

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07224

研究課題名(和文) 横紋筋肉腫に対する成長因子受容体を標的とした新規キメラ抗原受容体T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of chimeric antigen receptor T cells redirecting a growth factor receptor on human rhabdomyosarcoma

研究代表者

柳生 茂希 (Yagyu, Shigeki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10572547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：EPHB4を特異的に認識し、殺傷することができるキメラ抗原受容体T細胞(EPHB4-CAR-T細胞)を開発した。また、EPHB4-CAR-T細胞作製の際の培養方法について最適化した。さらに、本培養法でCAR-T細胞を作成した場合、CAR-T細胞の抗腫瘍効果と相関するナイーブ/ステムセルメモリー型T細胞分画優位になることが明らかとなった。免疫抑制剤投与下のカニクイザルに対して、ヒト由来EPHB4-CAR-T細胞を投与する試験を行い、超急性期の有害事象は認めなかった。本研究成果をもとに、非ウイルス遺伝子改変EPHB4-CAR-T細胞の臨床応用に向けて、非臨床安全性試験を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性固形腫瘍に対する新規治療戦略として、遺伝子細胞治療の開発が注目されている。なかでもキメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)療法が注目されているが、固形腫瘍に対してはさらなる改良が必要である。われわれが開発した、ピギーバックトランスポゾン法による遺伝子改変法は、免疫疲弊を起こしにくく、治療効果の高いCAR-T細胞を作製することが可能である。本方法を用いて、小児悪性軟部腫瘍に高発現するEPHB4受容体を標的としたCAR-T細胞を作成して、高い抗腫瘍効果を証明した。本細胞製剤をいち早く臨床応用するために、本研究成果に基づいた非臨床安全性試験を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：The present study has reported that EPHB4, a member of the largest family of receptor tyrosine kinases, is highly expressed in various tumors including rhabdomyosarcoma (RMS) and may be a suitable target for CAR-T cells. In the present study, we developed novel CAR-T cells targeting EPHB4 via piggyBac (PB) transposon-based gene transfer. We generated PB-EPHB4-CAR-T cells with a relatively high copy number of the CAR transgene and sufficient CAR positivity. The CAR-T cells exhibited a dominant stem cell memory fraction and low PD-1 expression after the 14 days expansion. The CAR-T cells presented strong and sustained inhibitory activity against the RMS cells even in multiple tumor challenges. Furthermore, in the in vivo experiment, The CAR-T cells also suppressed tumor growth in RMS xenograft-bearing mice. A nonclinical safety study on PB-EPHB4 CAR-T cell therapy targeting the EPHB4 positive tumors is underway, aiming future clinical trials in Japan.

研究分野：遺伝子細胞治療

キーワード：CAR-T細胞 横紋筋肉腫 免疫疲弊 ヒギーバックトランスポゾン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、難治性腫瘍の新規細胞免疫療法として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がもつ T 細胞受容体 (TCR) に対して遺伝子改変を加え、直接的かつ選択的に腫瘍細胞を CTL に認識させ、抗腫瘍効果を発揮するという遺伝子改変キメラ抗原受容体 T 細胞 (chimeric antigen receptor T-cell; CAR-T) 療法が開発されてきた。CAR は、腫瘍抗原を特異的に認識し、T 細胞を活性化させるたんぱくの総称である。CAR を発現する T 細胞は、腫瘍抗原を認識したあと、そのシグナルを T 細胞内に伝達し、T 細胞を活性化させ、殺細胞性因子を放出させることで抗腫瘍効果を発揮する。CAR-T 細胞を用いたがん治療は、CD19 陽性 B 細胞系腫瘍を対象とした臨床試験で高い有効性が示されたが、固形腫瘍では未だ実用には至っていない。CAR-T 細胞の効果を高め、実用化するためには、適切ながん特異的抗原を選択し、それを特異的に認識する抗原認識部位を持った CAR コンストラクトを作成することが必要である。

