

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04018

研究課題名(和文) 肉腫に対する新世代治療法の確立を志向した腫瘍血管傷害型CAR-T細胞の創薬化研究

研究課題名(英文) Drug discovery research on tumor vessels-injuring CAR-T cells aimed at establishing a new generation treatment for sarcoma

研究代表者

岡田 直貴 (OKADA, Naoki)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90312123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟部肉腫(STS)は不均一で攻撃的な悪性腫瘍であり、有効な治療法はほとんどない。我々は、血管内皮増殖因子受容体2(VEGFR2)特異的キメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞を開発し、腫瘍血管傷害型CAR-T細胞療法の確立を進めてきた。本研究では、mRNA導入法で作製した抗VEGFR2 CAR-T細胞の製造と輸送を最適化し、STS患者に対する本療法の有効性と安全性の可能性を推定できる情報を収集した。重要な結果として、STS患者のがん組織標本のほとんどでVEGFR2発現が検出され、本療法がSTSの新しい治療オプションとして有望であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の低分子医薬や抗体医薬では難しかった「腫瘍血管傷害」を作用機序とするCAR-T細胞の再生医療等製品が実用化されれば、固形がんに対して汎用性に優れた新規がん治療オプションを創出することとなり、集学的治療戦略に組み込むことで難治性がんに対する奏効率の向上に大きく貢献できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Soft tissue sarcomas (STSs) are heterogeneous and aggressive malignancies with few effective therapies available. We have developed T cells expressing a vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-specific chimeric antigen receptor (CAR) to establish tumor vessels-injuring CAR-T cell therapy. In this study, we optimized the manufacturing and transportation of mRNA-transfected anti-VEGFR2 CAR-T cells and collected information that allowed the extrapolation of efficacy and safety potential of our therapy for STS patients. Importantly, immunohistochemistry showed that most of the STS patients' specimens expressed VEGFR2, suggesting a great potential of our approach as a new treatment option for STSs.

研究分野：薬物送達学、免疫医薬品学

キーワード：細胞療法 腫瘍免疫 キメラ抗原受容体 肉腫 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

近年、任意の抗原に対して T 細胞の活性化を惹起することができるキメラ抗原受容体 (CAR) の創製と、それらを発現させた T (CAR-T) 細胞を用いたがんに対する免疫細胞療法の開発が欧米を中心に活況を呈しており、多くの臨床試験/治験が計画・実施されている。申請者は、血管内皮細胞増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 特異的な CAR-T 細胞が腫瘍血管標的化能 (腫瘍組織集積性の増強) および腫瘍血管傷害活性 (様々な固形がんに対する増殖抑制効果) を発揮することによって、固形がんに対する CAR-T 細胞療法の治療効果改善のみならず汎用性と利便性の向上にも貢献できることを実証した<sup>1</sup>。これら動物実験において得られた有望な成果を臨床へと展開するためには科学的根拠に基づく高い安全性が求められるため、CAR-T 細胞作製法としてこれまで使用してきたレトロウイルスベクター遺伝子導入法から遺伝毒性を払拭しうる新たな方法論への移行が望まれた。そこで CAR 発現期間 (作用発現期間) は一過性であるものの、時間経過とともに元の T 細胞に戻ることで副作用リスクを低減させることができる mRNA エレクトロポレーション (mRNA-EP) 法を問題解決へのアプローチと位置づけ、本法が T 細胞の性質を変えずに CAR を発現させられる手法であり、作製した CAR-T 細胞が臨床応用においても有効性が期待できることを報告した<sup>2</sup>。また、腫瘍血管傷害性 CAR-T 細胞療法のコンセプトにあった対象症例を選定する中で、VEGFR2 が非常に強く発現しているとされる肉腫をターゲットとすることとした。大阪大学では整形外科を中心にアンメット・メディカル・ニーズとしての希少疾患である肉腫治療に対する専門臨床チームを構成し、毎年約 30 名の肉腫患者の診察、治療を行っている。既にヒト肉腫細胞の株化、マウス Xenograft モデルを作製済みであり、血管肉腫をはじめとする一部の肉腫においては腫瘍新生血管のみならず腫瘍細胞自身にも VEGFR2 が非常に強く発現していることを確認している<sup>3</sup>。したがって、これらの肉腫に対して VEGFR2 特異的 CAR-T 細胞療法は、腫瘍血管の傷害に基づく効果だけでなく、腫瘍細胞自身に対する直接的な傷害による有効性も期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、mRNA-EP 法により作製した腫瘍新生血管を標的とする CAR-T 細胞医薬を医師主導治験へと展開すべく、治療有効性・安全性根拠に関する基盤データの強化ならびに臨床用 CAR-T 細胞の製造体制構築を計画し、研究終了時まで非臨床試験へと進める状態を目指す。CAR-T 細胞療法は血液がんでの治療で高い有効性が示されているものの固形がんに対しては臨床開発が立ち遅れており、加えて高額な治療費となることが想定されている。本課題では mRNA-EP 法を用いることにより、より安全で安価な CAR-T 細胞療法の社会実装が期待される。がん細胞表面の抗原が明らかとなっているがん種を標的とするのが主流となっている CAR-T 細胞療法研究のなかで、腫瘍新生血管を標的とした CAR-T 細胞療法はそれらと一線を画すアカデミア発シーズの治療法として、肉腫のみならず多種多様な悪性固形腫瘍にも水平展開できる可能性を秘めている。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床研究用 CAR-T 細胞の製造に向けた CAR mRNA の最適化

