

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08682

研究課題名（和文）バイオマーカーに基づくMAGE-A4 / CAR-T細胞作製による食道癌の免疫療法

研究課題名（英文）Biomarker-based manufacture of MAGE-A4/CAR-T cell in immunotherapy for esophageal cancer

研究代表者

影山 慎一（Kageyama, Shinichi）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：80194695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は食道癌の約50%に発現するMAGE-A4抗原を標的とするCAR-T療法の開発のために、既に臨床試験で細胞輸注されたTCR遺伝子導入T細胞の形質解析、遺伝子発現、代謝物質の網羅的解析を行い、臨床試験の情報（有害事象、臨床効果）に関連するバイオマーカーの抽出を行うものであり、NY-ESO-1/TCR-T細胞輸注を実施し同意のもとで保管されている臨床検体を使用し、サイトカイン放出症候群（CRS）、臨床反応と製造TCR-T細胞、輸注後の末梢血TCR-T細胞の免疫細胞学的解析を行った。輸注後の検体におけるT製品とその末梢血検体の解析で製造TCR-T細胞の不均一なT細胞マーカー発現が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T細胞療法が急性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫で実用化されて、治療効果を発揮しているが、固形腫瘍（癌、肉腫）に対するT細胞療法は未だ実用化されていない。本研究は難治性固形腫瘍である再発・転移食道癌に対するCAR-T細胞療法への実用化を目指す基盤研究であり、製造するT細胞の適切化が可能となる研究成果であり、臨床試験の計画が明確となった。標的抗原であるMAGE-A4の腫瘍組織での検出法が確立され、治療対象の適切化がなされた。本研究の成果を踏まえて、実用化を目指す治験の実施が開始された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to develop a CAR-T therapy targeting the MAGE-A4 antigen, which is expressed in approximately 50% of esophageal cancers, we comprehensively analyzed the trait analysis, gene expression, and metabolites of TCR transgenic T cells already infused in clinical trials, and biomarkers related to clinical trial information (adverse events, clinical efficacy) Cytokine release syndrome (CRS), clinical efficacy and immunocytological analysis of manufactured TCR-T cells and post-infusion peripheral blood TCR-T cells were performed using clinical specimens in which NY-ESO-1/TCR-T cell infusion was performed and stored under consent. Heterogeneous T cell marker expression of manufactured TCR-T cells was observed in the analysis of T cell products of post-infusion specimens and their peripheral blood samples.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：食道癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MAGE-4 抗原はがん精巢抗原の一つで、食道癌の 50%に発現する。MAGE-A4 は正常組織では発現せず、CAR-T / TCR-T 細胞療法における遺伝子改変 T 細胞輸注に最適な抗原 (shared antigen) とされる。しかし、CAR-T 療法は B 細胞性腫瘍などの造血器腫瘍では目覚ましい有効性が示されたが、食道癌をはじめとする固形腫瘍での CAR-T 療法の有効性を示した報告がほとんどない。これは、固形癌では造血器腫瘍とは異なり、主に腫瘍微小環境での抑制性 T 細胞 (Treg) 等の抑制メカニズムのためと考えられている。

研究担当者の属する三重大の研究グループでは、T 細胞に CAR 遺伝子を導入する際の活性化シグナル分子として GITR (Glucocorticoid-induced TNF-related Protein) を同時に遺伝子導入すると Treg 抵抗性を獲得して、固形腫瘍での有効性が顕著に高まることを確認している。この GITR シグナル遺伝子と MAGE-A4 ペプチド・MHC 複合体を認識する TCR 類似 (TCR-mimic) CAR 遺伝子による CAR-T 療法の基礎研究が進められている。

CAR-T 療法の有害事象として、サイトカイン放出症候群 (cytokine-release syndrome, CRS) と中枢神経障害があり、重篤化することも多く、死亡例の報告もある。治療、予測だけでなく、その予防対策が喫緊の課題である。一方で、臨床効果と CRS は同時に起こることも知られており、CRS を制御しつつ、臨床効果を維持しうる CAR-T 細胞の作製法の改良が極めて重要である。

三重大グループは、遺伝子改変 T 細胞輸注の日本での最も多くの臨床経験例をもっている。なかでも、滑膜肉腫での NY-ESO-1 抗原を対象にした TCR-T 療法で、CRS を発生しながら腫瘍縮小が得られる例と腫瘍縮小のない例があることを経験している。また、TCR-T 細胞製造において培養条件は同一ながら T 細胞の活性化状況が各例で大きく異なることも自験例として保有している。

研究担当者は、CAR-T / TCR-T 療法において輸注する T 細胞中に、腫瘍縮小の有効性を予測する因子、CRS 等の有害事象を予測する因子、がバイオマーカーとして存在する仮説を立てている。

