

令和元年5月22日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07167

研究課題名(和文) がん微小環境の免疫抑制機構に抵抗性のCAR-T細胞による固形がん治療

研究課題名(英文) Solid cancer treatment with CAR-T cells resistant to the immunosuppressive mechanism of cancer microenvironment

研究代表者

王立楠 (Wang, Linan)

三重大学・医学系研究科・特任助教(研究担当)

研究者番号：00589484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、以前の研究では、ヒトのようにCEAを生理学的に発現する腫瘍保有CEA-Tgマウスを使用して、我々は証明した。固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の有効性をさらに高めるためには、免疫抑制を克服する必要がある。我々は外部ドメインにおけるCEAに特異的なscFvならびにCD3ゼータおよびGITRシグナル伝達エンドドメイン(CEA-zGCAR)からなるCARを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、前述のがん微小環境における免疫抑制シグナルに抵抗性のGITRシグナル伝達ドメインを搭載したCEA特異的CAR(zG型-CAR)導入T細胞の固形がんに対する有効性と優位性を、SHP2の脱リン酸化作用により失活する28z型CARとの比較により明らかにする。これにより、固形がん特有ながん微小環境における免疫抑制機構を回避できるCAR-Tによる細胞輸注療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, using tumor bearing CEA-Tg mouse that physiologically express CEA in a manner like human, we have demonstrated: CEA-specific CAR-based adoptive T cell therapy may be effective for patients with solid tumors, but associates with symptom of cytokine release syndrome that leads anorexia. But administration of anti-IL-6R antibody successfully controlled cytokine releasing syndrome-like symptoms. Taken as a whole, these results suggest that CEA-specific CAR-based adoptive T cell therapy may be effective for patients with CEA+ solid tumors. To further augment the efficacy of CAR-T cell therapy against solid tumors, the immunosuppression should be overcome.

In the present study, we have developed a CAR consisting of a scFv specific to CEA in the ectodomain and CD3zeta and GITR signaling endodomain (CEA-zG.CAR). To further augment the efficacy of CAR-T cell therapy against solid tumors, the immunosuppression should be overcome.

研究分野：腫瘍免疫細胞治療学

キーワード：CAR CEA GITR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における癌患者の罹患率と死亡率は年々増加傾向にあり、有効な新規治療法として、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 輸注療法に期待が高まっている。最近、腫瘍細胞表面上に発現されるがん抗原(TAA)を認識するモノクローナル抗体を単鎖抗体化(scFv)し、T細胞受容体(TCR)と副刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加したキメラ抗原受容体(CAR)を導入したT細胞(CAR-T)を用いた細胞輸注療法は、造血管腫瘍に対する臨床試験において驚くべき治療効果を発揮した。このことから、CAR-T輸注療法の固形がんへの拡大適応が期待されている。CAR-TはTCR導入T細胞(TCR-T)とは異なり、主要組織適合性抗原(MHC)非依存的にがん抗原を認識・破壊でき、より広範囲の患者を対象にできる。また、固形がんに頻出するMHC欠落腫瘍細胞にも対応可能であること、CAR-Tは抗原提示細胞上の副刺激分子非依存的に活性化されるため、直接標的腫瘍によって強く活性化されるなどの長所を持つ。しかし、造血管腫瘍とは異なり、固形がん特有のがん微小環境は数々の免疫抑制機構が発達しているため、適切な副刺激シグナルの選択に基づいたCAR-Tの調製と前処置を含めた輸注法の確立が必要である。ところで、T細胞輸注療法において輸注したT細胞が増殖するための“スペースを空ける”必要がある。このため骨髄破壊性もしくはリンパ球減少性の前処置が施されるが、これが輸注T細胞の活性化を抑制する“制御性T細胞(Treg)を含む免疫抑制性細胞を除く”ことにもつながっている。しかし、前処置の強度に応じて患者の負担も増し、毒性も高まる。また、癌患者の多くはT細胞輸注療法に先立って前治療を施されており、前処置の毒性強度が予期せぬほど高まることわかってきた。従って、前処置の強度を可能な限り低下させても輸注T細胞の生存が患者体内で維持され、免疫抑制性細胞による活性化抑制に抵抗力を持ったCAR-Tが必要である。腫瘍特異的TCR-T輸注治療マウスモデルにおいて、Treg 除去あるいは腫瘍細胞上に発現するPD-L1に対する抗体投与の単独処理は腫瘍増殖を制御できないが、両者を併用することにより輸注TCR-Tによる腫瘍増殖を強く増強することが報告されている(J Immunol 2013;190:4899)。したがって両者はがん微小環境における免疫抑制状態に寄与する重要な因子であると考えられる。

