

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17634

研究課題名（和文）膵臓癌免疫療法における腫瘍間質および間質内免疫抑制細胞群の機能解析

研究課題名（英文）The role of tumor microenvironment in CAR-T cell therapy for solid tumor

研究代表者

小川 久貴 (Ogawa, Hisataka)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・Nitto核酸創薬共同研究部 主任研究員

研究者番号：20621022

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：難治性がんに対する新規治療法としてがん免疫療法の中でもキメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor：CAR）-T細胞療法が注目されている。CAR-T細胞は、がん組織内で特定の標的抗原を有するがん細胞を認識、特異的に結合し腫瘍細胞を傷害しながら、自らも活性化を受けて増殖する、“living drug”である。しかしながら血液がんにおいては非常に有効であるものの固形がんにおいては開発段階である。我々は固形がんにも有効なCAR-T細胞療法の開発に際して、その抵抗性の原因として固形がん特有のがん微小環境が重要であると考えている

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形がんの中でも膵臓がんはその予後が数十年に渡り改善されていない難治性がんの代表である。既存の治療法に抵抗性を示す膵臓がんに対して、本研究で開発するCAR-T細胞療法は新規治療法となり得る可能性がある。現在のところ、膵臓がんにも有効なCAR-T細胞療法は開発されていないが、膵臓がんの特徴的ながん微小環境に着目して開発されるCAR-T細胞療法は膵臓がんにも有効なものとなり得ると考えている。

研究成果の概要（英文）：CAR-T cell therapy is now being developed as a new cancer treatment for refractory cancers. CAR-T cell can behave like living drugs because CAR-T cell can bind to and lyse the cancer cells expressing its specific surface antigen in tumor, while stimulated to grow in the body. We have experienced a remarkable success of CAR-T cell therapy in the field of blood cancer, but still under development for solid tumor. We suppose resistance to CAR-T cell therapy of solid tumor can be caused by tumor microenvironment, which is characteristic of solid tumor.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：膵臓がん CAR-T細胞療法 CD44v6 がん微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CAR (Chimeric Antigen Receptor) -T 細胞は、特定の腫瘍表面抗原に特異的に反応するマウス抗体由来の一本鎖抗体 (single chain Fv : scFv) と、ヒト T 細胞受容体 (T Cell Receptor : TCR) 由来の主刺激分子および副刺激分子のシグナル伝達ドメインを結合させた CAR コンストラクトをヒト T 細胞に遺伝子導入することで作成される。白血病における CD19 を標的抗原とした CAR-T 細胞療法は 2017 年小児および若年成人の再発・難治性 B 細胞性急性芽球性白血病の治療として本邦でも保険収載され、以後類似薬が計 4 つ上市されている。従来の治療法に抵抗性をしめず固形がんに対する新規治療法として様々な抗原を標的とした CAR-T 細胞療法の開発、臨床試験が精力的に行われている。しかしながら臨床試験において未だ良好な結果を示せた固形がん (特に膵臓がん) に対する CAR-T 細胞療法は存在しない。我々は、膵臓がんが CAR-T 細胞療法に示す抵抗性の原因として、がん組織内で膵臓がんの特徴的な豊富ながん間質が CAR-T 細胞をがん細胞に到達できないよう間質内に留め、その上でがん間質に留めさせられた CAR-T 細胞ががん間質に存在する免疫抑制細胞群によりその機能が減弱させられているのではないかと仮説を立てた。膵臓がんにおいては、desmoplastic な変化により形成される豊富ながん間質が腫瘍内圧を上昇させ、腫瘍内血管を虚脱させることでがん細胞への薬剤到達が乏しい (AB. Ariffin et al. Cancer Research. 2014) がん間質は免疫抑制細胞群 (制御性 T 細胞 Regulatory T cell : Treg、骨髄由来抑制細胞 Myeloid Derived Suppressor Cell : MDSC、腫瘍関連マクロファージ Tumor Associated Macrophage : TAM) が局在できる場を提供し、がん間質においてこれら免疫抑制細胞群が CTL の機能を抑制している (Jorge Blando et al. PNAS. 2019) ことが報告されている。我々は、こののがん間質の存在により CAR-T 細胞ががん細胞に到達さえできず腫瘍免疫学的な反応の起きていない“Cold”な状態となり、の免疫抑制細胞群の存在により少なからずがん細胞に到達した CAR-T 細胞が“Cooled”な状態に機能的に抑制されていると考えており、腫瘍細胞に CAR-T 細胞が十分到達しかつ腫瘍免疫が惹起される“Hot”な状態に近づけることが、固形がんにおいて CAR-T 細胞療法が有効となる鍵であると考えた。本研究においてがん微小環境に着目しているため正常免疫を有する野生型マウスを用いた CAR-T 細胞療法を開発し、我々の仮説を検討することで得られる知見は、真に有効な固形癌に対する CAR-T 細胞療法の開発へとつながると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス同系皮下移植担がんモデルにおける固形がん (膵臓がんを含む) に対する CAR-T 細胞療法を開発し、CAR-T 細胞療法におけるがん微小環境の抑制的な機能を明らかにし、その抑制を解除可能な CAR-T 細胞療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

