

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02999

研究課題名（和文）固形癌に対するCAR-T、ウイルス療法の併用による新規免疫療法の開発

研究課題名（英文）New combination therapy using CAR-T and Oncolytic virus against solid tumor

研究代表者

粕谷 英樹（KASUYA, Hideki）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00402636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CAR-T細胞療法の限界である固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を増加させるために、腫瘍溶解性ウイルスとの効率的な組み合わせを開発することを目的とした研究開発である。本研究では、HSV-MSLNとMSLN-CAR T細胞の合理的な組み合わせをPan02腫瘍モデルマウスに対して実証した。固形癌におけるCAR T細胞療法の限界を克服するために、我々は感染後に腫瘍細胞表面にCAR標的を発現するHSV-MSLNを作製した。CAR標的の発現はCAR T細胞の活性を高めると期待される。Pan02腫瘍モデルマウスに対して、単体使用よりも有意な抗腫瘍効果を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍は、従来の抗がん剤治療に対して抵抗性であるため、強力な抗腫瘍効果を有する新たな治療戦略の開発が求められている。CAR-Tは標的免疫療法の一つであり、リンパ腫や急性リンパ性白血病の患者で有効な結果を示している。そのため、CAR-TはB細胞悪性腫瘍患者の治療法として食品医薬品局（FDA）から承認されている。しかし、固形癌では限界があることが示された。腫瘍溶解性ウイルスの炎症はTMEを破壊し、T細胞の浸潤を可能にする。さらに、遺伝子組み換えOVIは、CAR標的抗原を感染した腫瘍細胞表面に送達し、CAR-T細胞標的タンパク質の喪失や不均一性を克服し、CAR-Tの固形癌への有効性を広げた。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research and development was to develop an efficient combination with oncolytic viruses to increase the antitumor effect on solid tumors, which is a limitation of CAR-T cell therapy. In this study, a rational combination of HSV-MSLN and MSLN-CAR T cells was demonstrated against Pan02 tumor model mice. To overcome the limitations of CAR T-cell therapy in solid tumors, we generated HSV-MSLNs that express CAR targets on the tumor cell surface after infection; expression of CAR targets is expected to enhance CAR T-cell activity. We confirmed that the CAR T cells exhibit significant anti-tumor effects against the Pan02 tumor model mice compared to the use of the CAR T cells alone.

研究分野：癌免疫治療

キーワード：細胞療法 CAR-T 腫瘍溶解性ウイルス HSV 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、その高密度の間質と免疫抑制性の腫瘍環境のために、最も侵襲性が高く致死的な固形癌悪性腫瘍の一つである。膵癌は日本における癌による死亡原因の第4位を占めており、今後10年間は癌による死亡原因の第2位になると予想されている。膵癌は従来の抗がん剤治療に対して抵抗性であるため、強力な抗腫瘍効果を有する新たな治療戦略の開発が求められている。CAR-T細胞療法は標的免疫療法の一つであり、CAR-T細胞は腫瘍抗原を標的とする合成CARを発現するように操作される。B細胞上のCD19とB細胞成熟抗原(BMCA)を標的とするCAR-T細胞は、リンパ腫や急性リンパ性白血病の患者で有効な結果を示している。そのため、CAR-T細胞療法はB細胞悪性腫瘍患者の治療法として食品医薬品局(FDA)から承認されている。しかし、CAR-T細胞療法は、固形癌では表面抗原の発現パターンがheterogeneityであったりantigen escapingが起こるために限界があることが示された。さらに、固形がんは免疫抑制的な腫瘍環境を持ち、間質が密集しているため浸透率が低い。これらすべての要因が、固形がんにおけるCAR-T細胞療法の有効な抗腫瘍効果を低下させる。CAR-T細胞療法で固形癌の壁(障害)を破るために腫瘍溶解性ウイルス(OV)を併用する可能性を探索した。OVは弱毒化ウイルスであり、迅速なウイルス複製によってがん細胞を特異的に溶解・殺傷し、より多くの腫瘍細胞に感染するウイルス粒子を放出し、がん細胞を攻撃する免疫系を刺激する腫瘍抗原を放出する(図2)。ウイルスの炎症は腫瘍環境を改善し、T細胞の浸潤を可能にする。さらに、遺伝子組み換えOVは、CAR標的抗原を感染した腫瘍細胞表面に送達し、CAR-T細胞標的タンパク質の喪失や不均一性を克服することができる。

