

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻
平成 29 年度博士課程入学

氏名 吉本 翔
指導教員名 西村 亮平

論文題目 Developing and optimizing chimeric antigen receptor T cell approaches for the treatment of canine cancers
(イヌの悪性腫瘍に対するキメラ抗原受容体発現 T 細胞療法の開発と最適化)

悪性腫瘍は、ヒトにおける主な死亡原因の一つであり、毎年全世界で約 1,000 万人が亡くなっている。一方、イヌにおいても年々腫瘍の罹患数が増加し、現在ではイヌの死亡原因の中で大きな割合を占めている。腫瘍に対する治療法として、外科手術、化学療法、放射線療法が 3 大療法として位置づけられてきたが、悪性度の高い腫瘍や進行例においては、十分な予後の改善効果が得られないものが多く、人医療および獣医療における長年の課題となっていた。この問題を解決するために、様々な治療戦略が新たに模索されてきたが、最近腫瘍免疫療法が腫瘍治療における第 4 の治療法としてその地位を確立しつつある。腫瘍免疫療法は、本来生体が持つ腫瘍に対する免疫機構を活性化させることにより腫瘍を縮小、消失させることを目指すものであり、現在人医療および獣医療の双方で、様々な研究開発が進められている。

腫瘍免疫療法の 1 つである養子免疫療法は、生体の抗腫瘍免疫を増強させるために患者の体内から免疫細胞を採取し、体外で活性化・増殖後、再び体内に戻す治療法である。これまで LAK 療法や TIL 療法などが開発されてきたが、それぞれ腫瘍細胞の認識能をもたないことや、腫瘍組織内で疲弊した T 細胞を培養することが困難であるといった問題で、広く臨床応用するまでに至っていない。

近年、人工的にキメラ抗原受容体 (CAR) を発現させた T 細胞 (CAR-T 細胞) 療法が、これらの問題を解決する養子免疫療法として注目されている。CAR は、抗体の抗原結合部位 (scFv) と T 細胞受容体の CD3 ζ 鎖をキメラ化した受容体であり、CAR が抗原に結合すると CD3 ζ 鎖から活性化シグナルが送られる。そのため、腫瘍細胞に発現する特定の抗原を標的とする CAR-T 細胞を作製すると、標的抗原に結合することで活性化し、腫瘍細胞を特異的に攻撃する。ヒトでは CD19 抗原を標的とする CAR-T 細胞が難治性急性リンパ性白血病患者の 9 割で腫瘍細胞が完全消失するという劇的な治療効果を示し、さらに他の腫瘍種、他の抗原を標的とする CAR-T 細胞療法の臨床応用も進められている。一方、イヌの難治性

悪性腫瘍に対しても CAR-T 細胞療法は有望な治療法になることが期待されるが、その検討は始まったばかりで臨床応用の実現には至っていない。

そこで本研究では、イヌの悪性腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の臨床応用を目指し、イヌ CAR-T 細胞の開発と最適化を目的とした。第 1 章では、イヌの T 細胞に CAR を持続的に発現させるために、レトロウイルスベクターによる CAR 遺伝子の導入を試み、作製したイヌ CAR-T 細胞の機能を評価した。第 2 章では、本来 T 細胞の活性化に重要である共刺激分子からのシグナルに着目し、CAR の構造に共刺激ドメインを挿入したイヌ CAR-T 細胞を作製し、共刺激ドメインがイヌ CAR-T 細胞の機能に与える影響を評価した。第 3 章では、イヌ CAR-T 細胞が適応となる腫瘍種を広げるために、標的となる抗原の探索および標的抗原を発現する腫瘍種の同定を行った。

