

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03141

研究課題名（和文）犬固形腫瘍に対する低コストかつレディメイドで適応可能なCAR-T細胞製剤の開発

研究課題名（英文）Development of a low-cost, ready-made, adaptable CAR-T cell product for 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）・特任講師

研究者番号：60843216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,130,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、犬の固形腫瘍の標的抗原として有望であるグリピカン1(GPC1)およびヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2)を標的とした、人工の遺伝子改変抗腫瘍T細胞である犬キメラ抗原受容体(CAR)-T細胞を用いた治療法の確立を目指した研究開発を行なった。まず、GPC1およびHER2の犬固形腫瘍における発現の検証を行い、これら標的を発現する腫瘍種を多数同定し、CARに用いることが可能な抗GPC1または抗HER2一本鎖抗体(scFv)がそれらを認識することを明らかにした。さらに、世界初の抗GPC1犬CAR-T細胞の作成に成功し、前臨床研究において、安全性と有効性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)は、医学領域においてヒト血液腫瘍患者に対する治療法として承認されており、高い臨床効果を示し、固形がんへの応用が非常に期待されている。犬の血液腫瘍においても未だ研究段階ではあるが、CAR-T細胞の投与が実施されており、同様に固形がんへの応用が期待されている。本研究成果は、犬のみでなくヒト固形がんに対しても応用可能なCAR-T細胞を犬T細胞を用いて作成することに成功し、今後の臨床応用につながる研究成果であることから、獣医学的にも、医学的にも高い価値を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted research and development aimed at establishing a therapeutic approach using canine chimeric antigen receptor (CAR)-T cells, artificial genetically engineered anti-tumor T cells, targeting glypican-1 (GPC1) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), which are promising target antigens for canine solid tumors. First, we verified the expression of GPC1 and HER2 in canine solid tumors, identified a number of tumor types expressing these target antigens, and showed that anti-GPC1 or anti-HER2 single-chain variable fragment (scFv) that can be used with the CARs recognize them. Furthermore, we succeeded in generating the world's first anti-GPC1 canine CAR-T cells and demonstrated their safety and efficacy in preclinical studies.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：CAR-T細胞 GPC1 HER2 Comparative Oncology 比較腫瘍学 犬 腫瘍 細胞療法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性腫瘍は人と同様に犬の死亡原因の第1位であり、その改善が重要である。
- (2) 近年、新たな治療法として「免疫療法」がめざましい進歩を遂げ、一部の腫瘍では根治に至るほどの驚異的な治療効果を示している。
- (3) とくに、遺伝子改変 T 細胞(CAR-T 細胞)は、腫瘍の目印(腫瘍抗原)に対する抗体を T 細胞に恒常的に発現させ、腫瘍特異的な攻撃能力を付与した T 細胞を投与する治療法であり、ヒト血液腫瘍患者において、8割以上の奏効率という高い治療成績を示している。
- (4) この結果を受けて、CAR-T 細胞療法の固形腫瘍への応用も期待されているが、固形腫瘍に対して有効な標的抗原は未だ乏しく、確立された治療法はない。
- (5) 採択者は、犬固形腫瘍に特異的に発現する標的抗原を探索し、グリピカン 1(GPC1)およびヒト上皮増殖因子受容体 2 (HER2) と呼ばれる分子が、犬固形腫瘍の細胞膜上に特異的に発現しており、有望である可能性を明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、犬の固形腫瘍の標的抗原として有望である GPC1 および HER2 を標的とした犬 CAR-T 細胞の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 採択者が保有する抗 GPC1 または抗 HER2 抗体配列が、犬 GPC1 または犬 HER2 に結合性を有するか検証するために、抗 GPC1 または抗 HER2 抗体を用いて、qPCR により mRNA レベルでの発現を各種犬腫瘍細胞株において検証した後に、結合能をフローサイトメトリーにて検証した。また、GPC1 においては保有する、または分与を受けた細胞株全てにおいて、mRNA レベルでの発現を認めなかったことから、レンチウイルスベクターを用いた犬 GPC1 強制発現株を作成し、検証を行なった。
- (2) 採択者が保有する抗 GPC1 または抗 HER2 抗体配列を由来とする一本鎖抗体(scFv)配列と CD3,CD28 配列を連結させたキメラ抗原受容体(CAR)プラスミドを作成し、活性化した犬 T 細胞にレンチウイルスベクターを用いて、CAR の遺伝子導入を行なった。本実験に先行し、ConA 法や PMH 法、抗 CD3 抗体法など刺激条件や IL2 や IL7 など添加サイトカイン条件、RPMI や AIM-V など培地条件の検討およびレンチウイルスベクターに用いるエンベローププラスミド 4 種の条件検討を行い、最適な CAR-T 細胞の作成条件を検証した。
- (3) 作成した抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞と犬 GPC1 発現犬腫瘍細胞株の共培養を行い、抗原特異的なサイトカイン産生能を ELISA 法にて検証した。
- (4) 重度免疫不全 NOG マウス(NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Sug/ShiJic)に、犬 GPC1 発現犬腫瘍細胞株を皮下移植した後に、抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞を投与し、腫瘍径の変化を検証し、

