

平成 31 年 2 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830107

研究課題名(和文) がん微小環境中にリンパ組織様構造の形成を誘導する新規細胞免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel chimeric antigen receptor-expressing T cells promoting immune cell infiltration and survival in the tumor tissue

研究代表者

安達 圭志 (ADACHI, Keishi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40598611

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)：本研究課題では、より効果的に抗がん作用を発揮する次世代型キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)発現T細胞を用いた、新たながん治療法を創出することを目指し、以下の成果を得た。

1) がん抗原特異的なCARと共にT細胞の生存に関わる蛋白および遊走に関わる蛋白を一細胞に同時に発現する次世代型CAR-T細胞を作成した。2) 実験的がんマウスモデルにおいて、次世代型CAR-T細胞は従来型CAR-T細胞よりも優れた抗がん効果を発揮した。3) 次世代型CAR-T細胞の強力な抗がん効果の分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project is to generate a novel cancer therapy using the next generation chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cell that exerts anti-cancer effect more effectively than the conventional one. So far, the following results have been obtained;

1) The next generation CAR-T cell that concomitantly expresses CAR specific to a tumor antigen, a cytokine committing to T cell survival, and a chemokine inducing migration of T cells was generated. 2) The next generation CAR-T cells exerted more potent anti-tumor effects than the conventional one in several murine tumor models. 3) Molecular mechanisms underlying the potent tumoricidal efficacy of the next generation CAR-T cells were elucidated.

研究分野：免疫学

キーワード：次世代型キメラ抗原受容体発現T細胞 サイトカイン ケモカイン がん 抗がん効果

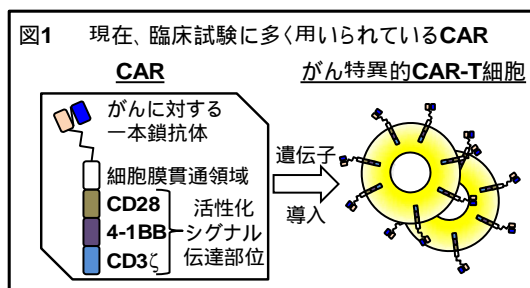
1. 研究開始当初の背景

1981年以降、我が国ではがんが死亡原因の一位となっており、現在でもその上昇傾向に歯止めがかかっていない。昨今では日本における全死亡者の約3.5人に1人が、がんで死亡したとされている。また、がん患者の診断や治療に要する医療費は著しく増大し、日本経済を圧迫する一因ともなっている。政府が策定した新成長戦略では、『ライフ・イノベーション』すなわち医療・健康・介護分野における技術革新が重要な柱と定められており、がんに対する最先端の診断技術や治療技術、治療薬を日本発で開発していくことは極めて重要な社会的課題である。本研究を介して、我が国発の革新的ながん免疫療法を開発することは、患者とその家族の利益に資すると同時に、我が国の経済・成長戦略に貢献することを目的としている。

従来の外科療法・化学療法・放射線療法で治療できない難治がんや進行がんに対する治療法として、次世代型免疫療法の基礎研究・臨床開発が現在進展している。特に、がん特異的なキメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR) を遺伝子導入した T 細胞を移入する CAR-T 細胞療法は極めて有望な新技術として注目されている。CAR とは、がんの細胞表面抗原に特異的な一本鎖抗体と T 細胞活性化に関わる分子のシグナル伝達領域を組み合わせた抗原受容体である (図1)。現在、欧米を中心に CAR-T 細胞の臨床試験が進行しており、白血病やリンパ腫などの血液系悪性腫瘍などに対して優れた治療効果が報告されている。しかし、CAR-T 細胞療法は完成されたものではなく、克服すべき問題点も多く指摘されている。特に、

