

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21608

研究課題名（和文）CAR-T細胞療法を用いた心臓再生医療におけるfail-safeシステムの確立

研究課題名（英文）Development of fail-safe system for human iPSC-derived tumor by CAR-T cell therapy  
CAR-T cell therapy

研究代表者

福田 恵一（Fukuda, Keiichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：20199227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：GPC3に対するモノクロー抗体の作製、遺伝子改変によるキメラ抗原受容体（CAR）の作製、GPC3に対するCAR-Tの作製を終了し、GPC3発現細胞に対する強い細胞傷害作用も確認した。iPS細胞からの分化細胞には作用せず、残存iPS細胞のみに作用することを確認し、マウスの動物実験においてCAR-T細胞投与により、iPS細胞を皮下移植して際に奇形腫形成が抑制されること、また心臓に移植した心筋細胞に傷害を認めることなく、奇形腫の形成抑制効果も確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはこれまでに、ヒトiPS細胞に特異的に発現し、分化心筋細胞には発現していない細胞膜表面抗原としてGPC3を同定し、これを標的抗原とするGPC3特異的細胞傷害性T細胞（CTL）療法を開発してきた（BBRC 2019）。また、ヒトiPS細胞由来の奇形腫においてGPC3が高発現していることを初めて見出し、GPC3を標的としたCAR-T細胞療法の免疫学的アプローチにより再生医療における全ての領域で応用可能な非侵襲的腫瘍除去法の確立を可能とした。

研究成果の概要（英文）：We completed the production of monoclonal antibody against GPC3, the production of chimeric antigen receptor (CAR) by gene modification, and the production of CAR-T against GPC3, and confirmed the strong cytotoxic effect on GPC3-expressing cells. Furthermore, we confirmed that it did not act on differentiated cells from iPSC cells, but only on residual iPSC cells. In animal experiments with mice, we elucidated that CAR-T cells administration suppressed teratoma formation when iPSC cells were transplanted.

研究分野：循環器内科

キーワード：CART細胞療法 未分化細胞除去法 iPSC細胞 心筋細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

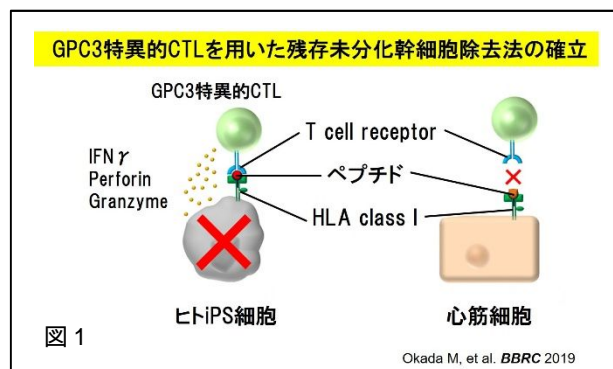
### 1. 研究開始当初の背景

近年多くの領域でiPS細胞を用いた再生医療が試みられている。網膜の再生医療では移植細胞数も少なく残存未分化幹細胞混入による腫瘍化抑制は可能であるが、心臓や肝臓等の大量細胞を移植するものでは、未分化幹細胞混入による腫瘍形成阻止は容易ではなく、腫瘍化への対処法が喫緊の課題である。細胞移植前に未分化幹細胞を除去する方法として申請者等はiPS細胞由来の分化細胞中に残存する未分化幹細胞や非筋細胞を代謝経路の差を利用して純度99%以上に純化する方法を開発した(*Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metabolism* 2016)。一方で、効率のよい純化精製法が確立されていない領域においては、未分化幹細胞を完全に除去することは困難である。また、万が一腫瘍化した場合には外科的切除以外に方法がないのが現状である。外科的手術はリスクが高いため、低侵襲で治療する手法の開発が必須である。

申請者等はこれまでに国立がん研究センターとの共同研究によりヒトiPS細胞に特異的に発現している抗原に対する免疫療法を開発してきた。具体的には、ヒトiPS細胞に特異的に発現し、分化した心筋細胞には発現していない細胞膜表面抗原としてGPC3 (Glypican 3) を同定

