

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15602

研究課題名（和文）キメラ抗原受容体を樹状細胞に組み込んだ新規細胞療法の抗腫瘍効果機序解析

研究課題名（英文）Analyzing the mechanism of antitumor effects of a novel cell therapy incorporating chimeric antigen receptors into dendritic cells

研究代表者

向山 宣昭（Mukoyama, Nobuaki）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40847521

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）：CAR細胞療法は単一の単鎖可変領域フラグメント(scFv)を介して標的抗原を認識し標的細胞を攻撃することから、標的抗原の多様性ならびに欠損により効果を失う。そこで我々はDCが多様な抗原を提示することが可能であることから、標的抗原を発現している腫瘍と発現していない腫瘍を混ぜてマウスの皮下に移植し、標的抗原が欠損している腫瘍を含んでいる腫瘍（ヘテロ腫瘍）に対するCAR-DCの抗腫瘍効果を検討した。その結果、CAR-DCの抗原特異的T細胞の活性化、ヘテロ腫瘍に対する強い抗腫瘍効果ならびに免疫記憶の成立を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD19を標的とするCAR-T細胞は血液悪性腫瘍の患者に顕著な有効性を示しているが、固形腫瘍患者におけるCAR-T細胞療法に対する効果は散発的かつ一過性である。その理由として、支持組織によるCAR-T細胞の侵入抵抗性ととも、固形腫瘍はヘテロな集団であることから複数の癌抗原の発現量は様々であり、単一の抗原認識をするCAR-T細胞では限界があると考えられる。従って、ヘテロ固形腫瘍に対して効果を発揮するように改良された新規細胞療法の開発は急務といえる。本研究によりCAR-DCがヘテロ腫瘍に対して強い抗腫瘍効果を示したことから、臨床においてヘテロ固形腫瘍に対する効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：CAR cell therapy recognizes target antigens and attacks target cells through a single single-chain variable region fragment (scFv), so it loses effectiveness due to diversity or deletion of target antigens. Therefore, since DCs are capable of presenting a variety of antigens, we subcutaneously transplanted a mixture of tumors that express the target antigen and tumors that do not, and found that the target antigen is deficient. We investigated the antitumor effect of CAR-DC on tumors containing tumors (hetero-tumours). As a result, we confirmed activation of antigen-specific T cells of CAR-DC, strong antitumor effects against heterogeneous tumors, and establishment of immune memory.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：CAR-DC 樹状細胞 抗原提示 免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

癌治療は現在第三世代の新ステージへ入ってきている。第一世代の増殖細胞を標的にした抗癌剤、放射線治療、第二世代の癌の枢軸を担う分子標的薬、分子抗体薬、そして癌による免疫寛容状態を打破し、T細胞やNK細胞による癌攻撃を惹起する、第三世代である。免疫チェックポイント阻害剤が認可され、各種の癌で著しい抗腫瘍効果が確認されている。また、米国で Novartis 社からの CAR-T 細胞療法の FDA 認可が下りた。これは T 細胞に腫瘍表面抗原を認識する抗体由来 scFv と T 細胞活性化に必要な細胞内シグナル伝達ドメインを融合させた CAR を導入し、賦活化された癌特異的抗原認識 T 細胞を作り出し患者の体内に戻すものである。再発・治療抵抗性急性リンパ性白血病に対しては、CD19 抗原を標的とした CD19 CAR-T 細胞療法が極めて有効であることが米国の臨床試験で示され(有効率 70~90%)、国内でも 2019 年に認可され臨床で使用されていることから、CAR 技術を用いた新しい細胞療法は臨床において期待されている。しかし、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法は良好な結果を示していないが、その理由として、腫瘍への CAR-T 細胞の浸潤が十分ではないことが報告されている。したがって、固形腫瘍に対して効果を発揮する改良 CAR-T 細胞療法ならびに新規細胞療法の確立は急務といえる。

2. 研究の目的

DC が外来抗原を取り込み T 細胞にそれら外来抗原を提示し T 細胞を活性化することに注目し、CAR-DC がヘテロ腫瘍に対して抗腫瘍効果を発揮できるかどうか検討した。