2. 研究の目的

私たちは、固形がんに値する有効なCAR-T細胞療法と腫瘍溶解性ウイルス(OV)の新しい併用療法を研究開発し、細胞療法の適応を固形癌に広げることが目的とする。

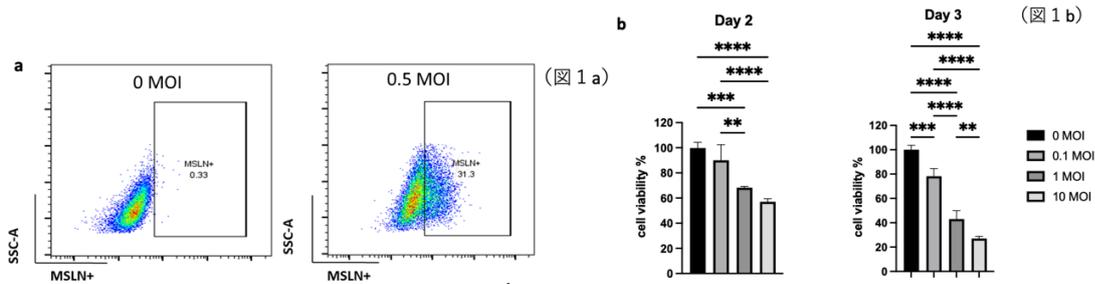
3. 研究の方法

我々は、単純性ヘルペスウイルスのICP34.5を両側で欠失させ、ヒトMSLN遺伝子を挿入してHSV-MSLNを作製し、弱毒化した腫瘍溶解性ウイルスHSV-MSLNを作製した。作製したウイルスの純度を定量PCRで確認した。次に、作製したウイルスのin vitroにおけるPan02膵癌腫瘍細胞に対する殺細胞効果を細胞増殖アッセイで評価し、異なるMOIのウイルスを感染させた後、フローサイトメトリーを用いて腫瘍細胞表面におけるMSLNの発現を評価した。次に、HSV-MSLNウイルスをPan02膵癌腫瘍マウスに注入して安全性を評価し、in vivoで腫瘍サイズを測定してウイルスの抗腫瘍効果を確認した。その後、第二世代MSLN-CAR-T細胞を作製し、HSV-MSLN感染Pan02腫瘍細胞またはMSLN安定発現Pan02腫瘍細胞と共培養後、IFN γ 産生を測定することによりin vitroでのCAR-T細胞活性を評価した。最後に、Pan02腫瘍担癌マウスを用いて、MSLN-CAR-T細胞とHSV-MSLN併用治療の抗腫瘍効果をin vivoで評価した。

