

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15547

研究課題名（和文）肺癌に対する非ウイルス遺伝子改変CAR-T細胞を用いた新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy for lung cancer using Non-viral chimeric antigen receptor (CAR) T cells

研究代表者

三浦 健太郎 (Miura, Kentaro)

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：70624716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺癌に過剰発現していることが報告されているIGF1受容体を標的とした、非ウイルス導入法によるLigand型CAR-T細胞の開発を行った。開発初期において、抗原認識部位にIGF1を採用したところ、CAR発現率が経時的に低下した。そこで、IGF1の成熟過程に注目し、未熟IGF1の変異体を用いたところ、安定したCAR発現が得られ、IGF1Rを発現する肺腺癌に対して高い抗腫瘍効果を示した。また、生体内でも持続した効果を発揮させることを目的として、アミノ酸変異を加えることで、IGF1とIGF1Rの反応を阻害するタンパクの影響を最小限にすることが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特徴は、CAR-T細胞の抗原認識部位にヒトLigandを採用していること、またCAR遺伝子の導入に非ウイルス導入法であるpiggyBac法を用いていることである。ヒトLigandは、従来の抗体の可変領域を用いるscFvと異なり、この抗原認識部位自体に対する抗体産生を原因とする効果減弱などの懸念がなく、標的となる受容体との適切な結合力によって持続的な効果が期待出来る。また、本開発で採用したpiggyBac法は、ウイルス導入法よりも安価かつ安全性が高いとされていることから、本開発品は臨床応用が期待出来ると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed Ligand-type CAR-T cells targeting the IGF1 receptor, which has been reported to be overexpressed in lung cancer, using a non-viral transduction method. In the early stage of development, when IGF1 was employed as the antigen recognition site, the CAR expression rate decreased over time. We focused on the maturation process of IGF1 and used a mutant of immature IGF1, which showed stable CAR expression and high antitumor efficacy against IGF1R-expressing lung adenocarcinoma. In addition, with the aim of achieving a sustained effect in vivo, amino acid mutations were added to minimize the effect of proteins that inhibit the reaction between IGF1 and IGF1R.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 CAR-T細胞 ピギーバックトランスポゾン IGF1受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 原発性肺癌について

進行・再発原発性肺癌に対する薬物療法は近年目覚ましいものがあるが、依然として効果は限定的である。従来の薬物療法に代わる、あるいはこれらの薬物療法に耐性化をきたした病変に対する新たな治療方法の開発が急務である。

#### (2) CAR-T 細胞療法について

近年、癌治療における、キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor; 以下 CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法 (以下 CAR-T 療法) が大きな注目を集めている。CAR-T 療法は患者の細胞障害性 T 細胞がもつ T 細胞受容体に対して遺伝子改変を加え、直接的かつ選択的に腫瘍細胞を細胞障害性 T 細胞に認識させて抗腫瘍効果を発揮する治療方法である。特に、血液内科領域における B 細胞性造血器腫瘍に対する CD19 抗原特異的 CAR-T 療法は、難治症例に対して劇的な効果をもたらすことが明らかとなった。

#### (3) 肺癌に対する CAR-T 細胞療法について

一方、肺癌を含めた固形腫瘍に対する臨床的效果は限定的であり、開発がいまだすすんでいない。そこで、我々は、肺癌における CAR-T 療法の標的分子として、肺癌細胞の細胞表面上に発現している IGF1 受容体 (IGF1R) に注目した新規 CAR-T 細胞療法の開発に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、非ウイルス導入法である piggyBac 法を用いて、肺癌に発現する IGF1R を標的とする Ligand 型 CAR-T 細胞を新規開発することである

### 3. 研究の方法

#### (1) CAR-T 細胞の作製と肺腺癌細胞株における in vitro 試験

腫瘍細胞株と IGF1R CAR-T 細胞の共培養による抗腫瘍活性の評価を行う。E:T 比 (腫瘍細胞数 (Tumor) と、共培養する CAR-T 細胞・活性化 T 細胞数 (Effector) との比率) を調節しつつ評価し、抗腫瘍活性が十分な CAR-T 細胞の濃度を検討する。

#### (2) NSG マウスを用いた in vivo 試験

NOD/LtSz-scid Il2rg<sup>-/-</sup> (NSG) マウスに肺癌細胞株を  $2 \times 10^6$  個ずつ尾静脈投与し、遠隔転移モデルを作成する。その後、各 CAR-T 細胞の輸注を行う。Control として PBS 群、CD19 CAR-T 投与群を作製し、IGF1R CAR-T 特異的な抗腫効果について検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 未熟 IGF1 を抗原認識部位とすることで IGF1 CAR タンパクは安定して発現する

