

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07249

研究課題名(和文) 子宮頸がんに対するiPSC由来キメラ抗原受容体T細胞療法の有効性の検討

研究課題名(英文) Efficacy of iPSC-derived chimeric antigen receptor T cell therapy for cervical cancer

研究代表者

安藤 純 (Ando, Jun)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60348943

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)：子宮頸がんの若年層における罹患数が増加しており、進行期では根治が望めず極めて予後不良である。CD19抗原を標的とするキメラ抗原受容体T細胞療法(CART療法)がB細胞性の急性白血病やリンパ腫に臨床応用され成功を収めている。固形がんの抗原をターゲットとしたCART療法も開発は進んでいるが、子宮頸がんに対する有望なCART療法は未だない。申請者らは子宮頸がん細胞株にB7-H3(CD276)が強陽性であることを確認した。本研究では、今まで申請者らが開発してきたiPS細胞技術を利用し、子宮頸がん細胞のB7-H3を標的とする有効で強力なCART療法の開発を目指すための基礎的検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸がんの限局期には手術や放射線治療、化学療法が選択されるが、進行期では根治が望めず極めて予後不良である。特に手術や放射線治療、化学療法後の再発・難治性の子宮頸がん患者には手立てがなく、新規治療開発が喫緊の課題である。われわれの開発するCART療法が新規治療につながる可能性があるため、学術的に重要な検討であり意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Cervical cancer is increasing in the young generation and with those found in the advanced stages, complete cure is difficult to achieve and therefore their prognosis is extremely poor. CD19-CART therapy for Acute lymphocytic leukemia (ALL) and lymphoma has already been successfully applied. CART therapy for solid tumor is also progressing, but there is still no promising CART therapy for cervical cancer. We confirmed that cervical cancer cell lines are strongly positive for B7-H3 (CD276). In this study, using the iPS cell technology that we have developed so far, we will conduct basic studies aimed at developing effective and powerful CART therapy targeting B7-H3 in cervical cancer cells.

研究分野：免疫細胞療法

キーワード：キメラ抗原受容体T細胞療法 B7-H3 子宮頸がん iPSC細胞技術

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮頸がんの若年層における罹患数は増加しているが、進行期では根治が望めず極めて予後不良である。近年、腫瘍の免疫回避機構を克服するためにキメラ抗原受容体 T 細胞療法(CART 療法)が開発され、CD19 抗原を標的とする CART 療法が B 細胞性の急性白血球病やリンパ腫に臨床応用され成功を収めている。固形がんの抗原をターゲットとした CART 療法も開発は進んでいるが子宮頸がんに対する有望な CART 療法は未だない。申請者らは子宮頸がん細胞株に発現する表面抗原を調べたところ B7-H3(CD276)が強陽性であることを確認した。本研究では、今まで申請者らが開発してきた技術を更に発展させ、子宮頸がん細胞に発現している B7-H3 を標的とする有効で強力な CART 療法の開発を目指すための基礎的検討を行う。

### 2. 研究の目的

子宮頸がん再発例での生存期間の中央値は約1年で、5年生存率は5%以下で極めて予後が悪い。子宮頸がんワクチンには HPV 感染予防効果はあるが、がん発症後に抗腫瘍効果はない。また、子宮全摘術が適応とならない進行期症例は、全身化学療法が用いられるが根治は望めない。若い命を救うための有効な治療開発が急務である。我々は、iPSC 技術を用いる CART 療法に着目した。腫瘍の生体内での免疫回避機構を克服するために開発された CART は、抗体の抗原認識部位の軽鎖と重鎖を一本鎖で繋いだキメラ抗原受容体を発現した遺伝子改変 T 細胞で、高い抗原認識力と強力な抗腫瘍効果が特徴である。しかし、実臨床の血液腫瘍に対する CD19-CART 療法では、CART の疲弊による ex vivo での増殖不良による製造中止、生体内での増殖不良は再発につながる深刻な問題である。これらの問題を克服するために我々は iPSC 技術を用いる新たな CART 療法を提案している。iPSC を経ることにより若返った治療用 CART 細胞をいつでも無限大に得ることができ、また CAR と内因性 TCR により 2 抗原を同時に標的とすることを可能とすることで、強力な抗腫瘍効果を実現できることを証明しており、この技術を子宮頸がんに対する CART 療法に応用できるか基礎的研究を計画した。

### 3. 研究の方法

#### (1) レンチウイルス B7-H3-CAR プラスミドを作成する。

B7-H3 の ScFV の部分は報告されている配列を遺伝子合成する。申請者らが以前作製した Cs-Ubc-GD2-CAR-4-1BB-CD3z-mcherry の GD2-CAR を B7-H3-CAR に入れ替えてサブクローニングを行い Cs-Ubc-B7-H3-4-1BB-CD3z-mcherry を作成する。