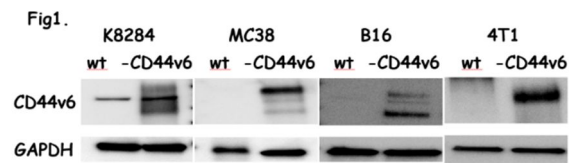
マウスがん細胞株は K8284 (膵がん自然発生マウスモデルである PDX-1-Cre;LSL-KrasG12D ; LSL-Trp53R172H トランスジェニックマウス (KPC マウス) から樹立した膵臓がん細胞株) (Prof. Vikas Dudeja より提供)、MC38 (大腸がん細胞株)、4T1 (乳がん細胞株)、B16 (メラノーマ株) を用いた。担癌に使用するマウスはそれぞれのホストマウス (K8284、MC38、B16 は C57BL/6J、4T1 は Balb-c) を用いた。標的抗原は接着分子である CD44 のバリエーションフォームである CD44 variant6 (CD44v6) とした (Sleeman JP et al. JBC. 1997)。CAR-T 細胞の作製に関しては担がんマウスが C57BL/6J (Thy1.2) の場合は congenic strain である B6.PL-Thy1a/CyJ (Thy1.1) から採取した脾臓内 T 細胞を用い、Balb-c の場合は同週齢の Balb-c から採

取した脾臓内 T 細胞から樹立した。CAR コンストラクトはレトロウイルスベースの第3世代 CAR コンストラクトを開発した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 標的がん細胞株の作製

K8284、MC38、4T1 および B16 の CD44v6 発現をフローサイトメトリー、Western blotting で確認したが発現レベルが低かった。そのためこれらの細胞株に CD44v6 遺伝子をレンチウイルスで導入、単離し、安定過剰発現株を作製した (Fig1)。作製したこれらのがん細胞株は皮下に担がんし安定した腫瘍形成が得られることを確認した。また C57BL/6J マウスの各主要正常臓器における CD44v6 の発現を Western blotting で評価したがどの正常臓器の発現も低発現であった。以上よりがん特異的抗原に近い形で CD44v6 を発現する同系皮下担がんマウスモデルの構築に成功した。



##### (2) CAR コンストラクトの作製

標的抗原 CD44v6 に対する一本鎖抗体 (Single chain variable fragment : scFv) に関しては、CD44v6 のマウスハイブリドーマ株を Prof. Jonathan Sleeman (Sleeman JP et al. JBC. 1997) より提供いただき、マウスハイブリドーマ配列解析で得られた配列を人工的に合成し、既報の標的抗原 CD19 のレトロウイルスベース CAR ベクター (Addgene Plasmid #107226) に組み込むことで複数個作製した。

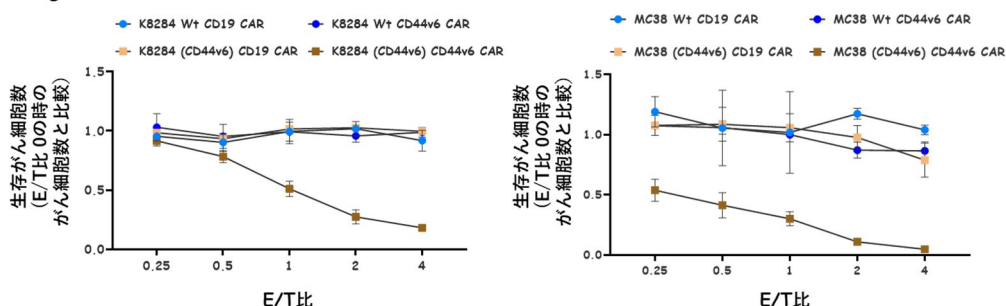
##### (3) CAR-T 細胞の作製

(2) で作製した CAR コンストラクトを脾臓内 T 細胞へ導入し CAR-T 細胞を作製した。無菌的に採取した脾臓から MACS システムによる磁気細胞 negative selection 分離により T 細胞を単離し、マウス IL-2 (50IU/ml)、マウス CD3 (1ug/ml)、マウス CD28 (0.5ug/ml) で刺激し翌日に RetroNectin-bound virus 感染法により CAR コンストラクトを導入、ベクター内薬剤耐性遺伝子による選択、約 1 週間の培養により純化した CAR-T 細胞が得られた。導入した CAR コンストラクトの発現に関しては免疫グロブリン (特に IgG) のカップー軽鎖と特異的に結合する Protein L を利用した biotin- Streptavidin 結合により検出した。

