

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：83904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861270

研究課題名(和文) 免疫抑制環境や腫瘍再燃に応答する遺伝子改変武装化T細胞の開発

研究課題名(英文) The development of immunotherapy in malignant brain tumor to overcome cancer immunosuppression and immune evasion

研究代表者

大野 真佐輔 (Ohno, Masasuke)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：40402606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマは最も予後の悪い癌の一つであり、標準治療では根治を得られない。免疫療法は新しい医療として期待されており、なかでも癌を特異的に認識する抗体と細胞障害性T細胞の活性化因子をシグナルドメインを人工合成したキメラ抗原レセプター(CAR)を用いたCAR-T細胞療法は免疫療法と遺伝子療法を融合させた最新の免疫療法である。我々は悪性グリオーマに発現する抗原を標的とした複数のCARを作成し、グリオーマ発症マウスモデルを用いてその有効性を報告する。また担癌患者の免疫抑制環境を打破すべく、CAR-T細胞療法に新たな遺伝子療法や免疫改変薬を併用し、より強力なCAR-T細胞療法を開発し報告する。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is the most lethal malignant brain tumor in adults despite the improvement on outcomes with this combined chemoradiotherapy approach after maximal surgical resection. In recent years, immunotherapy has emerged as a promising strategy for the treatment of GBM, especially CAR T-cell therapy is considered to be the most promising method to cure cancer. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced T cells can recognize pre-defined tumor surface antigens independent of MHC restriction, which is often downregulated in GBM. We constructed several CARs that recognize antigens expressing on the surface of GBM cells. We also developed new combination therapies to overcome cancer immunosuppression and immune evasion. Additional gene therapy or immunomodulatory drug therapy showed marked improvements in the survival time of the mice models of GBM.

研究分野：Neurooncology

キーワード：cancer immunotherapy CAR glioblastoma immunomodulatory drug gene therapy micro RNA

1. 研究開始当初の背景

(1)悪性グリオーマは最も予後の悪い癌の一つであり、既存治療では根治に至らない。そのため新たな治療法の開発が待たれている。免疫療法は有望な治療法の一つであるが、癌は患者の免疫機能を回避して成長することが知られている。例えば癌に対する免疫機能が活動するきっかけの一つに癌細胞膜表面上の MHC に癌特異抗原のエピトープが提示されることにあるが、癌細胞はこの MHC の発現を抑制することにより癌免疫の開始を回避する。また癌細胞は免疫回避物質を放出することにより癌組織周囲の免疫環境を改変し、患者の癌免疫を抑制したりする。また、癌に対しての標準治療には抗癌剤が多く用いられ、これが免疫細胞の機能をも減弱化させる可能性が示唆されている。患者から採取した T 細胞に腫瘍特異抗原を認識する抗体と T 細胞受容体のシグナル伝達ドメインを融合させたレセプター (Chimeric antigen receptor: CAR) 遺伝子を導入し、CAR を発現させ、これを体内に戻す養子免疫療法は CAR-T 細胞療法とよばれ、MHC に依存せず殺細胞 (癌) 効果を発揮し、特異的な免疫細胞を大量に誘導することが可能となる。

(2)CAR-T 細胞療法は前述のように癌の腫瘍免疫回避の問題を幾分か解決するものの、免疫療法と併用される抗癌剤による免疫細胞そのものへのダメージは免れない。また癌は前述のように免疫抑制物質を放出することにより免疫抑制環境を構築し、癌細胞表面の癌特異抗原の発現を抑制することなどの手段により、なおも免疫療法に抵抗する。これを解決する手段としては免疫抑制環境下での CAR-T 細胞の活性化を維持させる方法を開発したり、新たながん抗原に対する CAR-T 細胞の開発をしたりするなどの対策があげられる。

2. 研究の目的

(1)我々は過去に悪性グリオーマに発現する EGFRvIII を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成した。これをもとに単鎖抗体を作成し、さらに CAR-T 細胞を作成し、この CAR-T 細胞が EGFRvIII 発現グリオーマ細胞に対して特異的に殺細胞効果を発揮することを報告した。この CAR-T 細胞を用いて担癌患者が抱える低い腫瘍免疫の状態を改善させることを試みる。我々はこの目的に対し非翻訳 RNA (non-coding RNA) である miR-17 cluster や免疫改変薬と呼ばれる薬剤の一種レナリドミドに着目した。前者を CAR-T 細胞に遺伝子導入することにより、また後者を CAR-T 細胞と併用することにより担癌患者の癌免疫抑制環境下や化学療法による血液毒性環境下でも高い活性を維持させ、癌再燃時には迅速に再活性化させる。

(2)CAR-T 細胞療法とその強化療法は癌が作り出す免疫抑制環境を克服することが期待されるが、CAR-T 細胞療法は一種類の癌特異

抗原を認識する治療法である以上、癌がこの特異抗原の発現を抑制するといった対抗処置を講ずると治療効果が減弱する可能性がある。そのため新たな癌抗原を標的とした CAR-T 細胞の開発も併せて行い、悪性グリオーマに対する CAR-T 細胞のレパトリーの拡充を目指す。