#### (2) 末梢血より B7-H3-CART を作製し、子宮頸がん細胞株に対する抗腫瘍効果を確認する。

末梢血 PBMC に Cs-Ubc-B7-H3-4-1BB-CD3z-mcherry ベクターを遺伝子導入し、末梢血 B7-H3-CART を作製する。細胞傷害性試験(51Cr 放出試験)とリアルタイムセルアナライザーを用いて、子宮頸がん細胞株に対する抗腫瘍効果を確認する。

#### (3) iPSC 由来 B7-H3-CAR-HPV-rejT を作製する。

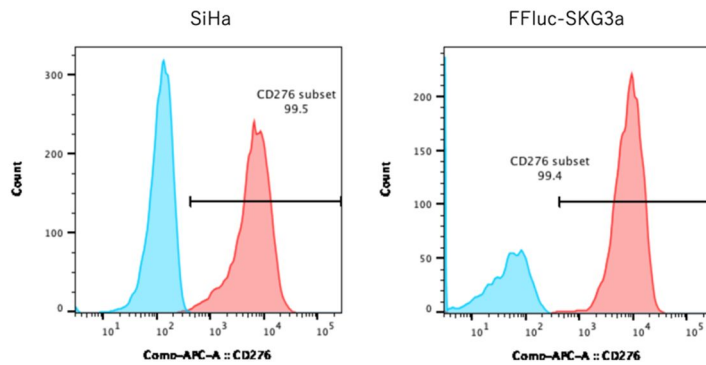
末梢血 HPV16-E6-CTL クローンより樹立した T-iPSC(Molecular Therapy 2020)に Cs-Ubc-B7-H3-4-1BB-CD3z-mcherry を遺伝子導入する。数回 mcherry 陽性細胞をソートすることで安定したクローンの集団を得る。コントロールとして HPV 抗原特異性のない T 細胞由来 iPSC に Cs-Ubc-B7-H3-4-1BB-CD3z-mcherry を遺伝子導入しコントロールとする。その後 2 種類の T-iPSC より B7-H3-CAR-rejT への分化誘導を行い、誘導後の T 細胞の機能を CAR 導入効率と tetramer 陽性率で評価を行う。

#### (4) iPSC 由来 B7-H3-CAR-HPV-rejT と末梢血由来 B7-H3-CART の抗腫瘍効果を比較検討する。

細胞傷害性試験(51Cr 放出試験)とリアルタイムセルアナライザーを用いて、子宮頸がん細胞株に対する抗腫瘍効果を比較する。また、免疫不全マウスにルシフェレースで標識した子宮頸がん細胞株を移植し、腫瘍樹立後に未治療群と治療群に分け、腫瘍量を生体内 in vivo 蛍光イメージングシステムを用いて経時的にモニターして抗腫瘍効果を検討する。また、長期効果に関しては、生存期間を観察する。

