

令和 5 年 2 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09641

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント分子を標的とするキメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞の新規開発

研究課題名(英文) Development of a novel chimeric antigen receptor T cell immunotherapy targeting immune checkpoint molecules

研究代表者

今村 勝 (IMAMURA, Masaru)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80464006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント分子(PD-L1/L2)を標的とした新規キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入T細胞(CAR-T)を作成し、腫瘍免疫回避機構の克服及び難治がんに対する新たな免疫細胞療法の開発を試みた。様々な構造のPD1-CAR-Tを作成したところ、PD1の発現は構造により大きく異なっていた。種々の腫瘍細胞株におけるPDL1/L2の発現についてフローサイトメトリーで検討し、更にCAR-Tと腫瘍細胞株を共培養した上清で骨肉腫の細胞株U2OSを刺激したところ、U2OSのPDL1発現が誘導された。U2OSとPD1-CAR-T細胞を共培養し、有意に高い細胞障害活性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDL1/L2に対する新規CAR-T細胞を作成し、その抗腫瘍効果を示すことができた。種々の構造のCAR-T細胞を作成、検討を行い、より効果的なCAR-T細胞による新規細胞療法を開発できた。また、悪性腫瘍細胞のPDL1/L2はCAR-T細胞の攻撃により容易に誘導されることから、PD1-CAR-T単独ではなく他のCAR-Tと併用することでより抗腫瘍効果を高めることができる可能性があり、今後検討していく。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy targeting immune checkpoint molecules. We constructed several CARs targeting PDL1/L2 (PD1-CAR). We used extracellular domain of PD-1 from human T cell as a ligand binding domain. Various components were used in the hinge, transmembrane and intracellular domain. The CARs was retrovirally transduced into human T cells from healthy donors. PD1-CAR-T cells showed different PD-1 expression by the constructs. We stimulated OS cell line, U2OS with supernatant from co-culture of CAR-T cells and a cell line. This stimulation upregulated PD-1 ligands expression in U2OS. PD1-CAR-T cells showed significant cytotoxicity against U2OS expressing PD-1 ligands. PD1-CAR may be a candidate of a novel therapy for OS, as secondary CAR-T therapy for cancer that evade after first CAR-T cells targeting another molecule.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：キメラ抗原受容体 Programmed cell death-1 T細胞療法

### 1. 研究開始当初の背景

従来の化学療法、手術、放射線治療に抵抗性の造血器腫瘍、固形腫瘍に対して、第4の治療法として免疫細胞療法が期待されてきた。しかし十分量の腫瘍特異的 T 細胞や NK 細胞が得られない“量的問題”や腫瘍微小環境における免疫抑制メカニズムによりエフェクター細胞が疲弊状態 (exhaustion) になる“質的問題”などから、強力な治療効果を誘導することは困難であった。

申請者らはヒト NK 細胞や T 細胞における新規キメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor: CAR) 遺伝子を開発し (Imai, et al. Leukemia 2004; 米国特許取得. Campana and Imai, US patent No.8399645, 2013)、従来困難であった NK 細胞の体外増幅法を確立した (Imai, et al. Blood 2005;)。以来、臨床応用に向け膜型インターロイキン (IL)-15 遺伝子導入 NK 細胞を開発し、IL-2 非存在下で自律性増殖、抗腫瘍効果を増加させることを報告した (Imamura, Imai, et al. Blood 2014; 米国特許申請中 Campana, Shook and Imamura, No. 61/993,494)。申請者らが開発した NK 増幅システムと抗 CD19 CAR 遺伝子 (anti-CD19-41BB-) を用いて、米国で難治性の造血器腫瘍、固形腫瘍に対する第1相臨床試験 NCT00640796 が終了、NCT00995137 が進行中である。更に、申請者らが開発した抗 CD19 CAR 遺伝子を用いた CAR-T 細胞療法は進行成人慢性リンパ性白血病に対し優れた臨床効果が示された (Porter, et al. NEJM 2011)。

CAR-T 細胞療法の優れた臨床効果が複数報告されている一方で、CAR-T 細胞が大量の腫瘍細胞上の標的抗原を一度に認識し、過剰に活性化するサイトカイン放出症候群が報告されている (Porter, et al. NEJM 2011)。on-target 効果による有害事象を避けるためには CAR-T 細胞による過剰な反応を制御することが重要となる。また、標的分子が微量であっても正常組織に発現している場合、それらに対し CAR-T 細胞が障害活性を示す on-target off-tumor toxicity による死亡例が報告された (Morgan, et al. Mol Ther. 2010)。これを避けるためには腫瘍細胞に選択的に発現している分子を標的抗原とすることが重要である。更に CAR-T 細胞療法投与後に標的抗原を欠失した腫瘍細胞が選択的に生存し、治療抵抗性を獲得することも明らかになった (Grupp SA, et al. NEJM 2013)。このように、CAR-T 細胞療法においては過剰な免疫応答を防ぎつつ、腫瘍免疫回避機構を克服することが重要である。

