

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830118

研究課題名(和文) 免疫抑制機構と腫瘍特異性の両方を制御する遺伝子改変技術を利用した癌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of new engineered CAR-T cells with the ability to block immune checkpoint pathways

研究代表者

佐古田 幸美 (SAKODA, Yukimi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30629754

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)：がんを認識するキメラ抗原受容体(CAR:Chimeric antigen receptor)を発現したT細胞を投与するCAR-T細胞療法は特に血液悪性腫瘍において優れた臨床効果を示している一方、固形がんに対する効果ははまだ確立していない。その原因の一つとしてがん局所における免疫チェックポイント分子を介した免疫抑制メカニズムが考えられている。本研究において、CAR-T細胞に免疫チェックポイント分子を阻害する能力を付加したところ通常のCAR-T細胞と比較し、より強力な抗腫瘍効果を誘導することを証明できた。

研究成果の概要(英文)：The adoptive transfer of chimeric antigen receptor (CAR) T cells shows an impressive clinical efficacy against B-cell derived hematologic malignancies, while the efficacy against solid tumors have been much less encouraging. One possible explanation of its low efficacy is that solid tumor facilitates immune checkpoint pathways as an important immune resistance mechanism within the tumor microenvironment. In this study, we have shown that CAR-T cells engineered to possess the capacity to block an immune checkpoint pathway can induce strong anti-tumor responses.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫療法 キメラ抗原受容体

1. 研究開始当初の背景

近年のがんに対する免疫療法は、遺伝子改変技術の開発等により飛躍的な発展を遂げている。その中でも患者の末梢血から採取した T 細胞にキメラ抗原受容体 (CAR: Chimeric Antigen Receptor) を発現させ増殖後に患者へ投与する「CAR 発現 T 細胞療法」は、加工せずに投与する従来の養子免疫療法に比べ極めて強力ながん傷害活性が誘導できる (Barrett et al., Annu Rev Med, 2014)。

CAR とは、がん細胞を認識する一本鎖抗体と T 細胞の活性化を誘導する細胞内シグナル伝達領域を融合させたキメラ蛋白である (図 1)。

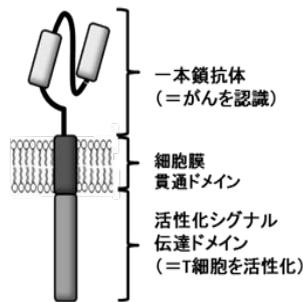


図1. CARの構造

遺伝子導入を用いて T 細胞に CAR を発現させた「CAR-T 細胞」は、通常の T 細胞と異なり一本鎖抗体によりがん細胞を特異的に認識する一方、細胞内に有する活性化シグナルを介してより強力な殺傷効果を発揮できる (図 2)。

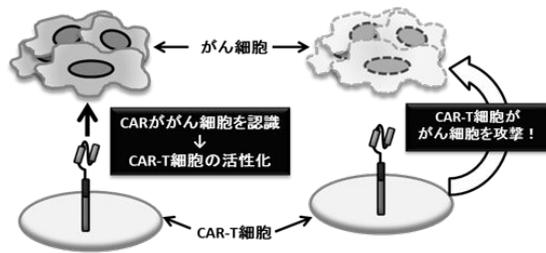


図2. CAR-T細胞による抗腫瘍効果

CAR-T 細胞療法は白血病やリンパ腫といった造血器悪性腫瘍には優れた治療効果を認めるものの、固形がんに対してはまだその効果を十分に発揮できていない。その原因の一つに固形腫瘍のがん微小環境において、免疫チェックポイントと呼ばれる免疫抑制メカニズムが作用していることが考えられる。そこで本研究では、がん免疫応答を抑制する免疫チェックポイント機構に着目し、免疫チェックポイント分子の制御を介してがん局所

の免疫応答を増強させる能力を有する CAR-T 細胞を作製することでより強力な CAR-T 細胞療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究では免疫チェックポイント分子阻害剤を産生する CAR-T 細胞を作製し、これを投与することによりがん局所において CAR-T 細胞のみならず内在性 T 細胞の免疫チェックポイント機構を阻害し、より強力な抗腫瘍効果を誘導することを目標とする。免疫チェックポイント阻害剤の全身投与による治療はがんに対する優れた殺傷効果をもたらす一方、一部の患者に重篤な自己免疫反応を誘導することが知られている。ところが我々の方法では全身性に抗体を投与する必要がないため重篤な副作用を誘導することなく治療効果を増強することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T 細胞の作製

まず我々がすでに有している Human CD20 を認識する CAR コンストラクト (抗 hCD20 CAR) を基に遺伝子改変により免疫チェックポイント分子阻害剤を産生する抗 hCD20 CAR コンストラクトを作製した。これをレトロウイルスベクターに組み込みマウス T 細胞へ遺伝子導入することで免疫チェックポイント分子阻害剤産生 CAR-T 細胞を作製した。細胞を回収しフローサイトメトリーにより CAR の発現を、また ELISA により上清中の阻害剤の検出を確認した。

