

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 年 03 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：王立楠

所属機関名：三重大学

所属部署名：大学院医学系研究科 職名：特任助教

所在地：三重県津市江戸橋 2-174

電話：059-231-5187（直通） 内線：



1. 助成金額： 80 万 円

2. 研究テーマ

CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する養子免疫療法の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：王 立楠

職名：特任助教

所属機関名：三重大学大学院医学系研究科

部署名：遺伝子免疫
細胞治療学

中国側研究者氏名：丁 曉慧

職名：教授

所属機関名：瀋陽医学院

部署名：病理学

4. 当該研究における発表論文等

1. Shirakura, Y., Mizuno, Y., Wang, L., Imai, N., Amaike, C., Sato, E., Ito, M., Nukaya, I., Mineno, J., Takesako, K., Ikeda, H., and Shiku, H. 2011. TCR gene therapy targeting MAGE-A4 inhibits human tumor growth in NOD/SCID/γc(null) mice. Cancer Science, 103(1):17-25.

5. 成果の概要

別紙添付

－日中医学協会助成事業－

CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する

養子免疫療法の開発

日本研究者氏名 特任助教 王立楠

日本所属機関 三重大学大学院医学系研究科

中国研究者氏名 丁 曉慧

中国所属機関 瀋陽医学院

要旨

本研究では、複数種類のヒトシグナル伝達ドメインを付加した癌胎児性抗原 (CEA) 特異的 CAR のレトロウイルスコンストラクトを用いてヒト末梢血 T 細胞に導入し、in vitro における機能評価と NOG マウスを用いて in vivo における抗腫瘍効果を評価した。その結果、従来から研究が進められている CD3z と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CAR (28z) に加えて、申請者等が明らかにした CD4T 細胞や CD8T 細胞に制御性 T 細胞抵抗性を付与する GITR シグナル伝達ドメインを付加した CAR (zG) 導入 T 細胞が、極めて有効であることを見いだした。ヒトと同様の CEA 発現パターンを示す CEA トランスジェニックマウスに大腸発がんを誘発し、CEA 特異的 CAR を導入したマウス T 細胞を用いて、さらなる有効性と安全性を評価するための治療モデルを確立する目的で、細胞内シグナル伝達ドメイン (CD3z、CD28、GITR) をマウス型に置き換えたエコトロピックウイルスを作製し、マウス T 細胞を用いてその発現と in vitro における機能評価を行った。その結果、マウス T 細胞においても機能的な CAR の発現が誘導できた。

Key Words キメラ抗原受容体、がん治療、複刺激シグナル分子

緒言

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、既存の治療法の改良に加えて、新規治療法の開発が積極的に行われてきている。なかでも、人工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。その一つとして人為的に腫瘍特異性を付与した遺伝子改変 T 細胞を輸注する方法が注目されている¹。これまで、腫瘍細胞の細胞表面上の主要組織適合性抗原 (MHC) と腫瘍特異的抗原因由来のペプチドとの複合体を認識する T 細胞受容体 (TCR) を、ウイルスベクターを用いて導入・改変した自己 T 細胞を利用した臨床試験が行われてきた。しかしながら、この療法には「ある特定の MHC に拘束されるために投与可能な患者数が制限されてしまう」、「MHC を欠落している腫瘍細胞が存在する」という短所がある。この問題を解決するための新たな試みとして、腫瘍細胞表面上に発現されるがん抗原を認識するモノクローナル抗体を T 細胞受容体として用いる方法が開発された。単鎖抗体 (scFv) と T 細胞受容体 (TCR) や副刺激分子のシグナル伝達ドメインからなるキメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor; CAR) を導入した T 細胞は MHC 非依存性にごん抗原を認識し破壊できることから、対象となるがん抗原を持つより広範囲の患者に適応可能となる長所を持つ。今までに複数の CAR 臨床試験が施行されてきたが、in vitro 評価系において優れた機能の発揮する CAR が、必ずしも優れた臨床効果を示していない。即ちこれまでの CAR 遺伝子導入 T 細胞は、in vitro での機能評価系を指標に順次開発されてきたものの、in vivo である