(1)-1. CAR 遺伝子をコードした mRNA の In vitro 合成

CAR mRNA は、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて CAR 遺伝子の転写、ARCA の付加、poly (A) の付加を添付のプロトコルに従い実施することで得た。

(1)-2. mRNA-EP 法

ヒト T 細胞は、健常人ボランティアより採取した PBMC を、Autologous human serum を添加した ALyS505N-175 (Cell Science and Technology Institute) に懸濁し、固相化 Anti-human CD3 mAb (5 µg/mL, Clone OKT3, Janssen Pharmaceutical K.K.) プレートおよび細胞培養バッグで 13 日間培養することで得た。これら活性化ヒト T 細胞は、CAR mRNA を含む Opti-MEM に懸濁し、CUY21Pro-Vitro 16 (Nepa Gene) あるいは MaxCyteGT system (MaxCyte) を用いた EP 法により CAR mRNA を細胞内へと導入した。EP 処置したヒト T 細胞は ALyS505N-175 で培養した。Cell viability はトリパンブルー排除法により測定した。

(1)-3. 細胞内 CAR mRNA の定量

細胞中の Total RNA を抽出し、cDNA を合成した。得られた cDNA ライブラリ中に含まれる抗 hVEGFR2 CAR cDNA およびヒト GAPDH cDNA は、TaqMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific) と CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) を用いて検出した。各 CAR-T 細胞における CAR mRNA レベルは、CAR cDNA 検出レベルと GAPDH cDNA 検出レベルとの比較サイクル閾値 (Ct) 法 ( $2^{-\Delta Ct}$ ) より算出した。

(1)-4. ヒト CAR-T 細胞における CAR の膜発現解析

ヒト CAR-T 細胞を適切な蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーター (FACS Canto II) を用いて解析し、FlowJo ソフトウェアを用いて生細胞中における CD8<sup>+</sup>細胞を分画し、CAR の発

