

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08273

研究課題名(和文) 神経芽腫に対するGD2を標的とした新規キメラ抗原受容体遺伝子改変T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel chimeric antigen receptor gene-modified T cell therapy targeting GD2 for neuroblastoma

研究代表者

西尾 信博(Nishio, Nobuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：00586430

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)：本研究では、小児がんの中で脳腫瘍について最も多い固形腫瘍である神経芽腫に対する副作用の少ない新規治療法を開発するため、神経芽腫の細胞表面に発現するGD2を標的とするキメラ抗原受容体CARを新たに作製し、製造コストの低いpiggyBacトランスポゾン遺伝子導入法を用いることで、神経芽腫に対する新規のGD2.CAR-T細胞療法の基盤構築を目的とした。複数の抗原認識部位や共刺激分子を組み合わせ、培養方法を最適化することで複数のGD2.CAR-T細胞を作製できた。機能解析を実施し、腫瘍細胞を強力に傷害し、疲弊が少なく、細胞増殖が良好なGD2.CAR-T細胞の選択が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において神経芽腫に対する最適化されたGD2.CAR-T細胞療法への基盤構築ができたため、実用化されれば致死的な再発・難治神経芽腫の予後が改善することが期待される。piggyBacトランスポゾン遺伝子導入法を用いたCAR-T細胞はウイルスベクター法と比較して製造コストが低く、GD2陽性小児腫瘍や他の癌種に対するCAR-T療法開発への波及効果も期待出来る。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to develop a new treatment for neuroblastoma, the most common solid tumor among pediatric cancers other than brain tumors, with fewer side effects, we generated a new chimeric antigen receptor CAR targeting GD2 expressed on the cell surface of neuroblastoma cells and used a piggyBac transposon gene transfer method with low production cost. CAR-T cell therapy for neuroblastoma. Multiple GD2.CAR-T cells could be generated by combining multiple antigen recognition sites and co-stimulatory molecules and optimizing the culture method. Functional analysis was performed, and it was possible to select GD2.CAR-T cells with potent tumor cell injury, low exhaustion, and good cell proliferation.

研究分野：小児がん、免疫療法

キーワード：神経芽腫 GD2 CAR

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫の生存率は極めて侵襲の強い集学的治療を行っても 40%程度であり、副作用の少ない新規治療法が切望されてきた。米国では、新たながん免疫療法として、再発、難治性の B 細胞性悪性腫瘍に発現する CD19 分子を標的としたキメラ抗原受容体(CAR)を用いた遺伝子改変 T 細胞療法 (CAR-T 療法)の有効性が示されたが、他のがんへの応用が期待されている一方で、その高い製造コストが問題視されている。本研究では、神経芽腫に対する CAR を新たに作製し、製造コストの低い piggyBac トランスポゾン遺伝子導入法を用いた神経芽腫に対する CAR-T 細胞療法の基盤構築を目的とする。

2. 研究の目的

GD2 は神経芽腫細胞表面に高発現しているガングリオシドであり、神経芽腫の他、脳腫瘍、軟部肉腫、骨肉腫の一部など、特に小児がんが発現する治療標的分子として重要である。正常細胞では神経組織のみに発現し、その発現は神経芽腫に比較して非常に低く、実際、GD2 を標的としたモノクローナル抗体薬が、米国・欧州で承認されていることから GD2 は CAR-T 細胞療法の標的として有望である。一方、同じ抗原を標的とする CAR-T 細胞でも、その抗原認識部位のクローンの差異、共刺激分子の違いが CAR-T 細胞の効果に影響を及ぼすため、最適な GD2.CAR コンストラクトを決定することは GD2.CAR-T 細胞療法開発にとって重要である。本研究では異なるクローン由来の抗原認識部位と共刺激分子を組み合わせ、同じ GD2 を標的とする複数の CAR コンストラクトを作成し、最適な GD2.CAR コンストラクトの決定を試みた。本研究において神経芽腫に対する最適化された GD2.CAR-T 細胞療法の有効性および安全性が示されれば、致死的な再発・難治神経芽腫の予後が改善することが期待される。piggyBac トランスポゾン遺伝子導入法を用いた CAR-T 細胞はウイルスベクター法と比較して製造コストが低く、GD2 陽性小児腫瘍や他の癌種に対する CAR-T 療法開発への波及効果も期待出来る。

3. 研究の方法

(1)GD2 特異的キメラ抗原受容体 (GD2.CAR) トランスポゾンベクターの作製

すでに研究協力者より取得している異なる抗原認識部位の配列情報と CD28、4-1BB などの共刺激分子の組み合わせにより、複数の GD2.CAR コンストラクトを作成する。

上記の GD2.CAR を、申請者が所有する CD19.CAR トランスポゾンベクター(pIRII-CD19.28.) の CAR 配列と入れ替え、GD2.CAR トランスポゾンベクターを作成する。

(2)piggyBac トランスポゾン法による GD2.CAR 遺伝子の導入および GD2.CAR-T 細胞の培養

研究代表者らが開発した piggyBac トランスポゾン遺伝子導入法を用いて、GD2.CAR 遺伝子を T 細胞に導入し、その GD2.CAR-T 細胞を、GMP 準拠培養法を用いて培養する。

(3) *In vitro* 実験系を用いた GD2.CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の評価

