

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23705

研究課題名（和文）GPC1を標的とした犬の固形腫瘍に対する遺伝子改変T細胞療法の基盤的研究

研究課題名（英文）Study of the gene-engineered T cell therapy targeting GPC1 against canine solid tumors

研究代表者

加藤 大貴 (Kato, Daiki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・農学特定研究員

研究者番号：60843216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：犬腫瘍症例に対する活性化T細胞療法が普及しているが、その腫瘍への特異性は低く、十分な治療効果は得られていない。遺伝子改変T細胞療法では、T細胞の遺伝子改変により強力な腫瘍特異性が付与可能であり、人血液腫瘍患者において明確な治療効果を挙げている。本研究では、獣医学領域において、犬固形腫瘍に対する遺伝子改変T細胞療法の確立に必要な標的抗原の実証およびそれら腫瘍抗原を認識する抗体の同定に成功した。今後、本研究成果をもとにした犬固形腫瘍に対する遺伝子改変T細胞療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、患者の免疫細胞を標的とした腫瘍免疫療法が明確な臨床効果を認め、新たな腫瘍治療法の一つとなった。なかでも、遺伝子改変T細胞療法は、人血液腫瘍患者において、劇的な治療効果を認め、その固形腫瘍への応用が期待されている新たな治療法である。本研究では、犬固形腫瘍を標的とした遺伝子改変T細胞療法の開発に必要な標的抗原やT細胞の培養法の実証に成功し、腫瘍免疫学分野の発展に大きく貢献した。また、発見した標的抗原は、抗体療法など別の腫瘍治療法の研究や犬腫瘍の病態解明研究への応用性も高く、獣医腫瘍学的にも価値ある成果を報告できた。

研究成果の概要（英文）：Activated T cell therapy for dogs with tumor has been performed in veterinary medicine, but its specificity for tumors is very low and sufficient therapeutic effect has not been obtained. In gene-engineered T cell therapy, strong tumor specificity can be conducted by genetic modification of T cells, and a significant therapeutic effect has been demonstrated in human hematological tumors. In this study, we successfully demonstrated novel target antigens of canine solid tumors which are necessary for development of gene-engineered T cell therapy for canine solid tumors in the field of veterinary medicine. Moreover, we identified antibodies that recognize those tumor antigens. As a further study, the gene-engineered T cell therapy for canine solid tumors will be developed based on the results of this research.

研究分野：獣医学

キーワード：犬 固形腫瘍 腫瘍免疫 CAR-T グリピカン

1. 研究開始当初の背景

(1) 犬の悪性固形腫瘍は手術での完全切除が難しく、再発・転移を防ぐ放射線や抗癌剤の有効性も血液腫瘍に比べて極めて低いことから、ヒトと同様に主要な死亡原因の一つとなっている疾患である。

(2) 近年、免疫療法が悪性腫瘍に対する新たな治療法として注目されており、腫瘍による抑制を受けた抗腫瘍 T 細胞を体外や体内で再活性化させる様々な治療法が開発されている。

(3) その一つが、患者の末梢血中の T 細胞を体外で活性化した後に、遺伝子組み換えにより、T 細胞膜上に標的抗原に対する抗体と殺傷シグナル分子をキメラ化した受容体を発現させ、腫瘍細胞への「強い特異性」と「強力な殺傷能力」を付与した人工抗腫瘍 T 細胞(CAR-T 細胞)を投与する治療法である。

(4) CAR-T 細胞療法は、ヒト血液腫瘍患者で劇的な治療効果を挙げており、固形腫瘍患者への応用が期待されている新たな免疫療法の一つである。

(5) 申請者は、グリピカン 1(GPC1)を標的とした固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法に関して、マウス細胞およびヒト細胞を用いて、その有効性と安全性を示すデータを得て、報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、獣医学領域における犬悪性固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の確立を目指して、その基盤となる標的抗原の探索、発現解析および犬 T 細胞を用いた CAR-T 細胞作製法の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 犬腫瘍細胞株および正常犬腎臓尿管上皮細胞株、健常犬末梢血単核球(PBMC)を用いて、標的抗原候補であるグリピカン 1(GPC1)、ポドプラニン(PDPN)、ヒト上皮成長因子受容体 2(HER2)の遺伝子発現量を qPCR 法にて解析した。

