

学位論文 (博士)

Anti-tumor efficacy of human anti-c-met CAR-T cells  
against papillary renal cell carcinoma in an orthotopic  
model

(同所性モデルを用いた乳頭状腎細胞癌に対する  
anti-c-met CAR-T 細胞療法抗腫瘍効果の検討)

氏名 森 純一

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 泌尿器科学講座

令和3年6月

## 目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3～4
3. 目的	4
4. 方法	4～6
(1) 対象	4
(2) 方法	4～6
(3) 解析	6
5. 結果	6～8
6. 考察	8～9
7. 結語	9
8. 謝辞	9～10
9. 参考文献	10～14

## 1. 要旨

キメラ抗原受容体導入 (CAR) -T 細胞療法は、癌免疫療法、特に B 細胞性腫瘍の治療において顕著な有効性が示されている。しかしながら、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の有効性は依然として不十分なままである。また、乳頭状腎細胞癌 (PRCC) は、淡明細胞型腎細胞癌 (CCRCC) に次いで 2 番目に多いタイプの腎癌であるが、PRCC の転移・再発例における標準治療はいまだ定まっていない。PRCC に対する新規治療として CAR-T 細胞の療法の開発は大きな可能性を秘めている。本研究では、まず c-met が乳頭状腎細胞癌 (PRCC) の適切な治療標的であることを臨床検体から示した。In vivo モデルでの抗腫瘍効果を検討するために c-met 陽性腎癌細胞を用いて PRCC 腎同所性マウスモデルを確立した。抗ヒト c-met CAR-T 細胞を作成し、同マウスモデルでの PRCC に対する抗 c-met CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。抗 c-met CAR-T 細胞の投与は、腫瘍組織への CAR-T 細胞の顕著な浸潤を促進し、腫瘍増殖を明らかに抑制した。さらに、アキシチニブとの併用により、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果は相乗的に増強された。これらの研究は、PRCC 患者の治療における抗 c-met CAR-T 細胞の臨床応用の可能性を示した。

## 2. 研究の背景

乳頭状腎細胞癌 (PRCC) は、淡明細胞型腎細胞癌 (CCRCC) に次いで 2 番目に多いタイプの腎癌であり、腎癌全体の約 10~20% を占める (1-3)。type-1 と type-2 の主要なサブタイプに分類される。PRCC type-1 は、組織学的には好塩基性細胞質と小さくて均一な楕円形の核を含む小さな細胞で覆われた乳頭状・管状構造を有する。多くの場合、再発または転移することはめったになく、予後は良好であるが、進行した症例では、予後は不良とされている。(4-6)。type-2 は、好酸球性細胞質を含む大きな細胞と顕著な核小体を伴う大きな球形の核で覆われた乳頭状構造を持つ。予後は、転移がみられることが多く、type-1 の予後よりも不良である (4-6)。CCRCC のような PRCC の進行した症例の治療では、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) および/またはラパマイシン阻害剤が臨床において経験的に使用される。しかし、それらの治療効果に関する科学的証拠はほとんど実証されておらず、現在、進行性疾患の患者に対する効果的な治療法はありません。(4, 5, 7, 8)。肝細胞増殖因子受容体 (c-met) は、細胞表面タンパク質チロシンキナーゼ (9-12) であり、胚発生、臓器の発達および分化だけでなく、乳癌、肺癌、および腎癌を含む様々な癌における腫瘍細胞の移動、増殖および浸潤においても重要な役割を果たす。(9-11, 13-17)。これらの発見に基づいて、TKI や抗体薬物複合体などの c-met を標的とする薬剤が現在開発中であり、クリゾチニブは一部の国で非小細胞肺癌に対して承認されている。(18, 19)。また、c-met は PRCC でも発現しており (4, 20)、c-met を標的とする TKI を用いた臨床試験が実施されている。しかし、このような治療によって腫瘍の完全寛解が誘導された症例はまれであることが分かっている。(21, 22)。そのため、PRCC、特に進行例における根治を目的とした新規治療法の確立は重要な課題である。CAR は、3 つの要素で構成される人工的に合成された抗原受容体である。CAR は免疫グロブリン一本鎖可変フラグメント (scFv) の軽鎖と重鎖から構成される癌細胞表面抗原に特異的なモノクローナル抗体、膜貫通ドメイン、および CD3 $\zeta$ 、CD28、4-1BB (CD137) の共刺激分子における細胞内シグナル伝達ドメインに由来する (23, 24)。多くの CAR-T 細胞は、レンチウイルスまたはレトロウイルスベクターを使用して患者から調製された自己末梢血 T 細胞に CAR 遺伝子をトランスフェクトすることによって生成される。一般的な T 細胞とは異なり、CAR-T 細胞は、腫瘍細胞の検出と攻撃において HLA の制限を受けない。CD19 を標的とする CAR-

