

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07781

研究課題名(和文) 小細胞肺癌に対するiPSC由来キメラ抗原受容体T細胞療法の有効性と安全性の検討

研究課題名(英文) The efficacy and safety of iPSC-derived CART therapy for small cell lung cancer

研究代表者

安藤 美樹 (Ando, Miki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10424251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はiPSC技術を用いてキメラ抗原受容体(CAR)と内因性T細胞受容体で2抗原を標的とするT細胞を作製し、EBV関連リンパ腫に対する強い抗腫瘍効果を証明した(Harada et al., Molecular Therapy, 2021)。この技術を応用し、GD2抗原陽性小細胞肺癌を標的としてiPSC由来GD2-CART細胞を作製し、有効性と安全性を検討した。末梢血GD2-CARTは小細胞肺癌に対し細胞傷害性を示さなかったが、iPSC由来GD2-CARTは強力な細胞傷害活性を示した。マウスモデルでも強い腫瘍増殖抑制効果と生体内の耐久性を証明した。難治性小細胞肺癌に対し有望な結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は肺癌の中で最も進行が速く、多くの患者は再発し治療抵抗性を示す。5年生存率は7%以下と極めて予後不良にも関わらず、新規治療開発から長らく取り残されてきた。本研究では小細胞肺癌の多くが細胞表面にGD2を発現することに着目し、iPSCにGD2-CARを遺伝子導入後GD2-CARTを分化誘導し、小細胞肺癌に強力な治療となりうるかを検証した。末梢血GD2-CARTは小細胞肺癌に細胞傷害活性を示さなかったが、iPSC由来GD2-CARTは強い細胞傷害活性を示した。小細胞肺癌に対する新規治療となりうる有望な結果であり、その抗腫瘍効果の差について解析することも学問的に重要と考える。

研究成果の概要(英文)：We have reported that iPSC-derived dual-antigen receptor rejuvenated T cells (rejTs) can target CD19 antigen via chimeric antigen receptor (CAR) and Epstein-Barr LMP2 antigen via native TCR, resulting in robust anti-tumor effect against EBV-associated lymphoma (Harada et al., Molecular Therapy, 2021). Applying this strategy to GD2 positive refractory tumors, we generated iPSC-derived GD2-CAR-rejTs and examined the efficacy and safety against GD2-positive small cell lung cancer (SCLC). Peripheral blood-derived GD2-CARTs did not show cytotoxicity against SCLC cell lines, whereas GD2-CAR-rejTs showed much stronger cytotoxicity against SCLC cell lines than that of peripheral blood-derived GD2-CARTs in vitro. Furthermore, GD2-CAR-rejTs successfully suppressed tumor growth in vivo compared to untreated mice. This approach would be a promising therapy for refractory SCLC.

研究分野：血液腫瘍学、キメラ抗原受容体T細胞療法、遺伝子細胞療法、再生医学

キーワード：キメラ抗原受容体T細胞 小細胞肺癌 GD2-CAR T-iPSC

1. 研究開始当初の背景

肺がんは日本のがん死亡率の1位であり、現在も増加傾向が続いている。小細胞肺がんは肺がんの15%を占め、肺がんの中でも特に進行が速く早期に全身に転移する。60%から70%の患者は診断時既に進展型であり、生存期間は多くの症例で診断後1年以下である。小細胞肺がん細胞表面に糖鎖抗原である gangliosides, GD2 が陽性である報告があり、GD2 は CART 療法のよい標的抗原になると考えられるが、小細胞肺がんに対し GD2-CART 療法を試みた報告はない。我々の研究グループでは慢性的な抗原暴露により疲弊した抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)を一度 iPS 細胞に変換し(T-iPSC)、機能的に若返った CTL(rejuvenated CTL; rejT)を分化誘導することに成功した(Nishimura et al. *Cell Stem Cell*, 2013)。その後 EB ウイルス特異的 rejT(EBV-rejT)が *in vivo* でも、EBV 感染腫瘍に対し強力な腫瘍縮小効果と生存期間の延長を示すことを証明した(Ando et al. *Stem Cell Reports*, 2015)。更に、EBV-rejT は生体内で6ヶ月以上もの長期間メモリー T 細胞として生存を続けてリンパ腫を排除した。この結果より生体内での EBV-rejT の耐久性を証明できた(Ando et al. *Haematologica* 2020)。

2. 研究の目的

近年キメラ抗原受容体(CAR)T 細胞療法の開発と臨床応用が進んだが、固形がんに対する CART 療法は腫瘍微小環境の問題もあり期待した抗腫瘍効果が得られず、副作用も懸念である。本研究では小細胞肺がんの多くが細胞表面に GD2 を発現することに着目して、iPSC に GD2-CAR を遺伝子導入後、若返り GD2-CART の分化誘導を試み、その抗腫瘍効果を検討する。CAR を遺伝子導入する T 細胞としては、既に生体内での強い耐久性が証明されている EBV-rejT を用いることで、極めて難治性の小細胞肺がんにより長期に抗腫瘍効果が持続する、強力な治療となりうるか検証する。