現を解析した。

#### (1)-5. CAR-T 細胞の細胞傷害試験

**L1.2 細胞 (VEGFR2 非発現細胞)** を **labeled Tag-It Violet Proliferation Cell Tracking Dye (BioLegend)** を用いて、**hVEGFR2 発現 L1.2 細胞 (VEGFR2 発現ターゲット細胞)** を **Cell Proliferation Dye eFluor 670 (Thermo fisher scientific)** を用いてそれぞれ蛍光標識した。各細胞は  $1 \times 10^6$  cells/mL となるよう調製し、**L1.2 細胞と hVEGFR2 発現 L1.2 細胞** を等量ずつ混合し、**200  $\mu$ L** ずつ **48-well plate** に播種した。**CAR-T 細胞** は、 $7 \times 10^5$ – $2 \times 10^7$  cells/mL となるよう調製し、**200  $\mu$ L** ずつターゲット細胞播種プレートに添加した。**18 時間**培養した後、**5  $\mu$ L** の **Count Bright Absolute Cell Counting Beads (Thermo fisher scientific)** と **10  $\mu$ L** の **7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend)** を各試験ウエルに添加し、**FACS CantoII** を用いて、**1000 個の Cell Counting Beads** 検出時における **VEGFR2 非発現細胞と VEGFR2 発現ターゲット細胞** の数を測定した。

#### (2) mRNA 導入 CAR-T 細胞の輸送条件の検討

##### (2)-1. mRNA 導入 CAR-T 細胞の輸送

ヒト **CAR-T 細胞** の凍結検討では、**EP 処置** から **3 時間**培養した **T 細胞** を **CP-1 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial)** と混合し、プログラムフリーザーを用いて緩慢凍結した。凍結した **CAR-T 細胞** は、ウォーターバスを用いて急速融解し、実験に供した。ヒト **CAR-T 細胞** の輸送温度条件の検討では、**EP 処置** から **18 時間**培養した **T 細胞** を **50 mL** チューブに分取し、温度ロガーとともに、**4 $^{\circ}$ C** または **18 $^{\circ}$ C** に調整した保冷バッグに保管し輸送した。保管から **6 時間**後の細胞を回収し、実験に供した。

##### 2)-2. ヒト抗 hVEGFR2 CAR-T 細胞のがん細胞排除効果

**Tag-It Violet Proliferation Cell Tracking Dye** で標識した  $1 \times 10^6$  個の **L1.2 細胞** と、**Cell Proliferation Dye eFluor 670** で標識した  $2 \times 10^6$  個の **hVEGFR2 発現 L1.2 細胞** とを混合し、**NOG マウス** の眼窩静脈叢へ投与した。**L1.2 細胞** 投与から **2 日後**において、**EP 処置** 後 **18 時間**培養し、**4 $^{\circ}$ C** 条件下で **6 時間**保管した **mRNA 導入 CAR-T 細胞** および **Mock T 細胞** を、 $1 \times 10^7$  個ずつ **NOG マウス** の眼窩静脈叢へ投与した。**T 細胞** 投与から **2 日後**に **NOG マウス** を安楽死させ、脾臓を採取した。脾臓中に存在する **L1.2 細胞** および **hVEGFR2 発現 L1.2 細胞** をフローサイトメーター (**FACS Canto II**) により検出した。

#### (3) CAR と同一の hVEGFR2 細胞外エピトープを認識する抗体の作製と結合性評価

**V-85 抗体** は、**Anti-hVEGFR2 scFv (Clone V-85)** を構成する **Fv** のアミノ酸配列とウサギ **IgG** 抗体由来定常領域を有する人工抗体を **Syd Labs** に合成依頼することで得た。**NIH/3T3 細胞** および **hVEGFR2 発現 NIH/3T3 細胞** を染色し、フローサイトメーター (**FACS Canto II**) および蛍光顕微鏡 (**BZ-X800**) を用いて **V-85 抗体** の **VEGFR2 結合性** を解析した。