本研究では、日本において TCR-T 臨床試験を中心的に実施し、多数の臨床検体を有する三重大グループで、食道癌を対象にする MAGE-A4 標的 CAR-T 療法において CRS を回避して臨床効果を高める CAR-T 細胞の製造検討を行うものである。

2. 研究の目的

MAGE-A4 抗原標的 CAR (キメラ抗原受容体) -T 療法の開発のため、以下を研究目的とする。

細胞輸注された TCR-T 細胞の形質解析、遺伝子発現、代謝物質の網羅的解析

臨床試験での情報 (有害事象、臨床効果) に関連するバイオマーカーの抽出

バイオマーカーに基づいた CAR-T 細胞製造での培養法の適正化

MAGE-A4 発現食道癌細胞の担癌免疫不全 NOG マウスモデルにおいて抗腫瘍反応の評価と CEA トランスジェニックマウスによる CEA-CAR-T 治療モデルでの有害事象の評価

本研究は、難治性食道癌に有用な CAR-T 療法を開発するために、既に臨床試験で細胞輸注された TCR 遺伝子導入 T 細胞の表面抗原形質と遺伝子発現等の網羅的解析を行い、臨床情報と関連する T 細胞のバイオマーカーを探索する。これまでの探索的検討にて既に 2 分子、CD244, CD39 が候補として挙がっているため、これらが関与する可能性が予想される。

バイオマーカー確定が第 1 の達成項目である。そのバイオマーカーを使用し、臨床試験に用いる CAR-T 細胞製造の最適化が可能であり、さらに最適化 CAR-T 細胞を用いた動物モデルの *in vivo* 研究へ進めることが可能である。In vivo 動物モデルにおいて、有害事象 (CRS) と有効性 (腫瘍拒絶効果) の分離が可能であれば、次の段階として MAGE-A4 抗原発現食道癌を対象にした CAR-T 療法の first-in-human 臨床試験を実施することを計画した。

3. 研究の方法

TCR-T 細胞製造サンプル、末梢血 T 細胞の解析から開始、バイオマーカー抽出までが第一段階とし、その後 CAR-T 細胞製造、*in vitro* 評価、動物モデルによる *in vivo* 評価を最終とした。

2021 年度

三重大に同意のもとで保管されている 38 種の TCR-T 細胞を使用し、mass cytometry によって網羅的抗原分子発現と網羅的遺伝子発現解析を行う。

同じ検体を使用して、臨床的に有効であった例での代謝マーカー (糖代謝、脂肪代謝) の探索解析を行う。

三重大大学のデータベースに記録されている臨床情報 (前治療、CRS などの有害事象、抗腫瘍反応) と解析データとの相関について統計処理を行う。

2022 年度

TCR-T 細胞検体を使用して、臨床的に有効であった例での代謝マーカー（糖代謝、脂肪代謝）の探索解析を行う。

三重大学のデータベースに記録されている臨床情報（前治療、CRS などの有害事象、抗腫瘍反応）と解析データとの相関について統計処理を行い、T 細胞バイオマーカーを特定する。