3. 研究の方法

1) GD2-CARrejTの作製方法を確立

もとのレトロウイルス iC9-GD2-CAR プラスミドから、T-iPSC に遺伝子導入するためレンチウイルスコンストラクトを作成した。プロモーターは Ubc で、GD2-CAR と標識である mcherry を 2A 配列で繋ぐよう設計した。このコンストラクトを用い、GD2-CAR ベクターを産生後、健常人 EBV-CTL クローンより樹立した T-iPSC に遺伝子を導入後、GD2-CARrejT の分化誘導を行った。

2) 末梢血由来GD2-CARTとiPSC由来GD2-CARrejTの抗腫瘍効果の比較

小細胞肺がんの細胞株を用いて、末梢血由来GD2-CART、iPSC由来GD2-CARrejTの細胞傷害活性をクロム放出試験で確認した。更に、標的細胞として患者ドナー胸水よりGD2陽性小細胞肺がん細胞を長期培養した結果(Ohara et al., *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2021)、細胞株樹立に成功したので、この新規細胞株も用いて抗腫瘍効果の評価を行った。更に細胞株に luciferase を遺伝子導入後、マウスモデルでも末梢血由来GD2-CART、iPSC由来GD2-CARrejTの抗腫瘍効果を比較した。

3) 末梢血由来GD2-CARTとiPSC由来GD2-CARrejTのT細胞機能評価

T細胞の phenotype 解析、腫瘍細胞と共培養後の疲弊マーカーの発現解析、CARTの生体内コピー数解析などにより、それぞれのT細胞の機能評価を行う。

4. 研究成果

*In vitro*の解析では、末梢血由来GD2-CARTは3種類の小細胞肺癌細胞株に細胞傷害活性を10%程度しか示さなかったが、一方でiPSC由来GD2-CARrejTは60-80%の高い細胞傷害活性を示した。マウスモデルでも、iPSC由来GD2-CARrejTのみが小細胞肺癌に対する、明らかな腫瘍増殖抑制効果と生存期間延長効果を証明することができた。更に末梢血由来GD2-CARTとiPSC由来GD2-CARrejTでなぜ小細胞肺癌に対する抗腫瘍効果に大きな差が生まれるのか、末梢血由来GD2-CARTとiPSC由来GD2-CARrejTのT細胞機能評価を行い解析中である。

