

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23913

研究課題名（和文）iPS細胞技術を用いた固形がんに対する他家移植用CAR-T細胞療法の開発

研究課題名（英文）Development of CAR-T cell therapy derived from iPS cells for solid tumor

研究代表者

嘉島 相輝（Kashima, Soki）

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50842952

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）：癌細胞株および前立腺癌患者検体を用いて、PSMAの発現を評価するとともに、抗腫瘍効果検証に向けたin vivoモデルを樹立した。他家移植用のHLAホモ型iPS細胞を用いてPSMA-CAR-iPS細胞を作製し、PSMA-CAR-iPS細胞から再生T細胞への分化誘導のための条件検討を行った。T cell receptor (TCR)遺伝子をiPS細胞に遺伝子導入することで作製したTCR-iPS細胞に対してCAR遺伝子を導入することで、TCRへの刺激を用いて効率よくCAR-再生T細胞へ分化誘導させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のCAR-T細胞療法は自家移植の系で用いられているため、患者ごとに個別に細胞を作製する必要があり、製品化する上で均質性が保ちづらいという問題点がある。均質なCAR-T細胞を大量に作製して製剤化するためには、他家移植の系が必要である。我々はこれらの問題点の克服に向けて、iPS細胞研究所が作製したHLA最頻ハプロタイプホモ型iPS細胞を用いてCAR-T細胞を作製することで、他家移植可能な”off-the shelf”のCAR-T細胞製剤の開発に取り組み、一定の成果を得た。固形がんに対する他家移植可能なCAR-T細胞療法の開発は他に類がなく、本研究の学術的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the expression of PSMA in cancer cell lines and patient specimens of prostate cancer. We established an in vivo model to evaluate antitumor effect. We established PSMA-CAR-iPS cells with HLA homozygote. We examined the conditions for T-cell differentiation from PSMA-CAR-iPS cells. By introducing the CAR gene into TCR-iPS cells, T-cell differentiation became efficient by stimulating TCR.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：iPS細胞 CAR-T 固形がん HLA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫療法ががんに対して有効であることが知られ、大いに期待されている。特に、CD19 を標的とする chimeric antigen receptor (CAR) を患者末梢血 T 細胞に導入した CAR-T 細胞療法が米国の認証を取得し、良好な治療成績をあげている。しかし、現行の CAR-T 細胞療法は自家移植の系で用いられているため、患者の免疫細胞が既に疲弊しており十分な機能を発揮しない場合があることや、CAR 遺伝子導入効率・発現効率の担保が難しいという問題点があり、細胞の均質性、安全性、治療効果が保ちづらいことが課題である。また、現在のところ CAR-T 細胞療法は血液がんに対して非常に有効である一方、固形がんに対しては良い標的抗原が定まっておらず、未だ実現に至っていない。海外で既に血液がんに対する CAR-T 細胞療法が劇的な効果を上げていることを考えると、今後我が国でも CAR-T 細胞療法が普及すると予想され、将来的には固形がんにも対象が拡大していくと考えられる。以上より、本格的な CAR-T 細胞療法の普及に備えて、免疫細胞の均一性を確保する技術の確立が必要である。また、現在の CAR-T 細胞療法法の適応は血液がんに限定されているが、難治性固形がんに対しても新規 CAR-T 細胞療法の開発が期待される。

### 2. 研究の目的

申請者の所属する研究室では、これまでに、がん抗原特異的 T 細胞を起源に樹立した T-iPS 細胞から同じ TCR を発現する T 細胞を大量に誘導することに成功し (Vizcardo R et al., Cell Stem Cell, 2013)、更にその後の研究で、より高品質である CD8 $\alpha$  $\beta$  型のキラー T 細胞を作製することに成功した (Maeda et al., Cancer Res, 2016)。申請者はこの技術を用いて、均質な抗原特異的キラー T 細胞を大量に再生し、患者由来の腎細胞癌ゼノグラフトモデルに対する抗腫瘍効果を示した (Kashima et al., iScience, 2020)。本研究ではこの技術を応用して、固形がんに対する CAR 遺伝子を HLA ホモ型 iPS 細胞に導入した CAR-iPS 細胞を作製し、CAR-iPS 細胞から他家移植用 CAR-再生 T 細胞を作製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

固形がんに対して有望と思われる細胞表面がん抗原を検討し、これを標的とする CAR 遺伝子とレポーター遺伝子を組み込んだレンチウイルスを HLA ホモ型 iPS 細胞に感染させ、遺伝子導入細胞をクローニングすることで PSMA-CAR-iPS 細胞を樹立する。

再構成された TCR 遺伝子を持つ T-iPS 細胞から未熟 T 細胞を誘導し、TCR 刺激により成熟 T 細胞へと分化誘導する技術は既に確立済みである。また、非 T 細胞由来の iPS 細胞に TCR 遺伝子を外来的に導入した、TCR-iPS 細胞による T 細胞への分化技術も既に確立済みである。これらの技術を応用し、CAR への刺激で成熟 T 細胞への分化誘導を試みる。即ち、T 細胞成熟に適した刺激を加えられる条件を検討する。

### 4. 研究成果

泌尿器がんにおいてこれまでの臨床実績からも特異性が高く副作用の可能性が低い抗原として、前立腺癌に高発現する Prostate specific membrane antigen (PSMA) に着目した。ヒト前立腺癌細胞株 5 種類について、flow cytometry により PSMA 陽性株および陰性株を確認した。

