

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20022

研究課題名(和文)キメラ抗原受容体遺伝子改変iPS細胞由来T細胞の樹立と新規膠芽腫治療法の開発

研究課題名(英文)Novel therapeutic approach for glioblastoma with iPS cells-derived CAR-T cells

研究代表者

中澤 務(Nakzawa, Tsutomu)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00772500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではiPS細胞にレンチウイルスベクターを用いてがん変異抗原EGFRvIII特異的CAR遺伝子(EvCAR)を導入し、T細胞へ分化誘導することでiPS細胞由来CAR-T細胞の作製を目指した。樹立したiPS細胞にEvCAR遺伝子を導入することでCAR-iPS細胞を樹立した。CAR-iPS細胞より造血幹細胞を各種サイトカインの存在下およびフィーダーレス条件下で誘導した。OP9⁺細胞と各種サイトカインの存在下でCD3陽性、CAR陽性細胞を誘導した。本細胞を用いて抗膠芽腫効果を評価でき、その効果が強力であれば、予後不良の膠芽腫に対する新たな治療法となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to establish EGFRvIII-specific CAR (EvCAR)-expressing iPS cells and differentiate into T cells from the EvCAR-iPS cells. The EvCAR-expressing iPS cells were established by transducing EvCAR gene-carrying lentivirus into iPS cells. Hematopoietic stem cells (HSC) were induced from the EvCAR-iPS cells in the presence of the defined cytokines under the feederless condition. CD3 positive and EvCAR positive cells were induced from the HSC in the presence of the defined cytokines on OP9⁺ cells. In conclusion, we can induce the iPS cell-derived EvCAR-T cells in vitro. The EvCAR-T cells can be a promising anti-tumoral cell source for glioblastoma if their anti-tumor effects for glioblastoma are able to be evaluate.

研究分野：腫瘍免疫学、分子生物学

キーワード：遺伝子免疫細胞治療 CAR 膠芽腫 iPS細胞 T細胞

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、標準治療法である手術、抗がん剤ならびに放射線療法を組み合わせた集学的治療法をもってしても、診断後の全生存期間中央値は 16 ヶ月未満と予後不良の悪性腫瘍の 1 つである。このため、免疫療法や遺伝子治療をはじめとした革新的な治療の開発が切望されている。

がん治療研究領域では、免疫細胞と遺伝子治療を融合した遺伝子免疫細胞治療の研究が注目されている。中でも、がん関連抗原を認識する細胞表面レセプター遺伝子を免疫細胞に発現させ、がん細胞に対する認識能力を飛躍的に高めて治療効果を得ようとする試みが行われている (Kershaw et al. Clin Transl Immunology 2014)。代表的なものとして、TCR (T cell receptor: T 細胞受容体) 改変 T 細胞と CAR (chimeric antigen receptor: キメラ抗原受容体)-T 細胞を用いた研究が挙げられる。

TCR 改変 T 細胞は体外で培養した T 細胞にがん関連抗原特異的 TCR を遺伝子導入した細胞である。悪性黒色腫に対する MART (melanoma antigen recognized by T cells)-1 特異的 TCR 改変 T 細胞を用いた治療研究が実施されており、31 名中 13% の患者に腫瘍退縮効果が認められた (Burns et al. Blood 2009)。

CAR-T 細胞 (CAR-T) は、がん関連抗原に対する単鎖抗体 (single-chain variable fragment: scFv) と細胞シグナル伝達分子を連結させた複合遺伝子である CAR を細胞に導入した細胞である。これまでに白血病に対する CD19 特異的 CAR-T を用いた治療の有用性が報告されている (Lee et al. Lancet 2015)。

がん関連抗原特異的 TCR 改変 T 細胞の問題点としては、HLA (Human leukocyte antigen: ヒト白血球抗原) 拘束性が挙げられる。TCR は HLA に結合したがん関連抗原ペプチドを認識する。HLA は個人差が非常に大きく、それぞれにがん関連抗原特異的 TCR を準備する必要がある。CAR-T は HLA 非依存性にごん関連抗原を認識でき、抗体遺伝子の種類を変えることで多数のごん関連抗原を標的にできる点において TCR 改変 T 細胞より優れている。

遺伝子導入した免疫細胞を含め、体外で免疫細胞を培養し、治療に使用する際の問題点として、培養効率に個体差が存在すること、治療に際して、すぐに細胞が準備できないことが挙げられる。このため、あらかじめ治療用免疫細胞を準備できれば、臨床応用において大きな利点となる。これまでに、induced pluripotent stem 細胞 (iPSC) 研究領域において、がん関連抗原特異的 TCR 導入 iPSC からの T 細胞誘導研究 (Vizard et al. Cell Stem cell 2013) ならびにごん関連抗原特異的 CAR 導入 iPSC からの T 細胞誘導研究 (Themeli et al. Nature biotech 2013) が報告されている。