抗腫瘍効果を評価した。

(5) 抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞を健常な実験犬に投与し、各種臨床学的検査を実施し、安全性を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 採択者が配列情報を保有し、CAR の作成に利用可能な抗 GPC1 または抗 HER2 抗体は、犬 GPC1 または犬 HER2 発現腫瘍細胞特異的な結合能を認め、本抗体を犬 CAR-T 細胞に利用できることを明らかにした。

(2) 各種条件検討の結果、ConA 刺激, IL2 添加, RPMI 培地, 1 種の特定のエンベロープの条件が、犬 CAR-T 細胞の効率的な作成に最適であることを明らかにし、本条件により 50%以上の導入効率での CAR-T 細胞の作成に成功した。

(3) 作成した抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞は、犬 GPC1 非発現犬腫瘍細胞株に比べ、犬 GPC1 発現犬腫瘍細胞株に対して有意に大量の犬インターフェロン $\gamma$  サイトカインの産生を認め、抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞の抗原特異的な抗腫瘍活性を明らかにした。

(4) 犬 GPC1 発現犬腫瘍細胞株移植 NOG マウスに抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞を投与したところ、コントロール群に比べ、有意な腫瘍径の縮小を認め、*in vivo* での抗腫瘍効果の実証に成功した。

(5) 実験犬より採血した末梢血単核球由来 T 細胞を用いて作成した抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞を、同一実験犬に投与したところ、重篤な副作用は認めず、臨床例においても抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞を安全に投与できることが示唆された。

#### (6) まとめ

本研究では、GPC1 および HER2 を標的とした犬 CAR-T 細胞の開発に取り組み、採択者が抗体配列を有する抗 GPC1 または抗 HER2 抗体が、犬固形腫瘍に対する犬 CAR-T 細胞の作成に利用可能であることを明らかにした。さらに、抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞は、*in vitro*、マウス *in vivo*、実験犬を用いた前臨床実験により、その抗腫瘍効果と安全性を実証することに成功し、抗 GPC1-犬 CAR-T 細胞を用いた犬臨床例に対する臨床試験の基礎的な検証を完遂した。

## 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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 KAMOTO Satoshi, SHINADA Masahiro, KATO Daiki, TSUBOI Masaya, YOSHIMOTO Sho, YOSHITAKE Ryohei, ETO Shotaro, IKEDA Namiko, TAKAHASHI Yosuke, HASHIMOTO Yuko, CHAMBERS James, UCHIDA Kazuyuki, YAMADA Shinji, KANEKO Mika K., NISHIMURA Ryohei, KATO Yukinari, NAKAGAWA Takayuki	4. 巻 83
2. 論文標題 Expression of podoplanin in various types of feline tumor tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1795 ~ 1799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0608	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 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 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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤大貴
2. 発表標題 新規腫瘍抗原GPC1特異的CAR-T細胞の開発及び抗PD-1抗体併用による複合免疫療法の検証
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会 獣医学奨励賞受賞記念講演 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 督、加藤大貴、池田凡子、品田真央、小寺優佳、李 捷生、太田峻介、高橋洋介、橋本裕子、坪井誠也、チェンパースジェームズ、内田和幸、西村亮平、中川貴之
2. 発表標題 犬前立腺癌細胞株を用いた新たな分子標的薬の探索
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嘉本諭、加藤大貴、品田真央、坪井誠也、池田凡子、青木督、小寺優佳、李捷生、太田峻介、高橋洋介、橋本裕子、チェンバースジェームズ、内田和幸、金子美華、西村亮平、加藤幸成、中川貴之
2. 発表標題 犬悪性黒色腫に対する抗ポドプラニン抗体を用いた分子標的治療の開発
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Shinada, Daiki Kato, Namiko Ikeda, Toshio Li, Yuka Koderu, Masaya Tsuboi, James Chambers, Kazuyuki Uchida, Yukinari Kato, Ryohei Nishimura, Takayuki Nakagawa.
2. 発表標題 Podoplanin promotes the tumor growth of canine malignant melanoma via Rho-associated kinase signals
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 加藤大貴	4. 発行年 2022年
2. 出版社 EDUWARD Press	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床を支える日本の研究(SA Medicine)	

1. 著者名 加藤大貴、池田凡子、西村亮平、中川貴之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ファームプレス	5. 総ページ数 6
3. 書名 獣医複合免疫療法の未来(JONCOL; Japanese Journal of Clinical Oncology)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医外科学研究室ホームページ  
<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>

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	谷口 智憲  (Yaguchi Tomonori)  (40424163)	京都大学・医学研究科・特定講師   (14301)	
研究分担者	富安 博隆  (Tomiyasu Hirotaka)  (70776111)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授   (12601)	
研究分担者	西村 亮平  (Nishimura Ryohei)  (80172708)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	
研究分担者	臼井 達哉  (Usui Tatsuya)  (80727652)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授   (12605)	
研究分担者	辻本 元  (Tsujimoto Hajime)  (60163804)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	

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