し、これを標的抗原とするGPC3特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) 療法を開発してきた (*BBRC* 2019)。また、さらなる解析の結果、ヒトiPS細胞由来の奇形腫においてもGPC3が高発現していることを見出した。しかし、一般にGPC3などの自己抗原に対するペプチドワクチン療法やCTLの細胞傷害活性は、比較的弱く、さらなる改良が必要である。CAR (Chimeric antigen receptor)-T細胞は、抗体の認識部位を用いて標的細胞を認識するように作製された遺伝子改変T細胞であり、内因性のT細胞に比べると非常に強い抗腫瘍効果を発揮できる。研究分担者の谷口は、長年腫瘍免疫学分野の研究に従事しており、固形癌に対するCAR-T細胞療法の開発を行ってきた。GPC3は、肝がんなどで特異的に高発現していることが報告されており、ペプチドワクチン療法や、ヒト化モノクローナル抗体 (GC33) による臨床試験が進行中であり、安全性が確認されている。谷口らは、既にGPC3に対する抗体を開発しており、エピトープの異なる複数のモノクローナル抗体を所有している。

本事業では、ヒト iPS 細胞における腫瘍化の課題に取り組んできた研究代表者と腫瘍免疫学を長年専門とする研究分担者の谷口が連携することにより、ヒト iPS 細胞由来腫瘍の免疫学的除去法の確立を目指す。本治療が確立できれば、全ての再生医療における腫瘍化に適応できるため、ヒト iPS 細胞由来腫瘍に対する標準的治療となる可能性があると考えている。



### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞における腫瘍化の課題に取り組んできた研究代表者の遠山と腫瘍免疫学を長年専門とする研究分担者の谷口が連携することにより、ヒト iPS 細胞膜表面に発現した GPC3 を標的として、強力な免疫反応を惹起しうる CAR-T 細胞を用いた免疫学的アプローチによりヒト iPS 細胞由来腫瘍の免疫学的除去法の確立を目指す。本治療が確立できれば、全ての再生医療における腫瘍化に適応できるため、ヒト iPS 細胞由来腫瘍に対する標準的治療となる可能性があると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) 未分化抗原特異的 CAR-T 細胞による *in vitro* における残存未分化幹細胞除去法の確立

**【 未分化幹細胞特異的抗原の同定および CAR-T 細胞の樹立】**

現在までに、申請者が誘導した GPC3 特異的 CTL の細胞傷害能を評価した結果、ヒト iPS 細胞に対しては細胞傷害能を示すが、移植に用いる iPS 細胞由来心筋細胞に対しては細胞傷害能を示さないことを確認した(特許出願済、[図 3](#))。既に標的抗原の 1 つである GPC3 に関しては CAR-T 細胞の樹立が完了している。

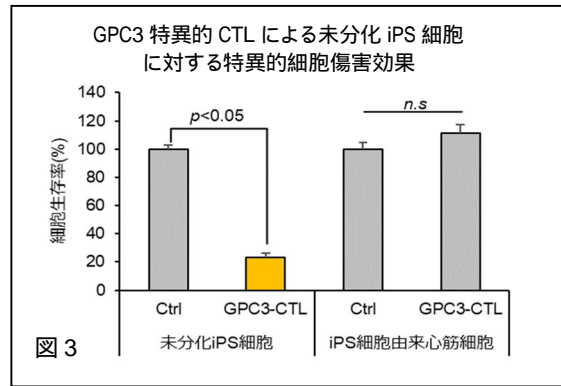


図 3

**【 未分化抗原特異的 CAR-T 細胞を用いた細胞傷害能の解析】**

既に分化心筋細胞においては GPC3 の発現が極めて低いことを確認している。各種 iPS 細胞株、および様々な分化細胞に対する未分化抗原特異的 CAR-T 細胞の細胞傷害活性を評価する。

**【 免疫不全マウスを用いた腫瘍形成抑制性能の確認】**

未分化幹細胞除去後の分化細胞の腫瘍形成能を免疫不全マウスへ移植し、未分化幹細胞の除去の有無で奇形腫形成が抑制されるかどうかを経時的に評価する。

**(2) 未分化抗原特異的 CAR-T 細胞による *in vivo* における奇形腫治療法の確立**

**【 ヒト iPS 細胞由来奇形腫における GPC3 等の未分化抗原の発現解析】**

GPC3 特異的 CAR-T 細胞療法による、実際の奇形腫形成抑制効果および副作用の有無を *in vivo* マウスモデルで確認する。すでに申請者らは、ヒト iPS 細胞由来の奇形腫の多くの細胞において GPC3 が発現していることを確認している([図 4](#))。

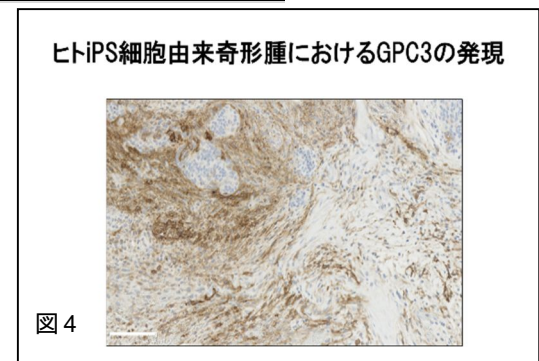


図 4

**【 マウスモデルを用いた iPS 細胞由来奇形腫形成後の腫瘍抑制効果の確認】**

ヒト iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し奇形腫を形成させた後、抗原特異的 CAR-T 細胞をマウスに静脈注射し、奇形腫除去能を評価する。予備検討の結果、GPC3 特異的 CAR-T 細胞投与により奇形腫が退縮することを確認している。