T細胞療法は、いくつかのB細胞悪性腫瘍において劇的な治療効果を示し、多くの国で承認されている(25-30)。抗c-met CAR-T細胞においても、乳癌を含むいくつかの種類の腫瘍に対して臨床試験が実施されている(31)。その一方で、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の有効性は限られており、その臨床応用には多くの課題が残されている(32-35)。

### 3. 目的

本研究の目的は、ヒトT細胞を用いて抗ヒトc-met CAR-T細胞を生成し、CAR-T細胞がPRCCに対しての治療効果を検討することである。そのため我々はc-met陽性のヒトPRCC細胞株を免疫不全マウスの腎被膜下に注入する同所性癌モデルを確立し、作製したヒト抗c-met CAR-T細胞が同モデルに対しての治療効果を検討した。さらに、CAR-T細胞の抗腫瘍活性がアキシチニブとの併用により相乗的に増強されることも検討を行った。

### 4. 方法

#### (1) 対象

In vitro 解析においてヒト腎癌細胞株であるA498は、American Type Culture Collection (Manassas, VA)から購入した。ルシフェラーゼを発現するA498-Lucおよびヒト骨髄腫細胞株であるKMS11は、Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Osaka, Japan)から購入した。次いでA498にレトロウイルスベクターを用いてGFPを導入し、A498-GFPクローンを確立した。A498系統に使用した培地は、10%FCS、100 U/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシンを添加したイーグル最小必須培地であった。KMS11に使用した培地は、10%FCS、100 U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、50 μMの2-メルカプトエタノール、25 mM HEPES、および2 mM L-グルタミンを添加したRPMI-1640であった。

In vivo 解析についてオスとメスのNOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wj1 / SzJ (NSG) マウス(6週齢)をSLC(静岡、日本)から購入し、この研究に使用した。山口大学の動物施設では、特定病原体除去条件下でマウスを飼育した。

臨床検体を用いた解析において2006年から2016年の間に山口県の7つの臨床センターで根治的または部分的腎摘出術を受けた計33人の患者を対象とした。患者背景をtable.1に示す。患者数は33人(男性19人、女性14人)で、年齢の中央値は66歳であった。腫瘍細胞の性質に基づいて、PRCCは1型、2型、およびoncocytic variantsに分類した。ここでoncocytic variantsとは、1型と2型の両方の組織学的特徴を示す集団とした。(36)。1型、2型、および腫瘍細胞変異体の比率それぞれ24.2%、57.6%、18.2%であった。この研究で標本が使用されたすべての患者はインフォームドコンセントを受け、腫瘍標本の使用は山口大学大学院医学系研究科の倫理委員会によって承認された。各標本は、腎癌病理を専門とする病理学者(37-40)と少なくとも1人の独立した病理学者によって診断された。

#### (2) 方法

### CAR-T細胞の作製

ヒトPBMCは、山口大学の機関の承認を得て、健康なボランティアから収集した。抗c-met一本鎖可変フラグメント(scFv)のコンストラクトは、以前の報告(41)に従って生成を行った。scFvとヒトCD8αの膜貫通ドメイン、およびヒトCD28、4-1BB(CD137)、



