

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670553

研究課題名(和文)キメラ抗原受容体導入Th1/Th17を用いたT細胞輸注療法のパラダイムシフト

研究課題名(英文)A paradigm shift in T cell adaptive cell therapy using Th1/Th17 cells transduced chimeric antigen receptor

研究代表者

加藤 琢磨 (KATO, Takuma)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60224515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌胎児性抗原(CEA)は、多くの癌種で発現が認められ、キメラ抗原受容体(CAR)導入T細胞輸注療法の望ましい標的となり得る。そのためには、有効性を高めるだけでなく、CEAが正常組織にも発現される自己抗原であることから、安全性は十分に確保されなければならない。本研究では、CAR導入CD4T細胞のヘルパー機能を利用したCAR導入CD8T細胞の抗腫瘍効果の増強作用を検討した結果、CAR導入CD4T細胞は、CEA特異的CAR導入CD8T細胞の抗腫瘍効果を増強しなかった。また、CEA Tgマウスを用いて、CEA特異的CAR輸注療法の安全性を評価したところ、サイトカイン遊離症候群に注意が必要であった。

研究成果の概要(英文)：CEA is cell surface antigens highly expressed on various cancer cell types but also expressed on healthy tissues, thus its feasibility as a target for CAR-modified T cell therapy will be required to augment efficacy, but also awaited before establishing its safety in terms of on-target-off-tumor effects. In the present study, we sought to determine whether CAR-CD4 T cells act in concert with CAR-CD8 T cells to exert anti-tumor activity in vivo using CEA-transgenic mouse expressing CEA as a self-antigen. The adoptive transfer of CEA specific CAR expression CD4 T cells did not enhance the efficacy of CEA-specific CAR-expressing CD8 T cells to exert anti-tumor activity. The adoptive transfer in conjunction with lymphodepleting preconditioning mediated significant tumor regression but caused weight loss in CEA-Tg mice. This weight loss was not associated with overt inflammation in CEA-expressing tissues, but malnutrition with elevated systemic levels of cytokines linked to anorexia.

研究分野：免疫学

キーワード：キメラ抗原受容体 T細胞輸注療法 癌胎児性抗原

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における悪性腫瘍による死亡は死亡原因の 30% を超え新規治療法の開発が切望されている。なかでも、人為的に腫瘍特異性を付与した T 細胞をがん患者に移入する遺伝子改変 T 細胞輸注療法に期待が集まっている (Johnson et al. Blood. 2009;114:535)。そのなかで、腫瘍細胞表面上のがん抗原を直接認識するモノクローナル抗体を単鎖抗体化し、T 細胞受容体 (TCR) や副刺激分子のシグナル伝達ドメイン付加したキメラ抗原受容体 (CAR) を導入した T 細胞 (CAR 導入 T 細胞) は、腫瘍上の主要組織適合性抗原 (MHC) 非依存的に抗原認識が可能、T 細胞上の CD8 等の co-receptor 非依存的に抗原認識が可能であり、それ故、CAR 導入 CD4T 細胞も腫瘍を直接認識し活性化される。CD8T 細胞機能の強化と維持に CD4 陽性 Th1 もしくは Th17 が重要な役割を果たすことできるが (Zhu J et al. Ann Rev Immunol. 2010;28:445)、従来の T 細胞輸注療法においてほとんど利用されてはこなかった。申請者等は、こうした CAR と Th の性質を積極的に生かすことで、腫瘍特異性を付与した Th1 あるいは Th17 細胞により CD8T 細胞の機能強化と維持を介して抗腫瘍効果を飛躍的に高めることができる可能性に着目した。

(2) CD19 を標的とした血液腫瘍に対して、CD19 特異的 CA-T 細胞輸注療法はめざましい治療効果を発揮することが報告された。この成果から、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞輸注療法に期待が高まっている。癌胎児性抗原は、肺がん、膵がん、胃がん等の腺がん等の光景腫瘍で主に発現が認められ、特に大腸がん細胞表面上において高頻度に発現され、CAR 導入 T 細胞輸注療法の望ましい標的となり得る。一方で、CEA は正常大腸の管腔側等に発現が認められる正常自己抗原であることから、自己免疫病発症のリスク評価を含めて on-target-off-tumor といった安全性は十分に検討されなければならない。腫瘍関連抗原を標的とした T 細胞輸注療法を目指した多くの前臨床試験において、標的抗原が自己抗原であることを無視した実験系でその有効性と安全性の検討がなされてきており、腫瘍関連抗原を自己抗原としてヒトと同様の発現様式を示す動物モデルの必要性が指摘されていた。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍抗原特異的 CAR 導入 CD4 ヘルパー T 細胞が、同一特異性の CAR 導入 CD8T 細胞の腫瘍障害活性増強と生存率上昇を介して抗腫瘍作用を増強している可能性、CAR 導入 CD4 ヘルパー T 細胞が直接的腫瘍障害活性を発揮する可能性、その両者により強力な腫瘍縮小効果を発揮する可能性、を明らかにする。併せて、ヒトと同様の発現様式を示す、CEA トランスジェニック (CEA-Tg)