#### (4) ヒト肉腫組織およびその周囲正常組織の凍結標本における hVEGFR2 発現解析

ヒト患者組織を用いた一連の解析は、大阪大学医学部付属病院および北海道大学医学部附属病院における観察研究倫理審査委員会の審査・承認を得て実施した。広範切除を行った肉腫組織およびその周囲正常組織の一部を切り出し、**4% PFA/PBS** に **24 時間**浸漬することで固定した。固定化組織は **20%** スクロース溶液に置換し、アブライドメディカルリサーチに当該組織のパラフィン包埋ブロックおよび **OCT コンパウンド** 包埋凍結組織ブロックの作製、組織標本の作製、およびヘマトキシリンとエオジン染色を依頼した。凍結組織標本は、**Blocking buffer** を添加し、室温で **1 時間**静置した。**Blocking buffer** を除去し、**V-85 抗体 (44 ng/mL)** あるいは **VEGF Receptor 2 Rabbit mAb (Clone 55B11, 44 ng/mL, Cell Signaling Technology)** と **Purified anti-human CD31 Antibody (Clone WM59, 5  $\mu$ g/mL, BioLegend)** を含む **Antibody dilution buffer** を添加し、**4 $^{\circ}$ C** で一晩反応させた。抗体溶液を除去した後、**0.05% Tween-20** を含むトリス緩衝生理食塩水で十分に洗浄し、**Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific)** および **Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647** を含む **Antibody dilution buffer** を添加し、室温で **2 時間**反応させた。抗体溶液を除去した後、**0.05% Tween-20** を含むトリス緩衝生理食塩水で十分に洗浄し、**ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI** で封入した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 (**BZ-X800**) を使用して取得した。各タンパク質の検出蛍光強度は、取得した蛍光画像をもとに解析アプリケーション (**BZ-H4M**) を用いて数値化し、無作為に選出した **3 視野** の平均値を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床研究用 CAR-T 細胞の製造に向けた CAR mRNA の最適化

**CAR-T 細胞** の免疫原性の低減や薬効持続性の向上を目的に、先行研究において **CAR mRNA** プロトタイプとして選定した **hCAR#h1** をもとに、**CAR** タンパク質解析用の **Tag** 配列を除去した **hCAR#h1.2**、コドンをもとに最適化した **hCAR#h1.3**、**CAR mRNA** における **5'-Cap** 構造を **Anti-reverse cap analog (ARCA)** から **CleanCap** へと変更した **hCAR#h1.4**、**5-Methoxyuridine** を用いて合成した **hCAR#h1.5**、の各 **mRNA** を作製した。

5種類のCAR mRNAをそれぞれヒトT細胞にEPしたところ、いずれのCAR mRNAもT細胞内に効率良く導入され、経時的に同様の減少プロファイルを示して48時間後には検出限界レベル付近にまで希釈・分解された。また、Tag配列の除去(hCAR#h1.2)およびコドンの最適化(hCAR#h1.3)は、CARタンパク質の膜発現プロファイルに影響を与えなかったが、5'-Cap構造のARCAからCleanCapへの改変(hCAR#h1.4)によってCAR発現強度と発現期間の向上が得られた。さらに、mRNA配列中のUridineを5-Methoxyuridineへと置換したhCAR#h1.5では、EP後早期において高いCAR発現強度が得られたが、その後急速に発現は低下し、48時間後のCAR発現強度はhCAR#h1、#h1.2、#h1.3と同等の低値であった。これらの結果は、5-Methoxyuridineを用いることによるCAR mRNAの安定性向上は達成できなかったが、5'-Cap構造にCleanCapを用いることでCARタンパク質の翻訳効率を上昇させられることを示した。

EP処置24時間後に各CAR mRNA導入T細胞の細胞傷害活性を評価した。いずれのCAR-T細胞もhVEGFR2発現L1.2細胞特異的な傷害活性が認められ、hCAR#h1.4導入T細胞およびhCAR#h1.5導入T細胞は、他の3つのCAR mRNA導入T細胞と比較して明らかに高い傷害活性を示した。この結果はCAR発現強度を直接的に反映しており、今回のCAR mRNAコンストラクトの改変がCAR-T細胞の生存率や特性に影響を与えないことを示唆した。