3. 研究の方法

(1)

EGFRv を特異的に認識する CAR を新たにデザインする。近年使用される CAR には T 細胞の自己増殖能と自己活性化能を強化するためその骨格に副刺激を組み込むことが多くなり、これにより CAR を導入された T 細胞は患者体内で強力に活性化し、増殖する。作成された遺伝子はレンチウイルスベクターに組み込まれる。同様に miR-17 cluster 遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み作成する。これらの遺伝子をヒト T 細胞に遺伝子導入し、その発現を確認する。続けて、遺伝子導入された T 細胞を用いて、in vitro においては抗原特異的に癌障害効果が得られるか、免疫抑制環境や抗癌剤投与環境において有意な活性の上昇が得られるかを検証する。その後、グリオーマ発病マウスモデルを用いて in vivo における抗腫瘍効果、生存延長効果や再発時の迅速な免疫応答について検証し、miR-17 cluster を発現する EGFRv 特異的 T 細胞を用いた治療の有用性を評価する。

EGFRvIII 特異的な CAR-T 細胞にレナリドミドを併用することによる CAR-T 細胞の癌細胞への障害効果の増強を in vitro レベルで評価する。またレナリドミドの CAR-T 細胞への免疫増強作用の機序の解明を試みる。続けて同様にグリオーマ発病マウスモデルを用いて CAR-T 細胞療法とレナリドミドの併用療法の有効性を検証する。

(2)悪性グリオーマに発現する癌抗原ポドプラニンに対する CAR-T 細胞を作成する。ポドプラニン特異抗体 NZ-1 の遺伝子情報から単鎖抗体をデザインし、CAR のシグナルドメイン領域の遺伝子と接合する。続けて、NZ-1 特異 CAR 遺伝子導入用レンチウイルスベクターを作成し、ヒト T リンパ球に導入し CAR-T 細胞を作成し発現を確認する。In vitro において NZ-1 特異 CAR-T 細胞のポドプラニン発現悪性グリオーマ細胞株に対する細胞障害性を検証する。続けてポドプラニン発現マウスグリオーマモデルにおいて CAR-T 細胞療法を行い、腫瘍縮小効果を確認する。

4. 研究成果

(1)CAR-T 細胞に miR-17 cluster を強制発現させることによる CAR-T 細胞療法の強化を試みた。T 細胞の自己活性化と分裂能をもたらす新しい世代の CAR の骨格を用いて、新たな EGFRvIII 特異的 CAR を作成し、レンチウイルスベクターに組み込んだ。同様に miR-17

cluster の遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み、いずれもヒト T 細胞に導入した。この CAR-T 細胞は *in vitro* において EGFRvIII 発現悪性グリオーマ細胞に対して特異的な殺細胞効果を示した。CAR-T 細胞に併せて miR-17 cluster を遺伝子導入した場合、殺細胞効果に大きな違いは認めないものの、実臨床で使われる抗がん剤テモゾロミドで誘発される低免疫環境下での CAR-T 細胞の活性化を有意に維持することができた。続けて EGFRvIII 発現グリオーマ発病マウスモデルにおいて CAR-T 細胞療法は有意な癌縮小・治療効果を認め、特に CAR-T 細胞に miR-17 cluster を導入するとさらに有意に治療効果が増強した(図 1)。この結果を国内および、海外の学会にて報告し、かつ論文として公表した。

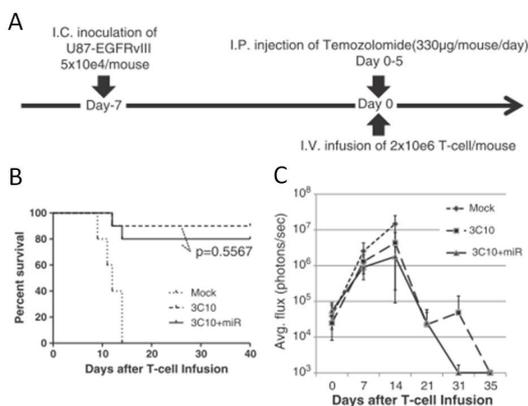


図 1

(2) 免疫改変薬レナリドミドを併用する CAR-T 細胞療法の開発を行った。In vitro においてレナリドミドを添加した CAR-T 細胞は癌特異的な活性の増強と殺細胞効果の増強を示した。続いてグリオーマ発病マウスモデルを用いた *in vivo* の試験において CAR-T 細胞とレナリドミドの併用療法を行った治療群において、CAR-T 細胞単独療法をしのぐ治療効果を示した(図 2)。この結果を国内の学会で発表し、さらに論文として報告した。

