論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成27年度博士課程入学
氏名　加藤　大貴
指導教員名　西村　亮平

論文題目

Development of novel tumor antigen GPC1 specific chimeric antigen receptor transduced T (CAR-T) cells and evaluation of combination immunotherapy with anti-PD-1 Ab
(新規腫瘍抗原GPC1特異的CAR-T細胞の開発及び抗PD-1抗体併用による複合免疫療法の検証)

近年、ヒトの化学療法抵抗性B細胞性白血病リンパ腫に対する新規治療法として、CD19を標的としたキメラ抗原受容体遺伝子導入T(CAR-T)細胞療法が開発された。本療法は8割以上の奏効率という非常に高い治療効果が得られ、現在では標準療法として承認されている。CAR-T細胞療法は、採取した末梢血T細胞に腫瘍特異的抗原を認識する抗体の抗原認識部位とT細胞活性化配列からなるキメラ抗原受容体(CAR)を遺伝子導入し、この腫瘍特異性を付与したT細胞を患者に投与する治療法である。血液腫瘍で認められた高い治療効果から、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法についても、その効果が期待されている。しかし、様々な研究にもかかわらず、未だ明確な治療効果は得られていない。その主要な理由として、CAR-T細胞が正常組織にも反応し致死的な副作用が生じることがあること、投与したCAR-T細胞が固形腫瘍組織内で十分に活性化されないことの2つが挙げられている。固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法で血液腫瘍と同等の治療効果を得るためには、これらの問題を解決することが不可欠となる。

近年、様々なヒト固形腫瘍(食道癌、膵癌、乳癌など)での特異的な高発現が報告されている細胞表面蛋白グリピカン-1(GPC1)は、増殖因子の安定化を担い胎児期の神経発達に関わる分子である。GPC1ノックアウトマウスを用いた解析では、胎児期の脳のわずかな発達遅延が認められるが、成体では異常を認めないことから、発生後の正常組織においては、発現がほとんどない、あるいは発現しているが重要な機能を持たないと考え

られている。したがって、GPC1 は固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の有望な標的抗原の候補であると考えられる。

血液腫瘍と異なり固形腫瘍は強い免疫抑制性の微小環境を有し、生体に備わる抗腫瘍免疫応答から逃避することで、腫瘍の増殖に寄与している。様々な免疫抑制機構が知られているが、なかでも腫瘍に発現する PD-L1 と活性化 T 細胞上に発現する PD-1 の結合を介した抗腫瘍 T 細胞の抑制機構が重要であることが明らかになってきた。実際に、抗 PD-1 抗体による内在性抗腫瘍 T 細胞の抑制解除により様々な固形腫瘍で、奏功する例は限られているものの高い治療効果が認められている。人工抗腫瘍 T 細胞である CAR-T 細胞においても、固形腫瘍に浸潤し、内在性抗腫瘍 T 細胞同様に PD-L1/PD-1 分子を介した抑制を受けると考えられることから、抗 PD-1 抗体と CAR-T 細胞療法を併用することにより、固形腫瘍に対してより有効な複合免疫療法となると期待される。

そこで本研究では、ヒト固形腫瘍に対する GPC1 を標的とした CAR-T 細胞療法および CAR-T 細胞療法と抗 PD-1 抗体併用による複合免疫療法を開発することを目的として、以下の検討を行った。まず、ヒトおよびマウス GPC1 に共親和性を有する抗 GPC1 抗体を作製し、それをもとに、抗 GPC1 CAR ベクターを構築した(第 1 章)。次に、抗 GPC1 ヒト CAR-T 細胞を作製し、*in vitro* 解析および異種移植マウスモデル解析により、ヒト腫瘍に対する抗腫瘍活性を検証した(第 2 章)。最後に、抗 GPC1 マウス CAR-T 細胞を作製し、同種移植マウスモデルでの解析により、副作用、内在性免疫への作用、抗 PD-1 抗体との併用効果を検証した(第 3 章)。

第 1 章では、抗 GPC1 CAR ベクターを構築した。まず、ニワトリを宿主に用いてヒトおよびマウス GPC1 に共親和性を有するニワトリ抗 GPC1 抗体を作製した。作製した抗体を用いて、ヒト GPC1 自然発現ヒト食道扁平上皮癌組織、マウス GPC1 強制発現マウス大腸癌細胞株組織、ヒトおよびマウス全身正常組織の免疫染色をした結果、ヒトおよびマウス GPC1 発現腫瘍組織では強い染色像を認めたが、正常組織では明らかな染色陽性像は認められなかった。次に、本抗体をもとに抗 GPC1 CAR レトロウイルスベクターを構築した。リーダーシークエンスにヒト CD8α由来配列を用い、抗 GPC1 抗体の可変領域配列(重鎖、軽鎖)をリンカーでつなぎ一本鎖抗体配列を作製し、その下流に、ヒト CD28、ヒト CD3ζ配列を配置した抗 GPC1 CAR 配列をレトロウイルスベクター(pMS3-F)に組み込むことで、抗 GPC1 CAR レトロウイルスベクターを構築することができた。ヒトおよびマウス GPC1 に共親和性を有する抗体を取得できたことで、ヒト腫瘍移植マウスモデル、マウス腫瘍移植マウスモデル双方で、同一の抗体由来の CAR-T 細胞による副作用および抗腫瘍活性を評価できると考えられた。免疫染色の結果より、作製した抗 GPC1 抗体はヒト正常組織に対する反応性を認めず、本抗体をもとにした CAR-T 細胞が副作用な