バイオマーカーに基づいた CAR-T 細胞製造での培養法の適正化と *in vitro* 機能解析

2023 年度

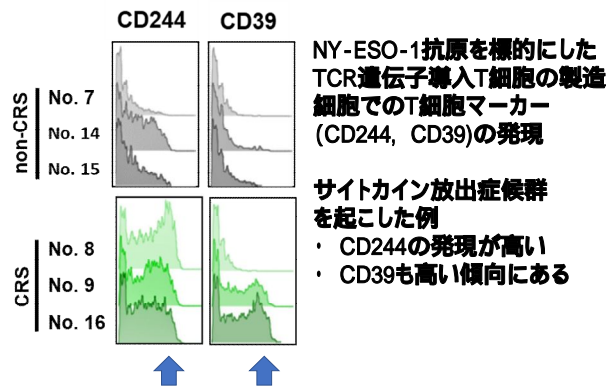
バイオマーカーに基づいた CAR-T 細胞製造での培養法の適正化

MAGE-A4 発現食道癌細胞の担癌免疫不全 NOG マウスモデルにおいて抗腫瘍反応の評価

MAGE-A4 発現食道癌の CAR-T 療法における治験製品概要書作成

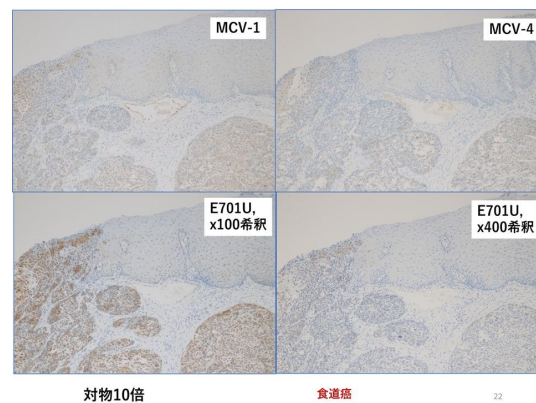
4. 研究成果

食道癌の約 50%に発現する MAGE-A4 抗原を標的とする CAR-T 療法の開発のために、既に臨床試験で細胞輸注された TCR 遺伝子導入 T 細胞の形質解析、遺伝子発現、代謝物質の網羅的解析を行った、臨床試験の情報（有害事象、臨床効果）に関連するバイオマーカーの抽出を行い、NY-ESO-1/TCR-T 細胞輸注を実施し同意のもとで保管されている臨床検体を使用してサイトカイン放出症候群（CRS）、臨床反応と製造 TCR-T 細胞、輸注後の末梢血 TCR-T 細胞の免疫細胞学的解析を行った。その結果、輸注後の検体における T 細胞製品とその末梢血検体の解析で製造 TCR-T 細胞の不均一な T 細胞マーカー発現が観察された。特に右図のように CD39 と CD244 の T 細胞における発現と CRS には関連が示唆された。



MAGE-A4 を標的とする CAR-T 細胞の製造を行い *in vitro* 機能解析を行い、MAGE-A4 陽性腫瘍細胞を効率よく障害できた。またマウスモデルの *in vivo* 実験においても抗原陽性細胞株の抑制効果が確認された。

MAGE-A4 の発現判定法を確立した。新しい抗体である E701U 抗体を用いて 10% をカットオフとする染色判定をすることとした。食道癌の陽性例を示す。MCV-1、MCV-4 染色は従来法であり、今回明確な検出が可能であった。



CAR-T 療法が急性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫で実用化されて、治療効果を発揮しているが、固形腫瘍（癌、肉腫）に対する T 細胞療法は未だ実用化されていない。本研究は難治性固形腫瘍である再発・転移食道癌に対する CAR-T 療法への実用化を目指す基盤研究であり、製造する T 細胞の適切化が可能となる研究成果であり、臨床試験の計画が明確となった。本研究の成果を踏まえて、MAGE-A4 発現食道癌などへの CAR-T 療法の治験の実施が開始された。

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 4件）

1. 著者名 Okumura S, Ishihara M, Kiyota N, Yakushijin K, Takada K, Kobayashi S, Ikeda H, Endo M, Kato K, Kitano S, Matsumine A, Nagata Y, Kageyama S, Shiraishi T, Yamada T, Horibe K, Takesako K, Miwa H, Watanabe T, Miyahara Y, Shiku H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Chimeric antigen receptor T-cell therapy targeting a MAGE A4 peptide and HLA-A*02:01 complex for unresectable advanced or recurrent solid cancer: protocol for a multi-institutional phase 1 clinical trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e065109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjopen-2022-065109.	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 Ishihara M, Kitano S, Kageyama S, Miyahara Y, Yamamoto N, Kato H, Mishima H, Hattori H, Funakoshi T, Kojima T, Sasada T, Sato E, Okamoto S, Tomura D, Nukaya I, Chono H, Mineno J, Kairi MF, Diem Hoang Nguyen P, Simoni Y, Nardin A, Newell E, Fehlings M, Ikeda H, Watanabe T, Shiku H.	4. 巻 10
2. 論文標題 NY-ESO-1-specific redirected T cells with endogenous TCR knockdown mediate tumor response and cytokine release syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Immunother Cancer	6. 最初と最後の頁 e003811.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2021-003811.	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 Nagata Y, Kageyama S, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Abe T, Murakami M, Otsuka K, Ariyoshi T, Kojima T, Taniguchi K, Kobayashi S, Shimada H, Yajima S, Suzuki T, Hirano S, Tsuchikawa T, Shichinohe T, Ueda S, Kanetaka K, Yoneda A, Wada H, Doki Y, Yamaue H, Katsuda M, Ohi M, Yasuda H, Kondo K, Kataoka M, et al.	4. 巻 71
2. 論文標題 Prognostic significance of NY-ESO-1 antigen and PIGR expression in esophageal tumors of CHP-NY-ESO-1-vaccinated patients as adjuvant therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 2743-2755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-022-03194-5.	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 Ishihara M, Nishida Y, Kitano S, Kawai A, Muraoka D, Momose F, Harada N, Miyahara Y, Seo N, Hattori H, Takada K, Emori M, Kakunaga S, Endo M, Matsumoto Y, Sasada T, Sato E, Yamada T, Matsumine A, Nagata Y, Watanabe T Kageyama S, Shiku H	4. 巻 152
2. 論文標題 A phase 1 trial of NY ESO 1 specific TCR engineered T cell therapy combined with a lymph node targeting nanoparticulate peptide vaccine for the treatment of advanced soft tissue sarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2554 ~ 2566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34453	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0件

〔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	宮原 慶裕 (Miyahara Yoshihiro) (10582083)	三重大学・医学系研究科・産学官連携講座教授 (14101)	

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