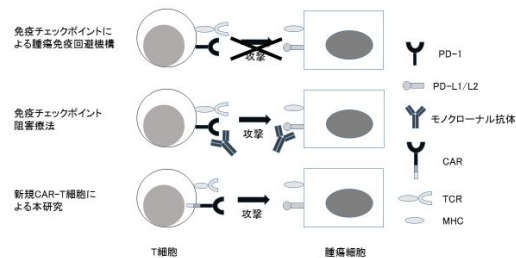
腫瘍免疫回避機構の克服に関して、近年免疫チェックポイント阻害療法が注目されている。これは腫瘍免疫抑制メカニズムを解除し、疲弊状態であった腫瘍免疫を再活性化させるものである。中でも活性化 T 細胞に発現する programmed-cell death-1 (PD-1) と腫瘍細胞が発現する PD-1 リガンド (PD-L1)

の結合を阻害するモノクローナル抗体療法は悪性黒色腫、腎細胞がん、非小細胞肺がんに対して優れた臨床効果が認められている (Topalian SL, et al. NEJM 2012, Brahmer JR, et al. NEJM 2012)。PD-L1 は肺癌、卵巣癌、大腸癌、悪性黒色腫などの腫瘍に発現するが、マクロファージを除く正常組織に発現を認めない (Dong H, et al. Nat Med 2002) ことより、CAR-T 細胞療法の新規標的抗原として理想的と考えた。

以上より、本研究により新たな標的抗原を用いた腫瘍免疫回避機構の克服を目指す新しい治療を確立できると考えた。

### 2. 研究の目的

最近、実臨床に導入された免疫チェックポイント分子を標的とした治療法は、モノクローナル抗体を用いて体内に残存する T 細胞を再活性化させるものであるが、新規 CAR-T 細胞は PD-1 からの抑制シグナルを活性化シグナルに変えて直接腫瘍細胞を攻撃することができる。また、CAR-T 細胞療法は通常体内に存在する T 細胞よりも多量の細胞数を得ることができる。これらの機序により、免疫細胞療法の課題であった量的問題及び質的問題を解決できると考えられる。(下図)



上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では免疫チェックポイントに関わるリガンドに対するレセプターを用いて新規 CAR-T 細胞を作製し、新しい治療法を開発するための基盤となる研究を行う。

- (1) PD-L1/L2 のレセプターである PD-1 リガンド結合部位を用いた CAR 遺伝子作製
- (2) 小児腫瘍における PD-L1/PD-L2 の発現の検討
- (3) 新規 CAR-T 細胞の機能解析 (細胞障害活性)

### 3. 研究の方法

- (1) 抗 PD-L1/L2 キメラ抗原受容体遺伝子の作製及び T 細胞への遺伝子導入  
ヒト T 細胞性白血病株 Jurkat 細胞からクローニングした PD-1 cDNA を受容体として発現するようにシグナルペプチド、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内シグナルドメインを

Splice by overlap extension PCR (SOE-PCR) を用いてつなぎ合わせる。これを MSCV-IRES-GFP レトロウイルスベクターのマルチクローニングサイトにサブクローニングする。Jurkat 細胞は無刺激では PD-1 を発現しない(Yang W, et al Invest Ophthalmol Vis Sci 2008)ので、発現ベクターを Jurkat 細胞に発現させフローサイトメトリー法にて PD-1 蛋白発現を確認する。導入効率を確認後、ヒト末梢血単核球から分離した T 細胞に遺伝子導入する。

(2) 小児腫瘍における PD-L1/PD-L2 の発現の検討

これまで PD-L1/PD-L2 の発現を検討された腫瘍は悪性黒色腫、肺がん、卵巣がん、多発性骨髄腫、結腸がん、子宮頸がんなど主に成人領域の腫瘍である。小児期発症が多い固形腫瘍の中では骨肉腫のみ(Shen JK, et al. Cancer Immunol Res 2014)である。小児固形腫瘍株(神経芽腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、Ewing 肉腫)における PD-L1/PD-L2 の発現についてフローサイトメトリー法を用いて検討する。