および CD3 $\zeta$  の細胞質領域とを融合し、第 3 世代の CAR を構築し、それを pMSGV1 にクローン化してレトロウイルスベクターを生成した。(41、42)。以前の報告(41, 43)をいくつか改変した方法で CAR を発現するレトロウイルスベクターをヒト T 細胞に導入した。具体的には、GP2-293 パッケージング細胞 (Clontech、Mountain View、CA) に、Lipofectamine<sup>®</sup> 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、p-Ampho レトロウイルスパッケージングプラスミド (Clontech) とともに CAR 発現プラスミドをトランスフェクトした。レトロウイルスベクターを含む培養上清を回収し、遺伝子導入に使用した。活性化された健康なドナー由来の PBMC を RetroNectin<sup>®</sup> (タカラバイオ、草津、日本) の存在下でウイルス上清に感染させた。その後 OpTmizer CTS、CTS 免疫細胞血清置換、L-グルタミン (Gibco)、ペニシリン-ストレプトマイシン硫酸塩、およびアンホテリシン B を添加した OpTmizer (Gibco) とともに、IL-2 の存在下で 5 日間インキュベートした。CAR の形質導入効率は、フローサイトメトリーを使用して評価した。

### Flow cytometry

APC-conjugated 抗 c-met mAb (clone 95106, R&D) を使用して、細胞膜表面の c-met を検出した。CAR で形質導入された T 細胞は、6-His tagged human c-met fusion protein (R&D Systems) および secondary PE-conjugated anti-6-His mAb (clone RM146, Abcam, Cambridge, UK)、APC-conjugated anti-CD8 $\alpha$  mAb (クローン RPA-T8、BioLegend) によって検出された。Zombie Yellow viability dye (BioLegend) および PE-conjugated anti-CD45 mAb (clone HI30, BioLegend) を invitro 共培養アッセイに使用した。ヒト TruStainFcX (BioLegend) は、Fc $\gamma$  受容体を介した抗原特異的抗体の非特異的結合をブロックするために使用した。フローサイトメトリーデータは、EC800 (SONY) または CytoFLEX (Beckman Coulter) によって取得され、FlowJo ソフトウェア (FlowJo、LLC。) を使用して分析した。

### In vitro cytotoxicity assay

CAR-T または un-transduced (以下、UTD と呼ぶ) T 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) をエフェクター対標的 (E:T) 比 1:3 もしくは 1:5 で 48 時間、腫瘍細胞と共培養した。培養細胞を回収し、Zombie Yellow viability dye と anti-CD45 mAb で染色した後、フローサイトメトリー分析を行って残存腫瘍細胞と T 細胞を検出した。さらに培養上清中のインターフェロン (IFN) - $\gamma$  の濃度を ELISA キット (BioLegend) で測定した。in vitro cytotoxicity assay を経時的に分析するために、CAR-T または UTD-T 細胞 ( $3 \times 10^4$  cells/well) を A498-GFP と E:T 比 1:1 で 48 時間共培養し、IncuCyte S3 (Sartorius) を用いて 30 分毎に撮影を行った。

### In vivo orthotopic mouse model of PRCC

day0 に全身麻酔下に NSG マウスの左腎被膜下へ Matrigel (Corning) を含む  $1 \times 10^6$  の A498-Luc を注入した。Day17 に  $1 \times 10^6$  または  $3 \times 10^6$  cells の CAR-T 細胞または UTD-T 細胞を尾静脈から静脈内 (i. v.) 注射した。アキシチニブは day17 から 1 週間、1 日 1 回経口投与を行った。アキシチニブ投与用量 ( $600 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) は、アキシチニブの単独投与がいくつかの癌モデルにわたって一定の抗腫瘍効果を誘発すること

が報告された、以前の報告に基づいて決定した(44-47)。腫瘍量は、IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (Perkin Elmer) を使用して定期的に測定し、Living Image Software (Perkin Elmer) によって分析を行った。NSG マウスの腎臓で増殖した A498-Luc の腫瘍塊を切除し、組織学的分析に使用した。