CAR発現プロファイルと細胞傷害活性の結果に基づいて、hCAR#h1.4が強力かつ持続的に細胞傷害活性を発揮できる臨床開発用の抗hVEGFR2 CAR mRNA導入T細胞を作製するためのmRNAコンストラクトとして最適であると判断した。

## (2) mRNA導入CAR-T細胞の輸送条件の検討

高い抗腫瘍活性を保持した状態のCAR-T細胞医薬を患者へと投与するためには、CAR-T細胞にダメージを与えることなく、できる限りCAR発現強度を高く維持する輸送方法の確立が必要とされる。そこでCAR mRNA導入T細胞の凍結輸送の是非を検討した。EPによって傷害された細胞膜が安定化されるEP処置3時間後のT細胞は凍害保護試薬CP-1を用いて緩慢凍結し、その21時間後(EP処置から24時間後)に急速融解した。融解直後のhCAR#h1 mRNA導入T細胞におけるCAR発現強度は、37°Cで培養維持したhCAR#h1 mRNA導入T細胞と比較して高値を示した。T細胞膜上におけるhCAR#h1分子は経時的に消失し、融解から72時間後(EP処置から96時間後)には全く検出されなかった。凍結保存したhCAR#h1 mRNA導入T細胞におけるCAR消失速度は37°Cで培養維持したhCAR#h1 mRNA導入T細胞と同等であったことから、細胞内hCAR#h1 mRNAの安定性に凍結融解処理は影響しないことが明らかとなった。凍結融解直後のhCAR#h1 mRNA導入T細胞は37°Cで培養維持したhCAR#h1 mRNA導入T細胞と同等の細胞生存率(>98%)を示したものの、hVEGFR2発現L1.2細胞に対する細胞傷害活性は大きく減弱した。これらの結果は、凍結融解の操作はT細胞のCAR発現強度を保持できるが、T細胞のエフェクター機能に多大なダメージを与えることを示している。したがって、臨床研究において使用実績がある凍害保護試薬がCP-1に限られる現状では、CAR mRNA導入T細胞の凍結保存および輸送は難しいと判断した。

そこで凍結輸送の代替策として常温(18°C)および冷蔵(4°C)条件下でのCAR mRNA導入T細胞の輸送について検討した。EP処置から37°Cで18時間培養したT細胞を18°Cあるいは4°Cに設定した輸送箱内で約6時間保管し、EP処置から24時間後のCAR発現強度と細胞傷害活性を評価した。両温度管理で輸送したhCAR#h1.4 mRNA導入T細胞は同等のCAR発現強度を示し、高い細胞傷害活性を保持していた。これらは37°Cで24時間培養したhCAR#h1.4 mRNA導入T細胞のCAR発現強度および細胞傷害活性と同等であった。さらに、4°Cで輸送したhCAR#h1.4 mRNA導入T細胞のin vivoにおける有効性を検証するために、NOGマウスに移入したhVEGFR2発現L1.2細胞に対する排除効果を解析した。Mock T細胞の投与では血中のhVEGFR2発現L1.2細胞を殺傷することはできなかったが、hCAR#h1.4 mRNA導入T細胞は、投与から2日間で20%のhVEGFR2発現L1.2細胞を排除することができた。

このように、18°Cおよび4°C条件下での輸送はCAR mRNA導入T細胞のCAR発現レベルおよび細胞傷害活性を維持できることから、T細胞の生存率やエフェクター機能の維持に優れるとされる4°C環境をCAR mRNA導入T細胞医薬の輸送条件に選定した。