これらの細胞株に対し、*in vitro* killing assay ( luciferase assay ) のためにレンチウイルスベクターを用いて luciferase 遺伝子を導入し、遺伝子発現細胞株を得た。また、5 例の前立腺癌手術検体から、患者由来前立腺癌ゼノグラフトモデルを 5 系統作製し、安定的に継代可能な株を樹立した。免疫染色により、手術時の患者病理検体と樹立したゼノグラフト腫瘍との PSMA タンパク発現を比較し、元の腫瘍の発現状態がゼノグラフト腫瘍で保たれていることを確認した。これらの患者由来前立腺癌ゼノグラフト腫瘍について、今後 *in vivo* における PSMA-CAR-再生 T 細胞の抗腫瘍効果検証を行うため、腫瘍増殖を観察した上で凍結保存を行った。

iPS 細胞に遺伝子導入するための PSMA-CAR 遺伝子については、Creative Biolabs 社からレンチウイルスベクターとして購入した。用いる iPS 細胞としては、京都大学 iPS 細胞研究所が作製した、日本人の HLA 最頻ハプロタイプホモ型 iPS 細胞を用いた。HLA 最頻ハプロタイプホモ型のドナーから作製された iPS 細胞を用いれば、日本人の 17% に対して移植可能であり、1 種類の元株を作るだけで多数の患者に投与できる。PSMA-CAR 遺伝子を HLA ホモ型 iPS 細胞に遺伝子導入し、レポーター遺伝子発現細胞を flow cytometry で single cell sorting した。レポーター遺伝子を発現する iPS 細胞のサブクローンを複数株選別し、PSMA-CAR-iPS 細胞を樹立した。また、また、コントロールとして CD19-CAR-iPS 細胞についても同様に作製した。CAR-iPS 細胞から再生 T 細胞への分化誘導のための条件検討を行った結果、CAR への刺激によって未熟 T 細胞から成熟 T 細胞への分化誘導を行うことは誘導効率が非常に悪かったため、予定を変更して HLA ホモ型 iPS 細胞に TCR 遺伝子を導入した TCR-iPS 細胞に対して CAR 遺伝子を導入することで、TCR への刺激を用いて成熟 T 細胞へ分化誘導させることとした。結果として、未熟 T 細胞から効率よく成熟 T 細胞へ分化誘導させることが出来た。以上より、当初予定していた研究内容は概ね実施され、順調に成果が得られたと考えている。今後、細胞株および患者由来前立腺癌ゼノグラフトに対する PSMA-CAR-再生 T 細胞による抗腫瘍効果を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 1)Kashima S, Maeda T, Masuda K, Nagano S, Inoue T, Takeda M, Kono Y, Kobayashi T, Saito S, Higuchi T, Ichise H, Kobayashi Y, Iwaisako K, Terada K, Agata Y, Numakura K, Saito M, Narita S, Yasukawa M, Ogawa O, Habuchi T, Kawamoto H	4. 巻 23
2. 論文標題 Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100998 ~ 100998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100998	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 Maeda Takuya, Nagano Seiji, Kashima Soki, Terada Koji, Agata Yasutoshi, Ichise Hiroshi, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Fujiki Fumihiro, Sugiyama Haruo, Kitawaki Toshio, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi, Masuda Kyoko, Kawamoto Hiroshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Regeneration of Tumor-Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes from iPSCs Transduced with Exogenous TCR Genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 250 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.09.011	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 Saito Ryoichi, Kobayashi Takashi, Kashima Soki, Matsumoto Keiyu, Ogawa Osamu	4. 巻 25
2. 論文標題 Faithful preclinical mouse models for better translation to bedside in the field of immunology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 831 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-019-01520-z	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 Takamori Hajime, Kamba Tomomi, Sumiyoshi Shinji, Tsuzuki Toyonori, Kashima Soki, Yoshino Takayuki, Sano Takeshi, Goto Takayuki, Sawada Atsuro, Akamatsu Shusuke, Kobayashi Takashi, Yamasaki Toshinari, Mizowaki Takashi, Ogawa Osamu, Inoue Takahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Solitary recurrence of prostate cancer surrounded by seminal vesicle/vas deferens like epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 171 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12168	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 Naoko Nose, Suguru Nogami, Kazuhiro Koshino, Xinyu Chen, Rudolf A. Werner, Soki Kashima, Steven P. Rowe, Constantin Lapa, Kazuki Fukuchi, Takahiro Higuchi	4. 巻 0
2. 論文標題 18F-FDG-Labelled Stem Cell PET Imaging in Different Route of Administration and Multiple Animal Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kashima S, Narita S, Koizumi A, Habuchi T.
2. 発表標題 The Role of Extensive Lymph Node Dissection in Robotic Radical Prostatectomy for High-risk Prostate Cancer after Neoadjuvant Chemohormonal Therapy
3. 学会等名 17th East Asian Society of Endourology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嘉島相輝, 前田卓也, 増田喬子, 永野誠治, 井上高光, 安川正貴, 小林 恭, 山崎俊成, 小川 修, 羽淵友則, 河本 宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたWT1抗原特異的再生キラーT細胞の腎細胞癌に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第12回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嘉島相輝, 前田卓也, 永野誠治, 増田喬子, 井上高光, 安川正貴, 小林 恭, 山崎俊成, 小川 修, 羽淵友則, 河本 宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたWT1抗原特異的再生キラーT細胞の腎細胞癌に対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田峻矢, 能勢直子, 野上俊, 嘉島相輝, 河本 宏, 福地一樹, 樋口隆弘
2. 発表標題 Direct cell labeling with 18F-FDG for in vivo regenerated CTLs tracking
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 嘉島相輝, 増田喬子, 河本 宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 10
3. 書名 医学のあゆみ	

1. 著者名 嘉島相輝, 増田喬子, 河本 宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 癌と化学療法社	5. 総ページ数 6
3. 書名 癌と化学療法	

〔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
---------	---------