**【 マウスモデルを用いた長期的な奇形腫形成の予防、治療効果の確認】**

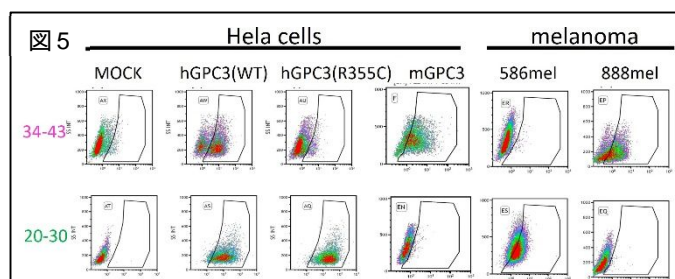
研究分担者の谷口らはヒトの組織を移植し長期間評価できるヒト化マウスの樹立に成功しており、同マウスを用いて、iPS 細胞由来心筋細胞を心臓へ移植し GPC3 特異的 CAR-T 細胞を用いて長期的な奇形腫形成の予防効果を確認する。投与した CAR-T 細胞が移植心筋細胞を攻撃することなく、奇形腫を除去できるかを評価する。

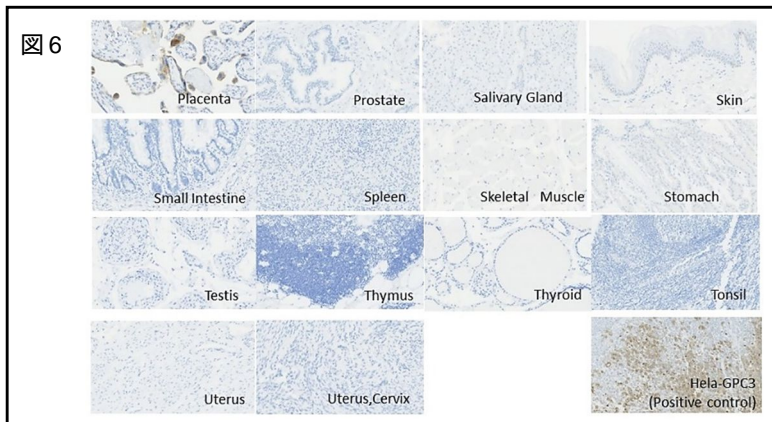
4. 研究成果

**(1) 未分化抗原特異的 CAR-T 細胞による *in vitro* における残存未分化幹細胞除去法の確立**

**【 未分化幹細胞特異的抗原の同定および CAR-T 細胞の樹立】**

申請者らは標的抗原の 1 つである GPC3 に関して、独自のモノクローナル抗体を 2 つ作製し、それを元に GPC3 特異的 CAR-T 細胞の作製に成功した(図 5)。またヒト正常組織における GPC3 の発現では胎盤にのみ発現が認められたがその他では有意な発現は認められなかった(図 6)。





### 【 未分化抗原特異的 CAR-T 細胞を用いた細胞傷害能の解析】

分化心筋細胞においてはGPC3の発現が極めて低いことを確認している。iPS細胞株、および心筋細胞に対する未分化抗原特異的CAR-T細胞の細胞傷害活性を評価するため、複数のヒトiPS細胞株およびそのiPS細胞から樹立した心筋細胞に対して、GPC3特異的CAR-T細胞を作用させ、細胞傷害性をIFN 産生等により評価した。前述の通り、iPS細胞に対しては強い細胞傷害性を認めたが、そこから由来する心筋細胞に対しては細胞傷害効果を認めなかった。

### (2) 未分化抗原特異的 CAR-T 細胞による *in vivo* における奇形腫治療法の確立

#### 【 ヒト iPS 細胞由来奇形腫における GPC3 等の未分化抗原の発現解析】

申請者らは、ヒト iPS 細胞由来の奇形腫の多くの細胞において GPC3 が発現していることを確認した(前述)。

#### 【 マウスモデルを用いた iPS 細胞由来奇形腫形成後の腫瘍抑制効果の確認】

ヒト iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し奇形腫を形成させた後、抗原特異的 CAR-T 細胞をマウスに静脈注射し、奇形腫除去能を評価した。結果として GPC3 特異的 CAR-T 細胞投与により奇形腫が退縮することを確認した。

