

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290057

研究課題名(和文) 癌に対する次世代型CAR-T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel CAR-T cell therapy against cancer

研究代表者

玉田 耕治 (TAMADA, Koji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00615841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではキメラ抗原受容体(Chimeric antigen receptor: CAR)を利用したがん免疫療法の応用性を向上させるために、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識した抗腫瘍抗体とFITC認識CAR-T細胞を利用した新規治療法の開発研究を実施した。その結果、複数の標的分子を有する腫瘍細胞に対する高い傷害活性、不均一な標的分子を発現する腫瘍細胞に対する傷害活性、腫瘍新生血管を標的としたがん治療効果などが認められた。このことから、FITC認識CAR-T細胞を利用した次世代型CAR-T細胞療法の優れた応用性が実証された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we explored anti-tumor therapeutic potential of novel CAR (chimeric antigen receptor)-T cell approach which combines FITC (fluorescein isothiocyanate)-labeled anti-tumor antibodies and anti-FITC CAR-T cells. Our studies demonstrated that the novel approach induces potent cytotoxic activity against tumor cells expressing multiple target molecules, and those harboring heterogeneous antigen expressions. In addition, the novel approach inhibits tumor growth by targeting neo-vasculature in tumor tissues. These results thus indicate superior anti-tumor effects and potent applicability of anti-FITC CAR-T cells as a next generation of cancer immunotherapy.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：がん免疫 CAR-T細胞 免疫細胞療法 遺伝子改変技術

1. 研究開始当初の背景

近年 CAR (Chimeric Antigen Receptor: キメラ抗原受容体) を利用した T 細胞の遺伝子改変技術が開発され、がんに対する免疫療法に応用されている。CAR とはがん細胞の細胞表面抗原に結合する一本鎖抗体に、T 細胞の活性化を誘導するシグナル伝達領域を融合させた人工的なキメラ蛋白であり、がん患者の末梢血リンパ球に遺伝子導入することにより、がん細胞を認識し攻撃する T 細胞を大量に作製することが可能となる。世界的な CAR-T 細胞投与療法の臨床試験では、B-ALL を始めとする血液悪性腫瘍に対して有効な臨床効果が報告されている。

CAR-T 細胞療法は進行性難治がんに対する有望な免疫療法であるが、多くのタイプのがんに対して臨床応用し、高い効果を得るためには、解決すべきいくつかの問題点が存在する。第一に、がんの細胞表面抗原に対する一本鎖抗体が樹立していない場合は利用できないこと、第二に、標的抗原ごとに異なる CAR 構造を作製する必要があるため、汎用性が低いこと、第三に、単一の標的抗原を認識し攻撃するため、その欠損・変異細胞では効果が消失すること、である。これらの問題点を克服するために、我々は FITC (Fluorescein Isothiocyanate) を認識する CAR 構造を遺伝子導入した T 細胞を作製し、FITC 付加したがん認識抗体と併用する技術を開発した。これまでの研究により、FITC 認識 CAR-T 細胞は FITC 標識した抗体依存性に活性化し、抗体の特異性に一致して様々ながんに対する傷害活性を発揮することが示された。我々の開発した FITC 認識 CAR-T 細胞は、現在の CAR-T 細胞療法の問題点を解決する最新技術と期待され、その応用性や分子メカニズムのさらなる検証が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、FITC 認識 CAR-T 細胞を利用した、より強力な効果的な次世代型 CAR-T 細胞療法の応用性について検討する。特に、(1) 複数の標的抗原を発現するがん細胞に対する傷害活性、(2) heterogeneous な標的分子を発現するがん細胞に対する傷害活性、(3) 腫瘍新生血管を標的とした FITC 認識 CAR-T 細胞療法の治療効果、について検討する。これらの研究により、FITC 認識 CAR-T 細胞システムと FITC 標識した腫瘍標的分子 (抗体) を組み合わせた次世代型 CAR-T 細胞療法の臨床応用に向けた前臨床データを獲得する。

3. 研究の方法

(1) 複数の標的分子を有する腫瘍細胞に対して、それぞれに対する抗体を同時に利用することで FITC 認識 CAR-T 細胞の腫瘍傷害活性が向上する可能性について検証した。遺伝子導入により EGFR 分子と Her2 分子を同時に発現する腫瘍株を作製し、FITC 標識した抗 EGFR 抗体、FITC 標識した抗 Her2 抗体、あるいはその両方の存在下で、FITC 認識 CAR-T 細胞と共培養し (図 1) 腫瘍細胞に対する傷害活性を ^{51}Cr 放出試験にて解析した。