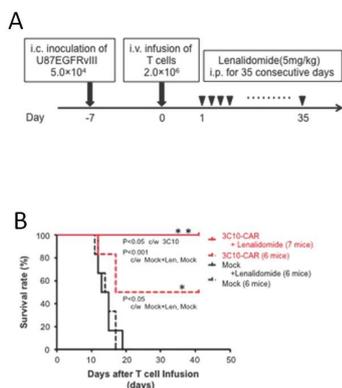


図 2

(3) 悪性グリオーマに発現する新たな腫瘍抗原ポドプランリンに対する CAR の開発を行った。Duke 大学の Bigner 教授との共同研究のもと

モノクローナル抗体 NZ-1 の供与を受け、この抗体の単鎖抗体をデザインし、CAR 遺伝子に組み込みこんだ。In vitro の試験において NZ-1 特異的 CAR の T 細胞上への発現を確認し、この CAR-T 細胞が NZ-1 発現グリオーマ細胞株に対し特異的な殺細胞効果を認めることを確認した。また *in vivo* 試験において NZ-1 発現グリオーマ発病マウスモデルを用いて CAR-T 細胞療法を行い、有意な腫瘍縮小効果を認めた(図 3)。この結果を国内学会において発表し、かつ論文にて公表した。

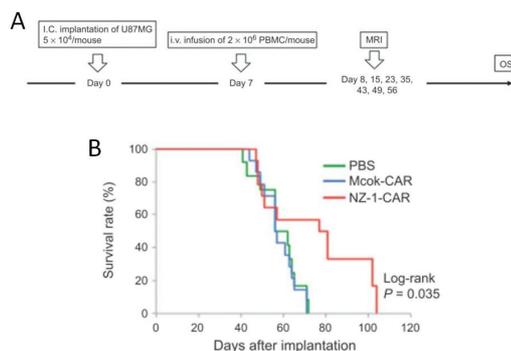


図 3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shiina S, Ohno M, Ohka F, Kuramitsu S, Yamamichi A, Kato A, Motomura K, Tanahashi K, Yamamoto T, Watanabe R, Ito I, Senga T, Hamaguchi M, Wakabayashi T, Kaneko MK, Kato Y, Chandramohan V, Bigner DD, Natsume A. *Cancer Immunol Res.* 2016 Mar;4(3):259-68. doi: 10.1158/2326-6066 査読あり

Kuramitsu S, Ohno M, Ohka F, Shiina S, Yamamichi A, Kato A, Tanahashi K, Motomura K, Kondo G, Kurimoto M, Senga T, Wakabayashi T, Natsume A. *Cancer Gene Ther.* 2015 Oct;22(10):487-95. doi: 10.1038/cgt.2015.47. 査読あり

Ohno M, Ohkuri T, Kosaka A, Tanahashi K, June CH, Natsume A, Okada H. *J Immunother Cancer.* 2013 Dec 16;1:21. doi: 10.1186/2051-1426-1-21. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

倉光俊一郎、夏目敦至、大野真佐輔 他、免疫シナプスを強化する lenalidomide と EGFRvIII キメラ抗原受容体発現 T 細胞の併用効果、第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014 年 11 月 30 日から 12 月 2 日、千葉県浦安市

椎名諭、夏目敦至、大野真佐輔、Darell D

Bigner 他、Podplanin 特異的キメラ抗原受容体を発現する T 細胞の GBM に対する抗腫瘍効果の検討、第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014 年 11 月 30 日から 12 月 2 日、千葉県浦安市

椎名諭、夏目敦至、大野真佐輔、Darell D Bigner 他、Podplanin 特異的キメラ抗原受容体を発現する T 細胞の抗腫瘍効果の検討、日本脳神経外科学会第 73 回学術総会、2014 年 10 月 9 日から 11 日、東京都港区

Masasuke Ohno, Takayuki Ohkuri, Akemi Kosaka, Carl H. June, Atushi Natusume, Hideho Okada, Expression of miR-17-92 enhances anti-tumor activity of T-cells transduced with the anti-EGFRvIII Chimeric antigen receptor in mice bearing human GBM xenografts, American Association for Cancer Research (AACR), Annual Meeting 2014, 2014 年 4 月 5 日から 9 日, San Diego, CA, U.S.A.

大野真佐輔 夏目敦至、岡田秀穂 他、GBM に対する化学療法による低免疫環境に耐性を持つ遺伝子改変 T 細胞療法の開発、第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、2013 年 12 月 8 日から 10 日、宮崎県宮崎市

大野真佐輔 夏目敦至、岡田秀穂 他、EGFRvIII 特異的キメラ抗原レセプターを発現する T 細胞への miR-17-92 遺伝子導入はマウス GBM モデルにおいて抗腫瘍活性を増強させる、日本脳神経外科学会第 72 回学術総会、2013 年 10 月 16 日、神奈川県横浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 真佐輔 (OHNO, Masasuke)
名古屋医療センター・脳神経外科・医員
研究者番号：40402606

(2) 連携研究者

夏目 敦至 (NATSUME, Atsushi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30362255

(3) 研究協力者

岡田 秀穂 (OKADA, Hideho)
ピッツバーグ大学・脳神経外科・教授

倉光 俊一郎 (KURAMITSU, Shunichiro)
名古屋大学・医学系研究科

椎名 諭 (SHIINA, Satoshi)
名古屋大学・医学系研究科