

## 審査の結果の要旨

氏名 加藤 大貴

様々な治療法の開発や改善にも関わらず、腫瘍は依然として主要な死亡原因の1つである。近年、新たな治療法として腫瘍免疫療法が注目されているが、その中でもキメラ抗原受容体遺伝子導入 T (CAR-T) 細胞療法はヒト血液腫瘍で高い治療効果を認めたことから、特に大きな期待が寄せられている。CAR-T 細胞療法は固形腫瘍への応用も期待されているが、現状では十分な治療効果は得られていない。その主な理由として、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。細胞表面蛋白グリピカン-1 (GPC1) は様々なヒト固形腫瘍での特異的な高発現が報告されている。GPC1 は胎児期の神経発達を担っているが、成体では重要な機能を持たないことから、副作用を回避するための有望な標的抗原の1つと考えられる。

一方、血液腫瘍と異なり固形腫瘍は腫瘍細胞周囲に強い免疫抑制性の微小環境を有している。とくに、PD-1 と PD-L1 の結合を介した抗腫瘍 T 細胞の抑制機構は重要な役割を果たしている。CAR-T 細胞においても、PD-1/PD-L1 分子を介した抑制を受けると考えられることから、CAR-T 細胞療法と抗 PD-1 抗体の併用により、CAR-T 細胞が十分に活性化されることが期待される。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の効果を検証することを目的に検討を行った。

第1章では、まずヒト及びマウス GPC1 に共親和性を有するニワトリ抗 GPC1 抗体を作製した。作製した抗体はヒト正常組織に反応性を示さず、GPC1 自然発現ヒト食道扁平上皮癌組織のみを認識することがわかった。次に、抗 GPC1 抗体の抗原認識部位をもとに抗 GPC1 CAR レトロウイルスベクターを構築した。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なかったことから、本抗体をもとにした抗 GPC1 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唆された。

第2章では、抗 GPC1 CAR レトロウイルスベクターをヒト活性化 T 細胞に遺伝子導入し、抗 GPC1 ヒト CAR-T 細胞を作製した。作製した CAR-T 細胞はヒト GPC1 強制発現ヒト肺癌細胞株及び GPC1 自然発現ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE14) との共培養により、抗原特異的サイトカイン産生能及び細胞傷害活性を示した。さらに、TE14 移植マウスへの抗 GPC1 ヒト CAR-T 細胞の投与により、有意な腫瘍縮小を認めた。これらの結果から、抗 GPC1 ヒト CAR-T 細胞は 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異種反応を生じてしまうことから、副作用の評価ができないことが課題となった。

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。その結果、作製した抗 GPC1 マウス CAR-T 細胞は抗原特異的サイトカイン産生能及び細胞傷害活性を示すことがわかった。さらに、マウス GPC1 強制発現マウス腫瘍細胞株を移植したマウスへの抗 GPC1 マウス CAR-T 細胞の投与により有意な抗腫瘍効果を認めた。また、CAR-T 細胞を投与したマウスの全身状態及び全身臓器の傷害像や T 細胞浸潤像の有無を解析した結果、明らかな副作用は認められなかった。次に、CAR-T 細胞による内在性抗腫瘍免疫への作用を検証した結果、CAR-T 細胞の投与により、GPC1 以外の腫瘍抗原に対する内在性の抗腫瘍免疫応答が増強することがわかった。さらに、マウス GPC1 強制発現マウス腫瘍細胞株移植マウスを用いて、CAR-T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用療法の効果を検証した。その結果、併用群で有意な治療効果の増強を認めた。以上より、抗 GPC1 CAR-T 細胞は直接的な腫瘍細胞傷害と内在性抗腫瘍免疫の増強を介して、GPC1 陽性ヒト固形腫瘍患者に対し副作用を示すことなく強い抗腫瘍効果が期待できると考えられた。さらに、抗 PD-1 抗体の併用により、CAR-T 細胞療法の治療効果を増強できることが明らかとなった。

以上、本研究で開発された抗 GPC1 CAR-T 細胞と CAR-T 細胞療法及び抗 PD-1 抗体併用による複合免疫療法は、新たな免疫療法として有用な治療法となることが期待された。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。