

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16132

研究課題名(和文) がん微小環境のTSLPシグナルをターゲットとしたCAR-T療法の肺がんへの応用

研究課題名(英文) CAR-T therapy targeting TSLP signaling in microenvironment of lung cancer

研究代表者

渋谷 里紗 (Shibuya, Risa)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90778408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の表面抗原であるAxlを標的抗原としたCARのベクターを作製し、T細胞株であるJurkat細胞に遺伝子導入し、CARの発現をフローサイトメーターで確認した。CARの導入効率は80%-98%と良好であった。作製したAxl-CAR Jurkat細胞がAxlに結合して活性化することをフローサイトメーターで確認した。しかし、A549及び患者の肺癌組織におけるTSLPの発現を確認することができなかった。そこで、TSLP以外のサイトカインシグナルに着目し、それらシグナルを標的としたAxl-CAR-T細胞の作成を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T療法の固形がんへの応用は、がん免疫及び細胞移入療法の分野において現在注目を集めている。これまで、固形がんのCARのターゲット分子の探索や、がん微小環境に耐性なCARが開発されてきたが、固形がん治療でのCAR-T療法の有効性は確立されていない。本研究では、未だ明らかでないがん微小環境でのTSLPの役割に着目し、「がん微小環境の免疫抑制シグナルに負けない」CAR-T細胞の作成を目指す。本研究で期待する結果が得られた場合、肺がんを含む固形がんに対する新たなCAR-T療法として、臨床応用へ繋がる可能性が非常に高い。

研究成果の概要(英文)：A CAR vector targeting lung cancer surface antigen Axl was prepared and transfected into Jurkat cells. 80-98% of the CAR expression on Jurkat cells was confirmed by flow cytometer. The activation of Axl-CAR Jurkat cells by Axl protein was also confirmed by flow cytometer.

However, the expression of TSLP in A549 and lung cancer tissues from patients were not detected. Therefore, we are focusing on cytokine signals other than TSLP, and are working on generation of Axl-CAR-T cells targeting these signals.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 CAR-T療法 癌微小環境 TSLP

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺組織及びがん微小環境における TSLP の機能: TSLP の受容体は、IL-7 受容体 α 鎖 (IL-7R α) と TSLP 受容体鎖の二量体から成り、その下流で JAK1/JAK2 および STAT5 の活性化を介して、細胞の成熟や生存、および炎症細胞の誘導など複数の機能を仲介する。肺組織においては、ウイルスや細菌感染に伴い、肺上皮細胞から TSLP が分泌されることで、液性免疫や 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) を活性化することが知られている (Rochman et al. PNAS. 2010)。また、がん微小環境においても 2 型ヘルパー T 細胞の誘導や免疫抑制性細胞を誘導することで、免疫抑制的な環境への寄与が示唆されている (Lo Kuan et al. The Journal of Immunology. 2014)。しかしながら、肺組織及びがん微小環境における細胞障害性 CD8⁺ T 細胞に対する TSLP の寄与は未だ明らかになっていない (Corren et al. Nature Immunology. 2019)。申請者は、T 細胞特異的な TSLP 受容体欠損マウスが、インフルエンザ感染に対して強い抵抗性を示すことを発見した。さらに、ウイルス感染に伴って肺組織から分泌される TSLP シグナルを遮断することで、CD8⁺ T 細胞が肺組織内で強い細胞増殖を示すことを明らかにした。また、網羅的遺伝子発現解析の結果から、TSLP 受容体欠損 T 細胞では細胞周期の亢進、アポトーシスへの耐性、及び T 細胞の細胞障害性に関する遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。

(2) 固形がん治療における CAR-T 療法の問題点: がん細胞は、免疫抑制性のサイトカインの産生や、免疫抑制性免疫細胞の誘導を介して、細胞障害性 T 細胞を主体とする抗腫瘍免疫を抑制する。また、T 細胞は、がん微小環境で慢性的な刺激を受けることで、PD-1 や CTLA-4 などの免疫チェックポイント分子を発現し、疲弊して機能不全に陥る。近年、人工的ながん細胞特異的な抗原受容体、キメラ抗原受容体 (CAR) を用いた CAR-T 療法が、チェックポイント阻害剤に次ぐ第二のがん免疫療法として注目されている。CAR-T 療法は難治性の小児及び若年性の白血病に対して高い奏功率を示した。一方で CAR-T 療法の固形がんへの応用も試みられているが、免疫抑制性のがん微小環境で十分な細胞障害活性を得られないことが原因となり、未だに十分な治療成績を得られていない。

2. 研究の目的

TSLP 受容体を欠損した CAR-T 細胞を作成して、その抗腫瘍効果及びそのメカニズムを検討する。TSLP 受容体の欠損が、患者由来肺がん組織中でより強い抗腫瘍効果をもたらすことが確認できれば、東北大学医学部呼吸器内科学分野において医師主導臨床試験の構築も視野に入れる。