## (3) CARと同一のhVEGFR2細胞外エピトープを認識する抗体の作製と結合性評価

臨床応用を目指すCAR-T細胞と同一のhVEGFR2細胞外領域エピトープを認識するコンパニオン診断薬の開発は、本療法が対象とすべき症例を適切に選定するための優れたツールになると期待される。そこで、CARの抗原認識領域に使用してきたAnti-hVEGFR2 scFv (Clone V-85)のFvを移植したウサギIgG抗体(V-85抗体)を作製した。V-85抗体は、免疫細胞染色およびフローサイトメトリー解析法の両方において、hVEGFR2細胞外領域を認識する市販抗体(Cone 7D4-6)と同様にhVEGFR2発現NIH/3T3細胞に特異的に結合した。そこで、V-85抗体と抗hVEGFR2 CAR(hCAR#h1)が認識するhVEGFR2細胞外領域エピトープの同一性を評価するために、hVEGFR2発現NIH/3T3細胞とhCAR#h1発現Jurkat細胞を用いたCell binding assayを実施した。hCAR#h1発現Jurkat細胞は、シート状に培養したNIH/3T3細胞に対しては結合せず、hVEGFR2発現NIH/3T3に強く結合した。本条件下において、7D4-6抗体添加はhVEGFR2発現NIH/3T3に対するhCAR#h1発現Jurkat細胞の結合をわずかに阻害しただけであったのに対して、V-85抗体添加では有意に強い阻害効果を示した。この結果は、V-85抗体

が **hCAR#h1** と同一のエピトープを認識することを示しており、**V-85** 抗体が **TACTICs** 療法の治療標的を選定するための優れたコンパニオン診断薬になりうるということが明らかとなった。

#### (4) ヒト肉腫組織およびその周囲正常組織の凍結標本における **hVEGFR2** 発現解析

肉腫組織および正常組織の凍結標本における免疫組織染色において、**V-85** 抗体と **VEGFR2** 細胞内領域を認識する市販抗体 (**Clone 55B11**) との間で **hVEGFR2** 検出に関する相関解析を行った。広範切除した **18** 例の軟部組織肉腫のうち、**14** 例において **hVEGFR2** の発現が認められ、そのうち **11** 例における **hVEGFR2** 染色像はどちらの抗体を用いた場合でも、血管内皮細胞マーカーである **hCD31** の局在に一致した。一方、悪性末梢神経鞘腫瘍 (**MPNST**) 患者組織では、**55B11** 抗体による **hVEGFR2** 染色像は血管内皮細胞に限られたのに対して、**V-85** 抗体による染色像は血管周囲の細胞にも認められた。血管肉腫患者組織においても、**55B11** 抗体による **hVEGFR2** 染色像は **hCD31**+血管内皮細胞に限られたが、**V-85** 抗体は腫瘍細胞のみを染色した。さらに、粘液型脂肪肉腫患者組織では、どちらの抗体を使用した場合も、**hCD31** 陰性となる領域においてスリット状の **hVEGFR2** 染色像が認められた。このように一部の肉腫においては **V-85** 抗体と **55B11** 抗体の **hVEGFR2** 染色像が異なるものの、**V-85** 抗体による **hVEGFR2** 染色強度 (検出レベル) は **55B11** 抗体の **hVEGFR2** 染色強度および **hCD31** の染色強度に正の相関を示した。これらの結果は、**V-85** 抗体を用いた免疫蛍光染色が本療法の対象症例を選択できる診断法となることを示し、多くの腫瘍血管浸潤を認める肉腫が本療法の著効症例となりうると期待された。

抗 **hVEGFR2 CAR-T** 細胞をヒトに投与した際の安全性情報 (有害事象発症リスク) を予測するために、肉腫組織周囲の正常筋肉組織・脂肪組織・皮膚組織における **hVEGFR2** の発現を **V-85** 抗体および **55B11** 抗体を用いた免疫蛍光染色によって解析した。各種肉腫組織に対する免疫蛍光染色と同じ観察条件で評価したところ、筋肉や脂肪組織はどちらの抗 **hVEGFR2** 抗体でも染色されなかった。一方、皮膚組織における **hVEGFR2** 染色像は **55B11** 抗体ではエクリン汗腺に陽性像を示したものの、**V-85** 抗体で染色した際には認められなかった。これらの結果は、抗 **hVEGFR2 CAR-T** 細胞は少なくとも正常な筋肉・脂肪・皮膚組織を傷害することはなく、同組織より発生した肉腫における腫瘍血管内皮細胞を特異的に傷害できることを示唆した。