『固形がんに対して効果が乏しい』

ことは大きな課題であった。



2. 研究の目的

CAR-T 細胞療法が血液系悪性腫瘍に対しては高い効果を発揮する一方、固形がんに対しては効果が乏しい理由はこれまでも複数想定されているが、その中でも特に、

- がん局所に CAR-T 細胞が集積しない

- がん微小環境内では CAR-T 細胞が長期間生存できない

ことは特に重要視されている。そこで、上記の2つの問題を克服するべく、以下のような CAR-T 細胞に関する技術革新を行うことを本研究の目的とした (図2)。

一個の T 細胞に、CAR とともに細胞の遊走、生存に直接関わる蛋白を同時に発現させ、がん特異的の反応性に加えて『長期生存し、他の免疫細胞と協調する能力』を付与した、『次世代型 CAR-T 細胞』の技術的基盤を確立する。

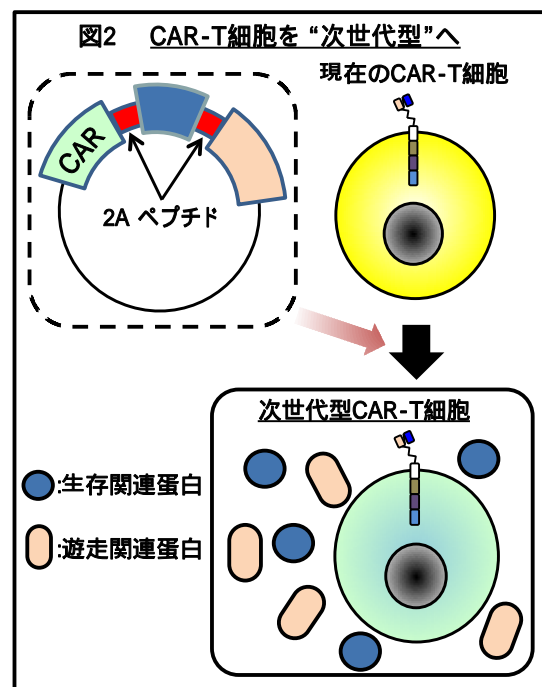
さらに、病巣、あるいはその周辺部に浸潤すると予想されるリンパ球や樹状細胞等の細胞群に着目し、

マウス腫瘍モデルにおいて、がん局所で次世代型 CAR-T 細胞が効率的に長期間生存し、かつ従来型の CAR-T 細胞よりも強力な抗腫瘍効果を発揮するために必要な内因性のメカニズムを明らかにする。

本研究の目的を達成することで、

- 病巣局所において、CAR-T 細胞の十分な増殖・活性化が誘導されて強力な抗がん効果が発揮されるだけでなく、それに続いてメモリー T 細胞 (記憶 T 細胞) が誘導され、長期スパンでがんを監視し続けて再発予防の役割を担うことができる。
- 移入した次世代型 CAR-T 細胞は、患者由来の免疫細胞と協調してより効率的にがん細胞を攻撃する。

という、従来型の CAR-T 細胞では得られなかった効果を誘導し、固形がんに対して強力な治療効果をもたらすことが期待された。



3. 研究の方法

一個のT細胞に複数の蛋白を独立して発現させる新規ベクターシステムを開発するため、CAR、細胞の遊走に関わる蛋白、生存に関わる蛋白、の3つの蛋白の間には“auto-cleavable linker”である、手足口病ウイルス由来の2Aペプチド(*)を挿入した(図2)。

(*)2Aペプチド:ピコルナウイルス由来の18~22アミノ酸からなるペプチドで、『-D-V/I-E-(X)-N-P-G-P-』という共通配列中のG-P間が、小胞体で切断される。

上記を踏まえ、平成26年度は主に、CARと細胞の遊走、生存に直接関わる蛋白を一細胞に同時に発現する次世代型CAR-T細胞の作製法を確立し、*in vitro*系において、細胞生存能、細胞遊走活性、殺腫瘍能などを、従来型のCAR-T細胞と比較・検討した。