##### (4) Cytolysis アッセイ

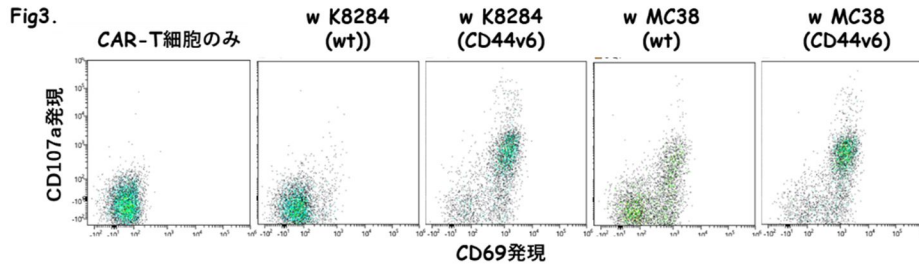
上記で作製した標的がん細胞株および CAR-T 細胞を in vitro で共培養することで CAR-T 細胞の cytolysis 能を評価した。K8284-Wild type (-wt)、K8284-CD44v6、MC38-wt、MC38-CD44v6 と 2 日間共培養することで抗原依存的、容量依存的な cytolysis 能を確認した (Fig2)。この際、対照 CAR-T 細胞として CD19 を標的とする CAR-T 細胞を用いた。また(2)で作製した複数個の CAR コンストラクトから作製した CAR-T 細胞はいずれのコンストラクトも同等の CAR 発現率および cytolysis 能を示したため、その中の一つを以後使用することとした。

Fig2.



(5) 脱顆粒アッセイ

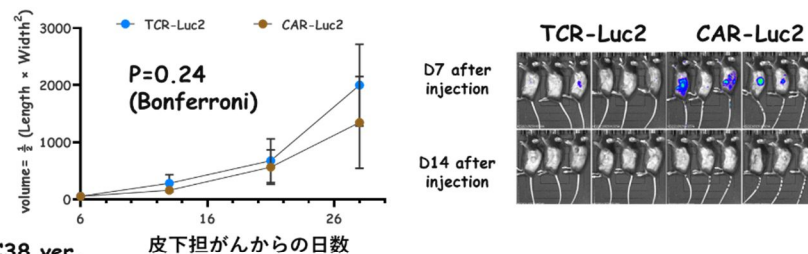
CAR-T 細胞の cytotoxicity は主に、抗原刺激により活性化した CAR-T 細胞から放出されるパーフォリン、グランザイムなどの顆粒による細胞傷害に起因すると考えられているため(4)で示した cytotoxicity において細胞内顆粒内膜に存在する CD107a および活性化マーカーCD69 を用いたフローサイトメトリーで細胞傷害因子の放出を確認した (Fig3)。