膠芽腫研究においては、膠芽腫の約 40% に

発現している EGFRvIII (epidermal growth factor receptor type III) 特異的 CAR-T の開発が進められており、動物生体内での抗がん効果が報告されている (Ohno et al. J immunother cancer 2013) されている。CAR 導入 iPSC から T 細胞を誘導することは膠芽腫治療の研究においても有望であると考えられるが、EGFRvIII 特異的 CAR 導入 iPSC からの T 細胞誘導研究はこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

レンチウイルスベクターを用いて iPSC にがん変異抗原 EGFRvIII 特異的 CAR (EvCAR) 遺伝子を導入し、造血幹細胞を介して T 細胞へ分化誘導することで iPSC 由来 EvCAR-T を作製することである。

3. 研究の方法

(1) EvCAR 搭載レンチウイルスの作製

Elongation factor-1 α 遺伝子プロモーターの下流に EGFRvIII 特異的抗体の抗原結合部位と CD28、4-1BB、CD3 ζ の細胞内シグナルドメインを連結させた第 3 世代の CAR 遺伝子を挿入した Self-inactive (SIN) 型レンチウイルスベクターである pELNS-3C10-CAR と pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2. G の 3 種類のヘルパーベクターを HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いたリポフェクション法を用いて遺伝子導入した。培養 2 日後に培養上清をポリエチレングリコールを用いて遠心濃縮した。得られたウイルスをヒト末梢血由来 T 細胞とともに共培養し、CAR 陽性細胞の頻度と EGFRvIII 発現 U87MG に対する殺傷効果を高性能顕微鏡を用いてタイムラプス解析を実施した。

(2) iPSC の樹立および培養系の確立

iPS 細胞研究所より譲り受けたセンダイウイルス誘導性 iPSC (SiPSC) のフィーダーフリー条件での培養系の確立を試みた。また、エピソーマルベクターを用いて OCT3/4、KLF4、SOX2、L-MYC、LIN28 と mouse p53 dominant negative form)、EBNA-1 を T 細胞に電気穿孔法を用いて iPS 細胞 (EiPS) の樹立をフィーダーフリー条件で試みた。

(3) EvCAR-iPSC の樹立

2 種類の iPSC に EvCAR をレンチウイルスを用いて導入し、磁気ビーズを用いて純度を高め、EvCAR-iPSC の樹立を試みた。iPSC ならびに EvCAR-iPSC について、幹細胞マーカーの発現解析と胚葉体を用いた多分化能評価を行った。

(4) EvCAR-iPSC を用いた造血幹細胞誘導

フィーダー細胞を用いない方法である spin EB 法を用いて HSC (hematopoietic stem cell: 造血幹細胞) の誘導を試みた。シングルセルにした iPSC を U 底 96 ウェルプレート

に 3,000 細胞ずつ播種し、hSCF、hBMP-4、hVEGF 等の存在下で 11 日間の培養を行った。培養液は chemical defined の APEL 培地を用いた。培養開始前に 480G、4 分間遠心し、細胞集塊の形成促進を図った。

(5) 造血幹細胞からの T 細胞の誘導

誘導した造血幹細胞を OP9 Δ1 上で、hIL-7、hSCF、hFlt3L 等の存在下で 3 週間培養を実施した。

4. 研究成果

(1) EvCAR 搭載レンチウイルスの作製

作製したウイルスを用いてヒト末梢血由来 T 細胞とともに共培養した結果、CD3 陽性 CAR 陽性細胞は 52% 存在した (図 1)。タイムラプス解析の結果、EGFRvIII 発現 U87MG を破壊することが確認できた (図 2)。

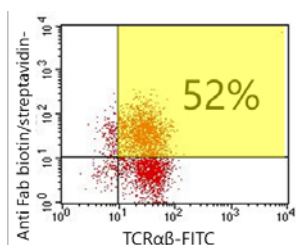


図 1. CAR 陽性 T 細胞の頻度解析

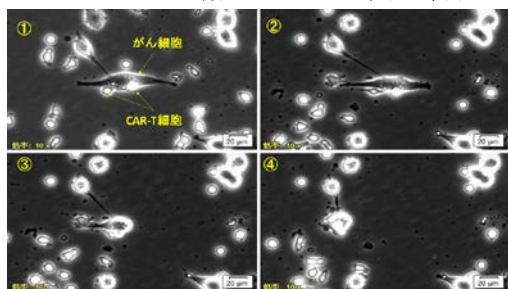


図 2. CAR-T の膠芽腫細胞の破壊

(2) iPSC の樹立および培養系の確立

iPS 細胞研究所より譲り受けた SiPSC をマウス SNL76/7 上で培養した結果、iPSC が継続的に培養できることが確認できた。シングルセルにした iPSC を Stemfit 培地および laminin511-E8 をコーティングした培養プレートで培養した結果、フィーダーレス条件での iPSC の培養が継続的に実施できた。エピソーマルベクターを用いた iPSC の誘導では培養 14 日目に iPSC が確認できた。iPSC コロニーをピックアップし、10 回の継代培養が可能であった細胞を凍結保存した (図 3)。