#### 4. 研究成果

- (1) 子宮頸がんの B7-H3 (CD276) の発現の確認  
2 種類の子宮頸がん細胞株を用いた検討では GD2 抗原、HER2 抗原などは陰性であったが、B7-H3 抗原は強陽性であった(下図)。B7-H3(CD276)は正常組織でほとんど発現が認めず、多くの固形がんで特異的に高発現する B7-family に属する免疫関連分子と報告されている。
- (2) 末梢血由来 B7-H3-CART を作製し、SiHa、SKG3a に対し細胞傷害性試験(51Cr 放出試験)で殺細胞効果を確認した。
- (3) iPSC 由来 B7-H3-CAR-HPVrejT を作製し、末梢血由来 B7-H3-CART と比較したところ、iPSC 由来 B7-H3-CAR-HPVrejT の方が殺細胞効果が高かった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Furukawa Yoshiki, Hamano Yasuharu, Shirane Shuichi, Kinoshita Shintaro, Azusawa Yoko, Ando Jun, Nakauchi Hiromitsu, Ando Miki	4. 巻 11
2. 論文標題 Advances in Allogeneic Cancer Cell Therapy and Future Perspectives on “Off-the-Shelf” T Cell Therapy Using iPSC Technology and Gene Editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 269 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11020269	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 Harada Sakiko, Ando Miki, Ando Jun, Ishii Midori, Yamaguchi Tomoyuki, Yamazaki Satoshi, Toyota Tokuko, Ohara Kazuo, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Shin Chansu, Ota Yasunori, Nakashima Kazutaka, Ohshima Koichi, Imai Chihaya, Nakazawa Yozo, Nakauchi Hiromitsu, Komatsu Norio	4. 巻 30
2. 論文標題 Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 534 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2021.10.006	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 Ishii Midori, Ando Jun, Yamazaki Satoshi, Toyota Tokuko, Ohara Kazuo, Furukawa Yoshiki, Suehara Yoshiyuki, Nakanishi Mahito, Nakashima Kazutaka, Ohshima Koichi, Nakauchi Hiromitsu, Ando Miki	4. 巻 9
2. 論文標題 iPSC-Derived Neoantigen-Specific CTL Therapy for Ewing Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1175 ~ 1186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-21-0193	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 Ohara Kazuo, Kinoshita Shintaro, Ando Jun, Azusawa Yoko, Ishii Midori, Harada Sakiko, Mitsuishi Yoichiro, Asao Tetsuhiko, Tajima Ken, Yamamoto Taketsugu, Takahashi Fumiyuki, Komatsu Norio, Takahashi Kazuhisa, Ando Miki	4. 巻 27
2. 論文標題 SCLC-J1, a novel small cell lung cancer cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101089 ~ 101089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101089	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 Harada Sakiko, Ando Miki, Ando Jun, Ishii Midori, Yamaguchi Tomoyuki, Yamazaki Satoshi, Toyota Tokuko, Ohara Kazuo, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Shin Chansu, Ota Yasunori, Nakashima Kazutaka, Ohshima Koichi, Imai Chihaya, Nakazawa Yozo, Nakauchi Hiromitsu, Komatsu Norio	4. 巻 30
2. 論文標題 Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 534 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2021.10.006	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 Kinoshita Shintaro, Ando Miki, Ando Jun, Ishii Midori, Furukawa Yoshiki, Tomita Osamu, Azusawa Yoko, Shirane Shuichi, Kishita Yoshihito, Yatsuka Yukiko, Eguchi Hidetaka, Okazaki Yasushi, Komatsu Norio	4. 巻 7
2. 論文標題 Trigenic ADH5/ALDH2/ADGRV1 mutations in myelodysplasia with Usher syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e07804 ~ e07804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e07804	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 Furukawa Yoshiki, Ishii Midori, Ando Jun, Ikeda Kazuya, Igarashi Kyomi J., Kinoshita Shintaro, Azusawa Yoko, Toyota Tokuko, Honda Tadahiro, Nakanishi Mahito, Ohshima Koichi, Masuda Ayako, Yoshida Emiko, Kitade Mari, Porteus Matthew, Terao Yasuhisa, Nakauchi Hiromitsu, Ando Miki	4. 巻 4
2. 論文標題 iPSC-derived hypoimmunogenic tissue resident memory T cells mediate robust anti-tumor activity against cervical cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 101327 ~ 101327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xcrm.2023.101327	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石井翠、安藤美樹、豊田稔子、小原和男、末原義之、安藤純、小松則夫、中内啓光
2. 発表標題 Ewing肉腫のネオアンチゲンを標的とする iPSC由来細胞傷害性T細胞の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下慎太郎、安藤美樹、原田早希子、石井翠、小原和男、豊田稊子、安藤純、小松則夫、中内啓光
2. 発表標題 難治性リンパ腫に対する2抗原を標的とするiPSC由来T細胞療法の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本和也、安藤美樹、安藤純、石井翠、梓澤陽子、古川芳樹、木下 慎太郎、本田匡宏、原田早希子、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 成人T細胞白血病/リンパ腫に対するiPS細胞由来Tax抗原特異的CTL療法の開発
3. 学会等名 第13回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shintaro Kinoshita , Miki Ando , Jun Ando , Midori Ishii , Yoshiki Furukawa , Osamu Tomita , Shuichi Shirane , Yoshihito Kishita , Yukiko Yatsuka , Hidetaka Eguchi , Yasushi Okazaki , Norio Komatsu
2. 発表標題 Trigenic ADH5 / ALDH2 / ADGRV1 mutations in myelodysplasia with Usher syndrome
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 Kazuya Sugimoto, Miki Ando , Jun Ando , Midori Ishii , Yoko Azusawa, Yoshiki Furukawa , Shintaro Kinoshita, Tadahiro Honda, Sakiko Harada, Hiromitsu Nakauchi, Norio Komatsu
2. 発表標題 Development of iPSC-derived Tax-specific CTL therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma
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 細谷英里奈、木下慎太郎、石井翠、築根豊、安田肇、高久智生、浜埜康晴、佐々木純、安藤純、安藤美樹
2. 発表標題 再発/難治性B細胞リンパ腫におけるCD19抗原標的CAR-T療法の単施設後方視的解析
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
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
研究分担者	安藤 美樹  (Ando Miki)  (10424251)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	
研究分担者	寺尾 泰久  (Terao Yasuhisa)  (00348997)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	

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