3. 研究の方法

マウスにヒト MSLN 発現マウス乳癌腫瘍 4T1 ならびにヒト MSLN を発現していない親株の 4T1 細胞を皮下に移植しヘテロ固形癌腫瘍モデルを作製した。MSLN は CAR-DC および CAR-T 細胞の標的抗原である。細胞内ドメインが TLR3 または TLR9 の CAR-DC をヘテロ腫瘍担癌マウスの静脈内に投与し、CAR-T 細胞と抗腫瘍効果を比較した。さらにヘテロ腫瘍モデルを用いて免疫チェックポイント阻害剤抗 PD-1 抗体と併用効果を調べた。また、腫瘍が完全に退縮したマウスを約 100 日間飼育し、親株である 4T1 を皮下に移植し免疫記憶の成立を検討した。in vitro において CAR-DC の抗原提示能を測定するために CAR 認識抗原発現腫瘍細胞 (Pan02/MSLN/OVA) と CAR-DC を共培養し、OVA で活性化する OT-I マウスの T 細胞を加え、OT-I T 細胞の増殖を指標として、CAR-DC の抗原提示能を測定した。

4. 研究成果

1) CAR-DC はヘテロ腫瘍の増殖を著しく抑制した。

CAR-DC の標的抗原を発現している腫瘍 (4T1/MSLN) とその親株 (4T1) をマウスの皮下に移植、CAR-DC を静脈内に投与し、CAR-DC のヘテロ腫瘍に対する抗腫瘍効果を調べた。細胞内ドメインが TLR3 または TLR9 の CAR-DC を担癌マウスの静脈内に投与し、CAR-T 細胞と抗腫瘍効果を比較したところ、いずれの CAR-DC も CAR-T 細胞より強い抗腫瘍効果を示し、細胞内ドメインが TLR3 の CAR-DC は 6 匹中 2 匹のマウスにおいて腫瘍が完全に退縮する強い抗腫瘍効果が認められた (図 1)。

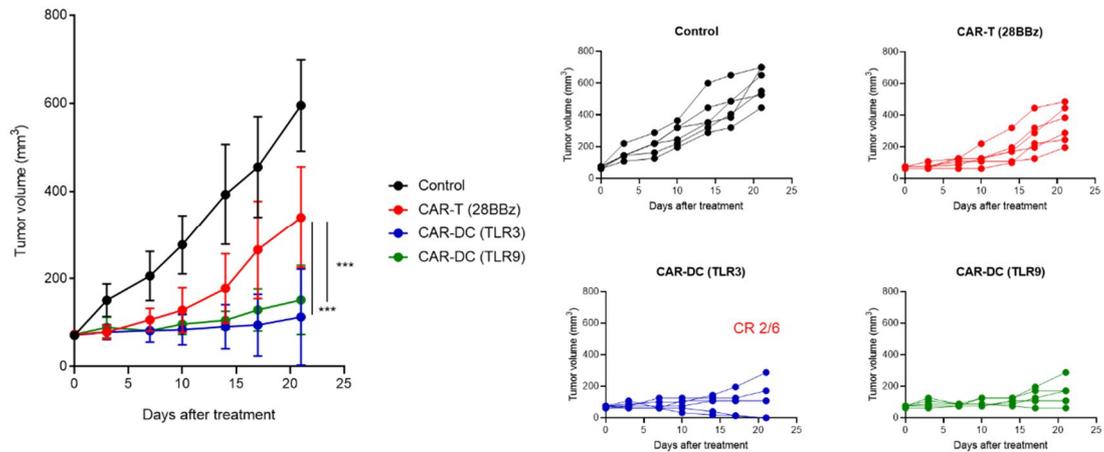


図1 CAR-DC (TLR3 および TLR9) はヘテロ腫瘍の増殖を著しく抑制する。

2) 免疫チェックポイント阻害剤との併用により CAR-DC の抗腫瘍効果が増強したヘテロ腫瘍モデルを用いて抗 PD-1 抗体と CAR-DC (TLR3) の併用効果を検討した。細胞内ドメインが TLR3 の CAR-DC をヘテロ腫瘍担癌マウスの静脈内に投与、抗 PD-1 抗体を腹腔内投与し併用効果を調べたところ、CAR-DC と抗 PD-1 抗体の併用により 6 匹中 4 匹のマウスにおいて腫瘍が完全に退縮する強い抗腫瘍効果が認められ、その効果は CAR-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用効果より強かった (図 2)。

