

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17001

研究課題名(和文)膵臓がんに対する次世代型免疫療法開発にむけた腫瘍細胞に特異的な糖鎖構造の解析

研究課題名(英文)Analyses of tumor cell-specific glycan structures for the development of next-generation immunotherapy for pancreatic cancer

研究代表者

大熊 遼太郎(Ohkuma, Ryotaro)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：30833769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤耐性や予後不良に関与する分子としてPIGRを同定し、新規CAR-T療法の標的抗原の候補とした。PIGRは一部正常細胞にも発現し、CAR-T療法の標的抗原としては正常細胞をも傷害する可能性がある。我々はPIGRにおける糖鎖発現解析を行い、レクチンAが正常細胞と腫瘍細胞との識別に有用と考えた。CAR-T細胞へ搭載するPIGRに対する抗体作製を進めており、抗体が得られ次第、PIGRと特異的に結合するCARを構築し、そのCAR-T細胞内に現在同定中のレクチンAを搭載させ、レクチンと抗体の両方のシグナルが入ったときのみにONとなるCARシステムを構築する方針である。既に条件検討は実施している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T療法の標的抗原の候補として、抗癌剤耐性に関わる分子や予後不良に関わる分子であるPIGRを同定した。しかしPIGRは一部正常細胞にも発現し、CAR-T療法の標的抗原として正常細胞をも傷害する問題がある。我々はPIGRにおける糖鎖発現を解析し、レクチンAが正常細胞と腫瘍細胞との識別に有用である可能性を示した。特定抗原における糖鎖修飾の違いに着目して、腫瘍細胞上の標的抗原の糖鎖修飾のみを認識するレクチンをCAR-T細胞に搭載するという発想は報告が乏しく、学術的意義は高い。また安全性の高いCAR-T療法の開発に応用できる可能性があり、治療法が少ない膵臓がん患者に対する意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer has a poor prognosis and warrants novel predictors of therapeutic efficacy and prognosis. We have demonstrated that Polymeric Immunoglobulin Receptor (PIGR) was involved in resistance against chemotherapies and poor prognosis of pancreatic cancer patients. Therefore, PIGR molecule has been identified as a candidate target antigen for novel CAR-T therapy. We are trying to create specific antibodies against PIGR to be loaded onto CAR-T cells. As soon as the antibodies against PIGR are obtained, we will construct CAR-T cells that bind specifically to PIGR, and load the currently identified "lectin-A" onto the CAR-T cells. We intended to construct the CAR system that turns "ON" only when both lectin and antibody signals are received. We have already performed the consideration of conditions. The cytotoxic activity and cytokine production capacity of "Lectin-CAR" will be analyzed, and its anti-tumor effect and adverse events will also be investigated in further study.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：PIGR Lectinアレイ CAR-T

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は2018年にノーベル生理学・医学賞の受賞を受け、これまで以上に多くの人々からの関心を受けるとともに、今後の発展が強く期待されている分野である。免疫チェックポイント阻害薬(Immune checkpoint inhibitor; ICI)は、従来の化学療法とは全く異なる機序の薬剤として開発され、その治療効果の特徴として、腫瘍の縮小のみならず長期生存も得られるようになり、がん治療に大きなインパクトを与えた。ICIはその適応を拡大し、今やほとんどのがん種において主たる治療法の一つとなっており、進歩が著しい領域である。しかしながら、膵臓がんに関しては、腫瘍および腫瘍内免疫細胞に発現するPD-L1発現が低く、かつリンパ球が少ない腫瘍であり、ICIが効きにくいがん種であるため、未だに保険適応を獲得していないのが現状である(Cancer Res. 2015; 75: 2139-45.)。膵臓がんの治療成績向上が芳しくない理由として、ICIに効果を示しにくいがん種であり適応が得られず薬物治療の治療選択肢が限られていること、またほとんどの症例で従来の抗がん剤に対しても薬剤耐性化が起こることは明確である。そのため、膵臓がんに対する早期診断バイオマーカーの同定や新規治療法の開発が強く求められている。我々は膵臓がんに対する新規免疫療法の開発を最終目標とし、ICIとはアプローチの異なる次世代型キメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞療法(CAR-T療法)を開発して臨床応用へとつなげる基盤的研究を行うことを目的とした。

