

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07625

研究課題名（和文）悪性中皮腫に対する次世代型CAR-T細胞療法の開発

研究課題名（英文）Next generation CAR-T cell therapy for malignant melanoma

研究代表者

佐古田 幸美（SAKODA, YUKIMI）

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30629754

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）：我々はメソセリンに対するIL-7とCCL-19を発現する次世代型CAR-T細胞療法を開発した。メソセリンを発現する悪性中皮腫やヒト膵がんのPDXモデルにおいて抗腫瘍効果を検討したところ、次世代型CAR-T細胞を投与したマウスにおいて、従来型のCAR-T細胞を投与したマウスと比較し生存期間の延長を示し、より強力な抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T細胞療法は難治性の血液がんでは有用な効果を示し日本や海外で承認されているが、固形がんに対しては未だ十分な効果を示せていない。本研究結果において我々の開発した次世代型「7x19」CAR-T細胞療法はより臨床に近いヒト固形がんを用いたマウスモデルにおいて従来のCAR-T細胞療法よりも強力な治療効果を示したことから、固形がんに対する新たな治療法となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Human anti-mesothelin 7x19 CAR-T cells displayed superior anti-tumor efficacy against solid cancer by their enhanced features to recruit CAR-T cells and endogenous immune cells in tumor microenvironment, compared to conventional CAR-T cells, in both orthotopic and PDX models.

研究分野：がん免疫

キーワード：キメラ抗原受容体 固形がん

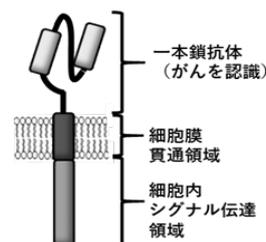
### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト暴露を主病因とする悪性度の高いがんである。日本の年間罹患者数は1200人程度と稀であるが、アスベスト暴露から発症までの期間が30～40年と長いことから過去の大量のアスベスト使用により今後も数十年間発症率や死亡数の増加が予想されている。早期診断が難しいため進行期で発見される症例が多く、一次治療には化学療法が用いられるが多くの治療抵抗性であるため、より効果的な新規治療法の開発が求められている。近年では悪性中皮腫に対し患者体外でがん反応性を増強させた免疫細胞を作製し投与する方法が試みられている。患者から採取した免疫細胞（T細胞）を遺伝子改変し、がん細胞を認識するキメラ抗原受容体（CAR: chimeric antigen receptor）を発現させたCAR-T細胞を作製し輸注するCAR-T細胞療法は、一時的な縮小効果は認めるものの著明な効果は認めていない。そこで、悪性中皮腫に対してより強力な治療効果を発揮できるような工夫を凝らした次世代型のCAR-T細胞の開発が重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

CAR-T細胞療法は難治性血液がんに対して極めて強力な治療効果を発揮する治療法として2017年に米国食品医薬品局（FDA）に承認された。CARとはがん細胞の表面抗原を認識する抗体の可変部領域由来の一本鎖抗体とT細胞の活性化を誘導する細胞内シグナル伝達領域を融合させたキメラ蛋白である（図1）。患者の末梢血から採取したT細胞にCARを遺伝子導入して誘導したCAR-T細胞は一本鎖抗体を介してがん細胞を特異的に認識するとともに、細胞内に有する活性化シグナルを介して強力な殺傷効果を誘導できる。しかしながら、血液がんに対する優れた効果と異なり、固形がんではCAR-T細胞の臨床的有効性は未だ確立されていない。

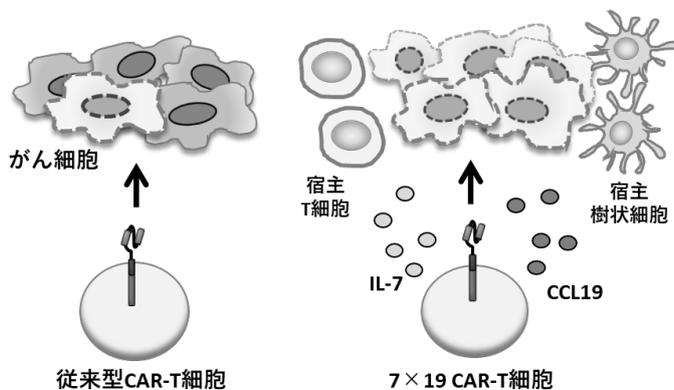
図1. キメラ抗原受容体(CAR)