第 1 章では、イヌ T 細胞上に CAR を持続的に発現させるために、レトロウイルスベクターによるイヌ T 細胞への CAR 遺伝子の導入を試みた。イヌ T 細胞を CD3/CD28 磁気ビーズを用いて活性化し、2 日後に 2 種のレトロウイルスベクター (MigR1、pMND) を用いてイヌ T 細胞への CAR 遺伝子の導入を行った。その後、IL-2 添加下で培養し、8 日目にイヌ T 細胞表面上の CAR の発現を評価した。その結果、pMND では約 40%、MigR1 では約 55% の CAR 発現が確認された。さらに同日、標的抗原発現細胞と共培養したところ、MigR1 により作製した CAR-T 細胞は抗原特異的な細胞傷害活性、脱顆粒マーカーの発現および各種サイトカイン (IFN γ 、TNF α 、IL-17) 産生を示した。また、8 日目に放射線照射した標的抗原発現細胞を加え、16 日目に CAR の発現を調べたところ、pMND では約 80%、MigR1 では約 95% の CAR の発現が確認された。以上より、レトロウイルスベクターによりイヌ T 細胞上に CAR を持続的に発現させることに成功し、MigR1 により作製された CAR-T 細胞は抗原特異的に腫瘍細胞を攻撃することが明らかとなった。

第 2 章では、イヌ CAR-T 細胞の機能を向上させるために、CAR の構造内に共刺激ドメインを挿入したイヌ CAR-T 細胞の機能評価を行った。まず、共刺激ドメイン (CD28、4-1BB あるいは ICOS) を挿入した 3 種類の CAR を設計した。次に第 1 章と同様の方法で各種 CAR をイヌ T 細胞に導入し、作製した CAR-T 細胞の細胞傷害能、脱顆粒マーカーの発現、サイトカイン産生能および細胞増殖能を評価した。その結果、培養 8 日目において共刺激ドメインを含まない CAR-T 細胞が他の CAR-T 細胞と比較して細胞傷害能と脱顆粒マーカーの発現が高い傾向にあったが、共刺激ドメインを含む各種 CAR-T 細胞間で細胞傷害能と脱顆粒マーカーの発現に明らかな差は認められなかった。また同日、共刺激ドメインを含まない CAR-T 細胞、CD28 および 4-1BB を挿入した CAR-T 細胞は、IFN γ 、TNF α および IL-17A の 3 種のサイトカインの産生が認められたが、ICOS を挿入した CAR-T 細胞におけるこれらのサイトカイン産生はほとんど認められなかった。また、サイトカイン産生を示した 3 種の CAR-T 細胞では、サイトカイン産生能に明らかな差は認められなかった。最後に、培養 16 日目に標的抗原発現細胞を用いて CAR-T 細胞を刺激し、各種 CAR-T 細胞の増殖能を比較した。その結果、CD4⁺CAR-T 細胞に関しては、CD28 を挿入した CAR-T 細胞

が最も高い増殖能を有し、次いで 4-1BB を挿入した CAR-T 細胞が 2 番目、ICOS を挿入した CAR-T 細胞が最も低かった。共刺激ドメインを含まない CD4⁺CAR-T 細胞は細胞増殖をほとんど示さなかった。一方、CD8⁺CAR-T 細胞においては、CD28 を挿入した CAR-T 細胞と 4-1BB を挿入した CAR-T 細胞が同程度に細胞増殖能を増強し、ICOS を挿入した CAR-T 細胞と共刺激ドメインを含まない CAR-T 細胞は低い増殖能を示した。以上より、細胞傷害能と脱顆粒マーカー発現に関しては、全ての共刺激ドメイン間で明らかな差を認めず、サイトカイン産生能と細胞増殖能に関しては、ICOS よりも CD28 と 4-1BB を挿入した CAR-T 細胞が優れることが明らかとなった。

第 3 章では、イヌ CAR-T 細胞療法の適応拡大のために、イヌの様々な腫瘍種を対象に標的抗原の探索を実施した。CAR-T 細胞の標的抗原として求められる条件として、腫瘍細胞に過剰もしくは特異的に発現しており、かつ生存に関わる正常細胞での発現が低いことが挙げられる。イヌに交差性を持ち抗体配列が入手可能な抗体が存在し、かつ上記の条件を満たし得る抗原として探索したところ、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) およびポドプラニン (PDPN) が候補となり、これについて以下の検討を行った。