近年、ICIとともに新たながん免疫療法の一つとして遺伝子改変T細胞移入療法が注目され、その臨床的有用性が実証されてきている。遺伝子改変T細胞移入療法の一つであるCAR-T療法は、CD19陽性造血器腫瘍に対して極めて高い抗腫瘍効果を示すことが報告され(N Engl J Med. 2018;378:449-459)、欧米では2017-2018年に承認され、日本でも一部の血液がん領域で既に承認を得ている。CARの構造は、腫瘍細胞の表面抗原を認識する一本鎖抗体とCD3鎖や共刺激シグナルなどのT細胞活性化を誘導する細胞内シグナル伝達部位を結合させたキメラ蛋白により構築されている。CAR-T細胞は、CARをレトロウイルスやレンチウイルスベクターで末梢血T細胞に遺伝子導入することで作製され、患者に輸注されると腫瘍細胞を認識し活性化して抗腫瘍効果を発揮する。

CAR-T療法は造血器腫瘍に対して優れた治療効果を発揮する一方、固形がんに対しては未だ十分な抗腫瘍効果が認められていない。その原因の一つとして、造血器腫瘍におけるCD19のような適切な標的抗原が固形がんにおいて同定されていないことが挙げられる。膵臓がんは極めて予後の悪い癌種の一つとして知られており、我々はその問題を解決するため、まず膵臓がんの抗がん剤耐性に関わる分子や予後不良に関わる分子の探索を行い、Olfactomedin-4(OLFM4)、Polymeric Immunoglobulin Receptor(PIGR)を同定した(図1、図2、図3)。