マウスを用いて、安全性に関する評価を行う。

3. 研究の方法

(1) CAR 導入 CD4T 細胞と CD8T 細胞の調整
マウス脾臓から CD4T 細胞と CD8T 細胞を精製した。それぞれの T 細胞亜集団を、ヒト CEA に反応する scFv と CD28 および CD3 のシグナル伝達ドメインから成り立つ CAR レトロウイルスベクターを用いて感染・導入した。感染・導入条件は既報のレトロウイルスベクターを用いた TCR 導入条件に基づいて行った (Iwamura K, Kato T et al. Gene Ther. 2012;19:959)。CEA 特異的 CAR の発現確認は、ビオチン化 CEA と蛍光標識アビジンを用いて行った。

(2) in vitro における機能評価
CAR 導入 CD4T 細胞と CD8T 細胞をそれぞれ、CEA 発現腫瘍で刺激し細胞内サイトカインサイトカイン産生、CEA 陽性腫瘍を標的として細胞傷害活性を測定した。

(3) in vivo における評価 (王立楠)

上述の CAR 導入 CD4T 細胞と CD8T 細胞を単独もしくは両者を混合して、CEA 陽性腫瘍株を背部皮下に接種した野生型 (WT) マウスに輸注し、経時的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を評価した。マウスはリンパ球減少性の前処置 (フルダラビン + シクロフォスファミド + 放射線全身照射) を施したものと、施さないものを用いた。同時に、輸注した担癌マウスの末梢血、所属 (膝下) リンパ節、脾臓、腫瘍組織を回収し、各臓器に存在する輸注細胞の存在比率、分化・活性化状態に関して細胞表面マーカーを指標にして解析した。輸注細胞を作製する際には C57BL/6 CD45.1 congenic マウス T 細胞を用いて追跡可能にした。

4. 研究成果

(1) レトロウイルスベクターを用いた CAR 導入法によりマウス CD4 と CD8T 細胞それぞれに 70~85% の効率で CAR の発現が認められ、両細胞集団とも抗原特異的的刺激によりサイトカインを産生できることを確認した。一方、CEA 特異的 CAR 陽性 CD8T 細胞は効率よく、CEA 陽性腫瘍を in vitro で傷害できたが、CD4T 細胞では認められなかった。CEA 陽性腫瘍を担癌させた WT マウスに、CEA 特異的 CAR 導入 CD4T 細胞と CD8T 細胞を単独もしくは両者を 1 : 1 で混合して輸注した結果、CD8 単独輸注は CD8 + CD4 輸注と同程度の腫瘍縮小が認められたが、CD4 単独輸注では全く認められなかった。

(2) CEA-Tg マウスを用いた安全性評価に先立って、このマウスの正常組織に於ける CEA 発現を免疫組織学的に確認した。その結果、肺胞、胃、小腸と大腸に発現を認めたが、それ以外の臓器では発現は認められず、ヒトと同様の発現様式を示す Tg マウスであること

を確認できた。安全性評価実験においては、CD4 と CD8 両者を含む全 CEA 特異的 CAR-T 細胞を CEA-Tg マウスに輸注した。コントロールとして WT マウスを用いた。輸注により CEA-Tg マウスに担癌させた CEA 陽性腫瘍の増殖を抑制した。その際、体重減少や下痢を指標にした副作用は認められなかった。さらに、ヒトにおける T 細胞輸注療法プロトコールに含まれるリンパ球減少性の前処置 (Cyclophosphamide + Fludarabine + 4.5Gy 放射線照射) を施した場合、腫瘍縮小効果が強まった。しかしながら、前処置群 + 輸注群においては、体重減少が認められた。一方、同様の腫瘍縮小効果が見られた WT マウスでは、全く認められなかった。この体重減少の原因を探るため、CEA 発現臓器、血中サイトカイン、血清生化学試験を行ったところ、サイトカイン遊離症候群にみられるサイトカインの中でも食欲不振に關与するサイトカイン (IL-6, TNF α , MIP-1 α 等) の上昇が認められた。血清生化学検査の結果等も、栄養不良状態が推測された。一方、CEA 発現臓器である肺と腸において、炎症が見られたが、その程度は WT マウスと同程度であった。

(3) CEA 特異的 CAR 導入 CD4T 細胞は、CEA 特異的 CAR 導入 CD8T 細胞の抗腫瘍効果を増強しなかったが、その原因として用いた CD4 ヘルパー T 細胞の適切な分化誘導ができていなかった可能性が高く、今後の検討が必要である。また、CEA を標的とした CAR-T 細胞輸注療法の安全性に関しては、サイトカイン遊離症候群に注意が必要であった。抗 IL-6 中和抗体により、症候群制御が可能かを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Hori, T., Kuribayashi, K., Saito, K., Wang, L., Torii, M., Uemoto, S., Kato, T. (2015) Alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells induced in vivo by ultraviolet irradiation after alloantigen immunization require interleukin-10 for their induction and activation, and flexibly mediate bystander immunosuppression of allograft rejection. *Transplant Immunology*, in press. 査読有り、DOI:10.1016/j.trim.2015.03.004.

