

平成 28 年 2 月 1 日

膠芽腫に対する新たな治療法の開発 ～ポドプラニンに対するキメラ遺伝子改変 T 細胞受容体 T 細胞療法～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）脳神経外科学の夏目敦至（なつめあつし）准教授、及び東北大学大学院医学系研究科（研究科長・下瀬川徹）地域イノベーション分野の加藤幸成（かとうゆきなり）教授を中心とした研究グループは、腫瘍抗原であるポドプラニンに対する CAR を作製し、膠芽腫に対するその抗腫瘍効果を評価しました。本研究成果は、米国科学誌「Cancer Immunology Research」（米国東部時間 1 月 28 日付の電子版）に掲載されました。

膠芽腫は 5 年生存率が 10%以下という極めて予後の悪い成人の原発性脳腫瘍です。近年、種々の悪性腫瘍において免疫療法が注目されており、膠芽腫に対してもその効果が期待されています。免疫療法の一つにキメラ抗原受容体（CAR）T 細胞療法があります。この療法により、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）に依存しない腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞を大量に作製することが可能になります。

ポドプラニンは頭頸部、食道、肺、子宮頸部の扁平上皮癌、精巣セミノーマ、悪性中皮腫など多くの悪性腫瘍に発現しており、膠芽腫を含む星細胞系腫瘍においては、悪性度に応じて発現が上昇するため膠芽腫の標的として適しています。研究グループは、ポドプラニンに対するモノクローナル抗体 NZ-1 を基に、CAR 遺伝子を人工合成し（NZ-1-CAR）、T 細胞に遺伝子導入した（NZ-1-CAR T 細胞）ところ、NZ-1-CAR T 細胞はポドプラニン陽性膠芽腫細胞株への抗腫瘍効果を示しました。

本研究成果により、ポドプラニンを標的とする CAR T 細胞療法は膠芽腫治療に有望であり、新たな治療法の開発が期待されます。

本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）及び革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業によってサポートされました。

膠芽腫に対する新たな治療法の開発

～ポドプラニンに対するキメラ遺伝子改変 T 細胞受容体 T 細胞療法～

ポイント

- ポドプラニンに対するモノクローナル抗体 NZ-1 を基に殺細胞効果の高いキメラ遺伝子改変 T 細胞受容体(NZ-1 CAR)を人工合成し、T 細胞に遺伝子導入した NZ-1-CAR T 細胞の発現を確認しました。
- NZ-1-CAR T 細胞は、ポドプラニンの特異的に認識し、癌細胞が T 細胞によって傷害されるときに放出されるサイトカインである IFN γ を産生しました。
- NZ-1-CAR T 細胞は、ポドプラニン陽性膠芽腫細胞株に対して、細胞傷害性を示しました。
- ポドプラニン陽性膠芽腫細胞株を脳内に移植したマウスにおいて、NZ-1-CAR T 細胞の全身投与により、腫瘍の増大は抑制され、生存期間の延長が認められました。

1. 背景

膠芽腫は最も予後の悪い成人の原発性脳腫瘍です。最大限の手術及び放射線化学療法を行っても、5年生存率が10%以下であり、新たな治療法の開発が望まれています。近年、種々の悪性腫瘍において免疫療法が注目されており、膠芽腫に対してもその効果が期待されています。免疫療法の一つにキメラ抗原受容体 (CAR) (注1) T細胞療法があります。CARは、癌抗原を特異的に認識する抗体とT細胞受容体の細胞内シグナルのハイブリッドです。CARをT細胞に発現させることにより、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) (注2) に依存しない腫瘍特異的細胞障害性T細胞を大量に作製することが可能になります。膠芽腫に発現するEGFR v III、HER2、IL13R α 2といった種々の腫瘍抗原に対するCARの報告がありますが、膠芽腫は様々な表現型を持っており、新たな腫瘍抗原に対するCARの作製は治療上有利となります。

