

令和元年5月29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：16K09533

研究課題名(和文) CEA特異的キメラ抗原受容体導入Tregを用いた難治性喘息に対する新規治療

研究課題名(英文) Therapeutic potential of Tregs transduced with CEA specific CAR in sever asthma

研究代表者

加藤 琢磨 (KATO, Takuma)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60224515

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)：制御性T細胞(Treg)は種々の炎症疾患制御に寄与している。Tregが免疫抑制活性を發揮するには特異抗原により活性化されることが必要であるが、消化管や気管の上皮細胞に発現しているCEAに特異的なキメラ抗原受容体をTregに導入して抗原特異性を付与し、Tregの特性であるBystander抑制作用を利用して炎症性T細胞の機能を阻害し気道炎症抑制作用の検討を試みた。CEA特異的CAR導入Tregの抗原特異的制御活性をin vitroで確認できた。OVA感作・暴露により気道炎症を誘発した喘息マウスモデルを用いてCEA特異的CAR導入Treg輸注による気道炎症抑制作用を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、気管支喘息患者の炎症局所、即ち気道上皮に恒常的に発現しているCEAでTregを活性化することで様々な疾患起因アレルゲンに対する過剰免疫応答によって発症する気管支喘息を制御することに特色があり、ステロイドによる炎症抑制作用とは作用機序が異なり、難治性喘息患者に対して有効な新規治療法となり得る。また、免疫抑制は炎症局所に限定し全身性の免疫抑制を伴わないことが期待され、感染症に対する抵抗力を削ぐことが無く、全身的な免疫抑制を伴う治療法に比較して優れた治療法になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) play an important role not only in immunological self-tolerance but also in various inflammatory diseases. In this study, we explored the possibility that Tregs redirected toward carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on lung epithelia have potential to control allergic airway inflammation. Retrovirally transduced Tregs with chimeric antigen receptor (CAR) gene constituting scFv specific to CEA as an ectodomain and signaling domains derived from CD3zeta and CD28 as an endodomain exerted potent regulatory activity in vitro. Using a mouse model of allergic asthma, the effect of adoptively transferred CEA-specific CAR-Tregs on airway inflammation will be examined.

研究分野：免疫学

キーワード：キメラ抗原受容体 制御性T細胞 T細胞輸注療法 癌胎児性抗原 喘息

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

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の気管支喘息の有病率は100万人程度で増加傾向にあるが、喘息患者の多くは低容量のステロイドによって安定した経過が得られる。しかし、高容量のステロイドによっても症状がコントロールできない重症・難治性喘息患者が10%程度存在し、新規治療法の開発が望まれている。生体には免疫応答を専ら負に制御する制御性T細胞(Treg)が存在し、免疫的自己寛容の維持に必要なだけでなく、様々な生理的あるいは病的な免疫応答の制御においても重要な役割を果たすT細胞亜集団である。こうしたことからTreg機能を誘導・強化することで気管支喘息を含む種々の炎症性疾患の治療に応用することが期待されており、これを支持する多くの前臨床実験結果が報告されている。ところで、Tregが免疫抑制活性を発揮するためには特異抗原によって活性化されることが必要である。したがって、Tregを用いた炎症制御には極めて頻度の低い特定の抗原に特異的なTregの選別し輸注することが必要となる。しかし、ひとたび活性化されたTregは抗原非特異的に近傍局所の免疫応答を抑制(Bystander抑制)できることから、炎症の原因となる抗原に特異的なTregでなくとも、炎症局所に輸注Tregの標的抗原が存在すれば炎症抑制効果が期待できる。したがって、炎症に伴って肺局所に出現する抗原に対して特異性を付与したTregを大量に調製し輸注することができれば、起因アレルゲンの種類を問わず重症・難治性喘息患者に対して有効な治療法となり得る。癌胎児性抗原(CEA)は、胎児組織や癌組織だけでなく、健康人の気道・消化管組織の上皮細胞にも恒常的に発現している。通常その発現は細胞極性により管腔側の細胞表面に限局して免疫系細胞には不可視であり、また血中への流失もない。しかし慢性炎症部位では極性を失い発現量も上昇する(Clin J Gastroenterol 2012;5:150)。気管支喘息患者においても、患者血清のCEA濃度は健康人に比して高値を示し、疾患活動度との相関を示すことが報告されている(日胸 1994;32:220、日胸 1997;35:883)。従って、CEAは喘息患者においてTregによる炎症制御機能のスイッチをオンにする標的として有望と考えられる。キメラ抗原受容体(CAR)とは細胞表面上に発現される抗原を認識するモノクローナル抗体を単鎖抗体(scFv)化し、細胞内ドメインにT細胞受容体(TCR)や副刺激分子のシグナル伝達部位を付加したもので、その導入により種々の細胞に主要組織適合性抗原(MHC)非依存的な抗原特異性を付与することができ(Trends Immunol 2015;36:494)、CARを導入したマウスとヒトTregが抗原特異的活性化により制御機能を発揮することも明らかになっている(Clin Immunol 2014;150:51)。これらの点から、CEA特異的CAR導入Treg(CAR-Treg)を用いた細胞輸注療法は、重症・難治性気管支喘息に対する新規治療法としての可能性を十分に満たしていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、消化管や気管の上皮細胞に発現している癌胎児性抗原に特異的なキメラ抗原受容体をTregに導入して抗原特異性を付与し、Tregの特性であるBystander抑制作用を利用して難治性喘息患者に対する新規細胞輸注療法開発のための基盤的研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) CAR導入制御性T細胞の調整