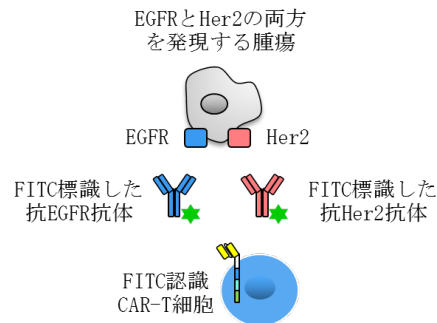


図 1. 2つの標的分子を発現する腫瘍細胞に対する FITC 標識抗体と FITC 認識 CAR-T 細胞による抗腫瘍活性の評価システム

(2) 標的となる分子の発現において不均一性 (heterogeneity) を有する腫瘍細胞に対して、それぞれの標的分子に対する抗体を組み合わせることで FITC 認識 CAR-T 細胞による腫瘍傷害活性が発揮できる可能性について検証した。CD20 のみを発現する腫瘍細胞と EGFR のみを発現する腫瘍細胞を 1 : 1 で混合して不均一な腫瘍細胞集団を作製し、FITC 標識した抗 CD20 抗体、FITC 標識した抗 EGFR 抗体、あるいはその両者の存在下にて FITC 認識 CAR-T 細胞と共培養し (図 2)、残存する腫瘍細胞をフローサイトメーターにて解析した。

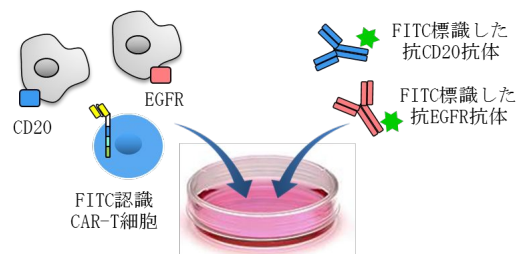


図 2. 異なる標的分子を発現する腫瘍細胞の集団に対する FITC 標識抗体と FITC 認識 CAR-T 細胞による抗腫瘍活性の評価システム

(3) FITC 認識 CAR-T 細胞と腫瘍新生血管に指向性を有するペプチドを利用して、腫瘍新生血管を選択的に攻撃する CAR-T 細胞療法の

開発を実施した。マウスに腫瘍細胞を皮下接種後、11日、16日、21日目に FITC 標識した腫瘍新生血管指向性ペプチドを投与し、12日、19日目に FITC 認識 CAR-T 細胞を輸注した。その後の腫瘍増殖を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) EGFR 分子と Her2 分子を同時に発現する腫瘍細胞に対して、FITC 標識した抗 EGFR 抗体、FITC 標識した抗 Her2 抗体、あるいはその両方の存在下で FITC 認識 CAR-T 細胞の腫瘍傷害活性を検討したところ、2 つの抗体が同時に存在する場合に、有意に高い腫瘍傷害活性が得られることが示された(図3)。このことから、それぞれの発現量が低い標的分子であっても、FITC 認識 CAR-T 細胞を利用してそれらを同時に標的とすることで、高い抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

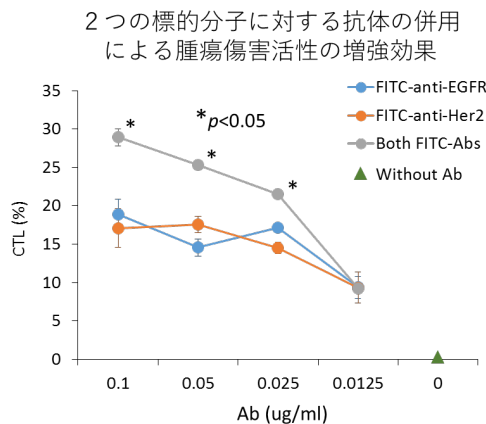


図3. 2つの標的分子を発現する腫瘍細胞に対する FITC 標識抗体と FITC 認識 CAR-T 細胞による抗腫瘍活性

(2) CD20 のみを発現する腫瘍細胞と EGFR のみを発現する腫瘍細胞を 1:1 で混合した不均一な腫瘍細胞集団に対して、FITC 標識した抗 CD20 抗体、FITC 標識した抗 EGFR 抗体、あるいはその両者の存在下にて FITC 認識 CAR-T 細胞と共培養した。その結果、FITC 標識抗 CD20 抗体存在下では CD20 陽性腫瘍細胞のみが傷害され、FITC 標識抗 EGFR 抗体存在下では EGFR 陽性腫瘍細胞のみが傷害されたため、いずれも完全な腫瘍消失は得られなかった。一方、両方の抗体の存在により、すべての腫瘍細胞が傷害され消失した(図4)。このことから、不均一 (heterogeneous) な腫瘍細胞集団に対しても、FITC 認識 CAR-T 細胞と複数の高腫瘍抗体を組み合わせることにより、優れた抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