Hori, T., Kuribayashi, K., Saito, K., Wang, L., Torii, M., Uemoto, S., Iida, T., Yagi, S., Kato, T. (2015) Ultraviolet-induced alloantigen-specific immunosuppression in transplant immunity. *World journal of transplantation* 5, 11-8. 査読有り、

DOI: 10.5500/wjt.v5.i1.11.

Nishikawa, K., Seo, N., Torii, M., Ma, N., Muraoka, D., Tawara, I., Masuya, M., Tanaka, K., Takei, Y., Shiku, H., Katayama, N., Kato, T. (2014) Interleukin-17 Induces an Atypical M2-Like Macrophage Subpopulation That Regulates Intestinal Inflammation. *PLoS one* 9, e108494. 査読有り、DOI: 10.1371/journal.pone.0108494.

Hori, T., Kuribayashi, K., Saito, K., Wang, L., Torii, M., Uemoto, S., Kato, T. (2014) Induction of alloantigen-specific CD4+ T regulatory Type 1 cells by alloantigen immunization and ultraviolet-B irradiation: a pilot study in murine transplantation models with skin and cardiac allografts. *Ann Transplant* 19, 519-536. 査読有り、DOI:10.12659/AOT.890890.

Muraoka, D., Nishikawa, H., Noguchi, T., Wang, L., Harada, N., Sato, E., Luescher, I., Nakayama, E., Kato, T., Shiku, H. (2013) Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8(+) T cells. *Vaccine* 31, 2110-2118. 査読有り、DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056.

Kato, T., Tada-Oikawa, S., Wang, L., Murata, M., Kuribayashi, K. (2013) Endocrine disruptors found in food contaminants enhance allergic sensitization through an oxidative stress that promotes the development of allergic airway inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273, 10-18. 査読有り、DOI:10.1016/j.taap.2013.08.029.

Hirayama, M., Nishikawa, H., Nagata, Y., Tsuji, T., Kato, T., Kageyama, S., Ueda, S., Sugiyama, D., Hori, S., Sakaguchi, S., Ritter, G., Old, L. J., Gnjatic, S., Shiku, H. (2013) Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *European Journal of Immunology* 43, 989-1000. 査読有り、DOI: 10.1002/eji.201242800.

〔学会発表〕(計9件)

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. Efficacy and safety of T cells with CEA-specific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. Cell Symposia, 2015/6/14~2015/6/16. Sitges, Spain.

Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T. Interleukin-17 Induces an Atypical M2-Like Macrophage Subpopulation That Regulates Intestinal Inflammation. World Immune Regulation Meeting IX, 2015/3/18~2015/3/21, Davos, Switzerland.

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. Keystone Symposia, 2015/2/18~2015/2/13, Banff, Canada

王立楠、加藤琢磨、瀬尾尚宏、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋。ヒトと同様の発現様式を示す癌胎児性抗原(CEA)トランスジェニックマウスを用いた CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞輸注療法の有効性と安全性の検討。日本がん免疫学会、2014/7/30~2014/8/1、ひめぎんホール、松山。

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. 日本癌学会、2014/9/25~2014/9/27、パシフィコ横浜、横浜。

Linan Wang, Takuma Kato, Naohiro Seo, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, and Hiroshi Shiku. EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY. 日本遺伝子治療学会、2014/7/6~2014/7/8、慈恵医科大学、東京。

王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、癌胎児性抗原(CEA)を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞の有効性と安全性の検討、日本がん免疫学会、2013/7/3~2013/7/5、ANA クラウンプラザ宇部、宇部。

天池千咲、池田裕明、王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、機能制御性キメラ抗原レセプター(CAR)導入 T 細胞輸注療法の開発、日本癌学会、2013/10/3~2013/10/5、パシフィコ横浜、横浜。

王立楠、加藤琢磨、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、竹迫一任、珠玖洋、癌胎児性抗原を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞輸注療法の有効性と安全性の検討、日本癌学会、2013/10/3~2013/10/5、パシフィコ横浜、横浜。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤琢磨 (KATO, Takuma)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60224515

(2) 研究分担者

王立楠 (WANG, Linan)
三重大学・大学院医学系研究科・特任助教
(研究担当)

研究者番号：00589484

(3)連携研究者
()

研究者番号：