

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591899

研究課題名(和文) 癌胎児性抗原特異的キメラ抗原受容体導入T細胞による消化器癌治療法の開発

研究課題名(英文) EFFICACY AND SAFETY OF T CELLS WITH CEA-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

研究代表者

王立楠(WANG, Linan)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) マウス型CEA特異的CARレトロウイルスベクターコンストラクトの作成とマウスT細胞への導入。(2) マウス型CAR導入マウスT細胞のin vitro機能評価。(3) リンパ球減少性の前処置との併用によりCEA特異的CAR導入T細胞輸注は、抗腫瘍効果を発揮した。(4) 輸注したCAR-TはWTとCEA-Tgマウスにおいて同程度の抗腫瘍効果を発揮したが、CEA-Tgマウスにのみ重篤な体重減少を誘導した。(5) CAR-T輸注によりWTとCEA-Tgマウスの肺に炎症が見られた。(6) CEAを標的としたCAR導入T細胞輸注療法は有効だが、安全性に十分な注意を払う必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1) Retrovirus vector composed of anti-CEA scFV and signaling domain of human or mouse CD3 and CD28 successfully transduced human or mouse T cells, respectively, to express functional CAR. (2) Adoptive therapy with CEA-specific CAR expressing human T cells to tumor bearing lymphopenic NOG mouse inhibited growth of CEA positive, but not CEA negative, tumor. (3) Likewise, adoptive therapy with CEA-specific CAR expressing mouse T cells to tumor bearing lymphoreplete CEA-Tg mouse inhibited growth of CEA-positive tumor only when the mouse received lymphodepleting preconditioning. (4) However, this tumor growth inhibition was associated with inflammation in lungs in a manner independent of CAR-specificity and severe weight loss in a manner dependent of CAR-specificity. (5) CEA-specific CAR-T cells induce systemic cytokine response that could induce anorexia in CEA-Tg. (6) CEA-specific CAR-T cells induce malnutrition in CEA-Tg.

研究分野：遺伝子免疫分子治療学

キーワード：CEA-Tgマウス CAR-T細胞

1. 研究開始当初の背景

日本における大腸がんによる総死者数は年々増加傾向にあり、さらには今後の人口の高齢化に伴い、2020 年度には男女とも罹患数・罹患率が悪性疾患の中で第一位となると予想されている。現在の所、進行がんに対しては、手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた集学的治療が行われる。しかしながら、多発腫瘍や中枢神経腫瘍では、手術的全摘出は困難であり、また、放射線治療や化学療法の繰り返しは、がん細胞の放射線抵抗性あるいは抗がん剤抵抗性を誘導し、がん再発の一因となる。近年、がんに対する新たな治療法として、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集まっている。その中で、腫瘍細胞表面上の癌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、主要組織適合性抗原非依存的に抗原認識が可能であり、多くのがん患者に適応可能である。事実、慢性リンパ性白血病患者を対象とした CD19 特異的 CAR 導入 T 細胞輸注療法はめざましい成果を上げている。一方で、固形腫瘍に対する有効性と安全性に関しては明らかでは無い。癌胎児性抗原 (CEA) は、大腸癌を筆頭に多くの癌種で発現が認められ、CAR 導入 T 細胞輸注療法の望ましい標的となり得る。しかしながら、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安全性は十分に確保されなければならない。故に、ヒトと同様の CEA 発現様式 CEA トランスジェニックマウス (CEA-Tg) 治療モデルが必要である。CEA を標的として CAR-T 輸注療法の有効性と安全性が期待する。

2. 研究の目的

キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen

Receptor; CAR) を利用した遺伝子改変 T 細胞輸注療法は血液腫瘍においてめざましい効果を示しているが、固形がんに関してその有効性は明らかではない。本研究では、癌胎児性抗原 (CEA) を自己抗原としてヒトと同様の発現様式を示す CEA トランスジェニックマウスを用いて、CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞輸注療法の固形腫瘍に対する有効性と安全性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 副刺激分子由来の細胞内シグナル伝達ドメインを付加した CEA 特異的 CAR レトロウイルスベクターコンストラクトの作成ヒト 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 (作成済み) を用いて、マウス脾臓 T 細胞に感染・導入した。CAR の導入効率をビオチン化 CEA を用いた細胞表面染色により解析した。

(2) マウス型 CAR 導入マウス T 細胞の *in vitro* 機能評価 (加藤琢磨)

調製した CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞を CEA 陽性腫瘍細胞株 (マウス大腸腫瘍細胞 CEA トランスフェクタント MC32a) と共培養することで、抗原特異的サイトカイン産生と細胞傷害性を確認した。

(3) ヒトと同様の CEA 発現様式をもつ CEA トランスジェニックマウス (CEA-Tg) 治療モデルを用いた *in vivo* での CAR 導入 T 細胞の有効性と安全性評価 CEA-Tg マウスはヒト CEA プロモーター領域を含む CEA 遺伝子を組み込んだマウスであり、CEA を自己抗原としてヒトと同様の発現様式を示す。 *in vitro* で機能を確認した CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞を担癌させた CEA-Tg マウスに輸注し、腫瘍縮小効果ならびに正常組織傷害作用の面から評価した。また、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) を含めた CEA 特異的 CAR

導入T細胞輸注による抗腫瘍効果の増強を安全性の確認を行った。

4. 研究成果

(1) マウス型 CEA 特異的 CAR レトロウイルスベクターコンストラクトの作成し、マウス T 細胞への導入した。CAR 導入マウス T 細胞を用いた移入治療モデルが必要である。そこで、移入 T 細胞のマウスによる拒絶を防止するために、CEA 特異的 CAR のシグナル伝達ドメインの遺伝子を全てマウス相同遺伝子と変換したマウス型 CAR レトロウイルスベクターを作製し、マウス型 CAR コンストラクトはマウス T 細胞に対して高い導入効率を示した。

(2) マウス型 CAR 導入マウス T 細胞の in vitro 機能評価。CAR-T は抗原特異的にサイトカイン産生と細胞障害活性を示しました。

(3) リンパ球減少性の前処置との併用により CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞輸注は、抗腫瘍効果を発揮した。輸注した CAR-T の生体内動態を解析したところ、前処置により輸注 CAR-T の生体内の生存性が高まっていました。

(4) 輸注した CAR-T は WT と CEA - Tg マウスにおいて同程度の抗腫瘍効果を発揮したが、CEA-Tg マウスにのみ重篤な体重減少を誘導した。

(5) CAR-T 輸注により WT と CEA-Tg マウスの肺に炎症が見られた。

(6) CEA を標的とした CAR 導入 T 細胞輸注療法は有効だが、安全性に十分な注意を払う必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔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, 519-36. 査読有り、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, 2110-8. 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、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

王立楠 (WANG, Linan)

三重大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00589484

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

()

研究者番号：