これらの成果を論文報告するため、現在論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ando Miki, Ando Jun, Yamazaki Satoshi, Ishii Midori, Sakiyama Yumi, Harada Sakiko, Honda Tadahiro, Yamaguchi Tomoyuki, Nojima Masanori, Ohshima Koichi, Nakauchi Hiromitsu, Komatsu Norio	4. 巻 105
2. 論文標題 Long-term eradication of extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, by induced pluripotent stem cell-derived Epstein-Barr virus-specific rejuvenated T cells in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 796 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.223511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jun Ando, Minhtran C. Ngo, Miki Ando, Ann Leen and Cliona M. Rooney	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of protective T-cell antigens for smallpox vaccines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 642-652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2020.04.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miki Ando, Jun Ando, Tadahiro Honda, Midori Ishii, Hiromitsu Nakauchi, and Norio Komatsu	4. 巻 66
2. 論文標題 iPSC-derived rejuvenated T cell therapy for Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 200-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.2020.66.jmj20-r03	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 -
1. 著者名 Tadahiro Honda, Miki Ando, Jun Ando, Midori Ishii, Yumi Sakiyama, Kazuo Ohara, Tokuko Toyota, Manami Ohtaka, Ayako Masuda, Yasuhisa Terao, Mahito Nakanishi, Hiromitsu Nakauchi, and Norio Komatsu	4. 巻 28
2. 論文標題 Sustainable tumor suppressive effect of iPSC-derived rejuvenated T cells targeting cervical cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2394-2405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohara Kazuo, Kinoshita Shintaro, Ando Jun, Azusawa Yoko, Ishii Midori, Harada Sakiko, Mitsuishi Yoichiro, Asao Tetsuhiko, Tajima Ken, Yamamoto Taketsugu, Takahashi Fumiyuki, Komatsu Norio, Takahashi Kazuhisa, Ando Miki	4. 巻 27
2. 論文標題 SCLC-J1, a novel small cell lung cancer cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101089 ~ 101089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Sakiko, Ando Miki, Ando Jun, Ishii Midori, Yamaguchi Tomoyuki, Yamazaki Satoshi, Toyota Tokuko, Ohara Kazuo, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Shin Chansu, Ota Yasunori, Nakashima Kazutaka, Ohshima Koichi, Imai Chihaya, Nakazawa Yozo, Nakauchi Hiromitsu, Komatsu Norio	4. 巻 30
2. 論文標題 Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 534 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2021.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Furukawa Yoshiki, Hamano Yasuharu, Shirane Shuichi, Kinoshita Shintaro, Azusawa Yoko, Ando Jun, Nakauchi Hiromitsu, Ando Miki	4. 巻 11
2. 論文標題 Advances in Allogeneic Cancer Cell Therapy and Future Perspectives on "Off-the-Shelf" T Cell Therapy Using iPSC Technology and Gene Editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 269 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11020269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 難治性がんを標的にしたiPSC由来T細胞療法の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Midori Ishii, Miki Ando, Sakiko Harada, Jun Ando, Tokuko Toyota, Norio Komatsu, and Hiromitsu Nakauchi
2. 発表標題 Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphomas.
3. 学会等名 ISSCR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Ando, Jun Ando, Midori Ishii, Kazuo Ohara, Tokuko Toyota, Risa Matsuoka, Mari Kitade, Yasuhisa Terao, Norio Komatsu and Hiromitsu Nakauchi
2. 発表標題 Development of iPSC-derived extended CTL therapy for cervical cancer
3. 学会等名 ISSCR 2020 Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 難治性がんに対する“off-the-shelf”T細胞療法の実現
3. 学会等名 第109回未来医療セミナー(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 子宮頸がんに対する持続可能なiPSC由来CTL療法の開発
3. 学会等名 令和2年度AMED再生・細胞医療・遺伝子治療交流会・シンポジウム、遺伝子改変細胞(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 iPS技術を用いた難治性がんに対する若返りT細胞療法の開発
3. 学会等名 第348回順天堂医学会学術集会 医学研究のUP-TO DATE (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りCTL療法の前臨床試験
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPSC由来若返りCTL療法の前臨床試験 ~ First In Human を目指す私たちの試み ~
3. 学会等名 第59回日本リンパ網内系学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田早希子、安藤美樹、山口智之、安藤純、中沢洋三、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 難治性EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来LMP1-CART療法の開発
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井翠、安藤美樹、原田早希子、本田匡宏、末原義之、安藤純、小松則夫、中内啓光
2. 発表標題 Ewing肉腫のネオアンチゲンを標的とするiPS細胞由来細胞傷害性T細胞療法の開発
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田匡宏、安藤美樹、安藤純、崎山祐未、中内啓光、小松則夫
2. 発表標題 子宮頸がんに対するiPS細胞由来CTL療法の開発
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadahiro Honda, Miki Ando, Yumi Sakiyama, Midori Ishii, Sakiko Harada, Kazuo Ohara, Jun Ando, Hiromitsu Nakauchi, Norio Komatsu
2. 発表標題 iPSC-derived CTL therapy for cervical cancer by targeting human papillomavirus (HPV)
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Midori Ishii, Miki Ando, Yumi Sakiyama, Sakiko Harada, Tadahiro Honda, Jun Ando, Norio Komatsu, Hiromitsu Nakauchi
2. 発表標題 The neoantigen-specific iPSC-derived rejuvenated CTL therapy for Ewing sarcoma
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakiko Harada , Miki Ando , Jun Ando , Satoshi Yamasaki , Midori Ishii , Tadahiro Honda , Kazuo Ohara , Yumi Sakiyama , Yozo Nakazawa , Malcolm K. Brenner , Hiromitsu Nakauchi , Norio Komatsu
2. 発表標題 Development of iPS cell derived LMP1-CART therapy for refractory EB virus associated lymphomas
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りCTL療法の前臨床試験
3. 学会等名 第8回日本免疫・細胞治療学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤美樹
2. 発表標題 子宮頸がんに対するiPS細胞を用いた”off-the-shelf”CTL療法
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 安藤美樹、中内啓光	4. 発行年 2020年
2. 出版社 実験医学増刊 羊土社	5. 総ページ数 627-632
3. 書名 iPS細胞技術を用いる若返りT細胞療法の開発 実臨床に向けた開発戦略	

1. 著者名 Ando M, Kinoshita S, Furukawa Y, Ando J, Nakauchi H, Brenner MK	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 21
3. 書名 Improving the safety of iPSC-derived T cell therapy; Molecular Players in iPSC Technology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

iPSC細胞由来の免疫キラーT細胞を用いることで悪性リンパ腫の治療に成功 https://www.juntendo.ac.jp/news/20190726-01.html

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	安藤 純 (Ando Jun) (60348943)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

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		
米国	ペイラー医科大学	スタンフォード大学	