マウス脾臓からCD4陽性CD25陽性T細胞、あるいはCD8陽性T細胞をソーティングにて精製した。BDF1マウスのCD4陽性CD25陽性T細胞を同系骨髄由来樹状細胞を用いてSyngeneic mixed lymphocyte reactionを行い、限界希釈法にて樹立した制御性T細胞クローンをを用いた(Jpn J Hyg 2010;65:530)。これらのT細胞に、研究代表者らが樹立したヒト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

固相化 CEA または CEA 発現腫瘍で CEA 特異的 CAR 導入 CD8 T 細胞を刺激する際に、CEA 特異的 CAR を導入し他制御性 T 細胞または制御性 T 細胞クローンを共存させ、CAR 導入 CD8 T 細胞のサイトカイン産生を ELISA 法もしくは細胞内サイトカイン染色法にて、増殖を CFSE dilution 法にてそれぞれ測定した。

#### (3) in vivo における機能評価 (王立楠)

ヒトと同様の発現様式 (気道・消化管の管腔側における限定的発現) を示す CEA トランスジェニックマウス (CEA-Tg) (Oncoimmunology 2016;5:w1211218) に、定法に従った OVA 感作 / 暴露による気道炎症を誘発する。OVA 暴露時に上述の CAR 導入制御性 T 細胞を輸注し、48 時間後の気管支肺胞洗浄液中の好酸球数を測定すると共にサイトカイン (IL-4, IL-5, IFN-g) を ELISA 法により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 制御性 T 細胞への CAR 導入

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制御性 T 細胞への導入効率は低く、また制御性 T 細胞の特性である in vitro における低増殖性から、得られる細胞数も限られていた。

#### (2) 制御性 T 細胞クローンへの CAR 導入

そこで、制御性 T 細胞クローンへの CAR 導入を試みた。BDF1 マウスから骨髄細胞を採取し、GM-CSF 存在下に 7 日間培養することで骨髄由来樹状細胞を調製した。骨髄由来樹状細胞をマイトマイシン C 処理により増殖を阻害した上で、制御性 T 細胞クローンを刺激し、3 日目に死細胞 (骨髄由来樹状細胞) を FicolI 法にて除去、IL-2 存在下にレトロウイルスベクターを用いて CAR を導入した。その結果、高い効率で CAR 発現が誘導されまた、細胞収率も良好であった。

