

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07233

研究課題名(和文) 癌精巣抗原CRT2を用いた新たなCAR-T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel CAR-T cell therapy using a cancer-testis antigen CRT2

研究代表者

林 恵美子(林恵美子)(Hayashi, Emiko)

日本医科大学・大学院医学研究科・ポストドクター

研究者番号：10620130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌免疫療法の一つとして、キメラ抗原受容体発現T細胞療法(CAR-T細胞療法)が注目されており、特に難治性固形癌への応用が期待されている。本研究では、申請者が同定した癌精巣抗原CRT2を認識し、難治性固形癌の一つである膵臓癌に対する新たなCAR-T細胞療法の開発を目指した。本研究期間を通じて、CRT2を認識するCARベクターを作製し、膵臓癌細胞株に対して抗腫瘍効果が認められるCRT2-CAR-T細胞を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科的切除困難な難治性固形癌は極めて予後不良であり、新たな治療法が求められている。近年、キメラ抗原受容体発現T細胞療法(CAR-T細胞療法)による癌免疫療法の研究が急速に進展している。しかし、現時点におけるCAR-T細胞療法は血液がんにおいては広く実用化に至っているが、固形癌に関しては未だ良い結果が得られていない。本研究では、癌精巣抗原CRT2を認識し、難治性固形癌の一つである膵臓癌に対して抗腫瘍効果が認められるCRT2-CAR-T細胞を開発した。本研究結果により、固形癌に対するCAR-T細胞療法の新たな可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells have achieved positive developments in the treatment of hematological malignancies; however, similar benefits have not yet been reported in the treatment of solid tumors. I have previously reported the use of CRT2, a testicular cancer antigen that is frequently expressed in various cancers; in this study we aimed to develop a new CAR-T cell therapy based on CRT2 for the treatment of pancreatic cancer, a kind of refractory solid tumor. As a result, we generated a CAR vector recognizing CRT2 and developed CRT2-CAR-T cells that showed anti-tumor effects against pancreatic cancer cell lines.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：CAR-T細胞療法 癌精巣抗原 遺伝子細胞療法 癌免疫療法 固形癌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)を遺伝子導入した T 細胞(CAR-T 細胞)による癌の免疫療法の研究は急速に進展している。CAR とは腫瘍細胞の表面抗原を認識する一本鎖抗体(single chain variable fragment: scFv)と CD3 δ 鎖や共刺激シグナルなどの T 細胞活性化を誘導する細胞内シグナル伝達部位を結合させたキメラタンパク質であり、癌患者の末梢血から強力な癌特異的傷害活性を有する T 細胞を大量に作製することを可能とした画期的な技術である。しかし、現時点における CAR-T 細胞療法は血液がんにおいては広く実用化に至っているが、固形癌に関しては未だ良い結果が得られていない。

申請者が単離し、研究を進める癌精巢抗原 CRT2 は、正常組織ではヒト組織適合性抗原(HLA)を発現しない精巢に限局している一方、癌組織では脳腫瘍、膵臓癌、大腸癌など多様な癌に高発現している。CRT2 は小胞体分子シャペロン CRT (calreticulin)とホモロジーがあり、CRT はアントラサイクリン系抗がん剤で癌細胞の免疫応答誘導性細胞死(immunogenic cell death: ICD)が誘導されることが報告されている。申請者は CRT2 もアントラサイクリン系抗がん剤で癌細胞の ICD が誘導されることを明らかにしており、さらにヒト浸潤性膵管癌 (PDAC)を模倣する膵癌モデルマウス(KPC マウス)から樹立した PDAC 細胞株中、CRT2 陽性細胞に膵臓癌幹細胞マーカーが高発現していることも見出している。したがって、CRT2 は様々な癌抗原の中でも、固形癌の標的化を目的とした免疫療法に有効な抗原であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が同定した癌精巢抗原 CRT2 を認識する CAR-T 細胞(CRT2-CAR-T 細胞)が膵臓癌細胞に対する抗腫瘍効果を評価し、CRT2-CAR-T 細胞を担癌モデルマウスに供給できるシステムを新たに構築することを目的とする。CRT2 抗原は様々な癌に共通する抗原であり、化学療法により癌細胞内の小胞体から細胞膜へ移行する eat me シグナルも知られており、癌細胞は CRT2-CAR-T 細胞の標的となる。CRT2-CAR-T 細胞の癌患者への応用性は幅広く、癌患者にとっての新たな治療戦略になることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト CRT2(hCRT2)-CAR の作製

CRT2 のモノクローナル抗体を作製するためヒト CRT2 の full length を組み込んだ pET 発現ベクターを作製し、リコンビナントタンパクを発現・精製した後、同リコンビナントタンパクを免疫原にしてマウスモノクローナル抗体を作製した。次に、より特異的なハイブリドーマをスクリーニングするために anti-CRT2 抗体と anti-His-tag 抗体を用いた ELISA 法を行った。さらに CRT2 高発現細胞株に特異的に反応するクローンを二次スクリーニングし、CRT2 特異的な抗体産生ハイブリドーマを確立した。CRT2 特異的なハイブリドーマ 2×10^6 細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成、H 鎖、L 鎖特異的プライマーを用いて塩基配列を決定した。この配列を基に CAR 遺伝子をコードする配列を含むレトロウイルスベクターを作製した。