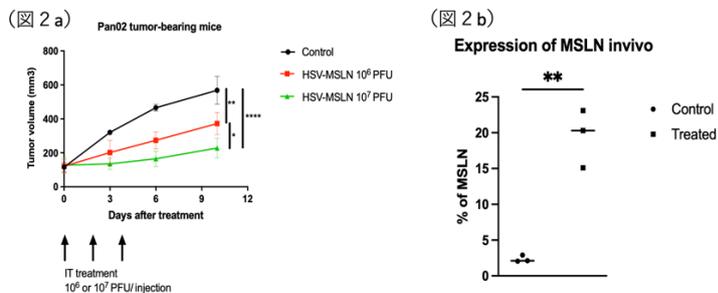
4. 研究成果

1- HSV-MSLNは、感染した腫瘍細胞にMSLNを効果的に送達し、in vitroでの細胞毒性を増強する。

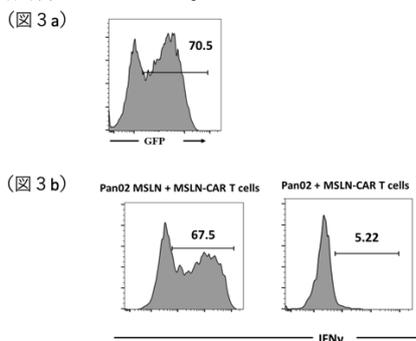
Pan02腫瘍細胞にHSV-MSLNを異なる感染倍率(MOI)で24時間感染させ、腫瘍上のMSLNの発現をフローサイトメトリーで評価した。MSLNの発現が観察され(図1.a)、発現はMOI依存的に増加した。次に、HSV-MSLNの細胞毒性効果をMTTアッセイで評価した。Pan02細胞を異なるMOI(0, 0.1, 1, 10)で感染させた。HSV-MSLNは、2日後および3日後にMOIおよび時間依存的に細胞毒性効果を示した(図1.b)。したがって、HSV-MSLNは感染した腫瘍細胞にMSLN遺伝子を送達し、なおかつ数日後に腫瘍細胞を死滅させることができると結論した。



2- HSV-MSLNはMSLNを発現することができ、片側Pan02腫瘍マウスにおいて抗腫瘍効果を有する。次に、HSV-MSLNの抗腫瘍効果をPan02担癌マウスで評価した。マウスに腫瘍を皮下接種した。腫瘍サイズが約100 mm³に達した時点で、HSV-MSLNを 1×10^6 pfuまたは 1×10^7 pfuを2日間隔で3回腫瘍内に注射した。腫瘍の大きさは週に2回測定した。HSV-MSLNは腫瘍増殖を有意に阻害し、その効果は用量依存的であった (図2 a)。マウスに副作用は見られなかった。従って、HSV-MSLNは安全性を伴う抗腫瘍効果を有すると結論した。次に、HSV-MSLNがin vivoでMSLNを腫瘍細胞表面に送達する能力をPan02担癌マウスで評価した。マウスに腫瘍を皮下接種した。腫瘍サイズが約100 mm³に達した時点で、HSV-MSLNを 5×10^6 pfu、2日間隔で2回腫瘍内に注射した。2日後に腫瘍を単離し、MSLNの発現をフローサイトメトリーで評価した。HSV-MSLN処理腫瘍では、PBSのみで処理した対照腫瘍と比較してMSLNの発現が観察された (図2 b)。この結果は、HSV-MSLNがin vivoの腫瘍でもin vitroと同様にMSLNを発現できることを示している。



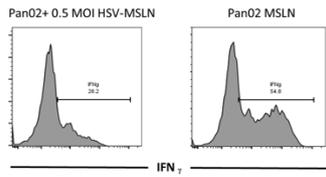
3- MSLN-CAR-T細胞は、MSLNを安定的に発現するPan02細胞に対して活性を示す。次に、MSLNを標的とするscFv、CD3とおよびCD28共刺激シグナル分子、GFPからなる第二代CARをOT1マウスの脾臓CD8+T細胞に導入し、MSLN特異的CAR-T細胞を作製した。レトロウイルスによるCAR構築遺伝子の導入後、GFP陽性T細胞をフローサイトメトリーで導入効率を確認したところ、マウスT細胞のほぼ70%がGFP陽性であった (図3a)。MSLN発現細胞に対するMSLN-CAR-T細胞の反応性を評価するために、MSLN-CAR-T細胞をMSLN発現Pan02細胞 (Pan02-MSLN) と共培養し、MSLN-CAR-T細胞からのIFN γ 産生をフローサイトメトリーで評価した。Pan02-MSLNと共培養したMSLN-CAR-T細胞は、Pan02細胞と共培養したMSLN-CAR-T細胞と比較して有意に高いIFN γ を産生した。これはMSLN-CAR-T細胞の抗原特異的反応を示している (図3b)。このことから、MSLN-CAR-T細胞はMSLN特異的に活性化されると結論づけられる。