#### (3) CAR 導入制御性 T 細胞クローンの in vitro 制御性 T 細胞機能確認

CAR 導入 T 細胞クローンの制御性 T 細胞活性を、in vitro で検討したところ、CAR 導入 CD8 T 細胞のサイトカイン産生、増殖を抑制した。

#### (4) CAR 導入制御性 T 細胞クローンの気道炎症抑制作用

CAR 導入に用いた制御性 T 細胞クローンは BDF1 由来であり H-2b/d を発現する。その標的抗原は不明であるものの H-2d を認識、活性化されるが、H-2b には反応しない。気道炎症マウスモデルを用いる予定の CEA-Tg マウスは H-2b であるため、CAR 導入制御性 T 細胞は拒絶されてしまう。そこで、研究代表者等が見いだした抗原感作後の紫外線照射による移植片拒絶抑制系 (Ann Transplant 2014;19:519) を用いて H-2d に対する寛容を誘導した CEA-Tg マウスを作製した。このマウスに CAR 導入制御性 T 細胞クローンを輸注し、生着を確認した。現在、このマウスを用いて CAR 導入制御性 T 細胞クローンの気道炎症抑制作用を検討する予定である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Akahori Y, Wang L, Yoneyama M, Seo N, Okumura S, Miyahara Y, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Maki T, Fujiwara H, Akatsuka Y, Kato T, Shiku H. Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. Blood. 2018;132:1134-1145. DOI: 10.1182/blood-2017-08-802926. 査読有り

Hori, T., S. Uemoto, K. Saito, K. Kuribayashi, Y. Hori, and T. Kato. Challenge of ex vivo-stimulated CD4(+)CD25(+) regulatory T cell-mediated alloantigen-specific immunosuppression by murine cardiac transplantation. Transplant Immunology. 2017;40:72-73. DOI: 10.1016/j.trim.2016.12.005. 査読有り

加藤琢磨. 腸内細菌とがん免疫応答性. 遺伝子医学 MOOK. 2017;31:55-59. 査読無し

Wang, L., N. Ma, S. Okamoto, Y. Amaishi, E. Sato, N. Seo, J. Mineno, K. Takesako, T. Kato, and H. Shiku. Efficient tumor regression by adoptively transferred CEA-specific CAR-T cells associated with symptoms of mild cytokine release syndrome. Oncoimmunol. 2016;5:e121128. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1211218. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

Okumura S, Kato T, Wang Y, Hayashi T, Shirakura K, Ikeda H, Wang L, Miyahara Y, Tanaka Y, Shiku H. Promising use of gene-modified T cells for Cancer Immunotherapy. 第77回日本癌学会学術総会、2018年

Akahori Y, Wang L, Yoneyama M, Seo N, Okumura S, Miyahara Y, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Maki T, Fujiwara H, Akatsuka Y, Kato T, Shiku H. Anti-tumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. 第77回日本癌学会学術総会、2018年

Akahori Y, Wang L, Yoneyama M, Seo N, Okumura S, Miyahara Y, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Maki T, Fujiwara H, Akatsuka Y, Kato T, Shiku H. Anti-tumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. 第22回日本がん免疫学会総会 2018年

Linan Wang, Ning Ma, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Eiichi Sato, Naohiro Seo, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Takuma Kato and Hiroshi Shiku. Efficient Tumour Regression by Adoptively Transferred CEA-Specific CAR-T Cells Associated with Symptoms of Mild Cytokine Release Syndrome which can be treated by anti-IL-6 receptor without compromising its efficacy. 第76回日本がん免疫学会学術総会、2017年

Linan Wang, Ning Ma, Sachiko Okamoto, Yasunori Amaishi, Eiichi Sato, Naohiro Seo, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Takuma Kato and Hiroshi Shiku. Efficient Tumour Regression by Adoptively Transferred CEA-Specific CAR-T Cells Associated with Symptoms of Mild Cytokine Release Syndrome which can be treated by anti-IL-6 receptor without compromising its efficacy. 第21回日本がん免疫学会総会 2017年

〔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：王 立楠  
ローマ字氏名：(WANG, Linan)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：特任助教（研究担当）  
研究者番号（8桁）: 00589484  
研究分担者氏名：宮原 慶裕  
ローマ字氏名：(MIYAHARA, Yoshihiro)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）: 10582083

(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。