#### < 引用文献 >

1. **Cancer Gene Ther.** **20**, 57–64, 2013
2. **Mol. Ther. Oncolytics** **3**, 16024, 2016
3. **Cancer Sci.** **105(9)**, 1124-1134, 2014

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujiwara Kento, Kitaura Masaki, Tsunei Ayaka, Kusabuka Hotaka, Ogaki Erika, Okada Naoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Structure of the Signal Transduction Domain in Second-Generation CAR Regulates the Input Efficiency of CAR Signals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2476 ~ 2476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Kento, Sasawatari Shigemi, Nakai Sho, Imaeda Keisuke, Nagai Seina, Matsuno Yoshihiro, Hatanaka Kanako, Hatanaka Yutaka, Takenaka Satoshi, Okada Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 Predicting the Efficacy and Safety of TACTICs (Tumor Angiogenesis-Specific CAR-T Cells Impacting Cancers) Therapy for Soft Tissue Sarcoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2735 ~ 2735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Kento, Shigematsu Kazuki, Tachibana Masashi, Okada Naoki	4. 巻 72
2. 論文標題 Development and functional analysis of an anticancer T cell medicine with immune checkpoint inhibitory ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUBMB Life	6. 最初と最後の頁 1649 ~ 1658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iub.2280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Kento, Masutani Mizuki, Tachibana Masashi, Okada Naoki	4. 巻 527
2. 論文標題 Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 350 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Kento, Tsunei Ayaka, Kusabuka Hotaka, Ogaki Erika, Tachibana Masashi, Okada Naoki	4. 巻 9
2. 論文標題 Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1182 ~ 1182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 藤原健人, 岡田直貴	4. 巻 18
2. 論文標題 遺伝子改変T細胞療法の開発状況	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PHARMSTAGE	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長井聖奈, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 抗原親和性の異なる抗Robo4 CAR-T細胞間での抗腫瘍効果の比較
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井 翔, 藤原健人, 今枝啓輔, 長井聖奈, 安田直弘, 前 裕和, 王谷英達, 濱田健一郎, 岡田直貴, 竹中 聡
2. 発表標題 軟部肉腫に対する腫瘍血管障害性CAR-T細胞療法の奏功予測研究
3. 学会等名 第53回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長井聖奈, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 固形がんに対する抗Robo4 CAR-T細胞療法の開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原健人, 中井 翔, 安田直弘, 王谷英達, 濱田健一郎, 竹中 聡, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 軟部肉腫に対する腫瘍血管傷害性CAR-T細胞療法の有効性・安全性予測に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長井聖奈, 藤原健人, 福井麻琴, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 固形がんに対するCAR-T細胞療法におけるROB04標的化の有用性評価とROB04特異的CARの構築
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今枝啓輔, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 キメラ抗原受容体 (CAR) が受ける翻訳後修飾のCAR-T細胞機能への影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Kento Fujiwara, Sho Nakai, Naohiro Yasuda, Hidetatsu Otani, Kenichiro Hamada, Satoshi Takenaka, Masashi Tachibana, Naoki Okada
2. 発表標題 Research to predict the effectiveness of tumor vessel-injuring CAR-T cell therapy for soft tissue sarcoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原健人, 升谷美月, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 CARの細胞外領域に適したscFv構築法の確立に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原健人, 升谷美月, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 キメラ抗原受容体のscFv構造と膜発現強度との連関解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 / 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 升谷美月, 藤原健人, 鎌田春彦, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 ファージライブラリ由来scFv cloneを用いたキメラ抗原受容体の構造最適化検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 我喜屋良行, 藤原健人, 竹中 聡, 濱田健一郎, 王谷英達, 中井 翔, 安田直弘, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 抗VEGFR2 CAR-T細胞療法のin vitro安全性・有効性評価系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今枝啓輔, 藤原健人, 鎌田春彦, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 CAR-T細胞機能に及ぼすCAR翻訳後修飾の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重松知樹, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 PD-L1/PD-1シグナル阻害能を付与した抗がんT細胞医薬の創製と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北裏将樹, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 CARのシグナル伝達領域改変によるCAR-T細胞機能制御に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原健人, 我喜屋良行, 笹渡繁巳, 神垣 隆, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 腫瘍血管傷害型CAR-T細胞医薬の品質・性能規格化に向けた基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 我喜屋良行, 藤原健人, 富山 舞, 笹渡繁巳, 竹中 聡, 神垣 隆, 岡田直貴
2. 発表標題 肉腫に対する腫瘍血管傷害型CAR-T細胞療法の開発
3. 学会等名 第16回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Shigematsu, Kento Fujiwara, Masashi Tachibana, Naoki Okada
2. 発表標題 Creation of T cell medicine capable of avoiding functional depression due to PD-L1/PD-1 signaling
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Kitaura, Kento Fujiwara, Masashi Tachibana, Naoki Okada
2. 発表標題 Structure-activity correlation analysis by using 2nd-generation CARs with modified of signal transduction domain
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kentou Fujiwara, Masashi Tachibana, Naoki Okada
2. 発表標題 Structure-activity correlation analysis by using 1st-generation CARs with modified of hinge/transmembrane domain
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北裏将樹, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 細胞内シグナル伝達領域を改変した各種第二世代CARのT細胞における発現・機能比較
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原健人, 今枝啓輔, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 ヒンジ・膜貫通領域を改変した各種第一世代CARのT細胞における発現・機能比較
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今枝啓輔, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 各種構造改変キメラ抗原受容体のT細胞膜上での存在状態に関する検討
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重松知樹, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 PD-L1/PD- 1シグナルによる機能不全を回避できるT細胞医薬の創製と機能解析
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担者	岡田 潔  (OKADA Kiyoshi)  (40576279)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授   (14401)	
研究 分担者	竹中 聡  (TAKENAKA Satoshi)  (00588379)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	