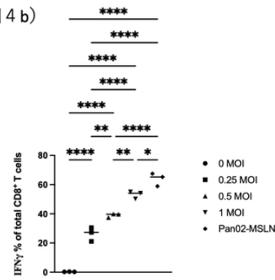
4- HSV-MSLNウイルスはPan02細胞にMSLNを送達し、in vitroでMSLN-CAR-T細胞を活性化する。Pan02細胞にHSV-MSLNウイルスを異なるMOIで24時間感染させた。感染細胞をMSLN-CAR-T細胞 (1 : 1) と6時間共培養し、フローサイトメトリーでIFN γ 産生を測定した。HSV-MSLNを感染させたPan02細胞と共培養すると、MSLN-CAR-T細胞からのIFN γ 産生が認められ、その効果はMOI依存的であった (図4 a & b)。この効果は、MSLN-CAR-T細胞を100%MSLN発現細胞と共培養した場合にも同等であった (図4 b)。これらの結果は、MSLN-CAR-T細胞がHSV-MSLNに感染した腫瘍細胞によって活性化される

ことを示している。

(図 4 a)



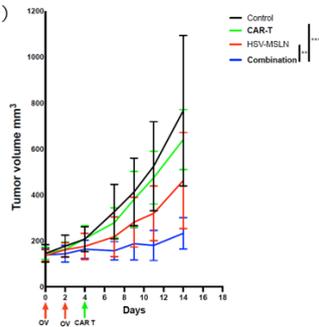
(図 4 b)



5- HSV-MSLNは、Pan02腫瘍担持マウスにおけるMSLN-CAR-Tの抗腫瘍効果を増強する。

マウス片方の脇腹に腫瘍を皮下接種した。腫瘍の大きさが約 100 mm³ に達した時点で、HSV-MSLN を 5×10^6 pfu 腫瘍内に注射し、2日後にもう1回ウイルスを注射した。2日後、 3×10^6 個の MSLN-CAR-T 細胞を腫瘍内に注射した。腫瘍の大きさは週2回測定した。併用療法は、コントロールおよび MSLN-CAR-T 細胞治療群、HSV-MSLN 治療群（未発表）と比較して、腫瘍増殖を有意に抑制した（図 5）。これにより我々の仮説が in vivo モデルでも証明された。