申請者らは、先行研究において、代表的な小児がんである横紋筋肉腫 (RMS) や、その他の成人がんに対して、腫瘍細胞で高発現し、ヒト正常組織での発現が極めて少ない成長因子受容体である EPHB4 に対して、CAR-T 細胞が認識しうる腫瘍抗原となりうることを世界で初めて発見した。また、これらの抗原と特異的に結合する抗原認識部位の遺伝子配列を同定に成功し、CAR-T 細胞を作成することに成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、先行研究での知見を用い、代表的な小児がんである RMS をモデルとして、RMS 細胞を特異的に認識し、殺細胞効果を有する CAR-T 細胞療法を開発することを目的とする。また、本研究において優れた基礎データが得られた場合は、速やかに特許を出願した上で国内小児がん研究グループと共同で臨床試験の計画し、難治性小児固形腫瘍に対する革新的な細胞遺伝子治療を提案することを最終目標とする。

### 3. 研究の方法

RMS 細胞株、RMS 腫瘍組織、正常組織 tissue panel を用いて、フローサイトメトリー法、定量 PCR 法によって、横紋筋肉腫細胞に高発現し、正常組織への発現がないか極めて弱いがん腫瘍抗原を同定する。

CAR-T 細胞が有効かつ安全に機能するためには、腫瘍細胞にのみ高発現し、正常細胞には発現がみられないか、極めて発現が低い抗原を標的とする必要がある。

我々は、すでに RMS 細胞を用いた網羅的解析で、RMS 細胞にのみ高発現している腫瘍抗原を数種類同定し、その腫瘍抗原が代表的な RMS 細胞株 3 種類で 100% 発現し、正常細胞での発現が極めて低いことを確認した。現在 RMS 腫瘍検体を用いて、これらの腫瘍抗原の発現解析を進めている。

これらの腫瘍抗原と特異的に結合するたんぱくのアミノ酸配列から塩基配列を同定し、第 2 世代 CAR 遺伝子に導入する。本研究では、T 細胞への遺伝子導入法として、非ウイルスベクターである *piggyBac* トランスポゾンベクターを用いる。

我々はすでに、CAR コンストラクトに必要な共刺激因子、CD3 $\zeta$  鎖が挿入されている *piggyBac* トランスポゾンベクターを所有している。また、RMS 細胞に高発現する抗原 C と特異的に結合する、たんぱくの塩基配列を同定しており、ベクターへの導入に成功している。また、抗原 A、抗原 B に対する抗原認識部位の特定と CAR 遺伝子への遺伝子導入を行っている。

CAR-T 遺伝子 *piggyBac* トランスポゾンシステムを用いて、エレクトロポレーション法で T 細胞

に導入する(予備実験済、遺伝子導入法については特許出願中。)。遺伝子導入された CAR-T 細胞は、リンパ球大量培養システムを用いて培養される。我々は、Wilson Wolf 社 G-Rex 細胞培養システムとサイトカイン添加液体培地を用いたヒト T 細胞培養に習熟しており、CAR-T 細胞の大量培養が可能である。

RMS 細胞と CAR-T 細胞を共培養し、培養上清中の炎症性サイトカイン放出、さらには、フローサイトメトリー法による腫瘍細胞の絶対数評価で抗腫瘍効果を確認する。具体的には、横紋筋肉腫細胞株を新規 CAR-T 細胞、対象として遺伝子導入していない mock T 細胞とともに共培養し、共培養開始 3 日目にフローサイトメトリー法を用いて CAR-T 細胞による RMS 細胞の増殖抑制効果を判定する。

さらに、免疫不全マウスの腹腔内に RMS 細胞株を接種し、担癌マウスモデルを作製する。接種 3 日後に担癌マウスの尾静脈から CAR-T 細胞、mock T 細胞のいずれかを輸注し、腫瘍サイズの変化とマウスの生死を経時的に観察する。我々は、CAR-T 細胞の in vivo 効果判定に、マウスを殺戮せずに体外から腫瘍サイズを観察するバイオイメージングシステムを確立している。