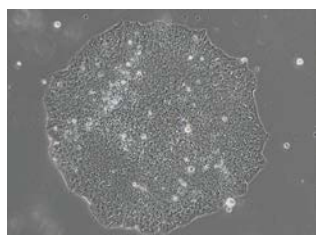


図 3. 樹立した EiPSC

(3) EvCAR-iPSC の樹立

2 種類の iPSC に EvCAR 遺伝子をレンチウイルスを用いて導入し、磁気ビーズを用いて純度を高め、フローサイトメーターで CAR 陽性細胞の頻度を確認した結果、どちらも 90% 以上が CAR 陽性細胞であった。幹細胞マーカーの発現を免疫染色法を用いてフローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡で確認した結果、Oct3/4、Nanog、SSEA-4、Tra-1-60 の発現が確認できた。マウス iPSC に発現し、ヒト iPSC に発現しない SSEA-1 の発現は認めなかった。以上の結果より、EvCAR -iPSC が樹立できた (図 4)。

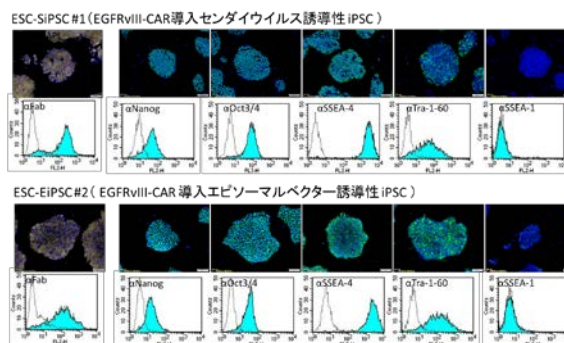


図 4. EvCAR-iPSC の樹立

(4) EvCAR-iPSC を用いた造血幹細胞誘導

誘導培養の結果、培養 11 日目までに胚葉体の形成が確認された。フローサイトメーター解析の結果、CD34 陽性 CD43 陽性細胞が 8.5% 存在した。以上の結果より、造血幹細胞の誘導が確認できた。

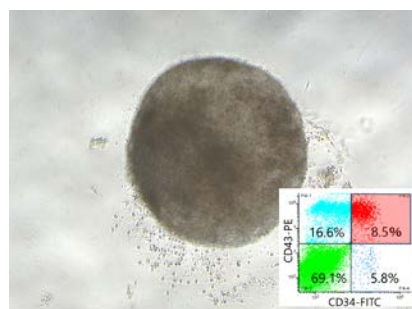


図 5. 造血幹細胞を含む胚葉体の誘導

(5) 造血幹細胞からの T 細胞の誘導

誘導した造血幹細胞を OP9 Δ1 上で培養し、3 週間培養した細胞について、免疫染色で CD3 と EvCAR の発現を確認した。その結果、CD3 陽性細胞および EvCAR 陽性細胞が確認できた。以上の結果より EvCAR-T の誘導が確認できた。

今回の実験により、EvCAR 搭載レンチウイルス、iPSC の樹立とフィーダーレス培養法の確立、EvCAR-iPSC の樹立、EvCAR-iPSC からの HSC を介した CAR-T の誘導が確認できた。得られた iPS 由来 CAR-T の抗がん効果解析を実施し、膠芽腫に対する抗がん効果を継続して検証することで、臨床応用可能な技術となることが期待できる。

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)

① Marutani A., Nakamura M, Nishimura F, Nakazawa T., Matsuda R, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Ouji Y, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nakase H.

Tumor-inhibition effect of levetiracetam in combination with temozolomide in glioblastoma cells. Neurochemical Journal 11(1): 43-49 2017

② Yasukawa M, Nakazawa T., Kawaguchi T, Kawai N, Tsujimura T, Tojo T, Taniguchi S. Minodronic Acid in Combination with $\gamma \delta$ T Cells Induces Apoptosis of Non-small Cell Lung Carcinoma Cell Lines. 2016 Anticancer Research 36:5883-5886

③ Nakazawa T., Nakamura M, Matsuda R, Nishimura F, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Ouji Y, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nakase H.

Antitumor effects of minodronate, a third-generation nitrogen-containing bisphosphonate, in synergy with $\gamma \delta$ T cells in human glioblastoma in vitro and in vivo.

2016 J Neurooncol. 129:231-241

[学会発表] (計 2 件)

① Nakazawa T., Nakamura M, Matsuda R, Nishimura F, Park YS, Motoyama Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Shida Y, Murakami T, Takanabe R, Tsujimura T, Nakase H.

Anti-tumor effect of minodronate, a third-generation nitrogen-containing bisphosphonate, in synergy with $\gamma \delta$ T cells, in human glioblastoma invitro and in vivo

The AACR Special Conference on Immunobiology of Primary and Metastatic CNS Cancer (2018/02/13)

② 田中 祥貴, 中澤 務, 中村 光利, 辻村 貴弘, 竹島 靖浩, 松田 良介, 田村 健太郎, 山田 修一, 中川 一郎, 西村 文彦, 横田 浩, 本山 靖, 朴 永銖, 中瀬 裕之

高純度 NK 細胞を用いた膠芽腫細胞に対する抗腫瘍効果と TMZ を用いた 併用効果の基礎的検討 第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会 (2017/2/11)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 務 (NAKAZAWA, Tsutomu)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00772500

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()