(3) 新規 CAR-T 細胞の機能解析(細胞障害活性)

対象となる腫瘍細胞株にルシフェラーゼを遺伝子導入しておき、新規 CAR-T 細胞と共培養開始 24 時間後および 7 日後に Bright-Glo Assay System (Promega)を用いて生体発光をプレートリーダーで検出し、抗腫瘍効果を測定する。

4. 研究成果

(1) 抗 PD-L1/L2 キメラ抗原受容体遺伝子の作製及び T 細胞への遺伝子導入

様々な構造の PD1-CAR 遺伝子を作成し、ヒト T 細胞へ遺伝子導入を行った。PD1 の発現を確認したところ、構造によって発現に大きな違いを認めた。PD1 のヒンジ、PD1 もしくは CD28 の膜貫通ドメインを用いた CAR が最も PD-1 の発現が高かった(図 1)。

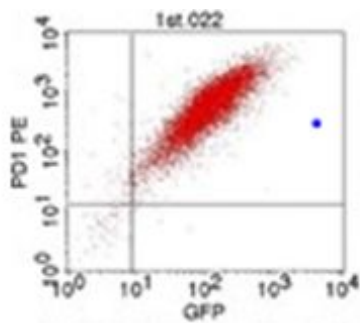


図 1. 代表的な構造の PD1-CAR 遺伝子導入 T 細胞における PD1 発現

(2) 小児腫瘍における PD-L1/PD-L2 の発現の検討

各種悪性腫瘍細胞株の PDL1/L2 発現をフローサイトメトリーで調べたところ、骨肉腫の細胞株である U2OS で PDL1/L2 が恒常的に発現していた。

PDL1/L2 は IFN などのサイトカインにより誘導されることが報告されており、CAR-T 細胞による attack により標的細胞の PDL1/L2 が誘導され、その結果 CAR-T 細胞の効果を減弱させることが想定される。そこで、CD19-CAR-T 細胞と Raji (Burkitt Lymphoma cell line) を 24 時間共培養した上清 (Conditioning Medium; CM) で U2OS を刺激し、CAR-T 細胞 attack 後の PDL1/L2 誘導を確認したところ、CM の刺激により PDL1/L2 が誘導された(図 2)。

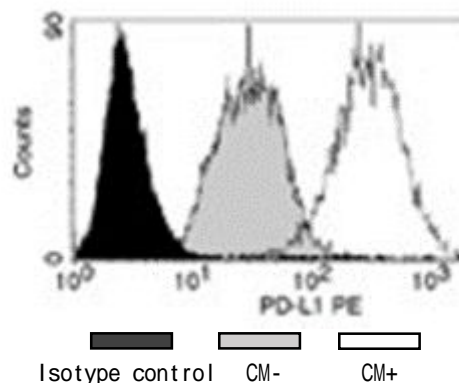


図 2. 骨肉腫細胞株 U2OS における PDL1 の発現及び Conditioning medium 刺激による PDL1 の誘導

(3) 新規 CAR-T 細胞の機能解析(細胞障害活性)

標的細胞と各種 CAR-T 細胞トロールとして空ベクターを遺伝子導入した T 細胞 (mock) と共培養した。骨肉腫の細胞株である U2OS で PDL1/L2 が恒常的に発現していたことから、U2OS を標的細胞として用いた。CAR-T 細胞は高い PD-1 発現を認めた 2 種類 (CAR 1, CAR 2) を用いた。24 時間後、7 日後のいずれでも CAR-T 細胞は有意な細胞障害活性を示した(図 3、4)。

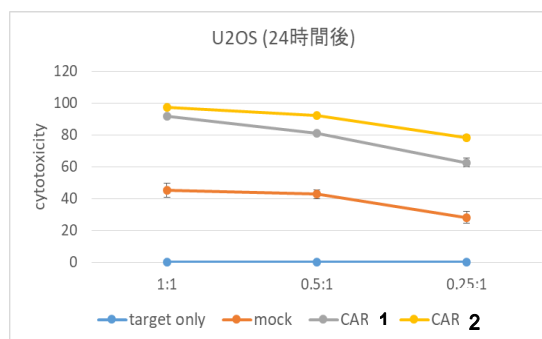


図 3. PD1-CAR 遺伝子導入 T 細胞による U2OS への細胞障害活性 (24 時間後)