2. 研究の目的

以前の研究では、ヒトのようにCEAを生理学的に発現する腫瘍保有CEA-Tgマウスを使用して証明した。固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の有効性をさらに高めるためには、免疫抑制を克服する必要がある。我々は外部ドメインにおけるCEAに特異的なscFvならびにCD3ゼータおよびGITRシグナル伝達エンドドメイン(CEA-zGCAR)からなるCARを開発した。

3. 研究の方法

研究代表者らは、CD3zとCD28由来のシグナル伝達ドメインを搭載したCEA特異的CAR(28z型-CAR)マウスT細胞に導入し、ヒトと同様のCEA発現様式を示すCEAトランスジェニックマウス(CEA-Tg)を用いて、CEA陽性腫瘍担癌7日目に輸注する治療モデル系での抗腫瘍効果と安全性の評価を行ってきた。その結果、28z型CAR-T輸注と共に骨髄破壊性の前処置を施すと強い治療効果を発揮したがマウスは突然死を起こした。一方、リンパ球減少性の前処置では抗腫瘍効果は減弱するものの、一定の治療効果が得られた(Oncoimmunol ,25:5(9)e1211218.2016)。

そこで本研究では、前述のがん微小環境における免疫抑制シグナルに抵抗性のGITRシグナル伝達ドメインを搭載したCEA特異的CAR(zG型-CAR)導入T細胞の固形がんに対する有効性と優位性を、SHP2の脱リン酸化作用により失活する28z型CARとの比較により明らかにする。これにより、固形

がん特有ながん微小環境における免疫抑制機構を回避できるCAT-Tによる細胞輸注療法の開発を目指す。

4. 研究成果

研究代表者らはCD3zとCD28由来のシグナル伝達ドメインを搭載した CEA特異的CAR(28z型-CAR) マウスT細胞に導入し、ヒトと同様のCEA発現様式を示すCEAトランスジェニックマウス(CEA-Tg) を用いてCEA陽性腫瘍担癌7日目に輸注する治療モデル系での抗腫瘍効果と安全性の評価を行ってきた。その結果、28z型 CAR-T輸注と共に骨髓破壊性の前処置を施すと強い治療効果を発揮したがマウスは突然死を起こした。一方、リンパ球減少性の前処置では抗腫瘍効果は減弱するものの、一定の治療効果が得られた。

そこで本研究では、前述のがん微小環境における免疫抑制シグナルに抵抗性のGITRシグナル伝達ドメインを搭載したCEA特異的CAR(zG型-CAR) 導入T細胞の固形がんに対する有効性と優位性を、SHP2の脱リン酸化作用により失活する28z型CARとの比較により明らかにする。(1)これにより、固形がん特有ながん微小環境における免疫抑制機構を回避できるCAT-Tによる細胞輸注療法の開発を目指す。研究代表者ら(1)CEA特異的CAR-T細胞(zG-CAR及び28z-CAR)を用いて*in vitro*で機能assay検討した(図1)。

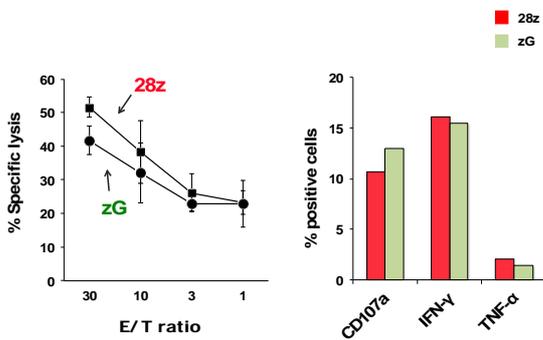
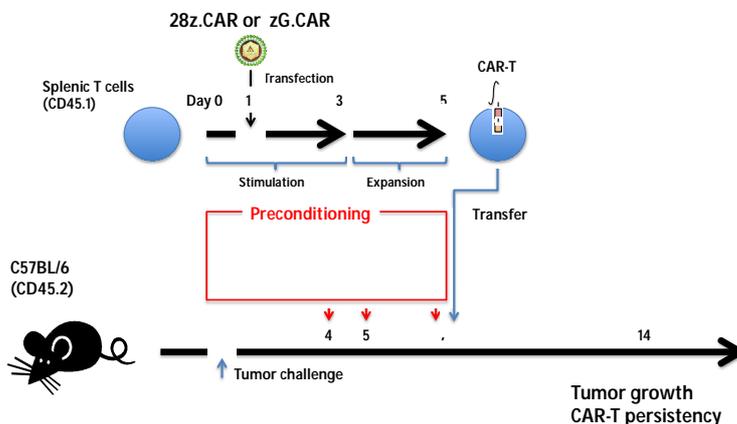