(2) 犬腫瘍細胞株および正常犬腎臓尿管上皮細胞株、健常犬末梢血、手術摘出腫瘍検体を用いて、標的抗原候補である GPC1、PDPN、HER2 の細胞表面における蛋白発現をフローサイトメトリ法にて解析した。

(3) 各種犬腫瘍および全身の犬正常組織パラフィン包埋ブロックを用いて、標的抗原候補である GPC1、PDPN、HER2 の蛋白発現を免疫染色法にて解析した。

(4) 犬末梢血単核球(PBMC)から、効率的に犬 T 細胞を増幅するために必要な刺激およびサイトカインを検証するために、刺激試薬としてコンカナバリン A(ConA), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)、サイトカインとしてインターロイキン 2(IL-2)を各種濃度で添加し、犬 T 細胞の増幅効率を検証した。

(5) 犬 CAR-T 細胞への遺伝子導入に必要な犬 CAR ベクター配列を、標的抗原に対する一本鎖抗体、犬 CD28, 犬 CD3z 配列を連結し、設計した。

4 . 研究成果

(1) 遺伝子発現解析の結果、GPC1、PDPN、HER2 全てが、正常犬腎臓尿管上皮細胞株および健常犬 PBMC に比べ、各種、犬腫瘍細胞株で高発現であった。GPC1 は、犬悪性黒色腫や骨肉腫細胞株で、PDPN は、犬悪性黒色腫細胞株で、HER2 は犬悪性黒色腫や骨肉腫、乳腺癌、犬膀胱癌細胞株で高発現を認めた。

(2) フローサイトメトリー解析の結果、抗犬 PDPN 抗体(PMab-38)が犬 PDPN 強制発現 CHO 細胞株や犬悪性黒色腫細胞株に結合性を示し、腫瘍細胞表面上で PDPN が発現することおよび PMab-38 抗体可変領域配列が CAR-T に利用可能であることがわかった。HER2 においては、抗ヒト HER2 抗体(Trastuzumab)が犬悪性黒色腫や骨肉腫、乳腺癌、犬膀胱癌細胞株および、犬肛門嚢腺癌臨床検体に結合性を示した。一方、GPC1 に関しては入手可能な抗体を用いて、犬腫瘍細胞株や手術摘出腫瘍組織における結合性を検証したものの、結合性を示す抗体を見つけることができなかった。

(3) 入手可能な抗 GPC1 抗体を用いて、各種犬腫瘍および全身の犬正常組織パラフィン包埋ブロックの染色を行なったが、染色性を示す抗体を見つけることができなかった。抗 PDPN 抗体 (PMab38)抗体を用いた検証では、本抗体の持つ腫瘍特異性により、正常組織では腎臓の一部細胞を除き陽性像を認めず、犬扁平上皮癌や犬肺腺癌、犬髄膜種、犬繊維肉腫、犬悪性黒色腫において染色性を認め、PDPN が有望な標的であることがわかった。抗 HER2 抗体による染色では、犬骨肉腫、犬乳腺癌、犬膀胱癌、犬前立腺癌、犬肺腺癌、犬肛門嚢腺癌、犬甲状腺癌において、細胞膜上に強い HER2 発現が確認でき、HER2 は犬の幅広い腫瘍種に適応可能な標的抗原であることがわかった。

(4) 健常犬末梢血より、PBMC を分離し、各種濃度の ConA, PMA および IL-2 を添加し、培養したところ、PMA に比べ ConA で培養した T 細胞の方が長寿命であり、CAR-T 細胞の作製に適していると考えられた。また、犬 T 細胞は IL-2 濃度依存的に、増殖効率が向上し、1000IU/ml 添加での T 細胞培養が適していると考えられた。

(5) 上記の実験をもとに、抗 PDPN 抗体 (PMab-38) の可変領域配列を用いて、PDPN を標的とした CAR-ベクターを、抗ヒト HER2 抗体 (Trastuzumab) の可変領域配列を用いて、HER2 を標的とした CAR-ベクターを作製することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kato Daiki, Yaguchi Tomonori, Iwata Takashi, Katoh Yuki, Morii Kenji, Tsubota Kinya, Takise Yoshiaki, Tamiya Masaki, Kamada Haruhiko, Akiba Hiroki, Tsumoto Kouhei, Serada Satoshi, Naka Tetsuji, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki, Kawakami Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e49392.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.49392	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 Yoshimoto Sho, Kato Daiki, Kamoto Satoshi, Yamamoto Kie, Tsuboi Masaya, Shinada Masahiro, Ikeda Namiko, Tanaka Yuiko, Yoshitake Ryohei, Eto Shotaro, Saeki Kohei, Chambers James, Kinoshita Ryohei, Uchida Kazuyuki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Immunohistochemical evaluation of HER2 expression in canine thyroid carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e02004 ~ e02004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e02004	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 YOSHIMOTO Sho, KATO Daiki, KAMOTO Satoshi, YAMAMOTO Kie, TSUBOI Masaya, SHINADA Masahiro, IKEDA Namiko, TANAKA Yuiko, YOSHITAKE Ryohei, ETO Shotaro, SAEKI Kohei, CHAMBERS James Kenn, KINOSHITA Ryohei, UCHIDA Kazuyuki, NISHIMURA Ryohei, NAKAGAWA Takayuki	4. 巻 81
2. 論文標題 Detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in canine anal sac gland carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0019	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 Shinada Masahiro, Kato Daiki, Kamoto Satoshi, Yoshimoto Sho, Tsuboi Masaya, Yoshitake Ryohei, Eto Shotaro, Ikeda Namiko, Saeki Kohei, Hashimoto Yuko, Takahashi Yosuke, Chambers James, Uchida Kazuyuki, Kaneko Mika K., Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Kato Yukinari, Nakagawa Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 PDPN Is Expressed in Various Types of Canine Tumors and Its Silencing Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Canine Malignant Melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1136 ~ 1136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051136	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 YOSHIMOTO Sho, KATO Daiki, KAMOTO Satoshi, YAMAMOTO Kie, TSUBOI Masaya, SHINADA Masahiro, IKEDA Namiko, TANAKA Yuiko, YOSHITAKE Ryohei, ETO Shotaro, SAEKI Kohei, CHAMBERS James, HASHIMOTO Yuko, UCHIDA Kazuyuki, NISHIMURA Ryohei, NAKAGAWA Takayuki	4. 巻 82
2. 論文標題 Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 in canine primary lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 804 ~ 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0026	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 Kamoto Satoshi, Shinada Masahiro, Kato Daiki, Yoshimoto Sho, Ikeda Namiko, Tsuboi Masaya, Yoshitake Ryohei, Eto Shotaro, Hashimoto Yuko, Takahashi Yosuke, Chambers James, Uchida Kazuyuki, Kaneko Mika K., Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Kato Yukinari, Nakagawa Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Phase I/II Clinical Trial of the Anti-Podoplanin Monoclonal Antibody Therapy in Dogs with Malignant Melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2529 ~ 2529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112529	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 加藤大貴
2. 発表標題 腫瘍抗原を標的とした免疫療法
3. 学会等名 第3回獣医がん分子生物学研究会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato Daiki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki
2. 発表標題 cancer immunotherapies targeting novel canine solid tumor antigens
3. 学会等名 The 1st ToBeST symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口智憲、加藤大貴、守井賢二、世良田聡、仲哲治、河上裕
2. 発表標題 固形がんに対するCAR-T細胞療法を用いた複合免疫療法
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 衛藤翔太郎, 佐伯巨平, 吉竹涼平, 加藤大貴, 坪井誠也, 吉本翔, 品田真央, 池田凡子, 嘉本諭, James Chambers, 内田和幸, 西村亮平, 中川貴之
2. 発表標題 犬移行上皮癌における腫瘍免疫微小環境の解析と関連因子の探索
3. 学会等名 第19回生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki KATO, Tomonori YAGUCHI, Kenji MORII, Satoshi SERADA, Tetsuji NAKA, Ryohei NISHIMURA, Yutaka KAWAKAMI, Takayuki NAKAGAWA
2. 発表標題 Glypican-1 (GPC-1) specific chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells eradicated solid tumor without adverse effects and showed synergistic effects with anti-PD-1 antibody
3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialities (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室(所属研究室 研究紹介)
<http://www.vn.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>
犬の希少がんの治療標的を発見(プレスリリース)
https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20190529-1.html
固形がんに対する新しい CAR-T 細胞療法の可能性(プレスリリース)
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2020/6/12/200612-2.pdf>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------