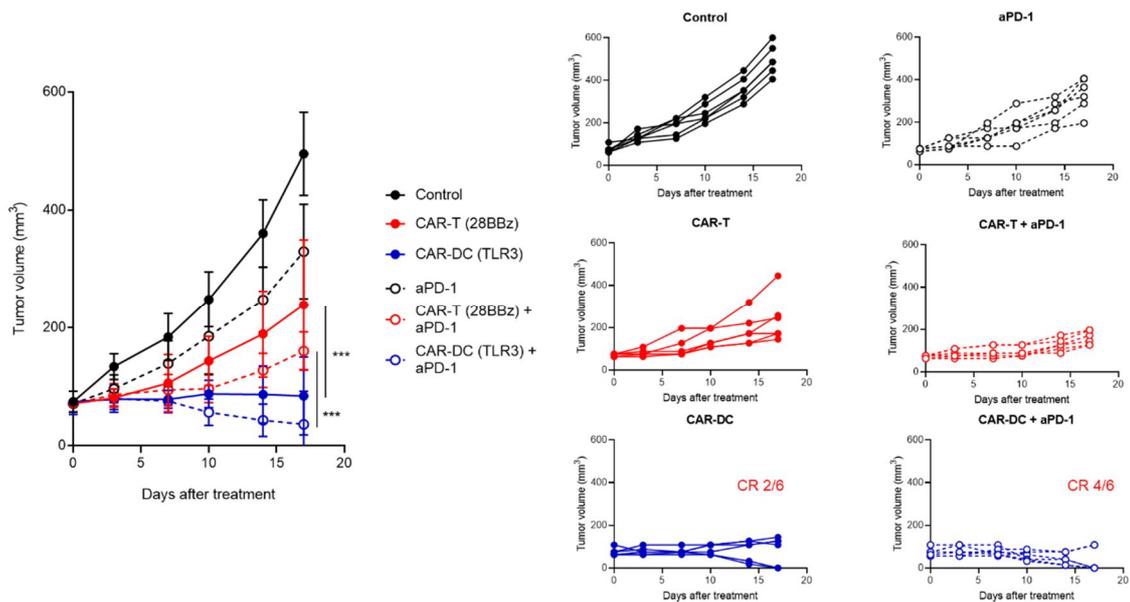


図2 CAR-DC は抗 PD-1 抗体と併用することにより抗腫瘍効果が増強する。

3) CAR-DC は免疫記憶を誘導した。

ヘテロ腫瘍担癌マウスにおいて CAR-DC ならび CAR-DC と抗 PD-1 抗体治療により腫瘍が完全に退縮したマウスを約 100 日間飼育した。その後、CAR-DC の標的抗原を発現していない親株をマウスの皮下に移植し腫瘍の増殖を測定した。その結果、コントロールマウス群では腫瘍の増殖が認められたが、CAR-DC ならび CAR-DC と抗 PD-1 抗体治療により腫瘍が完全に退縮したマウス群では、腫瘍の増殖が認められなかった (図 3)。この結果は CAR-DC 治療により免疫記憶が誘導されたことを示唆する。