図1. OLFM4発現細胞株を用いた細胞生存アッセイ

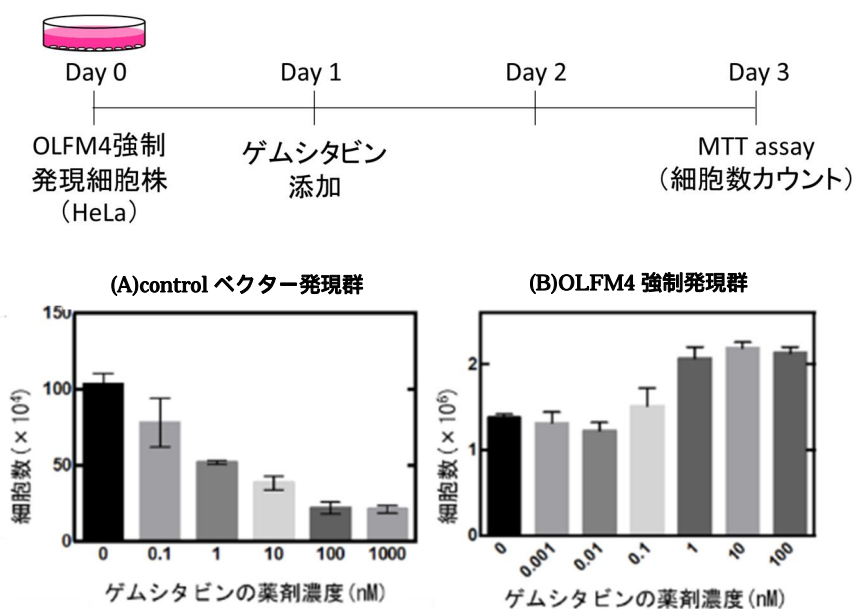


図 2. 膵臓がん患者組織を用いた OLFM4 発現の解析方法

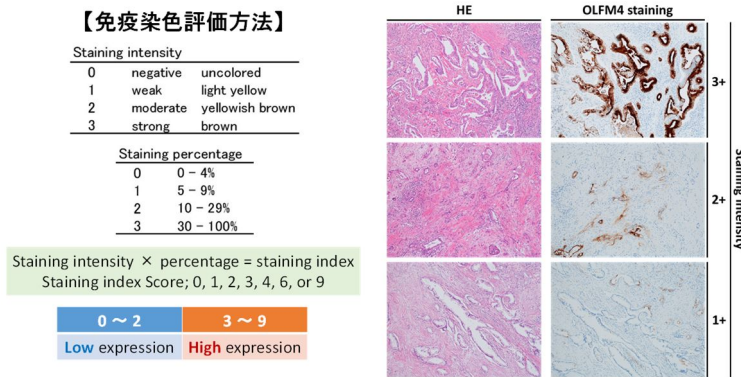
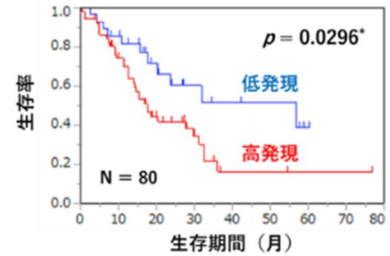


図 3. OLFM4 発現と予後の生存時間分析



しかし、これらの分子は一部の正常細胞にも発現を認めることが判明している。これらの分子を標的とした CAR-T 療法においては、正常細胞をも傷害してしまうという問題が起こり得る。そこで、腫瘍細胞上の糖鎖構造が正常細胞とは異なることに着目した。同じ抗原(タンパク)を発現している正常細胞と腫瘍細胞とを見分ける手法が今後のがん免疫療法、とりわけ CAR-T 療法においてカギとなる。そこで我々は、核酸・蛋白に続く第三の生命鎖と呼ばれる糖鎖に着目した。同じタンパク発現を認める正常細胞と腫瘍細胞との違いについては、正常細胞と腫瘍細胞上の特定タンパク抗原における糖鎖修飾の違いが明らかになっている。

2. 研究の目的

腫瘍細胞上の OLFM4、PIGR に発現する糖鎖構造を解析し、それを認識するレクチンを CAR-T 細胞に搭載すれば、腫瘍細胞のみを特異的に認識し、かつ膵臓がんの予後不良因子である OLFM4、PIGR を標的とした次世代型 CAR-T 療法を開発できると考えた。本研究では、正常細胞と腫瘍細胞に発現するこれらの分子の糖鎖修飾について解析を行い、腫瘍に特異的な糖鎖修飾を認識するレクチンの同定を試みる。さらにそのレクチンを搭載した次世代型の CAR-T 細胞 (Lectin-CAR) を作製して臨床応用へとつなげる基盤的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞上に発現する PIGR 分子の糖鎖修飾を認識するレクチンの探索

膵臓がん患者と健常者サンプルを用いて PIGR における糖鎖発現解析を行い、12 種類のレクチンで検討した。

同じプレパラート内の腫瘍細胞と正常細胞の両方に PIGR の発現を認める膵臓がん腫瘍組織検体を 20 症例分用意する。

我々が行ってきたこれまでの研究で候補に挙げているレクチンを 12 種類用意する。

用意した 20 症例分の腫瘍組織検体を用いて、蛍光標識を施したレクチン及び PIGR に対する抗体にて免疫染色を施行する。正常細胞では蛍光発色を認めず腫瘍細胞のみで染色を認めるレクチンを同定する。