開発初期において、我々は抗原認識部位としてヒト体内を循環する成熟 IGF1 を抗原認識部位とする CAR-T 細胞を作製した。しかし、これは培養過程において経時的に CAR 発現率が低下することが明らかとなった。これは、IGF1 はその立体構造の複雑性から、CAR タンパクとして不安定であることが原因と考えられた。そこで、IGF1 の翻訳過程に着目し、IGF1 タンパクの安定化向上に寄与する配列が得られないか模索した。結果、この immature IGF1 の変異体である Pre IGF1 は mature IGF1 と異なり、遺伝子導入後 14 日目の培養終了時点でも安定した遺伝子発現が得られることを確認した (図 1)。

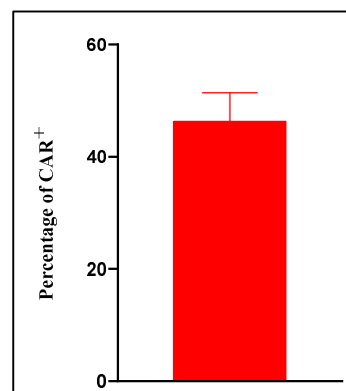


図 1. Pre IGF1 CAR 発現率

#### (2) 肺癌における IGF1R の膜表面発現の評価

In vitro 抗腫瘍効果の検証に先立ち、自施設が有する扁平上皮癌と腺癌細胞株における膜表面 IGF1R の発現を Flow cytometry で評価した。結果、16 種類中 7 種類において、90%以上の IGF1R 発現率を有することが判明した。これは、肺癌に対する CAR-T 細胞開発にとって、IGF1R は有望な標的となり得ることを示唆している。

**(3) Pre IGF1 を抗原認識部位とする IGF1R CAR-T 細胞は肺腺癌細胞株に対して高い抗腫瘍効果を発揮する**

IGF1R を高発現する肺癌細胞株のうち、A549 および H1568 に対し、IGF1R CAR-T 細胞の *in vitro* 抗腫瘍効果を検証した。E:T 比は 4:1 ~ 1:4 までとし、control には活性化 T 細胞(ATC)を用いた。結果、IGF1R CAR-T は ATC と比較して有意に腫瘍の増殖を抑制することが示された(図 2)。

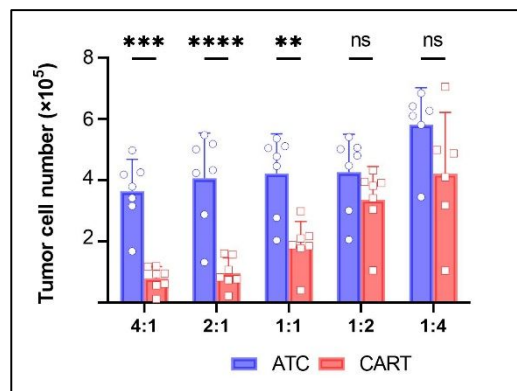


図 2. A549 に対する *in vitro* 抗腫瘍効果

**(4) Pre IGF1 はヒト血清中に存在する IGFBP3 によって IGF1R との親和性が低下し CAR-T 活性が低下する**

ヒト血中では、IGF1 の半減期は数分と極めて短い。そのため、IGF1 はそのほぼすべてが IGF binding protein(IGFBP)と結合しており、この 2 量体はさらに肝臓で産生される ALS タンパクと結合して 3 量体を形成することで半減期を延ばすことが知られている。それだけでなく、この複合体は IGF1R に対する親和性が低下していることも報告されている。我々が作成した Pre IGF1 は IGFBP への結合部位は維持されたままであるため、ヒト血中に存在する成熟 IGF1 と同様に IGFBP と結合し、標的である IGF1R への親和性が低下する可能性がある。これを検証するために、recombinant IGF1R をプレートに固相化させ、recombinant IGFBP の存在が CAR-T 活性に与える影響を IFN- $\gamma$  の産生量を測定することで調べた。すると、IGF1R CAR-T は、IGFBP の存在下では IFN 産生能を失うことが判明した(図 3)。これは、IGF1R CAR-T は *in vivo* 試験において、期待される抗腫瘍効果を発揮できない可能性を示唆しており、変異体の作成の必要性があることを示した。