	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
研究 協力者	藤原 健人  (FUJIWARA Kento)	大阪大学・薬学研究科・大学院生   (14401)	
研究 協力者	北裏 将樹  (KITAURA Masaki)	大阪大学・薬学研究科・大学院生   (14401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	重松 知樹  (SHIGEMATSU Kazuki)	大阪大学・薬学研究科・大学院生  (14401)	
研究協力者	今枝 啓輔  (IMAEDA Keisuke)	大阪大学・薬学研究科・大学院生  (14401)	
研究協力者	長井 聖奈  (NAGAI Seina)	大阪大学・薬学研究科・大学院生  (14401)	
研究協力者	富山 舞  (TOMIYAMA Mai)	株式会社メディネット・先端医科学研究所・研究員  (92714)	
研究協力者	濱田 健一郎  (HAMADA Kenichiro)	大阪大学・医学系研究科・助教  (14401)	
研究協力者	王谷 英達  (OUTANI Hidetatsu)	大阪大学・医学系研究科・助教  (14401)	
研究協力者	中井 翔  (NAKAI sho)	大阪大学・医学系研究科・大学院生  (14401)	
研究協力者	安田 直弘  (YASUDA Naohiro)	大阪大学・医学系研究科・大学院生  (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	笹渡 繁巳  (SASAWATARI Shigemi)  (30450597)	株式会社メディネット・先端医学研究所・所長代理    (92714)	
連携研究者	神垣 隆  (KAMIGAKI Takashi)  (20372641)	順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・特任教授    (32620)	

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