平成27年度は主に、マウス腫瘍モデルを用いて、次世代型CAR-T細胞の生体内での抗がん効果、細胞の生存期間および抗がん効果の持続期間、病巣部の免疫組織学的評価などを行った。

平成28年度は、マウス腫瘍モデルを用いて、がん局所で次世代型CAR-T細胞が効率的に長期間生存し、かつ従来型のCAR-T細胞よりも強力な抗腫瘍効果を発揮するために必要な内因性のメカニズムを、遺伝子、蛋白、細胞、それぞれのレベルで詳細に解析した。

4. 研究成果

平成26年度には以下のことが実施された。

自己切断能を有するピコルナウイルス由来2Aペプチドを利用して、がん抗原特異的なCARと共に、細胞の生存に関わるサイトカインと、T細胞など免疫担当細胞の局所遊走を誘導するケモカインを、一細胞に同時に発現させる、次世代型CARのコンストラクトを作成した。

レトロウイルスベクターを用いて、上記のコンストラクトをマウスのプライマリーT細胞に遺伝子導入した。CAR、遺伝子導入を行ったサイトカインおよびケモカインの発現は、フローサイトメーター、およびELISAを用いて確認した。

放射性クロミウムリリースアッセイを行った結果、次世代型CAR-T細胞は、従来型CAR-T細胞と同等の殺腫瘍能を有していることが分かった。

次世代型CAR-T細胞は従来型CAR-T細胞

と比較して、生存能と増殖能が増進していた。

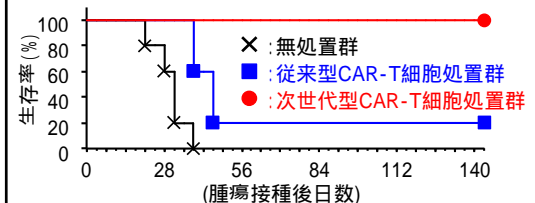
次世代型CAR-T細胞の産生するケモカインの細胞遊走活性は、トランスウェルアッセイによって確認した。

実験的がんマウスモデルにおいて、次世代型CAR-T細胞を投与することにより、従来型CAR-T細胞の投与よりも、マウスの生存期間が延長された(図3)。

組織学的解析の結果、次世代型CAR-T細胞が投与されたマウスの腫瘍組織内には、著名なT細胞の浸潤が見られた。

以上のことから、次世代型CAR-T細胞は従来型CAR-T細胞と比較して、優れた抗がん作用を有している可能性が高いことが予想された。

図3 次世代型CAR-T細胞は従来型のCAR-T細胞よりも極めて高い抗がん効果を発揮する



ヒトCD20(hCD20)を人工的な抗原として遺伝子導入した腫瘍を皮下接種したのち、hCD20を標的とする同数の従来型あるいは次世代型CAR-T細胞を静脈内投与した。従来型CAR-T細胞を投与した群ではほとんどのマウスが6週以内に死亡するのに対して、次世代型CAR-T細胞を投与した群では全てのマウスに腫瘍の完解が認められた。

平成27年度には以下のことが実施された。

組織学的解析の結果、次世代型CAR-T細胞が投与されたマウスの腫瘍組織内には、多数のT細胞以外の免疫担当細胞も浸潤しており、腫瘍局所で免疫応答が起こっていることを示唆する像が得られた。

腫瘍組織内に浸潤している細胞は、ドナー由来だけではなく、レシピエント(ホスト)由来の細胞も混在していた。

サイトカインのみを産生するCAR-T細胞、ケモカインのみを産生するCAR-T細胞を作成し、次世代型CAR-T細胞と*in vivo*における抗がん効果を比較したところ、次世代型CAR-T細胞ほどの抗がん効果は認められなかった。

サイトカインのみを産生するCAR-T細胞とケモカインのみを産生するCAR-T細胞の両方を担がんマウスに投与しても、次世代型CAR-T細胞ほどの抗がん効果は認められなかった。