最近我々は、CAR-T細胞にIL-7と呼ばれるサイトカインとCCL19と呼ばれるケモカインの両方を同時に産生する能力を搭載した次世代型の「7x19 CAR-T細胞」を開発した（Adachi K et al, Nature Biotechnol. 2018）（図2）。この7x19 CAR-T細胞は、固形がんのマウスモデルにお

いてがん抗原を認識するとIL-7の効果によりCAR-T細胞の生存と増殖を促進し、CCL19の効果により宿主のがん反応性T細胞や免疫応答に重要な樹状細胞のがん局所への集積を刺激することより従来型のCAR-T細胞と比べ強力な治療効果を示す。このように7x19 CAR-T細胞は、CAR-T細胞以外の免疫細胞を動員し協調して機能するが、加えてメモリー細胞を誘導することでがんに対する長期の再発予防効果を誘導できるという特徴も有している。本研究では、悪性中皮腫のマウスモデルを用いて、悪性中皮腫に多く発現するがん抗原であるmesothelinに対する7x19 CAR-T細胞を作製し、通常型のCAR-T細胞よりも優れた抗腫瘍効果を誘導することを検討する。

図2. 従来型と7x19 CAR-T細胞による抗腫瘍効果の違い



### 3. 研究の方法

#### (1) 抗mesothelin 7x19 CAR-T細胞のin vitroにおける抗腫瘍効果の評価

遺伝子改変により一つの細胞がmesothelinに対する一本鎖抗体を組み込んだCARと共にIL-7とCCL19を同時に産生することができる「7x19」CAR-T細胞を作製し、「従来型」と「7x19」CAR-T細胞のがん細胞に対する傷害活性を比較検討する。具体的には、各CAR-T細胞または陰性コントロールである遺伝子非導入細胞をmesothelin陽性（ACC-MESO-1）または陰性（NCI-H28）のヒト悪性中皮腫細胞株と共培養し、腫瘍細胞に対する傷害を比較検討する。

#### (2) 抗mesothelin 7x19 CAR-T細胞のin vivoにおける抗腫瘍効果の評価

免疫不全マウスを用いた悪性中皮腫マウスモデルにて、「従来型」および「7x19」CAR-T細胞投与によるin vivoの抗腫瘍効果を比較検討する。まずACC-MESO1にluciferaseを発現させたACC-MESO1-luc株を免疫不全マウスへ胸腔内投与し胸腔内への腫瘍の生着・増殖を確認する。このように作製した悪性中皮腫モデルを用いて非治療群、非遺伝子導入細胞投与群、従来型CAR-T細胞群、及び7x19 CAR-T細胞投与群における腫瘍縮小効果をIVIS (In Vivo Imaging System)で評価する。また、より臨床に近いヒト腫瘍を接種したPDXモ

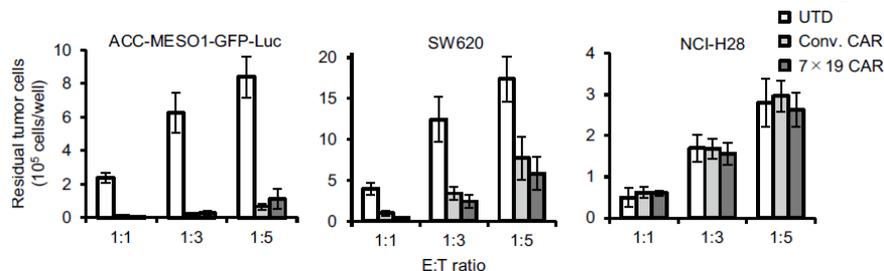
デルにおいても 7×19 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の検討をおこなう。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト抗 mesothelin 7×19 CAR-T 細胞の in vitro における抗腫瘍効果の評価

悪性中皮腫に対する 7×19 CAR-T 細胞を用いた次世代型 CAR-T 細胞療法の開発のため、ヒト T 細胞に「従来型」CAR と IL-7 と CCL-19 を産生する「7×19」CAR を遺伝子導入した CAR-T 細胞をそれぞれ作製し、in vitro にて腫瘍細胞との共培養試験をおこなったところ、mesothelin 陽性の ACC-MESO1 や SW620 腫瘍細胞に対していずれの CAR-T 細胞も同等の細胞傷害活性を認めた (図 3)。一方で mesothelin 陰性 NCI-H28 細胞に対してはいずれも傷害活性を認めなかったことから、本活性は mesothelin 特異的であることが示された。