(2) Lectin アレイを用いた網羅的解析

スライドガラス上に糖鎖と結合する能力をもつタンパク質(レクチン)を多数配置させたマイクロアレイの一種であり、98 レクチンを網羅的に解析した。

(3) PIGR に対する抗体を作製する。

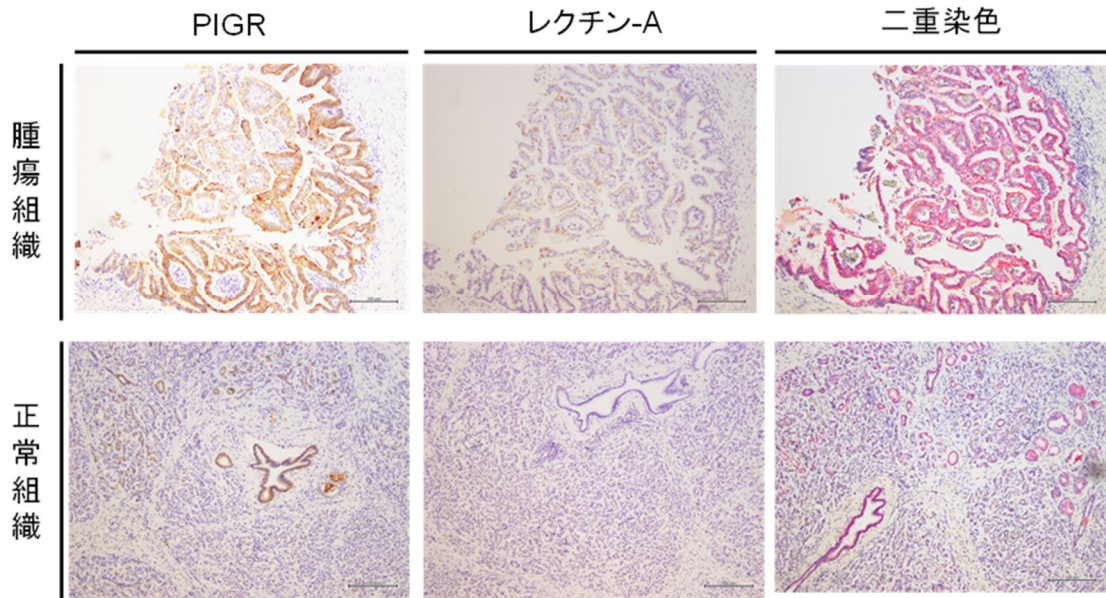
(1)と並行して CAR-T 細胞に搭載する PIGR に対する抗体作製を実施する。

(4) PIGR を標的とする CAR-T 細胞を作製する。

4. 研究成果

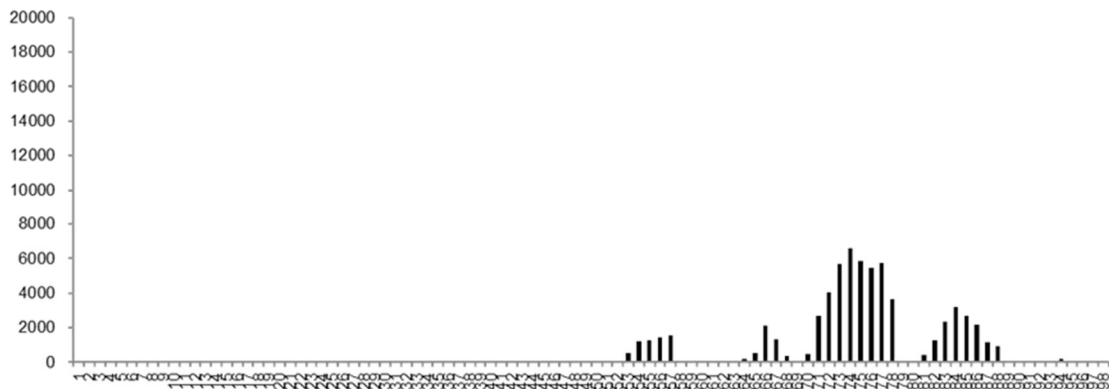
膵臓がん患者と健常者サンプルを用いて OLFM4 または PIGR における糖鎖発現解析を行った。12 種類のレクチンで検討すると、PIGR ではレクチン-A については正常細胞に比較して腫瘍細胞で強く染色されている症例が多く、正常細胞と腫瘍細胞との識別に有用と考えられた(図 4)。すなわちレクチン-A は正常細胞には発現しない症例が多く、PIGR と組み合わせた検討で腫瘍細胞と正常細胞とを分別できる可能性が示唆されたため、PIGR について検討を進める方針とした。

図 4. 正常・腫瘍組織における PIGR 分子、レクチン-A の免疫組織化学染色による比較検討



また、レクチンアレイを用いた網羅的解析も実施している。スライドガラス上に糖鎖と結合する能力をもつタンパク質(レクチン)を多数配置させたマイクロアレイの一種であり、98 レクチンを解析した。ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 においては、正常細胞と比較して乳癌細胞株において高発現となっているレクチンが同定されており(図 5)、PIGR と組み合わせた検討で腫瘍細胞と正常細胞とを分別できる可能性がある。レクチン数も多く現在詳細な解析を行っており、引き続き継続していく方針である。