#### 【 マウスモデルを用いた長期的な奇形腫形成の予防、治療効果の確認】

研究分担者の谷口は、これまでにヒトの組織を移植し評価できるヒト化マウスの開発を行っており、マウスの MHC (主要組織適合遺伝子複合体) をノックアウトした NOG マウス (Yaguchi et al. Cell Mol Immunol. 2017) では、移入したヒト T 細胞がマウス個体に対して GVHD 反応を起こすことがないため、長期にマウスを観察する事が可能である。本研究においては、このマウスを使用し、投与したヒト CAR-T 細胞がヒト iPS 細胞由来の腫瘍を攻撃し、分化した正常細胞には影響を及ぼさないことを長期観察するのに最適なマウスモデルと考えられた。同マウスを用いて、iPS 細胞由来心筋細胞を心臓へ移植し、皮下に iPS 細胞を移植し奇形腫を形成させ、GPC3 特異的 CAR-T 細胞を用いて長期的な奇形腫形成の予防効果を確認した。結果として、投与した CAR-T 細胞が移植心筋細胞を攻撃することなく、奇形腫形成抑制効果を確認した。

以上により GPC3 を標的とした CAR-T 細胞療法等の免疫学的アプローチにより再生医療における全ての領域で応用可能な非侵襲的腫瘍除去法の確立を検討した。

現在、がん領域において既に GPC3 を特異的に認識する抗体療法 (GC33) の臨床試験が進行しており安全性が既に確認されている。また、その抗体を応用した GPC3 特異的キメラ抗原受容体遺伝子導入 T 細胞療法 (CAR-T 療法) の臨床試験がアメリカや中国で進行しており、今後様々な臨床応用に移行しやすいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sho Tanosaki, Shugo Tohyama, Jun Fujita, Hiroki Nakanishi, Takayo Ohto-Nakanishi, Tomohiko Akiyama, Yuika Morita, Yoshikazu Kishino, Marina Okada, Hidenori Tani, Yusuke Soma, Kazuaki Nakajima, Hideaki Kanazawa, Masahiro Sugimoto, Minoru S.H. Ko, Makoto Suematsu, Keiichi Fukuda	4. 巻 23
2. 論文標題 Fatty Acid Synthesis Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	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) 10.1016/j.isci.2020.101535.	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 Shota Someya, Shugo Tohyama, Kotaro Kameda, Sho Tanosaki, Yuika Morita, Kazunori Sasaki, Moon Il Kang, Yoshikazu Kishino, Marina Okada, Hidenori Tani, Yusuke Soma, Kazuaki Nakajima, Tomohiko Umei, Otoy Sekine, Taijun Moriwaki, Hideaki Kanazawa, Eiji Kobayashi, Jun Fujita, Keiichi Fukuda	4. 巻 24
2. 論文標題 Tryptophan Metabolism Regulates Proliferative Capacity of Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	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) 10.1016/j.isci.2021.102090.	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10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 iPS細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状と展望
3. 学会等名 第85回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 臨床応用段階に入った心筋補填による心臓再生医療：その開発の経緯と将来展望
3. 学会等名 第24回日本心不全学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 Clinical application of iPS cell-derived regenerated cardiomyocyte therapy for severe congestive heart failure
3. 学会等名 第75回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 臨床応用段階に入った心筋補填による心臓再生医療：その開発の経緯と将来展望
3. 学会等名 第75回日本循環器学会教育講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 International symposium on stem cells and regenerative medicine
3. 学会等名 The 13th Institute for Biomedical Sciences International Symposium（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた難治性心不全治療法開発の現況と展望
3. 学会等名 日本安全性薬理研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 臨床応用段階に入った心筋補填による心筋再生医療：その開発の経緯と将来展望
3. 学会等名 東京女子医科大学講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 臨床応用段階に入った心筋補填による心臓再生医療：その開発の経緯と将来展望
3. 学会等名 順天堂大学循環器内科講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 心不全治療の近未来と遠未来：ARNiと心筋再生医療に関する最新の話題
3. 学会等名 福島循環器セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田恵一
2. 発表標題 心不全治療の近未来と遠未来：SGLT2阻害薬と心筋再生医療に関する最新の話題
3. 学会等名 秋田ハートフォーラム
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
研究分担者	岡田 麻里奈  (Okada Marina)  (00594582)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教   (32612)	
研究分担者	谷口 智憲  (Yaguchi Tomonori)  (40424163)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師   (32612)	
研究分担者	遠山 周吾  (Tohyama Shugo)  (90528192)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師   (32612)	

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