2. 研究成果

ポドプラニンは頭頸部、食道、肺、子宮頸部の扁平上皮癌、精巣セミノーマ、悪性中皮腫など多くの悪性腫瘍に発現しており、膠芽腫を含む星細胞系腫瘍においては、悪性度に応じて発現が上昇しています。そのため、膠芽腫の標的として適しています。ポドプラニンに対するモノクローナル抗体 (注3) NZ-1 を基に、CAR 遺伝子を人工合成し (NZ-1-CAR) (図1)、T細胞に遺伝子導入しました (NZ-1-CAR T細胞)。NZ-1-CAR T細胞の細胞傷害性をカルセインアッセイにて、評価したところ、ポドプラニン陽性膠芽腫細胞株であるLN319やU87MGに対して、E/T比に従って、有意に細胞傷害性が認められました。一方、ポドプラニンをノックアウトしたLN319、U87MGでは有意差は認められませんでした (図2)。NZ-1-CAR T細胞とポドプラニン陽性膠芽腫細胞株であるLN319やU87MGを共培養することにより、モックCAR T細胞に比し、癌細胞がT細胞によって傷害されるときに放出されるサイトカインであるIFN γ の産生量が有意に多く、NZ-1-CAR T細胞がポドプラニンを特異的に認識していることが示されました (図3)。マウスの脳内にポドプラニン陽性膠芽腫細胞株を移植後、CAR T細胞をマウスに全身投与し、非治療群、モックCAR T(対

照 CAR T)細胞群、NZ-1-CAR T 細胞群において、腫瘍サイズと生存期間の評価を行いました。NZ-1-CAR T 細胞群では腫瘍の増大が抑制され (図 4)、約 60%のマウスで生存期間の延長が認められました (図 5)。

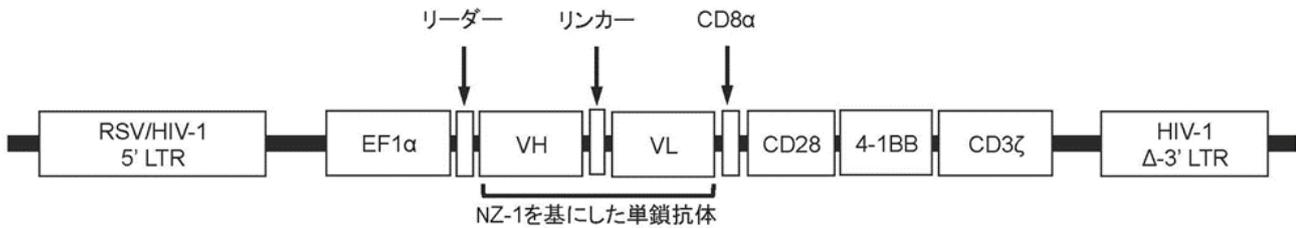


図1: NZ-1-CARの遺伝子構造

プロモーターであるEF1αにNZ-1を基にした単鎖抗体、共刺激分子のCD28、4-1BB、T細胞受容体の細胞内シグナルドメインのCD3ζを結合させています。

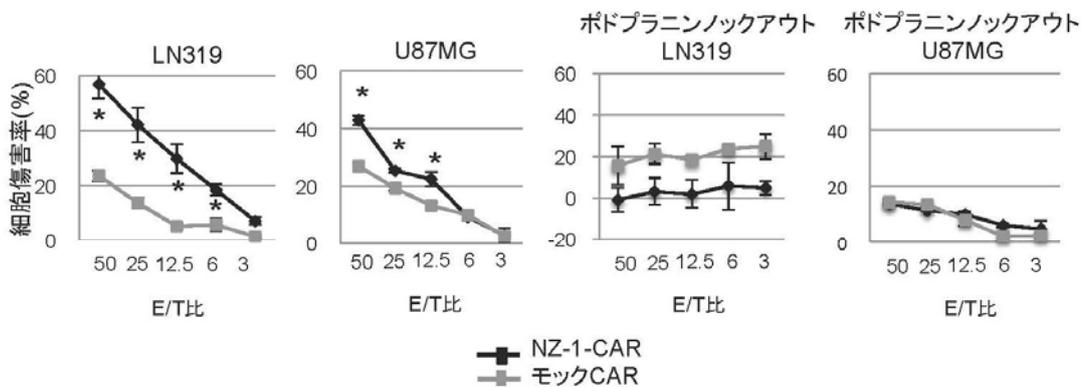


図2: カルセインアッセイ

NZ-1-CAR T細胞はポドプラニン陽性膠芽腫細胞株のLN319、U87MGに対して、E/T比に従って細胞傷害性を示しました。対照的にポドプラニンをノックアウトした細胞株では細胞傷害性が認められませんでした。