CAR-T 細胞と神経芽腫細胞株をサイトカイン無添加・10%血清存在下で 1 週間共培養する系などを用い、GD2.CAR-T 細胞の抗原特異性、細胞傷害活性、増殖活性、細胞表面 exhaustion マーカー、CAR-T 細胞の persistency などを検討する。

4. 研究成果

(1)GD2.CAR トランスポゾンベクターの作製: 3 種類の異なる抗原認識部位、スパーサー、共刺激分子の組み合わせにより、複数の GD2.CAR コンストラクトを作製した。作製した GD2.CAR を、

研究代表者が所有する CD19.CAR トランスポゾンベクター(pIRII-CD19.28.z) の CAR 配列と入れ替え、GD2.CAR トランスポゾンベクターを作製した。さらに、ヒト IL-15 の遺伝子を 2A シークエンスをはさんで組み込むことで、遺伝子導入された CAR-T 細胞が IL-15 を産生できるコンストラクトも作製した。

(2)piggyBac トランスポゾン法による GD2.CAR 遺伝子の導入および GD2.CAR-T 細胞の培養：研究代表者らが開発した piggyBac トランスポゾン遺伝子導入法を用い、末梢血単核球にヌクレオフェクション装置を用いて、T 細胞に GD2.CAR トランスポゾンベクターと piggyBac 遺伝子転位酵素ベクターを導入した。その後インターロイキン(IL)-7 および IL-15 を添加した培地中で培養した。複数のヌクレオフェクション装置を用いて遺伝子導入効率や培養効率をみることで最適な培養方法の確立を試みたところ、培養開始 14 日目にフローサイトメトリーを用いて T 細胞上の GD2.CAR 発現率を測定し、20-50%の遺伝子導入効率を得ることができた。また CCR7、CD45RA を用いた T 細胞サブセット解析では CCR7+CD45RA+のナイーブ表現型が優位な CAR-T 細胞を得ることができた。従来の培養法をさらに改良することで、より多くの CAR-T 細胞を得ることが可能となった。そのため、必要な CAR-T 細胞数を得るための培養日数を短縮することが可能である上に、より疲弊していない増殖活性の高い GD2.CAR-T 細胞を得ることに貢献した。培養終了時の遺伝子導入効率、T 細胞サブセット、CAR-T 細胞数はコンストラクトの違いによる明らかな差異は見られなかった。

(3)In vitro 実験系を用いた GD2.CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の評価：CAR-T 細胞と神経芽腫細胞株をサイトカイン無添加・5-10%血清存在下で共培養し、GD2.CAR-T 細胞の抗原特異性、細胞傷害活性、増殖性を比較した。複数の GD2 発現細胞株との共培養では、いずれの GD2.CAR-T 細胞でも強力に腫瘍細胞を傷害した。一方で GD2 非発現細胞株は傷害せず、培養した GD2.CAR-T 細胞は高い抗原特異性を示した。GD2.CAR-T 細胞は神経芽腫細胞株との共培養によって増殖するが、抗原刺激によって CCR7 陰性分画の比率が高くなり、PD1 などの疲弊マーカーの発現が増加し、GD2.CAR-T 細胞が疲弊して増殖しにくくなる様子が観察できた。その増殖、疲弊には使用したコンストラクトによって差が見られ、作製したコンストラクトの中で最適な治療効果を得ることができる CAR を選択することが可能であった。さらに疲弊しにくい GD2.CAR-T 細胞を得るために、GD2.CAR と同時に IL-15 を自己産生できるコンストラクトを作製し、GD2.CAR-T 細胞を製造した。IL-15 産生 GD2.CAR-T 細胞を神経芽腫細胞株との共培養を実施したところ、強力に細胞株を傷害し、さらに疲弊を遅らせ、高い増殖活性を得ることが可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾信博
2. 発表標題 非ウイルスベクター法によるCAR-T細胞療法臨床試験
3. 学会等名 第123回日本小児科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西尾信博, Nattiya Hirankarn, Udomsak Bunworasate, Koramit Suppipat, Supannikar Tawinwang, Rattapoom Thaiwong, Suparat Tudsamran, 中沢洋三, 濱田太立, 市川大輔, 西川英里, 川島希, 成田敦, 村松秀城, 小島勢二, 高橋義行
2. 発表標題 タイにおけるPiggyBacトランスポゾン法によるCD19キメラ抗原受容体遺伝子改変T細胞療法臨床第I相試験への技術支援
3. 学会等名 第12回血液疾患免疫療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuhiro Nishio, Motoharu Hamada, Yusuke Okuno, Masayuki Imaya, Taro Yoshida, Ayako Yamamori, Shunsuke Miwata, Kotaro Narita, Hironobu Kitazawa, Daisuke Ichikawa, Nozomu Kawashima, Eri Nishikawa, Atsushi Narita, Hideki Muramatsu, Kai Wang, Huyong Zheng, Lung-Ji Chang, Seiji Kojima, Yoshiyuki Takahashi
2. 発表標題 Evaluation of next-generation sequencing-based minimal residual disease analysis after CAR-T therapy
3. 学会等名 第82回日本血液学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 キメラ抗原受容体遺伝子改変リンパ球の調製方法	発明者 西尾信博、高橋義行	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-209891	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	高橋 義行 (Takahashi Yoshiyuki) (40432273)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

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