図 1

(2) *In vivo*でzG-CAR T細胞は強く抗腫瘍を発揮した(図2)。



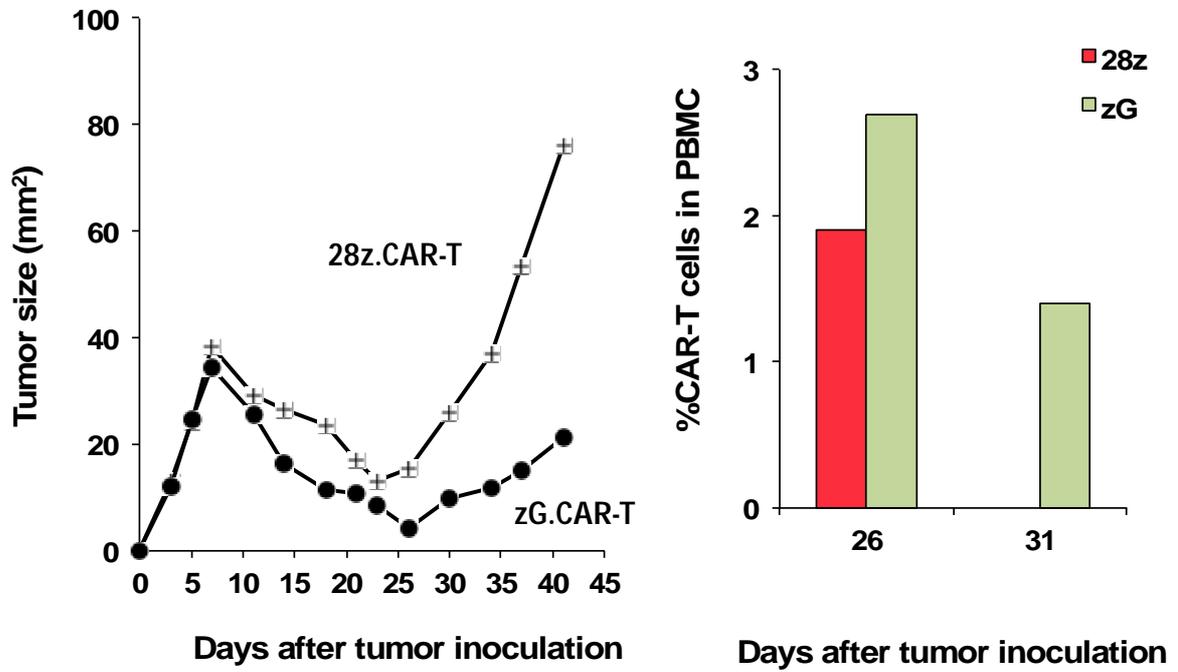


図 2

(3) zG.CAR-細胞は *in vitro* で Treg 介して抑制に抵抗性を示し、Treg 存在下で優れた腫瘍増殖抑制を示した (図 3)。

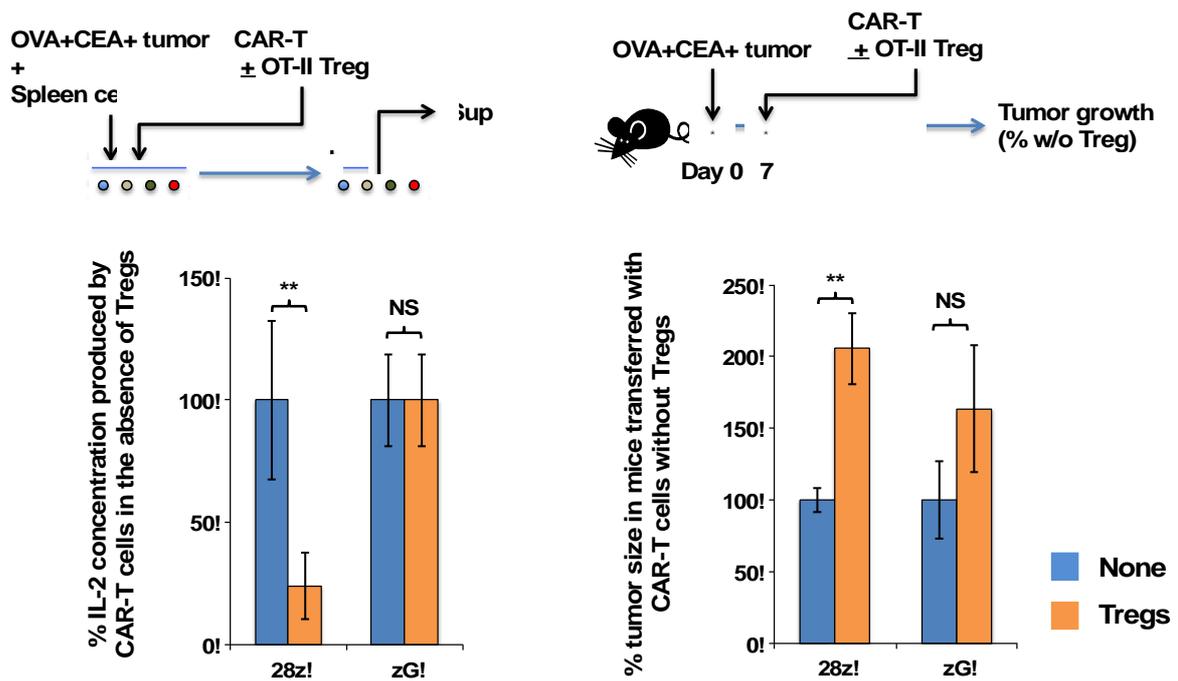


図 3

(4) In vitro で PD-1 / PD-L1 blockade すると CEA 陽性腫瘍と相互作用 zG.CART 細胞の IFN- γ 産生を増強しなかった (図4)。

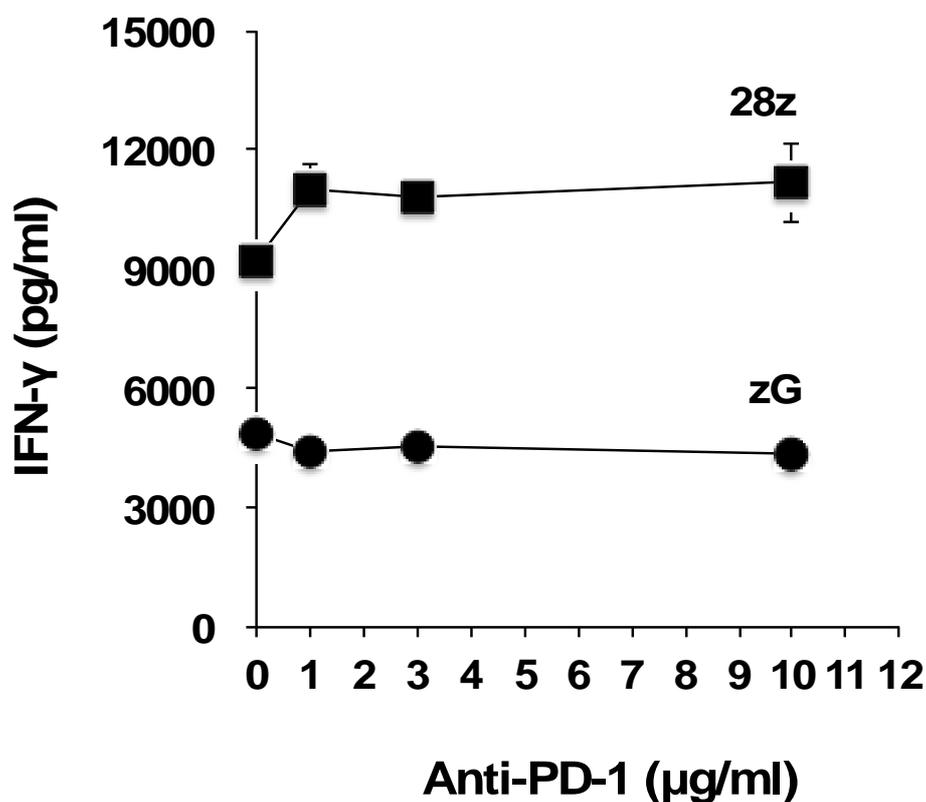


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yasushi Akahori, Linan Wang Motohiro Yoneyama, Motohiro Yoneyama, Motohiro Yoneyama, Takuma Kato, and Hiroshi Shiku. (2018) Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. *Blood* 132(11):1134-1145. doi: 10.1182/blood-2017-08-802926. 査読有。
2. Linan Wang, Ning Ma, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Eiichi Sato, Naohiro Seo, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Takuma Kato and Hiroshi Shiku. (2016) Efficient Tumour Regression by Adoptively Transferred CEA-Specific CAR-T Cells Associated with Symptoms of Mild Cytokine Release Syndrome. *Oncoimmunol* ,25:5(9) e1211218. 査読有。

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 琢磨

ローマ字氏名： (Kato , Takama)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60224515

+ + + + +

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。