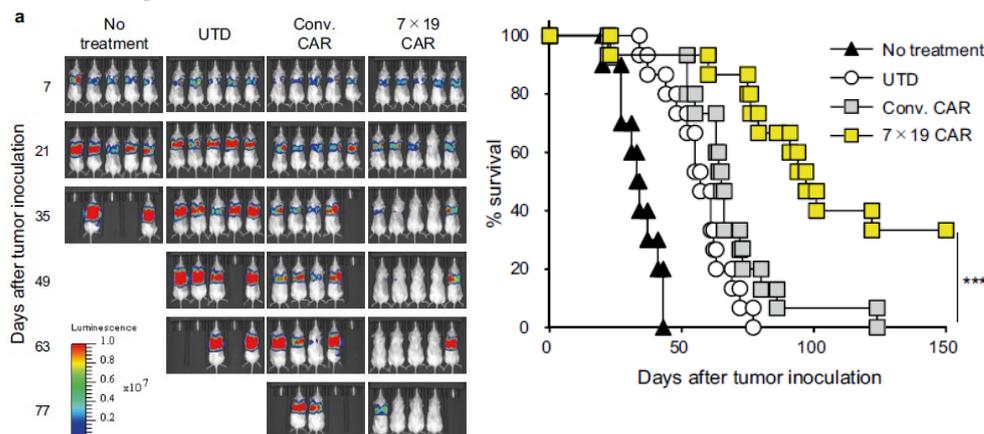
図 3: 従来型と 7×19 CAR-T 細胞の mesothelin 陽性/陰性細胞に対する in vitro killing 活性



##### (2) ヒト抗 mesothelin 7×19 CAR-T 細胞の in vivo における抗腫瘍効果の評価

次に vivo における評価のため、mesothelin を発現する悪性中皮腫のがん細胞株 ACC-MESO1 を胸腔内に接種した orthotopic マウスモデルにて治療効果を検討したところ、「7×19」CAR-T 細胞は「従来型」CAR-T 細胞に比較し腫瘍縮小効果 (IVIS) および生存期間の延長を認めた (図 4)。

図 4: orthotopic マウスモデル (悪性中皮腫) における vivo 腫瘍縮小効果



また「7×19」CAR-T 治療マウス腫瘍縮小メカニズムの解析のため、「従来型」および「7×19」CAR-T 治療マウスの腫瘍局所の解析をおこなったところ、「7×19」CAR-T 治療マウスにおいて、腫瘍局所の CAR-T および non CAR-T いずれの細胞も「従来型」CAR-T 治療マウスと比較し優位に増加しており、「7×19」CAR-T が CAR-T だけでなく non CAR-T の増殖や腫瘍への浸潤を介して抗腫瘍活性を高めていることが明らかとなった。さらに、より臨床に近いヒト膵がん腫瘍を接種した PDX モデルにおいても「7×19」CAR-T 細胞治療マウスは「従来型」CAR-T 細胞治療マウスと比較し優位な腫瘍縮小効果及び生存期間の延長を認めた。さらに腫瘍を拒絶した PDX マウスに改めて mesothelin 陽性腫瘍を接種したところ、mesothelin 陰性腫瘍に比べて優位な腫瘍増殖抑制効果を認め、この現象は通常のナイーブマウスでは認めなかったことから、これらのマウスは mesothelin 陽性腫瘍に対する長期間のメモリー反応を有していることも示された。

このように次世代型「7x19」CAR-T 細胞療法はヒト臨床に近い固形がんのモデルにおいて従来の CAR-T 細胞療法よりも強力な抗腫瘍効果を誘導することから、今後の臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Goto Shunsuke, Sakoda Yukimi, Adachi Keishi, Sekido Yoshitaka, Yano Seiji, Eto Masatoshi, Tamada Koji	4. 巻 70
2. 論文標題 Enhanced anti-tumor efficacy of IL-7/CCL19-producing human CAR-T cells in orthotopic and patient-derived xenograft tumor models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2503 ~ 2515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-02853-3	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 -

〔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	玉田 耕治  (TAMADA KOJI)  (00615841)	山口大学・大学院医学系研究科・教授    (15501)	

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