くヒト患者に投与できる可能性が示された。

第2章では、抗GPC1 ヒトCAR-T細胞のGPC1発現ヒト腫瘍に対する抗腫瘍活性を検討した。健常人末梢血単核球を抗CD3抗体(50 ng/ml)を用いて48時間刺激した後、抗GPC1 CARレトロウイルスベクターにより抗GPC1 CARを遺伝子導入した。FACS解析によりCAR発現率を解析した結果、約50%のT細胞上にCAR発現を認めた。次に、ヒトGPC1強制発現ヒト肺癌細胞株(LK2-hGPC1)および GPC1 自然発現ヒト食道扁平上皮癌細胞株(TE14)との共培養法による抗原特異的サイトカイン産生能およびCr51 リリースアッセイによる細胞傷害活性の評価を行ったところ、抗GPC1 ヒトCAR-T細胞がGPC1特異的IFNγ産生能、細胞傷害活性を有することが示された。重度免疫不全NOGマウスにTE14を移植し異種移植マウスモデルを作製し、これに抗GPC1 ヒトCAR-T細胞を投与したところ、有意な腫瘍縮小を認めた(n=5)。その後、腫瘍縮小過程でT細胞を投与したマウスは移植片対宿主病による削痩、致死に至った。作製したCAR-T細胞はヒト患者由来のGPC1自然発現細胞株に対して抗腫瘍効果を示したことから、GPC1陽性ヒト固形腫瘍患者に対して、十分な抗腫瘍効果が期待されると考えられた。しかし、異種移植マウスモデルでは、投与したヒトT細胞がマウス正常組織を認識することによる移植片対宿主病を生じ、副作用の評価はできなかった。

第3章では、同種移植マウスモデルを用い、CAR-T細胞療法のマウス腫瘍に対する抗腫瘍効果ならびに副作用、内在性免疫への作用、抗PD-1抗体との併用による効果について検討した。C57BL/6マウス脾臓細胞をコンカナバリンA(2.5 mg/ml)を用い24時間刺激した後、抗GPC1 CARレトロウイルスベクターにより遺伝子導入をした。FACS解析により、70%以上のT細胞上にCARの発現を認めた。マウスGPC1強制発現マウス大腸癌細胞株(MC38-mGPC1)を標的に、第2章同様の評価を行った結果、抗GPC1 マウスCAR-T細胞はGPC1特異的IFNγ産生能、細胞傷害活性を有することが示された。次に、C57BL/6マウスにMC38-mGPC1またはマウスGPC1強制発現マウス肉腫細胞株(MCA205-mGPC1)を移植し作製した同種移植マウスモデルに、抗GPC1マウスCAR-T細胞を投与した。その結果、MC38-mGPC1 移植マウス(n=5)、MCA205-mGPC1 移植マウス(n=5)ともに有意な抗腫瘍効果を認め、MCA205-mGPC1移植マウスではCAR-T細胞投与後10日前後で腫瘍の消失に至った(4/5匹)。CAR-T細胞を投与したマウスの症状、全身臓器のHE染色解析を行った結果、明らかな副作用は認められなかった。

次に、CAR-T細胞の内在性抗腫瘍免疫への作用を検証するために、MC38-mGPC1に内在するGPC1以外の腫瘍抗原(gp70)エピトープペプチドとマウス腫瘍内T細胞を共培養した。その結果、CAR-T細胞投与マウス由来T細胞は、コントロールT細胞投与マウス由来T細胞に比べ、有意にIFNγ産生能が増加していた。次に、CAR-T細胞、内在性T細

胞上の PD-1 分子の FACS 解析を行ったところ、50%以上の分画で発現を認めた。最後に、MC38-mGPC1 を移植したマウスに CAR-T 細胞を投与した後、抗 PD-1 抗体を投与したところ、抗 PD-1 抗体単独投与群では抗腫瘍効果を認めなかったが、併用群では CAR-T 細胞単独投与群に比べ、有意な腫瘍縮小を認め、併用群のみで半数のマウス(2/5 匹)が腫瘍消失に至った。抗 GPC1 マウス CAR-T 細胞は移植腫瘍を完全に消失させる強い抗腫瘍活性を示し、全身臓器における副作用を認めなかったことから、GPC1 陽性ヒト固形腫瘍患者に対しても、副作用なく強い抗腫瘍効果が期待できると考えられた。さらに、CAR-T 細胞投与により抗原拡大を引き起こし、内在性腫瘍抗原に対する抗腫瘍免疫応答が増強したことから、今回開発した CAR-T 細胞療法は、標的抗原発現の不均一な固形腫瘍においても、様々な腫瘍抗原を認識する内在性の抗腫瘍免疫の増強を介した治療効果も期待できると考えられた。また、CAR-T 細胞療法抵抗性モデル(MC38-mGPC1 移植モデル)の検証により増強された内在性抗腫瘍 T 細胞および CAR-T 細胞に発現する PD-1 を標的に、抗 PD-1 抗体を併用することで相乗的抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった。

以上より、今回開発した抗 GPC1 CAR-T 細胞は、GPC1 陽性ヒト固形腫瘍患者に対して、副作用なく抗腫瘍効果が得られる治療法になりうることが示唆された。さらに、CAR-T 細胞療法と抗 PD-1 抗体併用による複合免疫療法は固形腫瘍に対して有効な治療法になると考えられた。