図 5. レクチンアレイ解析



CAR-T の作成に関しては、JURCAT 細胞(ヒト白血病 T 細胞由来の細胞株)や末梢血単核細胞(PBMC; Peripheral Blood Mononuclear Cells)を用いて、レンチウイルスベクターやトランスフェクションによる遺伝子導入効率を確認する試験を実施している。既存の CD19 等の作製には成功しており、マウスモデルでの系も使用できるようになった。

CAR-T 細胞への搭載を検討している PIGR に対する抗体作製について、抗体産生に使用する動物はマウスを使用した。マウスに PIGR 抗原を注射し、脾臓から抗体産生する B 細胞を抽出した。抗体を産生している B 細胞と不死化したがん細胞を人工的に融合させ、PIGR 抗体遺伝子を維持しながら半永久的に生存できる融合細胞(ハイブリドーマ)を作製した。このハイブリドーマの中から、結合親和性や特異性に優れた有用なモノクローナル抗体を産生する細胞を選択しているが、良い抗体がまだ得られていないのが現状であり、外部業者にも委託しながら進めている状況にある。

今後は PIGR 抗体が得られたのち、PIGR と特異的に結合する CAR を構築し、その CAR-T 細胞内に現在同定中の LectinA を搭載させ、Lectin と抗体の両方のシグナルが入ったときのみ ON となる CAR システムを構築する方針である。既に条件検討は実施した。そして Lectin-CAR の細胞障害活性及びサイトカイン産生能を解析し、抗腫瘍効果及び有害事象も検討していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, Komura D, Kubota Y, Hamada K, Horiike A, Ishiguro T, Hirasawa Y, Ariizumi H, Shida M, Watanabe M, Onoue R, Ando K, Tsurutani J, Yoshimura K, Sasada T, Aoki T, Murakami M, Norose T, Ohike N, Takimoto M, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S. | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 High expression levels of polymeric immunoglobulin receptor are correlated with chemoresistance and poor prognosis in pancreatic cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 252-262 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7610 | 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 Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, Komura D, Ishizaki H, Tamada K, Kubota Y, Hamada K, Ishida H, Hirasawa Y, Ariizumi H, Satoh E, Shida M, Watanabe M, Onoue R, Ando K, Tsurutani J, Yoshimura K, Yokobori T, Sasada T, Aoki T, Murakami M, Norose T, Ohike N, Takimoto M, Izumizaki M, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S. | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 High expression of olfactomedin-4 is correlated with chemoresistance and poor prognosis in pancreatic cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0226707 | 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 Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, Komura D, Kubota Y, Hamada K, Horiike A, Ishiguro T, Hirasawa Y, Ariizumi H, Shida M, Watanabe M, Onoue R, Ando K, Tsurutani J, Yoshimura K, Sasada T, Aoki T, Murakami M, Norose T, Ohike N, Takimoto M, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S. | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 High levels of human epididymis protein 4 mRNA and protein expression are associated with chemoresistance and a poor prognosis in pancreatic cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 57～69 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.5147 | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡邊真, 家口勝昭, 大西伸幸, 五嶋翼, 大熊遼太郎, 鈴木梨沙子, 辻まゆみ, 木内祐二, 角田卓也, 内田直樹, 小林真一, 和田聡. |
| 2. 発表標題 Development of a novel cancer diagnostic method targeting glycosylation on specific molecules. |
| 3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 / 第43回日本臨床薬理学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ryotaro Ohkuma, Erica Yada, Shumpei Ishikawa, Daisuke Komura, Yutaro Kubota, Kazuyuki Hamada, Atsushi Horiike, Kiyohiro Ando, Junji Tsurutani, Kiyoshi Yoshimura, Tetsuro Sasada, Masahiko Murakami, Masafumi Takimoto, Takuya Tsunoda, Satoshi Wada. |
| 2. 発表標題 High expression of human epididymis protein 4 correlates with chemoresistance and poor prognosis for pancreatic cancer. |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|