(2) 免疫チェックポイント分子阻害抗 hCD20 CAR-T 細胞の in vitro 機能アッセイによる抗腫瘍効果の検討

通常の抗 hCD20 CAR-T 細胞および免疫チェックポイント分子阻害抗 hCD20 CAR-T 細胞を作製し、それぞれ培養プレート上で hCD20 陽性がん細胞株と共培養を実施した。二日あるいは三日後に培養細胞を回収し、フローサイト

メトリーにより残存腫瘍細胞と CAR-T 細胞の割合を解析した。本解析結果より免疫チェックポイント分子阻害蛋白の産生による CAR-T 細胞の in vitro がん傷害活性の増強の評価をおこなった。

(3) 免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T 細胞の in vivo における抗腫瘍効果

まず hCD20 発現肺がん細胞株 (3LL) を皮下接種した担癌マウスを作製した。径 5-6mm 大の腫瘍を形成した担癌マウスに非致死量の放射線照射による前処置後、通常 hCD20 CAR-T 細胞あるいは免疫チェックポイント分子阻害抗 hCD20 CAR-T 細胞を担癌マウスに静脈投与した。腫瘍の大きさ、肺転移巣の数、生存率などの評価項目について解析し、免疫チェックポイント阻害 CAR-T 細胞が通常の CAR-T 細胞と比べ in vivo でも優れた腫瘍障害活性を有するか検討した。

4. 研究成果

(1) 通常の抗 hCD20 CAR および免疫チェックポイント分子阻害抗 hCD20 CAR をそれぞれレトロウイルスベクターを用いてマウス T 細胞に遺伝子導入したところ両者とも同

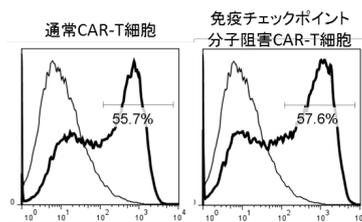


図3. 抗hCD20 CARの発現

程度の抗 hCD20 CAR の発現を認めた (図3)

また、CAR-T 細胞培養上清の ELISA にて免疫チェックポイント阻害蛋白を

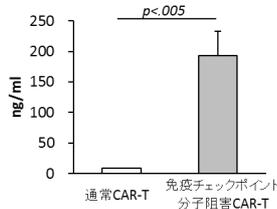


図4. 培養上清中の免疫チェックポイント阻害蛋白の産生

検出した (図4)。これらの結果より免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T 細胞が作製できたことを確認できた。

(2) 次に、(1) で作製した通常 CAR-T 細胞と免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T 細胞をそれぞれ hCD20 陽性肺がん細胞株 (3LL)

と共に培養後、がん細胞と CAR-T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。通常の CAR-T 細胞群ではがん細胞の残存を認めた一方、免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T 細胞ではがん細胞はほとんど認めず CAR-T 細胞が9割以上を占めていたことから免疫チェックポイント分子阻害により CAR-T 細胞の in vitro がん傷害活性が増強することが示された (図5)。

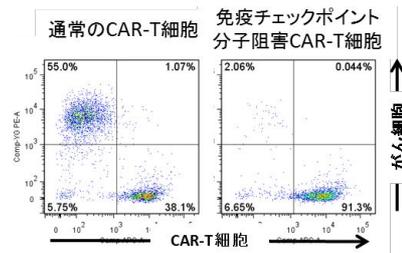


図5. 免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T細胞のin vitroがん傷害活性

(3) 次にマウスに肺がん細胞を接種し担癌マウスを作製し、前処置後に通常抗 hCD20 CAR-T 細胞および免疫チェックポイント分子阻害抗 hCD20 CAR-T 細胞を静脈投与した。腫瘍接種後の腫瘍増殖および生存率を評価したところ、免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T 細胞投与群では通常 CAR-T 細胞と比較し優位に生存期間を延長した (図6)。これより in vivo マウスモデルにおいても免疫チェックポイント分子阻害による抗腫瘍効果の増強を証明した。

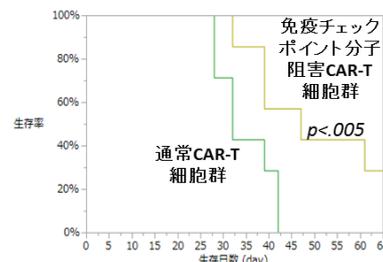


図6. 免疫チェックポイント分子阻害 CAR-T細胞のin vivo抗腫瘍効果

現在はさらなる抗腫瘍効果の増強を目指し複数の免疫チェックポイント分子を阻害する CAR コンストラクトを作製するとともに、ヒト CAR-T 細胞でもヒト由来の腫瘍に対し同様の効果を誘導できるかを検討中である。

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 2 件)

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、vol 13.
no.2,140(90-98)、2015.

Yukimi Sakoda, Koji Tamada

Development of cancer immunotherapy by
next generation multi-targeting CAR-T
cells. Rinsho Ketsueki vol 55:no.6
103(651-656), 2014.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

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：30629754

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし