

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23894

研究課題名(和文) CAR-T細胞の「疲弊」改善に寄与する共刺激因子発現型腫瘍溶解ウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of a co-stimulator-expressing oncolytic virus that contributes to the improvement of "immunological exhaustion" of CAR-T cells

研究代表者

吉田 秀樹 (Yoshida, Hideki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10643546

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)：1) 発現ベクターを用いて共刺激因子CD80を発現するRMS細胞株(Rh30)を作製した。またフローサイトメトリーにより安定して発現していること確認した。2) CD80を発現させたRh30および、野生型のRh30とCAR-Tを共培養し、real time analyzerでRh30に対する抗腫瘍効果を評価した。CD80を発現したRh30は、CAR-Tにより長時間細胞数が抑制された。免疫学的疲弊の軽減を示唆する結果と考える。3) MYOGプロモーター制御型OAdをもとに、E1遺伝子、T2A、CD80をつないだウイルスプラスミドを作製した。現在ウイルスとしてassembleできるか検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者の腫瘍免疫機構を回復させるために、細胞傷害性T細胞(CTL)がもつT細胞受容体(TCR)に対して遺伝子改変したCAR-T細胞を用いたがん治療は、すでに一部の急性リンパ性白血病や悪性リンパ腫に対して使用されているが、血液腫瘍以外の小児固形腫瘍のCAR-T細胞療法は、いまだ研究レベルの域を出ていない。標的となるがん細胞上に共刺激因子を発現させる遺伝子改変OAdをCAR-Tと併用することで、T細胞に生じる『免疫学的疲弊』を軽減し、抗腫瘍効果を増強させることができれば、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の治療効果を著しく高める可能性がある。

研究成果の概要(英文)：1) We made an RMS cell line (Rh30) expressing the co-stimulator CD80 using an expression vector pcDNA3.1(+). We also confirmed that the expression was stable by flow cytometry. 2) CD80-expressing Rh30 and wild-type Rh30, and CAR-T were co-cultured respectively, and then the antitumor effect on Rh30 was evaluated by a real time analyzer. The cell number of CD80-expressing Rh30 was suppressed for a long time by CAR-T. This result suggests a reduction in immunological exhaustion. 3) Based on the MYOG promoter-controlled OAd, a viral plasmid in which the E1 gene, T2A, and CD80 were linked was prepared. We are currently verifying whether it can be assembled as a virus.

研究分野：小児悪性疾患腫瘍

キーワード：腫瘍溶解性アデノウイルス 横紋筋肉腫 CAR-T細胞療法 免疫学的疲弊 共刺激因子

## 1. 研究開始当初の背景

進行期横紋筋肉腫 (RMS) に対して、手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた集学的治療が行われるが、治療不応例、再発例の予後は極めて不良であり、新規治療の開発が望まれている。腫瘍溶解性ウイルス療法 (OAd) は患者への侵襲性が低く、他の治療法とは異なる細胞障害機序でがん細胞に作用するため、治療抵抗性のがんも対象とでき、「次世代のがん治療」として期待されている。またウイルス製剤はがん細胞を直接殺傷するだけでなく、がんに対して体内の免疫反応を賦活していることが以前より知られている (Todo, et al. Hum Gene Ther. 1999)。

アデノウイルスはエンベロープをもたない約 35kb サイズの二重鎖 DNA ウィルスで、その 5 型は in vivo で高い遺伝子導入効率を示すことから遺伝子治療用ベクターとして用いられてきた。万が一感染を起こしたとしても上気道炎、即ちいわゆる「かぜ」で済み、安全面で大きな問題とはならない。OAd の選択的特異性を高める方法の一つが OAd のウィルス遺伝子の転写に必須である E1 gene の発現をがん特異的プロモーターで制御することである (Yamamoto, et al. Mol. Ther. 2010; Yoshida, et al. Transl Oncol. 2021)。

がん患者の腫瘍免疫機構を回復させるために、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がもつ T 細胞受容体 (TCR) に対して遺伝子改変を加え、直接的かつ選択的に腫瘍細胞を CTL に認識させ、抗腫瘍効果を発揮するという遺伝子改変キメラ受容体 T 細胞治療が近年開発されてきた。CAR-T 細胞を用いたがん治療はすでに臨床試験として応用されているが、血液腫瘍以外の小児固形腫瘍の CAR-T 細胞療法ははまだ十分な研究がなされておらず、臨床応用もされていない。本研究では、本課題提案者および共同研究者が持つ小児がんに対する OAd 療法および CAR-T 細胞療法の開発技術を集結させ、「共刺激因子を RMS 細胞上に発現させる改変 OAd を CAR-T と併用することが、T 細胞に生じる『免疫学的疲弊』を軽減し、抗腫瘍効果を増強させ得るのか」という問いを明らかにすることを最終目標とする