#### 4. 研究成果

小児悪性軟部肉腫に高発現する EPHB4 受容体に対して、EPHB4 を特異的に認識し、殺傷することができるキメラ抗原受容体 T 細胞(EPHB4-CAR-T 細胞)を開発した。EPHB4-CAR-T 細胞は、EPHB4 陽性の横紋筋肉腫細胞のみならず、乳がん細胞、骨肉腫細胞においても強力な抗腫瘍効果を認めた。EPHB4-CAR-T 細胞を最適化するために、適切なスパーサー、共刺激因子の検討を行った。その結果、非ウイルス遺伝子改変法で EPHB4-CAR-T 細胞を作製した場合には良好な細胞増殖と抗腫瘍効果を得た。また、EPHB4-CAR-T 細胞作製の際の培養方法について最適化した。我々の検討により、自己末梢血単核球由来の遺伝子改変フィーダー細胞を用いることで、およそ 14 日間で、ドナー特性によらず、良好な CAR 発現率(60%以上)、細胞増殖率(5 倍以上)を得ることができた。さらに、本培養法で CAR-T 細胞を作成した場合、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果と相関するナイーブ/ステムセルメモリー型 T 細胞分画優位になることが明らかとなった。さらには、正常組織パネルを用いた EPHB4 発現解析を行った。免疫組織化学による検討では、ヒト胎盤で比較的強い EPHB 発現を認めたが、それ以外の正常組織では、EPHB4 の膜表面上の発現は認めなかった。EPHB4-CAR-T 細胞の超急性期に発症しうるオフターゲット毒性の評価のために、免疫抑制剤投与下のカニクイザルに対して、ヒト由来 EPHB4-CAR-T 細胞を投与する試験を行い、超急性期の有害事象は認めなかった。本研究成果をもとに、非ウイルス遺伝子改変 EPHB4-CAR-T 細胞の臨床応用に向けて、非臨床安全性試験を開始した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Tanaka M, Iehara T, Nakazawa Y, Hosoi H.
2. 発表標題 piggyBac transposon mediated chimeric antigen receptor T cell therapy for pediatric solid tumors.
3. 学会等名 60th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, Chicago, LA, USA, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yagyu S, Nakazawa Y
2. 発表標題 Development of piggyBac CAR-T cells - Experiences in Japan.
3. 学会等名 6th piggyBac CART meeting, Houston, TX, USA, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳生茂希
2. 発表標題 キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)療法の開発と臨床応用
3. 学会等名 第3回日本遺伝子細胞治療学会研究会セミナー, 東京, 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yagyu S.
2. 発表標題 piggyBac transposon mediated chimeric antigen receptor T cell therapy for pediatric solid tumors.
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会, 京都, 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Tanaka M, Nakazawa Y.
2. 発表標題 Function, phenotype, and tonic signaling of GD2-CART cells using piggyBac transposon gene transfer.
3. 学会等名 5th piggybac CART meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura K, Yagyu S, Morita D, Kikuchi K, Iehara T, Hosoi H, Nakazawa Y.
2. 発表標題 Chimeric Antigen Receptor T cells redirecting EPHB4 for the Treatment of Human Rhabdomyosarcoma.
3. 学会等名 第2回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳生茂希, 中村加世子.
2. 発表標題 CAR-T細胞療法と免疫逃避 - GD2-CAR-T細胞での検討-
3. 学会等名 第5回信州CARTミーティング
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Kikuchi K, Iehara T, Hosoi H, Nakazawa Y.
2. 発表標題 Chimeric Antigen Receptor T cells redirecting EPHB4 for the Treatment of Human Rhabdomyosarcoma.
3. 学会等名 第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yagyu S, Nakamura K, Morita D, Kikuchi K, Iehara T, Hosoi H, Nakazawa Y.
2. 発表標題 Chimeric Antigen Receptor T cells redirecting EPHB4 for the Treatment of Human Rhabdomyosarcoma
3. 学会等名 第59回日本小児血液が学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 殺細胞効果を有するキメラ抗原受容体遺伝子改変リンパ球	発明者 柳生茂希、中沢洋三、家原知子、細井創	権利者 京都府公立大学法人、国立大学法人信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、国際PCT/JP2017/43729	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	菊地 顕  (Kikuchi Ken)  (40453104)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教   (24303)	
研究分担者	中沢 洋三  (Nakazawa Yoxo)  (60397312)	信州大学・学術研究院医学系・教授   (13601)	