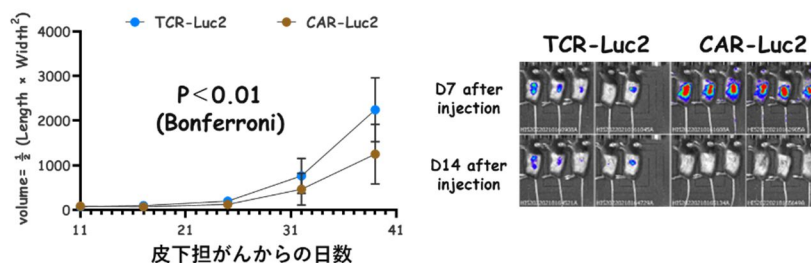
(6) 同系皮下担がんマウスモデルでの CAR-T 細胞療法

以上により in vitro での抗原特異的、容量依存的な cytotoxicity 能を示す CD44v6 を標的とする CAR-T 細胞の作製に成功したためマウス実験へと移った。皮下腫瘍内へ集積する CAR-T 細胞を経時的にモニターするために IVIS imaging system (超高感度冷却 CCD カメラで発光を捉え、定量化できる光 in vivo イメージングシステム) を利用し、CAR コンストラクトを導入する際にレトロウイルス Luc2 遺伝子を共感染させた。K8284-CD44v6 および MC38-CD44v6 を C57BL/6J マウス皮下に担がんし、接種後約 1 週間後に腫瘍体積が約 100mm<sup>3</sup> となった段階で CAR-T 細胞投与群および対照 T 細胞投与群 (Luc2 のみ導入した T 細胞を CAR-T 細胞と同様の方法で刺激、培養した) に群分けし、それぞれ 5X10<sup>6</sup> 個を尾静脈から 1 回投与した。なお骨髄前処置として CAR-T 細胞、対照 T 細胞投与前日に cyclophosphamide (100mg/kg) を腹腔内に投与している。両モデルにおいても CAR-T 細胞投与による腫瘍消失は認めなかったが、MC38-CD44v6 皮下腫瘍においては CAR-T 細胞療法の抗腫瘍効果は統計的に有意であった。しかしながら K8284-CD44v6 皮下腫瘍においては統計的な有意差を認めなかった。IVIS imaging system による CAR-T 細胞の腫瘍内集積評価では CAR-T 細胞注射後 1 週間目には K8284-CD44v6 皮下腫瘍、MC38-CD44v6 皮下腫瘍ともに CAR-T 細胞の集積を認め、より MC38-CD44v6 皮下腫瘍において強かった。しかしながら興味深いことに、CAR-T 細胞投与後 2 週間目にはどちらのモデルにおいても完全に腫瘍内 CAR-T 細胞の集積が消失していた。(Fig4)。

Fig4. K8284 ver.



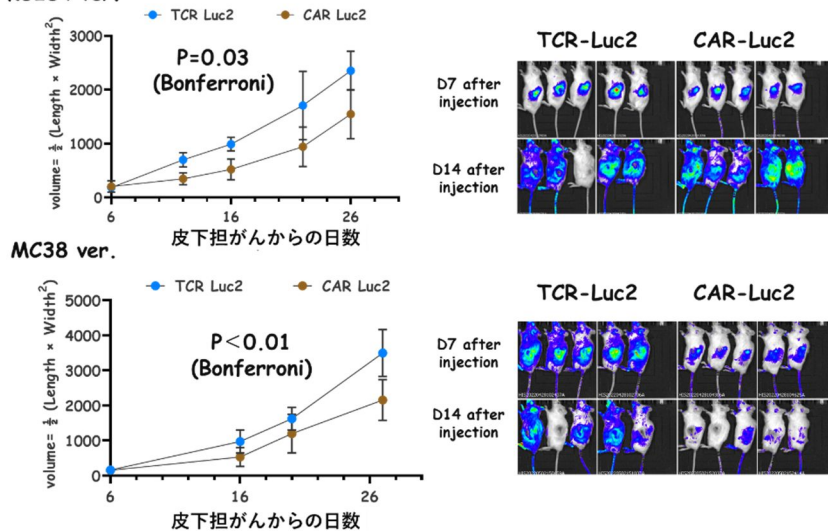
MC38 ver.



## (7) 重度免疫不全マウスモデルでの CAR-T 細胞療法

がん微小環境における免疫抑制細胞群の CAR-T 細胞療法に対する抑制的な機能を評価する目的で重度免疫不全マウスである NSG マウス皮下担がんモデルを構築し、同様に CAR-T 細胞療法を施行した。治療スケジュールは(6)における条件 (接種がん細胞数、接種方法、投与 CAR-T 細胞数、CAR-T 細胞投与時期) と同じとし、骨髄前処置は省略した。興味深いことに、K8284-CD44v6 皮下腫瘍、MC38-CD44v6 皮下腫瘍の両モデルにおいて CAR-T 細胞投与後約 3 週間にわたり腫瘍内に CAR-T 細胞が生存、集積を続け、腫瘍消失、増大停止は認めなかったが、CAR-T 細胞療法の抗腫瘍効果は統計学的に有意であった (Fig5)。

Fig5. K8284 ver.



以上の二つの動物実験により、

腫瘍内免疫抑制細胞群が存在しない状況 (NSG マウスでの実験) では腫瘍内 CAR-T 細胞が長期間生存、集積しているにもかかわらず腫瘍消失や増大停止が得られなかったこと、腫瘍内免疫抑制細胞群が存在している状況 (野生型マウスでの実験) ではより腫瘍内 CAR-T 細胞の生存が困難となり、抗腫瘍効果も認めにくいことがわかった。そのため、がん細胞との interaction により誘導される CAR-T 細胞の機能抑制を解除する必要がある、かつがん細胞による機能抑制を克服した上で、腫瘍内免疫抑制細胞群への対策が必要であると考えられた。現在 K8284-CD44v6、MC38-CD44v6 とともに PD-L1 を高発現し、これらがん細胞との共培養により CAR-T 細胞の PD-1 発現が顕著に上昇することから PD-1/PD-L1 軸を標的とする新規 CAR-T 細胞を開発していく予定である。また、免疫抑制細胞群の中でも MDSC および TAM に注目してこれらの除去抗体による抗腫瘍効果への影響、腫瘍内 CAR-T 細胞への生存への影響などを検討していく予定である。

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