## 2. 研究の目的

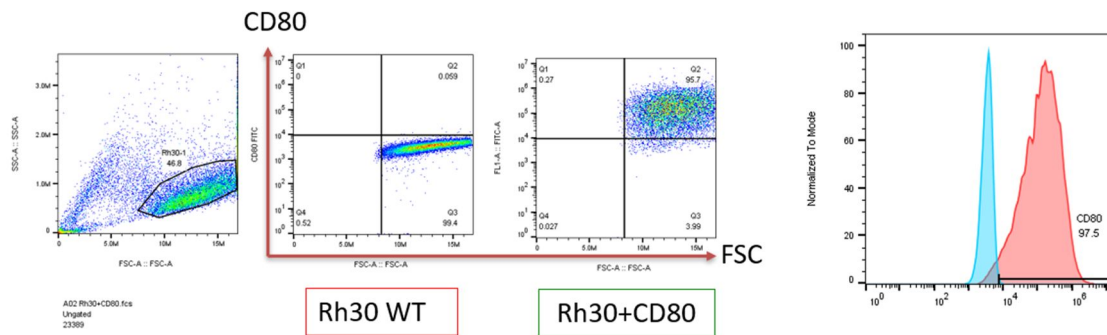
本研究の目的は「共刺激因子を強制発現することでがん細胞を『抗原提示細胞化』させると CAR-T 細胞の免疫学的疲弊が軽減され、結果的に抗腫瘍効果を増強できるか」を検証することである。

## 3. 研究の方法

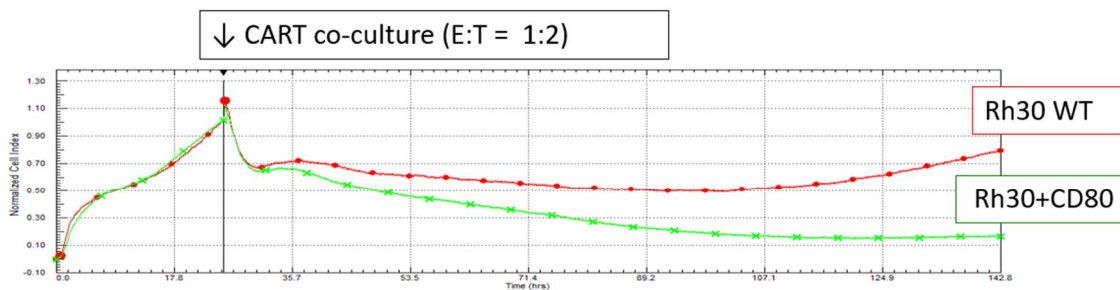
- 共刺激因子安定発現横紋筋肉腫 (RMS) 細胞株の作製
- 共刺激因子安定発現 RMS と RMS 特異的 CAR-T の共培養。
- 共刺激因子発現型 RMS 特異的 OAd の開発
- 共刺激因子発現型 OAd による、CAR-T の 疲弊抑制効果の検証

## 4. 研究成果

1) 共刺激因子安定発現横紋筋肉腫 (RMS) 細胞株の作製。pcDNA3.1 発現ベクターを用いて CD80 を発現する RMS 細胞株 (Rh30) を作製した。また puromycin にてセレクションを行い、フローサイトメトリーにより安定して発現していること確認した。



2) 共刺激因子安定発現 RMS と RMS 特異的 CAR-T の共培養。CD80 を発現させた Rh30 および、野生型の Rh30 と CAR-T を共培養し、real time analyzer で Rh30 に対する抗腫瘍効果を評価した。CD80 を発現した Rh30 は、CAR-T により長時間細胞数が抑制された。免疫学的疲弊の軽減を示唆する結果と考える。



共培養開始80時間後頃にRh30(wild type)は再増殖を認めるが、CD80を発現させたRh30では120時間後もまだ増殖が抑えられている

3) 共刺激因子発現型 RMS 特異的 OAd の開発 (現在進行形である)。MYOG プロモーター制御型 OAd をもとに、E1gene の後に T2A で CD80 をつないだコンストラクトを作製し、ウイルスとして assemble 可能か検証中である。

4) 共刺激因子発現型 OAd による、CAR-T の 疲弊抑制効果の検証 (現時点で到達していない)。ウイルスが作製次第、CAR-T との併用効果を in vitro, in vivo で検証する予定である。

【意義・重要性】

共刺激因子を標的となるがん細胞上に発現させることで、CAR-T 細胞に生じる『免疫学的疲弊』を軽減し、抗腫瘍効果を増強させることができれば、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の治療効果を著しく高める可能性がある。in vivo で腫瘍に目的のタンパクを発現させる OAd の開発は、癌腫を問わず技術応用することが可能であり、非常に潜在力を秘めた研究と確信する。

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

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