臨床効果との間に乖離が見られている。また、TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法で見られた程の有効性が、未だ CAR 臨床試験では確認されていない。このような期待に反する結果の理由として、投与後の抗腫瘍効果を予測するための in vivo での機能評価系が未成熟であることが挙げられる。現状では、投与薬剤そのものであるヒト T 細胞生体内細胞やヒトがん細胞は、マウス等の宿主の免疫系により拒絶される為に単純に投与することが出来ず、これまでの改変 T 細胞輸注療法における安全性、薬理薬効はほとんど実験動物では検証されないままに臨床研究が開始されてきた。最近になって、T 細胞移入細胞療法では、移入 T 細胞の生体内における長期生存性が優れた臨床効果を発揮するために必須の条件であることが明らかになり、in vivo での評価系が切望されている。本研究では、GITR を含む様々な副刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加した癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen; CEA) 特異的 CAR 導入 T 細胞を作製し、ヒト T 細胞が生着可能な重度免疫不全マウスである NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG) マウス及び CEA トランスジェニックマウスを用いた in vivo 評価系を樹立した。

材料と方法

マウス

8 週令前後の重度免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG)) は公益財団法人実験動物中央研究所より購入、使用した。8 週令前後の C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入、使用した。ヒト CEA プロモータ領域を含む CEA トランスジェニックマウス² (C57BL/6 バックグラウンド) は Wolfgang Zimmermann 教授 (Institute of Immunobiology, University of Freiburg, Germany) より御供与いただき、三重大学動物実験施設において飼育・繁殖した。

細胞

同意書による同意を得た上で、健常人末梢血から Ficoll 法により末梢血単核球を分離した。マウス細胞は、マウス脾臓をナイロンメッシュにてほぐし、単一細胞懸濁液を調製した。ヒト由来の CEA 陽性胃癌細胞株 (MKN45) と CEA 陰性胃癌細胞株 (MKN1) は対数増殖期に使用した。

ウイルスコンストラクト

CEA 特異的単鎖抗体に図 1 に示すシグナル伝達分子の細胞内ドメインを付加した CAR コンストラクトを含むレトロウイルスを作製、使用した。

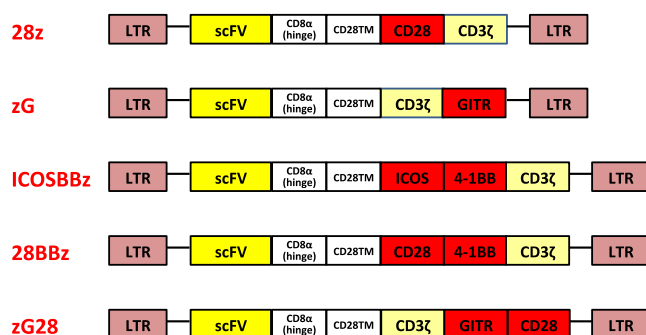


図 1. CARコンストラクト

発がん実験

CEA-Tg マウスに AOM (10 mg/kg) を投与しその 1 週間後に 1% DSS を飲水にて反復投与 (7 日間連続、7 日間休止を 3 サイクル) を開始して、大腸発がんを誘発した。

結果

複刺激分子 GITR と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR の発現誘導

複刺激分子 CD28、GITR、ICOS、4-1BB のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR のヒト末梢血 T 細胞への導入を比較検討した。その結果、CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR の導入効率が陽性率の面でも発現強度の面でも最も高かった (図 2)。また、その際のレトロウイルスコピー数は最少で (図 3)、安全性が高いことも示唆された。

図2. CAR導入ヒト末梢血T細胞のCAR発現

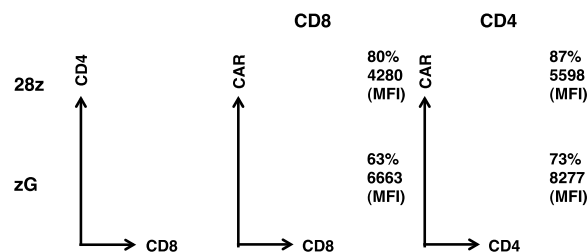
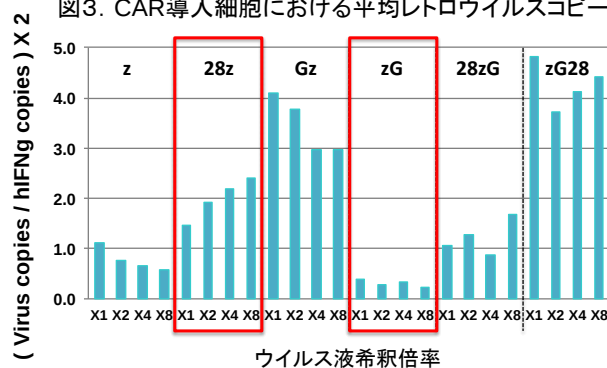