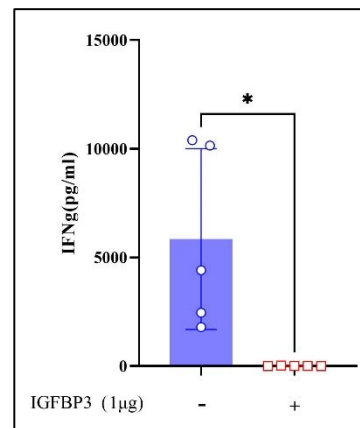


図 3. IGFBP による CAR-T 活性能の低下

**(5) Pre IGF1 をベースにしたアミノ酸変異体は IGFBP の影響を受けず、CAR-T 活性が維持される**

そこで、我々はこの Pre IGF1 をベースに、IGFBP の結合に関与しているとされるアミノ酸を欠損あるいは変異させた変異型 Pre IGF1 を抗原認識部位とする複数の IGF1R CAR-T 細胞を作製し、CAR 発現率の比較、A549 に対する *in vitro* 抗腫瘍効果、IGFBP および ALS 存在下での IGF1R に対する CAR-T 活性を評価した。CAR 発現は変異体 4 が最も高かったが(図 4a)、*in vitro* 抗腫瘍効果は変異体 1 および 3 が高く、変異体 4 は低かった(図 4b)。この変異体 1 と 3 を候補として IGFBP および ALS 存在下での IGF1R に対する CAR-T 活性を評価したところ、変異体 1 は 2 量体、3 量体となるにつれて IFN 産生能の低下がみられた(図 4c)一方で、変異体 3 は IGFBP、ALS の有無にかかわらず一定した IFN 産生能を維持していた(図 4d)。現在、この変異体 3 による *in vivo* 試験を実施中である。

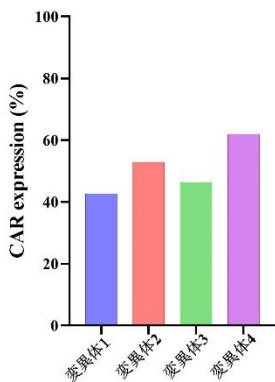


図 4a. CAR 発現率

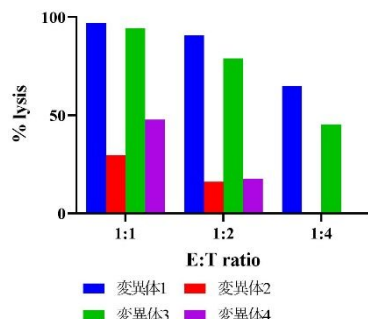


図 4b. A549 に対する *in vitro* 試験

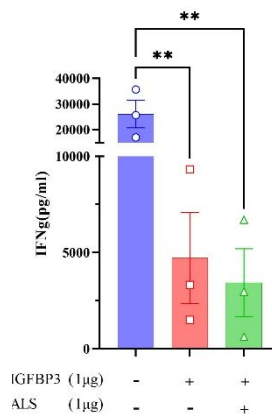


図 4c. 変異体 1 の IFN 産生能

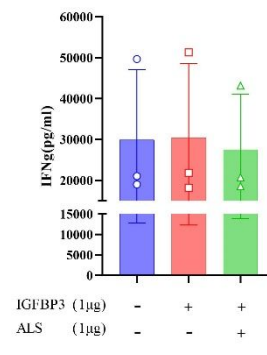


図 4d. 変異体 3 の IFN 産生能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三島修治、平林耕一、丸山悠太、田中美幸、中沢洋三、清水公裕
2. 発表標題 Development of novel CAR-T cell therapy targeting insulin-like growth factor I receptor for lung adenocarcinoma
3. 学会等名 日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島修治、平林耕一、丸山悠太、田中美幸、柳生茂希、中沢洋三、清水公裕
2. 発表標題 piggyBac法による新規リガンド型IGF1R CARTの開発
3. 学会等名 日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三島修治、原大輔、松岡峻一郎、竹田哲、三浦健太郎、江口隆、濱中一敏、清水公裕
2. 発表標題 Current status of Chimeric Antigen Receptor T cell therapy for lung cancer and the strategy of our group
3. 学会等名 日本肺癌学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 IGF1Rを標的とするpre-pro前駆体型キメラ抗原受容体発現細胞	発明者 清水公裕、三島修治、他4名	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/003012	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 IGF1Rを標的とするpre-pro前駆体型キメラ抗原受容体発現細胞	発明者 清水公裕、三島修治、他4名	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、112103302	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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