3. 研究の方法

(1) 肺がん組織における TSLP の発現を、データベース、PCR、ウェスタンブロットティング、IHC により確認する。

(2) チロシンキナーゼである Axl は様々な固形がんにおいて過剰発現し、増殖や浸潤、血管新生、転移に関与している。また、肺がんにおける Axl の高発現は、がん細胞の耐性獲得に寄与しており、予後不良因子として知られている。本研究で使用する CAR-T 細胞の標的として Axl が適切かどうかを評価するために、肺がん組織における Axl の発現を、データベース、PCR、ウェスタンブロットティング、IHC により確認する。

(3) Axl を標的とした CAR ベクターを作製し、Jurkat 細胞に導入して CAR の導入効率をフローサイトメトリーで調べる。

(4) 作製した Axl-CAR-Jurkat 細胞の抗原特異性を、早期活性化マーカーの発現を調べることで検証する。

4. 研究成果

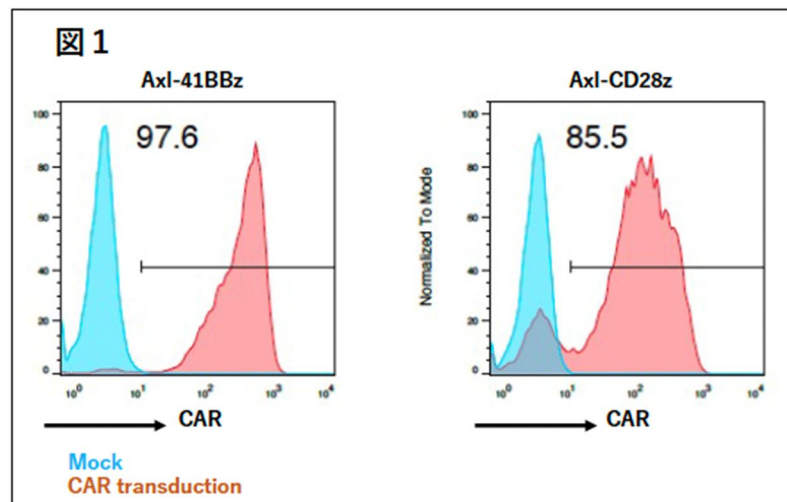
(1) 肺がん組織における TSLP の発現の確認：TCGA を用いた解析で、他の癌腫と比較して肺がんでは TSLP の発現が高いことを確認した。しかし、患者由来の肺がん組織を用いた PCR、ウェスタンブロットリング、IHC では TSLP の発現を確認できなかった。このことから、TSLP シグナル改変 CAR-T 細胞を作製し、その機能を検証するという当初の計画を変更し、TSLP シグナルに変わる着眼点を模索中である。

(2) 肺がん組織における Axl の発現の確認：IHC 及び WB を用いて、肺がん検体及び肺癌細胞株である A549 細胞における Axl の発現を確認した。

(3) TSLP 受容体欠損 CAR-T 細胞の樹立：CAR ベクターは、抗原認識ドメインである scFv 領域と、co-stimulatory molecule などを含むバックボーン領域から構成される。本研究では、CAR-T 細胞のターゲットとしてチロシンキナーゼ受容体 Axl を選択した。既報にある Axl をターゲットとする scFv ドメインの配列を参考にして、Axl-scFv を含むベクターを作成した。一方、co-stimulatory molecule として 41BBz、CD28z をそれぞれ含むバックボーンを使用するため、CD19-41BBz CAR、CD19-CD28z CAR のベクターを入手した。制限酵素反応を用いて、Axl-scFv と CD19-41BBz CAR、CD19-CD28z CAR のバックボーンをそれぞれ結合し、Axl-CAR ベクターを 2 種類作成した。これらベクターを Jurkat 細胞にトランスダクションし、ProteinL を使用した FACS

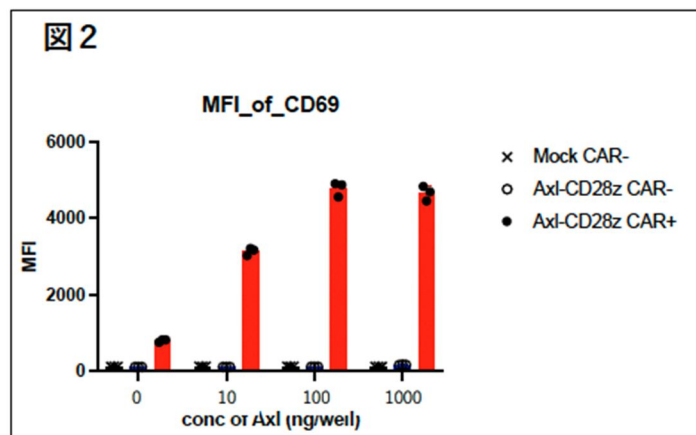
解析で、80%以上の CAR の発現を確認した (図 1)。また、作成した CAR Jurkat 細胞で TSLPR の発現があることを確認した。

(4) 作成した Axl-CAR Jurkat 細胞を、Axl 蛋白コーティングプレートで培養したところ、T 細胞の早期活性化マーカー



である CD69 の発現が Axl 濃度依存的に上昇することをフローサイトメーターで確認した (図

2)。このことから、Axl-CAR Jurkat 細胞が Axl を認識して活性化されることを示すことができた。現在、より Biological な設定で Axl-CAR Jurkat 細胞の機能を検証するために、Axl 強制発現 K562 細胞株の樹立を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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