(2) hCAT2-CAR-T 細胞の作製

ヒト T 細胞へのレトロウイルス遺伝子導入は CRT2-CAR をヒト T 細胞に高効率に感染させるため、GalV エンベロープを持つ PG13 パッケージ細胞を用いたプロデューサー細胞を樹立した。具体的には、G3T-hi cell 細胞株に hCRT2-CAR の DNA トランスフェクションを行い、感染用レトロウイルスベクター溶液を作製した。PG13 パッケージ細胞にこのレトロウイルスベクター溶液を用いて 3 回感染させ、感染後、拡大培養を行い、hCRT2-CAR レトロウイルス

ベクター溶液からレトロウイルスの力価を測定した。プロデューサー細胞の培養上清である hCRT2-CAR レトロウイルス溶液を用いて、抗 CD3 抗体を添加した培地で 3 日間培養したヒト末梢血単核球細胞にレトロネクチン法により遺伝子導入し、その後インターロイキン 2 を添加した培地で約一週間培養することにより、hCRT2-CAR-T 細胞を作製した。

(3) CAT2-CAR-T 細胞の *in vitro* における抗腫瘍効果

ヒト膵臓癌細胞株を用いて CRT2 の発現をフローサイトメトリーで確認し、ターゲット細胞を決定し、癌細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。ターゲット細胞に CRT2 が高発現している Capan-1 細胞株、コントロールの細胞に HEK293 細胞株を用いて、ELISA 法による IFN- γ の産生試験、および LDH assay により細胞傷害試験を検討した。

(4) マウス CRT2(mCRT2)-CAR の作製

本開発の CRT2-CAR 遺伝子はヒトとマウスの CRT2 を認識することができることを見出している。そこで、ヒト PDAC を模倣する KPC マウスを用いて抗腫瘍効果を検討するために、マウス CRT2(mCRT2)-CAR をマウス T 細胞に感染させるため、Plat-E パッケージング細胞を用いたプロデューサー細胞を樹立した。具体的には、Plat-A または G3T-hi cell 細胞株に mCRT2-CAR の DNA トランスフェクションを行い、感染用レトロウイルスベクター溶液を作製した。Plat-E パッケージング細胞にこのレトロウイルスベクター溶液を用いて 3 回感染させ、感染後、拡大培養を行い、mCRT2-CAR レトロウイルスベクター溶液からレトロウイルスの力価を測定した。

4. 研究成果

複数のヒト膵臓癌細胞株の細胞表面に発現している CRT2 の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。特に Capan-1 細胞株に CRT2 の強発現が認められた。また、同様に複数の膵臓癌細胞株についてアントラサイクリン系抗がん剤のドキソルビシンで処理した後に CRT2 の発現量をフローサイトメトリーにて解析したところ、抗がん剤処理前は CRT2 の発現が認められなかった膵臓癌細胞株において、細胞膜に惹起していることが確認された。さらに、膵臓癌の化学療法治療でよく用いられる抗がん剤の一つであるジェムザールを用いて、同様の検討を行ったところ、抗がん剤処理前は CRT2 の発現が認められなかった膵臓癌細胞株において、細胞膜に惹起していることが確認された。このことから、CRT2 はアントラサイクリン系以外の抗がん剤でも、膵臓癌細胞の ICD を誘導することが確認された。

次に、CRT2 が高発現していた Capan1 細胞株をターゲットとした hCRT2-CAR-T 細胞の IFN- γ 産生試験を検討した。コントロールとして HEK293 細胞株を用いて各々共培養を行なったところ、Capan-1 細胞株に対する hCRT2-CAR-T 細胞は有意に IFN- γ 産生が認められた。また、同様に LDH assay により Capan-1 細胞株に対する hCRT2-CAR-T 細胞の細胞傷害性を検討したところ、hCRT2-CAR-T 細胞は Capan-1 細胞株 に対する強い細胞傷害性を認めることを見出した。以上の結果より、CRT2 が膵臓癌を標的とした CAR-T 細胞療法における優れた標的分子である可能性が示唆された。今後は、引き続き樹立したプロデューサー細胞を用いて mCRT2-CAR-T 細胞を作製し、KPC マウスから樹立した PDAC 細胞株に対する傷害性を *in vitro* で検討するとともに、担癌モデルマウスに対する mCRT2-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を *in vivo* で評価する。また、CRT2 が膵臓癌細胞の ICD を誘導することから、抗がん剤投与による治療効果の上昇に関する解析を行い、担癌モデルマウスに CRT2-CAR-T 細胞を供給できるシステムを構築する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	内山 徹 (Uchiyama Toru) (10436107)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・室長 (82612)	
研究分担者	佐野 誠 (Sano Makoto) (70339323)	日本大学・医学部・兼任講師 (32665)	

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