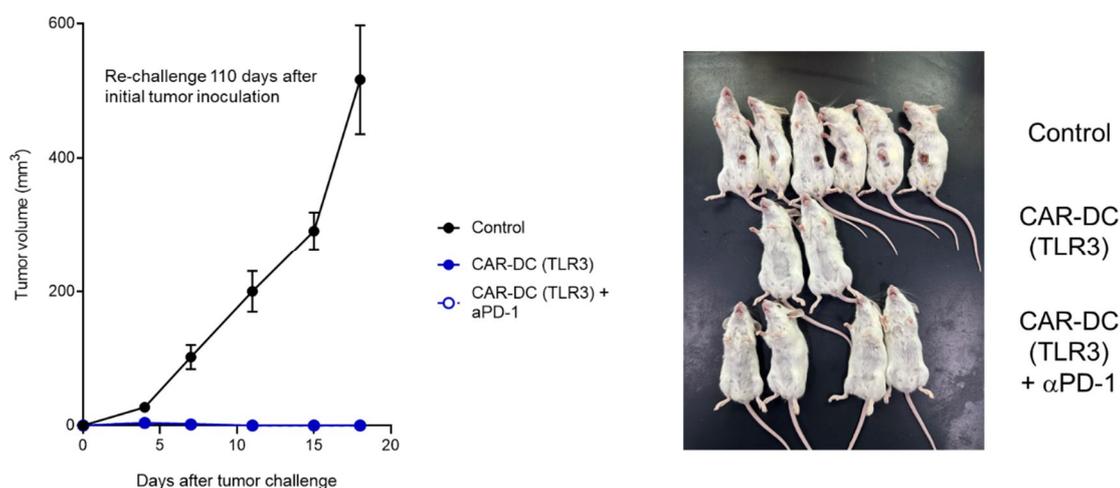


図 3 CAR-DC は免疫記憶を誘導する。

4) CAR-DC は標的抗原以外の抗原を提示する

CAR-DC は腫瘍内にて腫瘍抗原の発現がヘテロである腫瘍の増殖を著しく抑制した。このことから、CAR-DC は CAR を介して成熟後、他の抗原を捕食、その抗原を MHC class I に提示することを示唆した。そこで、CAR-DC が CAR で CAR 認識抗原を認識後、他の抗原をクロスプレゼンテーションするか検討した。CAR 認識抗原(MSLN)ならびに OVA を発現する腫瘍 (Pan02/MSLN/OVA) を CAR-DC(TLR3)と共培養し、その後、MHC class I に提示された OVA により活性化・増殖する OT-I T 細胞 (CFSE 標識済み) を加えた。その結果、OT-I 細胞の CFSE 強度が減弱し、OT-I 細胞の増殖が認められた (図 4)。この結果は CAR-DC が OVA ペプチドを OT-I に提示したことを示し、CAR-DC が抗原をクロスプレゼンテーションすることを示唆した。

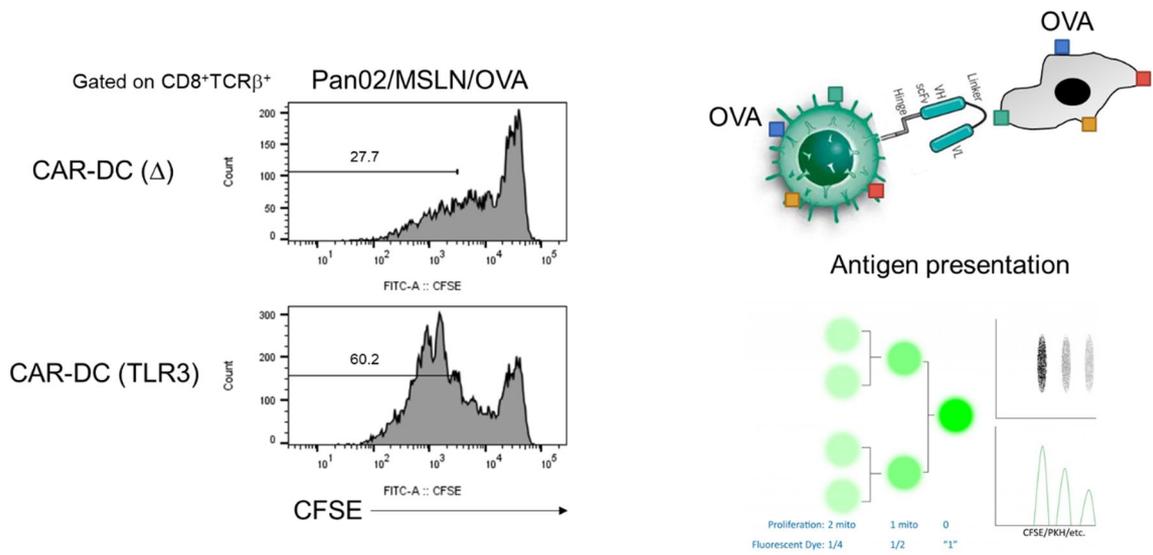


図4 CAR-DCは抗原をクロスプレゼンテーションする。

以上の検討により、CAR-DCはCAR-T細胞が効果を発揮できない固形腫瘍に強い抗腫瘍効果を示すことが期待できる。

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