不均一な標的分子を有する腫瘍細胞に対する傷害活性

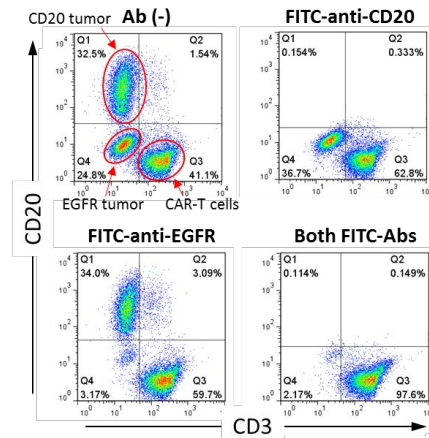


図4. 異なる標的分子を発現する腫瘍細胞の集団に対する FITC 標識抗体と FITC 認識 CAR-T 細胞による抗腫瘍活性

(3) マウスに皮下腫瘍を接種後、FITC 標識した腫瘍新生血管指向性ペプチドを投与した群と投与しない群を作製し、それぞれに FITC 認識 CAR-T 細胞を輸注した。腫瘍新生血管指向性ペプチドを投与しない群では腫瘍の増大を認めた一方、投与した群では有意に腫瘍の増殖が抑制された(図5)。このことから、FITC 認識 CAR-T 細胞を利用することによる腫瘍新生血管を標的とした治療法の可能性が示唆された。

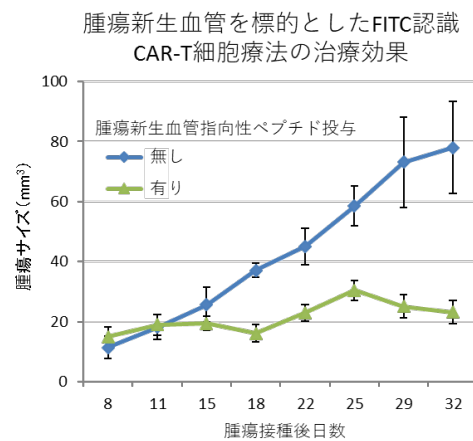


図5. 腫瘍新生血管を標的とした FITC 標識ペプチドと FITC 認識 CAR-T 細胞による抗腫瘍活性

(4) まとめ：本研究成果により、FITC 認識 CAR-T 細胞を利用した次世代型 CAR-T 細胞療法の優れた応用性が実証された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9件)

Kano Y, Iguchi T, Matsui H, Adachi K, Sakoda Y, Miyakawa T, Doi S, Hazama S, Nagano H, Ueyama Y, Tamada K., Combined adjuvants of poly(I:C) plus LAG-3-Ig improve anti-tumor effects of tumor-specific T cells preventing their exhaustion., *Cancer Sci.*, 査読有, 107(4), 2016, 398-406
DOI:10.1111/cas.12861.

玉田耕治, がん免疫療法のアプローチ - 攻める側の強化と守る側への攻略 -, *BIO Clinica*, 査読無, 31, 2016, 39-43.

玉田耕治, CAR 遺伝子導入 T 細胞によるがん免疫細胞療法, *医学のあゆみ*, 査読無, 256, 2016, 805-809.

佐古田幸美, 玉田耕治, CAR-T 療法: がんに対する養子免疫療法の飛躍的進展, *感染症免疫*, 査読無, 46, 2016, 62-64.

奥山奈美子, 佐古田幸美, 玉田耕治, キメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入 T 細胞療法の現状と課題, *医薬ジャーナル*, 査読無, 52, 2016, 113-117.

Adachi K, Tamada K., Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy., *Cancer Sci.*, 査読無, 106(8), 2015, 945-50
DOI:10.1111/cas.12695.

佐古田幸美, 玉田耕治, CAR-T 細胞療法の開発と最新研究の動向, *がん分子標的治療*, 査読無, 13(2), 2015, 90-98.