以上のことから、次世代型CAR-T細胞の*in vivo*における抗がん効果は、サイトカインとケモカイン、両方の因子が一細胞から同時に産生され、免疫担当細胞を局所に集積させる

ことに依存していることが示唆された。

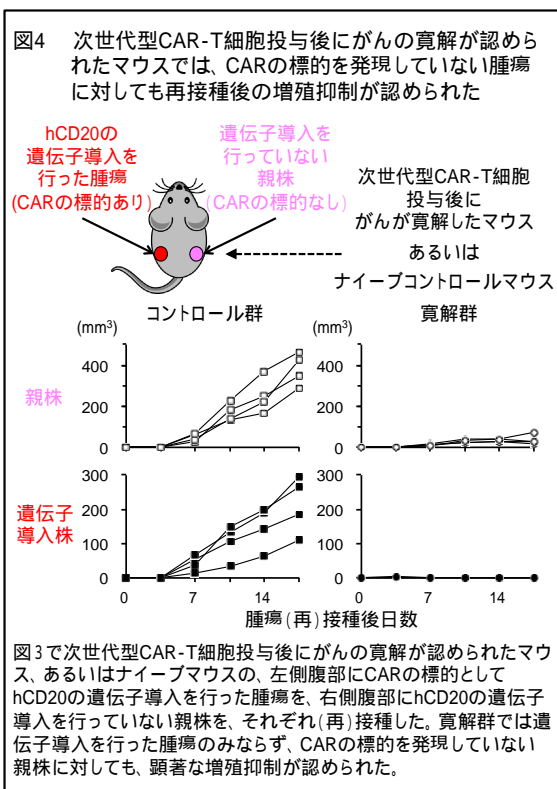
平成 28 年度には以下のことが実施された。

次世代型 CAR-T 細胞投与後、がん局所に集積するレシピエント T 細胞の、抗がん効果における役割を検討するため、レシピエントの T 細胞に特異的な抗体を投与することでレシピエントの T 細胞を除去したところ、抗がん効果は減弱した。

次世代型 CAR-T 細胞の投与後、効果的に免疫記憶が形成されているかを検討するため、寛解が誘導されたマウスに同種のがんを再接種したところ、がんの生着は認められなかった。

次世代型 CAR-T 細胞投与後にエピトープスプレッディングが誘導されるのかを検討するため、がんの寛解が認められたマウスに、同種ではあるが CAR の標的が発現していないがんを接種したところ、顕著な増殖抑制が認められた (図 4)。

以上のことから、次世代型 CAR-T 細胞は、投与後、レシピエントの T 細胞と相互作用して相乗的に抗がん効果を発揮するとともに、効率的に免疫記憶を形成することでがんの再発を抑制していると考えられた。また、抗がん効果にはエピトープスプレッディングも重要な役割を果たしていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Keishi Adachi, Yosuke Kano, Tomohiko Nagai, Namiko Okuyama, Yukimi Sakoda, Koji Tamada
IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor.
Nature Biotechnology 査読有、36(4)、2018、346-351
DOI: 10.1038/nbt.4086

〔学会発表〕(計 1 件)

Keishi Adachi and Koji Tamada
Development of functionally improved, novel chimeric antigen receptor-expressing T cells against tumors
International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015
2015年07月09日~11日
東京都文京区(東京大学 伊藤国際学術研究センター)

〔産業財産権〕

取得状況(計 2 件)

名称: CAR発現ベクター及びCAR発現T細胞

発明者: 玉田耕治、佐古田幸美、安達圭志

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: W0/2016/056228

国際出願日: 2015年6月10日

国際公開日: 2016年4月14日

国内外の別: 外国

名称: 免疫機能制御因子を発現する免疫担当細胞及び発現ベクター

発明者: 玉田耕治、佐古田幸美、安達圭志

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: W0/2017/159736

国際出願日: 2017年3月15日

国際公開日: 2017年9月21日

国内外の別: 外国

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安達 圭志 (ADACHI, Keishi)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40598611