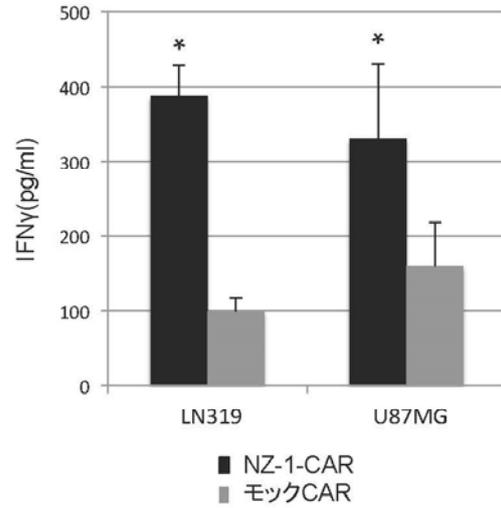
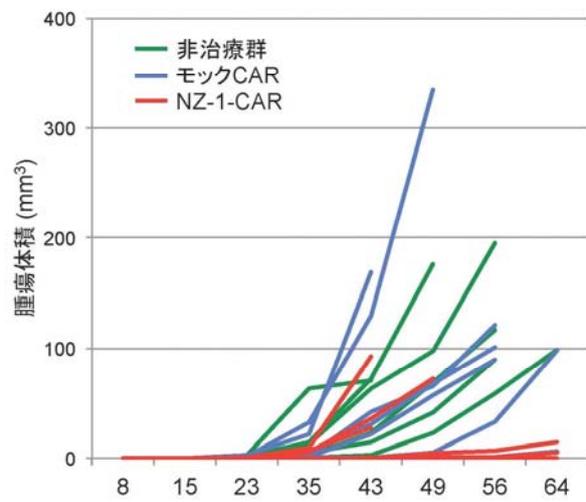
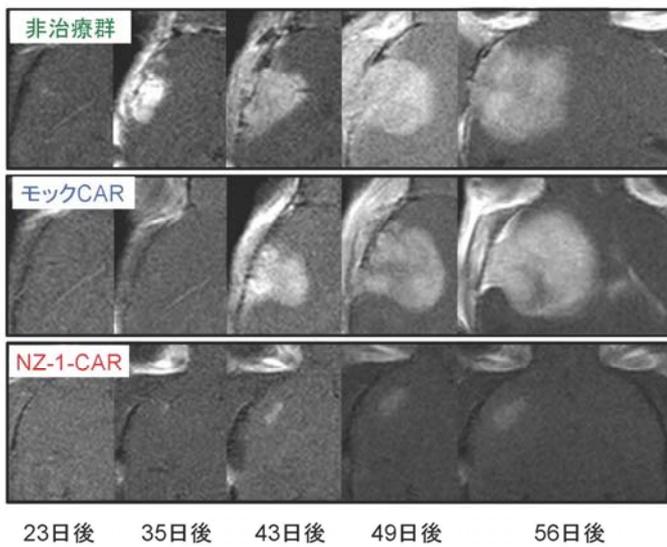


図3: IFN γ の産生量

NZ-1-CAR T細胞とLN319、U87MGを共培養すると、IFN γ の産生量はモックCAR T細胞に比し、有意に多かった。



膠芽腫細胞株移植後の日数

図4: 造影MRI初見と腫瘍体積の経時的変化

マウスの脳内に膠芽腫細胞株を移植後、CAR T細胞をマウスに全身投与し、腫瘍サイズの経時的変化を造影MRIにて、評価しました。NZ-1-CAR T細胞群は他の2群より、明らかに腫瘍の増大速度が遅かった。