第 1 節では、HER2 について検討を行った。HER2 は、これまでイヌの乳腺癌、移行上皮癌、骨肉腫および悪性黒色腫で発現することが知られていたが、その他の腫瘍種における発現は明らかにされていなかった。予備的検討において HER2 の発現が確認されたイヌ肛門嚢腺癌、原発性肺癌および甲状腺癌の 3 種の腫瘍種を対象に、免疫組織化学染色法 (IHC) によって HER2 の発現を確認したところ、それぞれ、80%、69%、48%の腫瘍組織で HER2 の陽性像が認められた。また、イヌ HER2 への交差性を持つ抗ヒト HER2 抗体 (トラスツズマブ) を用いてフローサイトメトリーによる解析を行ったところ、イヌの乳腺癌、移行上皮癌、骨肉腫および悪性黒色腫の細胞株において細胞表面における HER2 の発現が確認された。以上より、肛門嚢腺癌、原発性肺癌および甲状腺癌においても HER2 を標的とする CAR-T 細胞療法が適応となる可能性が考えられ、さらに CAR の設計にはトラスツズマブ由来の scFv が使用できることが明らかとなった。

第 2 節では、PDPN について検討を行った。PDPN は、ヒトの扁平上皮癌などの腫瘍種で発現が報告されている糖タンパク質であるが、正常組織にも発現するため標的分子とすることは困難であると考えられていた。しかし、近年腫瘍組織中の異常な糖鎖修飾 PDPN に特異的に結合する可能性をもつ抗イヌ PDPN 抗体 (PMab-38) が開発された。そこで第 2 節では、まず初めに本抗体の腫瘍特異性を調べるために、PMab-38 と汎 PDPN 抗体との IHC の染色像を比較した。その結果、汎 PDPN 抗体では、本来 PDPN が発現する肺胞上皮細胞で陽性像が確認されたのに対し、PMab-38 では確認されなかった。一方、扁平上皮癌の腫瘍組織においては、PMab-38 と汎 PDPN 抗体の両方で同様の染色像が確認された。次に、イヌの 13 種の固形腫瘍と 19 種の正常組織を対象に PMab-38 を用いて IHC を実施した。その結果、扁平上皮癌や肺癌の腫瘍細胞において高頻度に陽性像が確認された。また、腫瘍細胞だけでなく、扁平上皮癌、肛門嚢腺癌および移行上皮癌の腫瘍関連線維芽細胞にお

いても陽性像が確認された。一方、正常組織では腎臓で弱い陽性像が認められたが、PDPNの発現が報告されているリンパ管や肺胞を含む18種の正常組織においては認められなかった。最後に、PMab-38を用いてフローサイトメトリーによる解析を行ったところ、イヌの悪性黒色腫の細胞株において細胞表面におけるPDPNの発現が確認された。以上より、PMab-38を用いた染色で陽性像を示した腫瘍種において、異常な糖鎖修飾PDPNがCAR-T細胞療法の標的分子となり得ると考えられ、さらに異常な糖鎖修飾PDPNを標的とするCAR-T細胞のCARの設計にPMab-38由来のscFvが使用できることが明らかとなった。

以上の結果から、レトロウイルスベクターを用いることでイヌT細胞上に持続的なCARの発現を得ることができ、CARの構造内に共刺激ドメイン（CD28および4-1BB）を挿入することによりイヌCAR-T細胞の増殖能を増強することが明らかとなった。また、イヌCAR-T細胞療法の適応拡大のためには、HER2と異常な糖鎖修飾PDPNが標的分子とすることが有用であることが示された。今後、イヌCAR-T細胞の臨床応用に向け、*in vivo*での抗腫瘍効果の評価、イヌでの安全性の検証をしていく必要がある。