(図 5)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Abdelmoneim Mohamed, Eissa Ibrahim Ragab, Aboalela Mona Alhussein, Naoe Yoshinori, Matsumura Shigeru, Sibal Patricia Angela, Bustos-Villalobos Itzel, Tanaka Maki, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 Metformin enhances the antitumor activity of oncolytic herpes simplex virus HF10 (canerpaturev) in a pancreatic cell cancer subcutaneous model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-25065-w	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 Eissa Ibrahim Ragab, Mukoyama Nobuaki, Abdelmoneim Mohamed, Naoe Yoshinori, Matsumura Shigeru, Bustos Villalobos Itzel, Ichinose Toru, Miyajima Noriyuki, Morimoto Daishi, Tanaka Maki, Fujimoto Yasushi, Sone Michihiko, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki	4. 巻 149
2. 論文標題 Oncolytic herpes simplex virus HF10 (canerpaturev) promotes accumulation of CD8+ PD-1- tumor-infiltrating T cells in PD-L1-enriched tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 214 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Daishi, Matsumura Shigeru, Bustos-Villalobos Itzel, Sibal Patricia Angela, Ichinose Toru, Naoe Yoshinori, Eissa Ibrahim Ragab, Abdelmoneim Mohamed, Mukoyama Nobuaki, Miyajima Noriyuki, Tanaka Maki, Kodera Yasuhiro, Kasuya Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 C-REV Retains High Infectivity Regardless of the Expression Levels of cGAS and STING in Cultured Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1502 ~ 1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061502	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 Noriyuki Miyajima, Ibrahim Ragab Eissa, Mohamed Abdelmoneim, Yoshinori Naoe, Toru Ichinose, Shigeru Matsumura, Itzel Bustos-Villalobos, Nobuaki Mukoyama, Daishi Morimoto, Masahiro Shibata, Dai Takeuchi, Nobuyuki Tsunoda, Toyone Kikumori, Maki Tanaka, Yasuhiro Kodera, Hideki Kasuya	4. 巻 83
2. 論文標題 S-1 facilitates canerpaturev (C-REV)-induced antitumor efficacy in a triple-negative breast cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 683 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.83.4.683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mohamed Abdelmoneim, Yoshinori Naoe, Ibrahim Ragab Eissa, Mona Aboalela, Shigeru Matsumura, Maki Tanaka, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 Cytokine-armed C-REV exhibits strong antitumor effects that lead to complete tumor regression.
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mohamed Abdelmoneim, Yoshinori Naoe, Ibrahim Ragab Eissa, Mona Aboalela, Shigeru Matsumura, Maki Tanaka, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 Cytokine-armed C-REV exhibits strong antitumor effects that lead to complete tumor regression.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mona Alhussein Aboalela, Abdelmoneim Mohamed, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Hideki Kasuya.
2. 発表標題 Expression of CAR Targets on Solid Tumors by Armed Oncolytic virus has synergetic effect on T cell therapy
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mona Alhussein Aboalela, Abdelmoneim Mohamed, Yoshinori Naoe, Shigeru Matsumura, Hideki Kasuya.
2. 発表標題 Expression of CAR Targets on Solid Tumors by Armed Oncolytic virus has synergetic effect on T cell therapy
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshinori Naoe, Mohamed Abdelmoneim, Mona Aboalela, Ibrahim Ragab Eissa, Shigeru Matsumura, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 キメラ抗原受容体を樹状細胞(dendritic cell: DC)に組み込んだ新規細胞療法CAR-DC
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshinori Naoe, Mohamed Abdelmoneim, Mona Aboalela, Ibrahim Ragab Eissa, Shigeru Matsumura, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 キメラ抗原受容体を樹状細胞(dendritic cell: DC)に組み込んだ新規細胞療法CAR-DC
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshinori Naoe, Mohamed Abdelmoneim, Mona Aboalela, Ibrahim Ragab Eissa, Shigeru Matsumura, and Hideki Kasuya
2. 発表標題 キメラ抗原受容体を樹状細胞(dendritic cell: DC)に組み込んだ新規細胞療法CAR-DC
3. 学会等名 第26回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideki Kasuya, Mohamed Abdelmoneim, Yoshinori Naoe, Ibrahim Ragab Eissa, Mona Aboalela, Shigeru Matsumura, Maki Tanaka
2. 発表標題 The novel armed oncolytic HSV exhibits a strong antitumor effect that completely regresses tumors
3. 学会等名 The 14th International Oncolytic Virotherapy Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 1型単純ヘルペスウイルス	発明者 粕谷英樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-051489	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 キメラ標的因子受容体	発明者 粕谷英樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-005337	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

<p>名古屋大学大学院医学系研究科 癌免疫治療研究室 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/intl/exch/cancerimmuno/www/index.html 名古屋大学大学院医学系研究科 癌免疫治療研究室 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/intl/exch/cancerimmuno/www/index.html</p>

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	直江 吉則 (NAOE Yoshinori) (50392048)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	松村 繁 (MATSUMURA Shigeru) (60523511)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	

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