

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03639

研究課題名(和文) バイオフィジックスの論理的分子デザインに基づいた安全なCAR-T細胞の開発

研究課題名(英文) Development of safe CAR-T cells based on logical molecular design of biophysics

研究代表者

中沢 洋三 (Nakazawa, Yozo)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：60397312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：CAR-T細胞療法は有望な次世代がん治療法として期待されている。研究代表者はCAR-T細胞の臨床開発を行っている。CAR-T細胞は標的抗原を発現する正常細胞に対するoff-tumor毒性のリスクを伴う。本研究では、効果と安全性の高いリガンド型CAR-T細胞の開発を目的に、腫瘍細胞には高親和性、正常細胞には低親和性となるCARの分子設計を試みた。その結果、2種類の新規CAR-T細胞、EGFR CAR-T細胞とIGF1R CAR-T細胞の作製に成功した。両CAR-T細胞は、良好なin vitro効果およびin vivo効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児・AYA世代の再発・難治性固形がんに対するCAR-T細胞の臨床応用が期待されているが、効果と安全性のバランスの取れたCARの設計が難しく、承認に近い製品がない。本研究で開発したCAR-T細胞が標的する2種類の標的抗原(EGFR、IGF1R)はいずれも、固形がんに共通した代表的な治療標的(受容体型チロシンキナーゼ)であるが、off-tumor毒性が懸念され、CAR-T細胞の標的としての開発は敬遠されてきた。本研究で開発したEGFR/IGF1R CAR-T細胞は良好な抗腫瘍効果を有するため、安全性が確認できれば、小児・AYA世代の固形がんに対する新しい治療選択肢となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：CAR-T cell therapy is expected as a promising next-generation cancer therapy. The principal investigator is conducting clinical development of CAR-T cells. CAR-T cells carry the risk of off-tumor toxicity against normal cells expressing target antigens. In this study, with the aim of developing highly effective and safe ligand-based CAR-T cells, we tried to design CARs with high affinity for tumor cells and low affinity for normal cells. As a result, we succeeded in generating two types of novel CAR-T cells, EGFR CAR-T cells and IGF1R CAR-T cells. Both CAR-T cells showed good in vitro and in vivo efficacy.

研究分野：小児血液・がん

キーワード：CAR-T細胞 キメラ抗原受容体 受容体型チロシンキナーゼ 固形腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CAR-T細胞療法は難治性がんに対する有望な次世代治療法として期待されているが、重篤な副作用など課題も多い。特に固形がんを対象とするCAR-T細胞を開発する場合、標的抗原を発現する正常細胞に対するon-target/off-tumor毒性のリスクが懸念されるため、適切な標的抗原と効果と安全性のバランスがとれたCAR-T細胞の設計が重要となる。

受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は細胞の増殖や分化にかかわる膜タンパク質で、ヒトでは58種類のRTKが同定されていて、20のファミリーに分類される。RTKは、多くの固形がんにも複数種類高発現するため、抗体創薬の代表的な標的抗原とされている。小児・AYA世代固形がんにおいても複数種類の高発現が報告されており、RTKを標的とする新規モダリティが開発されれば、再発・難治不応性小児・AYA世代患者の新しい治療選択肢となりうる。しかし、RTKは正常細胞にも広範に発現するため、臨床開発においては高いレベルでの効果と安全性のバランスが求められる。特にCAR-T細胞の新規開発においては、CAR-T細胞が低いレベルで標的抗原を発現する細胞にも殺細胞効果を発揮するため、適切な抗原選択と斬新なCAR設計が必要となる。

2. 研究の目的

研究代表者は、固形がんを対象とする新規CAR-T細胞の臨床開発を行っている。CARの抗原結合領域に通常の本鎖抗体 (scFv) ではなく、標的抗原のリガンドを用いたCARの分子設計を得意とする。本研究では、RTKを標的とする、効果と安全性の高いリガンド型CAR-T細胞の開発を目的に、リガンド型CARの分子設計を行った。

3. 研究の方法

公知文献の情報から CAR-T 細胞の標的候補として EGFR を選定した。次に EGFR の 7 つのリガンドの中から EGFR に対する親和性データを基に 3 つのリガンド (EGF、TGF、AREG) を選択した。

1 つのリガンドについてはリガンドの改変を行った。改変リガンドを含む 3 つのリガンドを既存のトランスポゾン CAR ベクター (pIRII-CAR.28.z) へサブクローニングした。

非ウイルス遺伝子改変法 (piggyBac トランスポゾン法) を用いて、健常ドナー末梢血に上記 3 種類の抗 EGFR CAR を遺伝子導入し、EGFR CAR-T 細胞を作製した。EGFR CAR-T 細胞の増殖効率と CAR 発現率を 3 種類の候補の間で比較した。

EGFR を発現する腫瘍細胞株と EGFR CAR-T 細胞を混合培養し、EGFR CAR-T 細胞の *in vitro* 抗腫瘍効果を評価した。

免疫不全マウスに EGFR 発現腫瘍細胞株を接種し、7 日後に EGFR CAR-T 細胞を尾静脈から投与し、*in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。