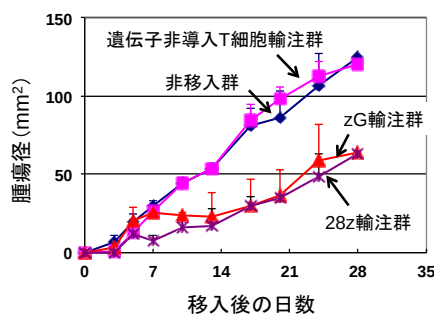
図3. CAR導入細胞における平均レトロウイルスコピー数



複刺激分子 GITR と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR の in vivo での抗腫瘍効果

次に in vivo での有効性を評価する目的で、ヒト癌細胞が生着可能な NOG マウスに CEA 陽性胃癌細胞株 MKN45 を接種すると同時に CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞を輸注し、腫瘍縮小効果を評価した。その結果、CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR を導入したヒト T 細胞は抗腫瘍効果を発揮した (図 4)。

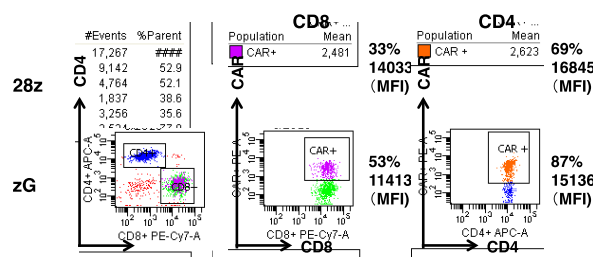
図4. CAR導入T細胞輸注NOGマウスにおけるCEA陽性ヒト胃癌細胞株MKN-45の増殖抑制



マウス T 細胞への CAR 導入

NOG マウスはヒト細胞が生着可能であるが、ヒト T 細胞を移入した場合は移植片対宿主病を発症してしまし、長期のわたる CAR 導入 T 細胞の有効性やまた安全性を評価することはできない。そこで、マウス T 細胞を用いた治療評価系を樹立する目的で、シグナル伝達ドメインをマ

図5. CAR導入マウス脾臓T細胞のCAR発現

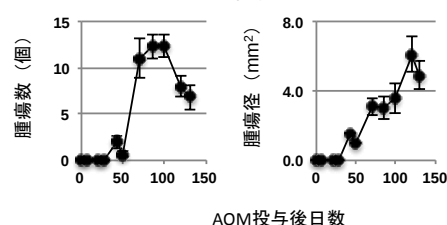


ウス型に置き換えた CAR コンストラクトを作製し、マウス T 細胞への導入効率を検討した。ヒトにおいて導入効率の高かった CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR を検討対象とした。その結果、マウスにおいても十分に発現が誘導できた (図 5)。

マウス大腸がん系を用いた有効性と安全性評価系の樹立

正常状態でヒトと同様の発現パターン、即ち正常大腸上皮細胞の管腔側に弱く発現しする CEA トランスジェニック (CEA-Tg) マウス (C57BL/6 background) を本研究で用いる (導入・繁殖済み)。このマウスは、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により大腸炎症の再燃と寛解を繰り返す潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌を模したモデルを作成すると、発生した大腸癌が CEA を強く発現することが示されている²。したがって、CET-Tg マウスは T 細胞輸注療法の有効性を発がん系で評価するために格好のモデルマウスである。CAR 導入細胞の輸注による治療モデル作製のためには腫瘍発生時期のその後の腫瘍増殖がわかっていなければならない。そこで、C57BL/6 マウスに AOM (10 mg/kg) を投与しその 1 週間後に 1% DSS を飲水にて反復投与 (7 日間連続、7 日間休止を 3 サイクル) を開始して、大腸発がんを誘発し、大腸癌の発生時期と発生した大腸癌の増殖率を明らかにした (図 6)。

図6. AOM/DSS投与マウスの大腸癌発生時期と大腸癌増殖率



考察

本研究により、レトロウイルスベクターを用いたヒト T 細胞への導入において、CD28 と GITR を含む CAR が低ウイルスコピー数で効率よく発現誘導でき、また、*in vivo* でも抗腫瘍効果を発揮したこと、安全性と効率の面でも高いことが明らかになった。NOG を用いた CAR の *in vivo* 有効性評価には限界があるため、マウス型 CAR を作製し、その発現誘導を確認できた。従来、移植癌を用いた抗腫瘍効果の評価の限界点を超えるため、自家発がん系マウスモデルを作製し、発がんのタイミング等を明らかにできた。この 2 点を明らかにできたことで、今後マウス大腸発がん系を用いた CAR 導入 T 細胞の有効性と安全性評価系を確立していく予定である。

参考文献

1. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535–546, 2009.
2. Eades-Perner AM, Vander Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, and Zimmermann W. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994;54:4169–76.