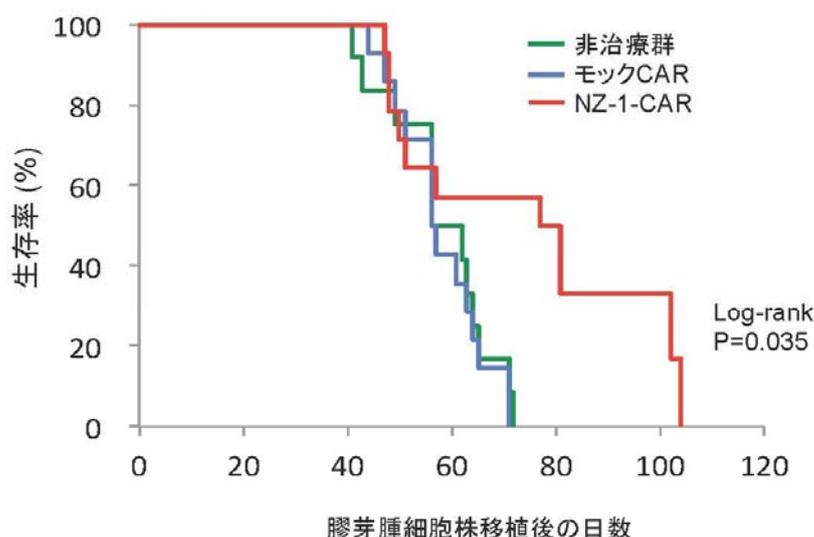


図5: 生存曲線

NZ-1-CAR T細胞群の約60%のマウスで生存期間の延長を認めました。

3. 今後の展開

ポドプラニンをターゲットとする CAR T 細胞療法は膠芽腫治療に有望ですが、ポドプラニンはリンパ管内皮細胞や肺胞上皮細胞などの正常細胞にも発現しており、NZ-1-CAR T 細胞が正常細胞も攻撃してしまうという欠点があります。加藤教授らは既に癌に発現しているポドプラニンのみを認識する癌特異的モノクローナル抗体 (CasMab) を開発しており、夏目准教授らはこの抗体を基にして、正常細胞を傷害しない CAR T 細胞の作製を目指しています。

4. 用語説明

(注1) キメラ抗原受容体 (CAR) : 腫瘍特異抗原に対する単鎖抗体と T 細胞受容体 (TCR) の細胞内シグナルドメインである CD3 とを融合させた人工的な TCR。CD28 や 4-1BB といった共刺激分子を組み込んだ第 2、第 3 世代の CAR が開発され、今回 CD28 と 4-1BB を組み込んだ第 3 世代の CAR を使用しています。

(注2) 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) : 腫瘍抗原や細胞に感染したウイルスなどは MHC と結合して細胞表面に提示されることにより、T 細胞に認識され、免疫反応が起こります。腫瘍細胞は MHC の発現を低下させるといった免疫を回避する機構を持っているため、MHC に依存しない CAR は免疫回避機構を打ち破る手段として有用です。

(注3) モノクローナル抗体 : 単一の抗体産生細胞に由来する抗体で、抗原の特定の部位に反応する。

(注4) モック CAR T 細胞 : ポドプラニンを含め、抗原認識能のない CAR を導入した T 細胞。

5. 発表雑誌 :

Satoshi Shiina, Masasuke Ohno, Fumiharu Ohka, Shunichiro Kuramitsu, Akane Yamamichi, Akira Kato, Kazuya Motomura, Kuniaki Tanahashi, Takashi Yamamoto, Reiko Watanabe, Ichiro Ito, Takeshi Senga, Michinari Hamaguchi, Toshihiko Wakabayashi, Mika K. Kaneko, Yukinari Kato, Vidyalakshmi Chandramohan, Darell D. Bigner, Atsushi Natsume. CAR T cells targeting podoplanin reduce orthotopic glioblastoma in mouse brains. *Cancer Immunology Research*, (米国東部時間 1 月 28 日付の電子版) .

English ver.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical/en/res/ResearchTopics/2015/CAR_T_20160201en.pdf