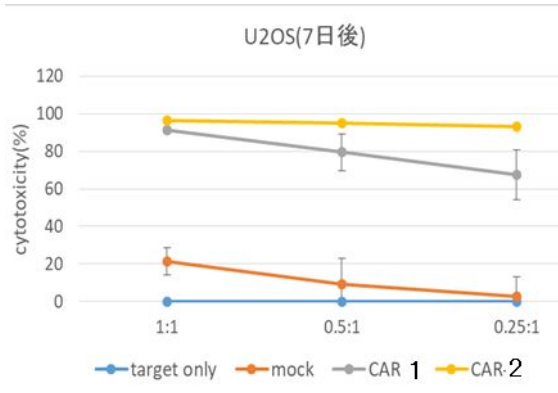


図4. PD1-CAR 遺伝子導入 T 細胞による U2OS への細胞障害活性 (7 日後)

以上の結果より、PDL1/L2 に対する新規 CAR-T 細胞を作成し、その抗腫瘍効果を示すことができた。種々の構造の CAR-T 細胞を作成、検討を行い、より効果的な CAR-T 細胞による新規細胞療法を開発できた。また、悪性腫瘍細胞の PDL1/L2 は CAR-T 細胞の attack により容易に誘導されることから、PD1-CAR-T 単独ではなく他の CAR-T と併用することでより抗腫瘍効果を高めることができる可能性があり、今後検討していく。

#### 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 6 件)

- Hosokai R, Masuko M, Shibasaki Y, Saitoh A, Furukawa T, Imai C: Donor Killer Immunoglobulin-Like Receptor Haplotype B/x Induces Severe Acute Graft-versus-Host Disease in the Presence of Human Leukocyte Antigen Mismatch in T Cell-Replete Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 23(4): 606-611, 2017 (査読あり)
- Imamura M, Shook D, Kamiya T, Shimasaki N, Chai SM, Coustan-Smith E, Imai C, Campana D: Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15. *Blood.* 124(7):1081-8, 2014 (査読あり)
- Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, Chng WJ, Campana D: T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res.* 74(1):93-103,

2014 (査読あり)

- Campana D, Schwarz H, Imai C: 4-1BB chimeric antigen receptors. *Cancer J.*20(2):134-40 2014 (査読あり)
- Imamura M, Kawai T, Okada S, Izawa K, Takachi T, Iwabuchi H, Yoshida S, Hosokai R, Kanegane H, Yamamoto T, Umezu H, Nishikomori R, Heike T, Uchiyama M, Imai C: Disseminated BCG infection mimicking metastatic nasopharyngeal carcinoma in an immunodeficient child with a novel hypomorphic NEMO mutation. *J Clin Immunol.*31(5):802-10, 2011(査読あり)
- Mihara K, Yanagihara K, Takigahira M, Kitanaka A, Imai C, Bhattacharyya J, Kubo T, Takei Y, Yasunaga S, Takihara Y, Kimura A: Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 151(1):37-46, 2010 (査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

- 名称: 改変ナチュラルキラー細胞及びその使用  
発明者: Campana D, Shook D and Imamura M  
権利者: National University of Singapore; St. Jude Children's Research Hospital, Inc.  
種類: 日本国特許  
番号: 特表 2017-515506  
出願年月日: 2017 年 6 月 15 日  
国内外の別: 国内
- 名称: Modified Natural Killer Cells And Uses Thereof  
発明者: Campana D, Shook D and Imamura M  
権利者: National University of Singapore; St. Jude Children's Research Hospital, Inc.  
種類: United States Patent  
番号: US2017/0073638 A1  
出願年月日: 2017 年 3 月 16 日  
国内外の別: 国外
- 名称: Modified Natural Killer Cells And Uses Thereof  
発明者: Campana D, Shook D and Imamura M  
権利者: National University of Singapore; St. Jude Children's Research Hospital,

Inc.

種類：International Patent

番号：WO 2015/174928 A1 A1

出願年月日：2015年11月19日

国内外の別：国外

取得状況（計0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今村 勝 (IMAMURA, Masaru )

新潟大学医歯学総合病院・小児科・講師

研究者番号：80464006

### (2) 研究分担者

今井 千速 (IMAI, Chihaya )

新潟大学医歯学系・小児科・准教授

研究者番号：90419284

### (3) 連携研究者

高地 貴行 (TAKACHI, Takayuki )

新潟大学医歯学総合病院・小児科・特任助教

研究者番号：70444164

### (4) 研究協力者

岩淵 晴子 (IWABUCHI, Haruko )

新潟大学医歯学総合病院・小児科・医員

研究者番号：60444163