玉田耕治, キメラ抗原レセプター (CAR) 遺伝子導入 T 細胞によるがん治療, *臨床免疫・アレルギー科*, 査読無, 62, 2014, 344-348

佐古田幸美, 玉田耕治, 複数のがん標的分子を認識する次世代型 CAR-T 細胞の研究と開発, *臨床血液*, 査読無, 55, 2014, 651-656

[学会発表](計 19件)

玉田耕治, がん治療に向けた次世代型 CAR-T 細胞療法の開発, 第 15 回日本再生医療学会総会, 日本免疫治療学研究会ジョイントシンポジウム(招待講演), 2016年3月18日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

玉田耕治, 最新がん免疫療法の潮流と将来展望, 第 103 回日本肺癌学会関西支部学術集会(招待講演), 2016年2月20日, 薬業年金会館(大阪府大阪市)

玉田耕治, 造血器悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の進展と将来展望, 第 24 回広島悪性リンパ腫研究会(招待講演), 2015年11月28日, ホテルメルパルク広島(広島県広島市)

玉田耕治, がん免疫療法の分子・細胞メカニズム解析: さらなる進展を目指して, 第 44 回日本免疫学会学術集会(招待講演), 2015年11月20日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

玉田耕治, 造血器悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の進展と将来展望, 第 26 回山口血液疾患研究会(招待講演), 2015年11月16日, 山口グランドホテル(山口県山口市)

玉田耕治, がん免疫療法の最新研究と将来展望, 第 26 回免疫細胞療法研究会(招待講演), 2015年10月5日, 福島県立医科大学(福島県福島市)

玉田耕治, 免疫療法が切り開くがん治療の新時代, 第 1 回 Immuno-Oncology Forum(招待講演), 2015年8月22日, 第一ホテル東京(東京都港区)

玉田耕治, Next generation CAR-T cells endowed with a superior survival and migration potential, 第 21 回日本遺伝子治療学会(招待講演), 2015年7月24日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

玉田耕治, がん治療に向けた次世代型 CAR-T 細胞療法の開発, 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 CAR-T cell therapy seminar(招待講演), 2015年7月17日, ロイトン札幌(北海道札幌市)

玉田耕治, Novel technology to advance chimeric antigen receptor T cells for cancer immunotherapy, *がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015*(国際学会), 2015年7月10日, 東京大学 伊藤謝恩ホール(東京都文京区)

玉田耕治, がん免疫療法の進歩 - 基礎的

野から -、第 114 回日本皮膚科学会学術総会
(招待講演) 2015 年 5 月 29 日、パシフィコ
横浜 (神奈川県横浜市)

玉田耕治、がん免疫療法の最新研究 - 抗体
療法と細胞療法 -、第 55 回日本呼吸器学会
(招待講演) 2015 年 4 月 18 日、東京国際フ
ォーラム (東京都千代田区)

玉田耕治、がんに対する次世代型 CAR-T 細
胞療法の開発、第 12 回日本免疫治療学研究
会シンポジウム (招待講演) 2015 年 2 月 28
日、東京ガーデンパレス (東京都文京区)

玉田耕治、CAR-T 細胞による免疫療法の将
来展望、日本がん分子標的治療学会 (招待講
演) 2015 年 1 月 20 日、都市センターホテル
(東京都千代田区)

玉田耕治、Novel strategies of chimeric
antigen receptor (CAR)-T cells for cancer
immunotherapy.、第 19 回がん研究会 国際
癌化学療法シンポジウム (招待講演) 2014
年 12 月 11 日、日本科学未来館 (東京都江東
区)

玉田耕治、遺伝子改変 T 細胞療法の次世代
技術開発: CAR-T 細胞療法の改良を目指して、
第 27 回日本バイオセラピー学会シンポジウ
ム (招待講演) 2014 年 12 月 4 日、ナレッジ
キャピタルコングレコンベンションセンタ
ー (大阪府大阪市)

玉田耕治、がん免疫療法の進展と将来展望
- 抗体療法と細胞療法 -、第 35 回癌免疫外
科研究会モーニングセミナー (招待講演)
2014 年 5 月 23 日、シェラトン都ホテル大阪
(大阪府大阪市)

玉田耕治、Development of multitargeting
CAR T cells for cancer immunotherapy、第
75 回日本血液学会学術集会 (招待講演) 2013
年 10 月 12 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

玉田耕治、CAR-T 細胞による免疫療法の将
来展望、第 17 回がん免疫学会 (招待講演)
2013 年 7 月 4 日、ANA クラウンプラザホテル
宇部 (山口県山口市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 耕治 (TAMADA, Koji)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 0 0 6 1 5 8 4 1

(2) 研究分担者

佐古田 幸美 (SAKODA, Yukimi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 3 0 6 2 9 7 5 4

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし