用する場合にも、以下のように適用可能なのではないかと考えられている。

- (1) 抗体療法やT細胞療法など、特定のエピトープに対する免疫療法が治療の初期段階で効果的に作用すると、がん細胞が大量に破壊される。
- (2) 抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell: APC) による貪食が亢進して内因性がん抗原が提示され、最初に投与されたものの標的とは異なるエピトープを認識するがん抗原特異的T細胞の活性化や抗体産生が誘導される。
- (3) 結果的に抗がん効果のポジティブフィードバックが誘導される。

しかし現在までに、がん免疫療法を受けた生体内で上記のような免疫反応が実際に起こっているのか、実験的・臨床的に明確に証明されているわけではなく概念/仮説の段階で留まっており、その誘導メカニズムについても未知のままである。



一方で、従来のCAR-T細胞療法においてCAR-T細胞に与えられる役割は、“生体内に存在する全てのがん細胞を殺傷すること”であり、がん細胞を直接傷害する機能ばかりに注目が集まってきた。しかし本研究では、

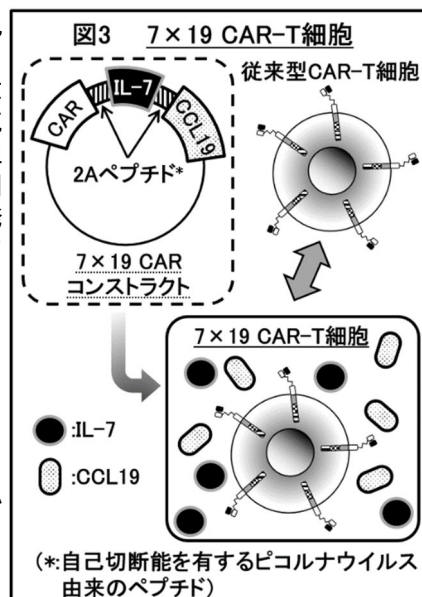
CAR-T細胞の役割をESのインデューサー/エンハンサーと定義し直す。そのうえで将来的に、CAR-T細胞にES誘導能を賦与することにより、がん組織内におけるCAR標的分子の発現が時空間的に不均一であっても効果的に機能することが可能になると予想される(図2)。

【エピトープスプレッディングの概念を具現化する独創的な解析ツール・実験系】

我々は最近、固形がんに対して効果的に機能する新規免疫療法の創出を目的とし、CAR と共に T 細胞の生存に関わる IL-7 と遊走に関わる CCL19 を一細胞に同時に発現する次世代型 CAR-T 細胞 (7×19 CAR-T 細胞) を作製し (図 3)、抗がん効果の検討を行った。その結果、7×19 CAR-T 細胞は担がんマウスに投与後、ドナー、レシピエント、双方の免疫細胞をがん局所に集積させ、相乗的に強力な抗がん効果を発揮し、完全完解を誘導することが明らかとなった。すなわち

7×19 CAR-T 細胞投与後、担がんマウス体内では、CAR-T 細胞による CAR の標的分子を介したがん細胞傷害が契機となり、ES が誘導されて内因性的がん抗原に特異的なレシピエント T 細胞も活性化されたと考えられる。

したがって、我々が独自に開発した 7×19 CAR-T 細胞は、がん免疫療法における ES の概念を実証するうえで独創的かつ極めて有用性の高いツール・実験系である。



3. 研究の方法

【3年間の研究計画の概要】

- (1) 本研究で使用するマウス腫瘍株を樹立するため、CAR の標的分子やモデル抗原を一細胞に同時に発現させるコンストラクトをデザインし、レトロウイルスベクターを作製する。(2021年度)
- (2) 複数種のマウス腫瘍細胞株に遺伝子導入を行い、モノクローナル細胞株を樹立する。(2021年度)
- (3) (2)で樹立したモノクローナル細胞株を用いて担がんマウスを作成し、7×19 CAR-T 細胞あるいは従来型のコントロール CAR-T 細胞をそれぞれ移入して、ES の誘導を in vivo 系において比較検討する。(2021~2022 年度)
- (4) 7×19 CAR-T 細胞移入後の ES 誘導メカニズムを解明するため、CAR-T 細胞投与後に担がんマウスから脾臓、あるいはリンパ節を摘出して、T 細胞と樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) を中心に ex vivo 系での免疫学的解析を行う。(2022~2023 年度)

4. 研究成果

- (1) モデル抗原として、卵白アルブミン (OVA) と高感度緑色蛍光蛋白質 (eGFP) を選択し、腫瘍株への遺伝子導入を目的とするレトロウイルスベクターを作製した。
- (2) CAR の標的分子として当研究室で研究実績のあるヒト CD20 (hCD20) を発現するよう遺伝子改変を行ったマウス黒色腫株 B16F10 に OVA を (以下、 とする) 同様に hCD20 を発現するよう遺伝子改変を行ったマウス肥満細胞腫株 P815 に上記 eGFP を (以下、 とする) それぞれ遺伝子導入を行い、モノクローナル細胞株を樹立した。また、がん新生抗原の存在が明らかになっているマウス結腸腺がん細胞株 MC38 に hCD20 を遺伝子導入してモノクローナル細胞株を樹立した (以下、 とする)。
- (3) 、 、 をマウスに皮下接種したところ、 、 の生着性を確認した。
- (4) 、 の担がんマウスに、7×19 CAR-T 細胞あるいは従来型 CAR-T 細胞をそれぞれ移入したところ、従来型 CAR-T 細胞ではがんの増殖を制御できなかった一方で、7×19 CAR-T 細胞ではほとんどのマウスでがんの寛解を誘導した。
- (5) 2021 年度に樹立した (マウス黒色腫株、C57BL/6 由来) をマウスに接種し、7×19 CAR-T 細胞を投与した後に脾臓、および腫瘍所属リンパ節を摘出して単細胞懸濁液を作成し、B16F10 由来のがん抗原および OVA ペプチドで刺激して、上清中の IFN- を測定することで、それぞれの抗原に対する T 細胞の誘導を検討したところ、7×19 CAR-T 細胞は、幅広い抗原に対する T 細胞応答を高効率に拡大させることが明らかとなった。
- (6) 2021 年度に樹立した (マウス結腸腺がん細胞株、C57BL/6 由来) と、MC38 由来のネオアンチゲンペプチドを用いて (5) と同様の検討を行ったところ、7×19 CAR-T 細胞は、ネオアンチゲンに対しても幅広く T 細胞応答を拡大させることが明らかとなった。
- (7) ES における T 細胞への抗原提示機構には、クロスプレゼンテーション (XP) が中枢的な役割を担うと考えられている。そこで、XP 能を有する DC のポピュレーション (cpDCs) を解析

したところ、7×19 CAR-T 細胞投与後の腫瘍所属リンパ節では cpDCs が増加していた。

- (8) をマウスに接種して7×19 CAR-T 細胞を投与した後、腫瘍所属リンパ節から DC を単離し、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス OT-I の T 細胞と共培養を行った。上清中の IFN- γ を測定することで、DC の XP 能を検討したところ、7×19 CAR-T 細胞投与後に分離した DC は OT-I の T 細胞を刺激し、IFN- γ の産生を誘導することが明らかとなった。
- (9) hCD20 発現 P815(マウス肥満細胞腫株、DBA/2 由来、以下、P815-hCD20)をマウスに接種し、2022 年度に実施した方法で ES 誘導を検討したところ、7×19 CAR-T 細胞投与によりがん抗原に対する T 細胞応答が誘導されることが明らかとなった。
- (10) 2021 年度に樹立した (マウス黒色腫株、C57BL/6 由来)あるいは P815-hCD20 を接種したマウスに対して、従来型 CAR-T 細胞を大量投与して生存延長や寛解を誘導しても、ES は誘導されなかったことから、ES の誘導には IL-7 と CCL19 の作用が必要であることが判明した。
- (11) cpDCs を解析したところ、7×19 CAR-T 細胞投与後、腫瘍組織内でも cpDCs が増加していた。
- (12) を接種した後に cpDC を除去したマウスでは、7×19 CAR-T 細胞投与後も ES が誘導されなかったことから、ES 誘導に cpDC が重要な役割を果たすことが判明した。
- (13) 7×19 CAR-T 細胞投与後、 を接種したマウスの腫瘍所属リンパ節や腫瘍組織内では、XP によって活性化されうる宿主 T 細胞が増加していた。
- (14) CAR の標的を発現する腫瘍株と発現していない親株とを混合して接種したマウスに対して、7×19 CAR-T 細胞を投与することにより生存延長が認められ、一部のマウスでは寛解も誘導されたことから、ES が治療効果にも影響を与えることが判明した。
- (15) 他系マウス由来の7×19 CAR-T 細胞を投与すると投与後9日以内に宿主から拒絶されるが ES は誘導されており、in vivo における抗腫瘍効果も認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安達圭志、玉田耕治
2. 発表標題 固形がんに効率的にエピトープスプレディングを誘導する新規CAR-T細胞療法
3. 学会等名 第26回 日本がん免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keishi Adachi, Yukimi Sakoda, Koji Tamada
2. 発表標題 CAR-T cells expressing both IL-7 and CCL19 induce epitope spreading via cross presentation of endogenous tumor antigens
3. 学会等名 38th annual meeting of the society for immunotherapy of cancer（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------