(1) IGF1R CAR-T 細胞

公知文献の情報から CAR-T 細胞の標的候補として IGF1R を選定した。次に IGF1R のリガンド・リガンド前駆体を 5 種類選択した。

5 つのリガンド・リガンド前駆体を既存のトランスポゾン CAR ベクター (pIRII-CAR.28.z) へサブクローニングした。

非ウイルス遺伝子改変法 (piggyBac トランスポゾン法) を用いて、健常ドナー末梢血に上記 5 種類の抗 IGF1R CAR を遺伝子導入し、IGF1R CAR-T 細胞を作製した。

IGF1R CAR-T 細胞の増殖効率と CAR 発現率を 5 種類の候補の間で比較した。

IGF1R を発現する腫瘍細胞株と IGF1R CAR-T 細胞を混合培養し、IGF1R CAR-T 細胞の *in vitro* 抗腫瘍効果を評価した。

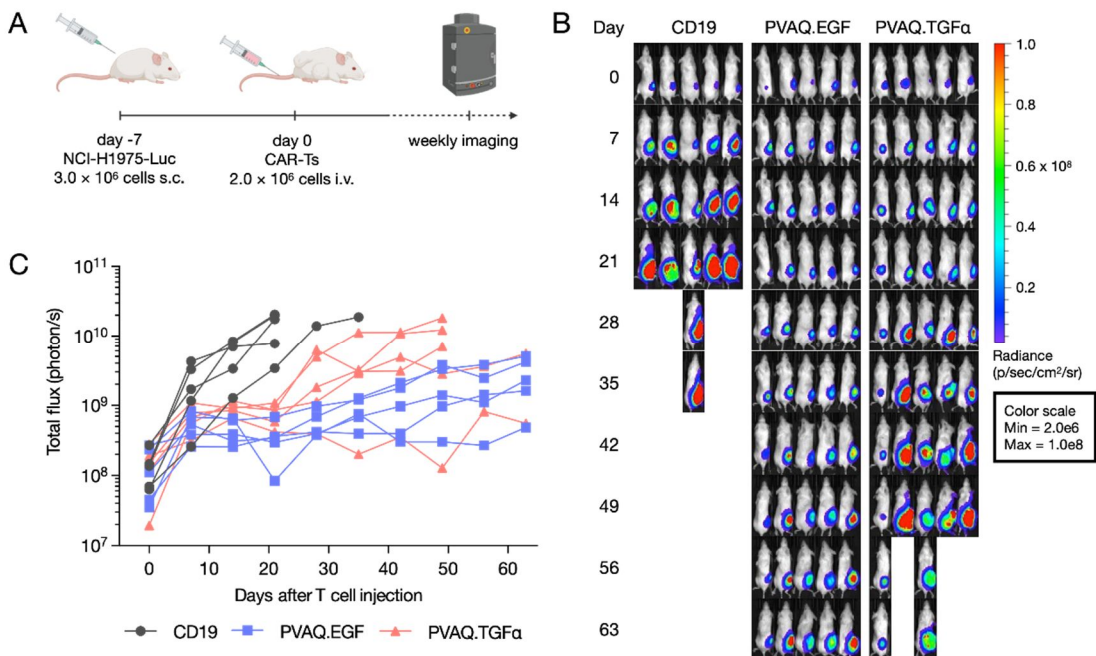
免疫不全マウスに EGFR 発現腫瘍細胞株を接種し、7 日後に EGFR CAR-T 細胞を尾静脈から投与し、*in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。

4. 研究成果

(1) EGFR CAR-T 細胞

- ・ 新規に設計した EGFR CAR-T 細胞 3 種類のうち 2 種類 (EGF 型と TGF 型) で良好な増殖と CAR 発現が得られた。
- ・ 両型で *in vitro* 抗腫瘍効果が確認されたが、EGF 型で有意に高かった。
- ・ 両型で *in vivo* 抗腫瘍効果が確認されたが、EGF 型で有意に高かった (図 1)。
- ・ 今後、正常細胞に対する毒性を評価し、効果と安全性のバランスが高い EGFR CAR-T 細胞を臨床開発品として選定する。

(図 1)



(2) IGF1R CAR-T 細胞

- ・ 増殖効率と CAR 発現率が共に高いリガンド型 IGF1R CAR-T 細胞が設計できた。
- ・ リガンド型 IGF1R CAR-T 細胞の *in vitro* 抗腫瘍効果が確認された。
- ・ リガンド型 IGF1R CAR-T 細胞の *in vivo* 抗腫瘍効果が確認された。
- ・ 今後、正常細胞に対する毒性を評価し、臨床開発品としての可能性を検討する。

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

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 特許権	発明者 中沢洋三、平林耕一、丸山悠太、柳生茂希、清水公裕、三	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-012674	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 特許権	発明者 中沢洋三、平林耕一、タンヤウィー・チンスワン、他2名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-088480	出願年 2022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	梅澤 公二 (Umezawa Koji) (00609258)	信州大学・総合理工学研究科・助教 (13601)	

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