## Histopathological analysis

患者または担癌マウスに由来するホルマリン固定およびパラフィン包埋腫瘍組織を用いヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色を霜仁会 (宇部、日本) へ依頼した。患者検体での c-met の発現を評価するために、rabbit anti-c-met mAb (clone EPR19067, Abcam) を使用して免疫組織化学染色 (IHC) を行った。c-met の発現強度は、臨床データや実験設定に関する事前情報がない病理学者の決定に基づいて、4 段階 (0~+3) に分類した。マウスモデルの腫瘍組織への CD8 + T 細胞の浸潤を評価するために、rabbit anti-CD8 polyclonal Ab (Abcam) を用いた IHC を実施しました。H &E、IHC 標本の顕微鏡分析には、BZ-X710 (KEYENCE) を使用した。

## RNA *in situ* hybridization

マウスモデルの腫瘍組織への CAR-T 細胞の浸潤を調べるために、RNA scope 2.5 HD Duplex detection Kit (Advanced Cell Diagnostics) を使用して RNA *in situ* hybridization を行った。anti-c-metCAR scFv のヌクレオチドに相補的なプローブは、Advanced CellDiagnostics へ依頼し設計・合成した。hybridization はメーカーの指示通りに行い、ヘマトキシリンでコントロール染色が行われた。顕微鏡分析には BZ-X710 (KEYENCE) を使用した。

## Animal study approval

すべての動物実験は、動物の人道的治療に関する国のガイドラインに従って実施され、山口大学の施設内動物管理使用委員会 (IACUC) によって承認されました。

### (3) 統計

両側検定の対応のない Student-t 検定を行い、0.05 未満の P 値は有意であると判定した。

## 5. 結果

### PRCC 臨床標本における c-met 発現

まず、c-met が PRCC に対する CAR の標的として適切であるかを検証するために臨床検体での臨床サンプル中の c-met の発現レベルを分析した。Fig. 1 と Table 2 に示すように、PRCC のサブタイプに関係なく、ほぼすべてのサンプル (97%) で c-met の発現を認めた。特に PRCC の大部分を占める type-1 と type-2 では、100%、95% の検体において +2 以上の c-met 発現強度を示した (Table 2)。対照的に正常な腎組織では、一部の腎尿細管を除いて、c-met の発現は検出されなかった (Fig. S1)。これらの結果から c-met が PRCC に対する CAR の標的分子としての有力な候補であることを示

唆された。

### ***In vitro*における抗 c-metCAR-T 細胞の抗腫瘍効果の検討**

CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を調べるために、CD28、4-1BB、CD3と配列からなるシグナル伝達モチーフを含む抗ヒト c-met CAR を構築した (Fig. S2A)。ヒト末梢血 T 細胞に抗 c-metCAR をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した場合、形質導入効率は約 60~75%であった (Fig. S2B)。次に、細胞表面に内因性 c-met を発現するヒト腫瘍細胞株に対する CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を評価した。標的腫瘍として c-met が高発現しているヒト腎癌細胞株 A498 (図 S2C) を使用した。ヒト骨髄腫細胞株である KMS11 は c-met を発現しておらず、negative control として使用した。これらの腫瘍細胞と共培養すると、CAR-T 細胞群において T 細胞の増加を認め、有意に A498 細胞数を減少させた。(Fig. 2A, B)。対照的に CAR-T 細胞は KMS11 に対して殺腫瘍活性を示さず、抗 c-met CAR の特異性を強く示唆してした。(Fig. 2A, B)。さらに、A498 と CAR-T 細胞の共培養により顕著な IFN- $\gamma$  産生が認められたが、A498 と UTD-T 細胞との共培養や KMS11 との共培養ではほとんど分泌されなかったことが確認された。この点においても、c-met 陽性腫瘍に特異的な CAR-T 細胞の反応性が確認された (Fig. 2C)。さらに、CAR-T 細胞による抗腫瘍効果を経時的に分析した。抗腫瘍活性の誘導は共培養の初期段階で見られ、48 時間以上持続した (Fig. 2D)。これらの結果のすべては、抗 c-metCAR-T 細胞が c-met に特異的な効果的な抗腫瘍活性を発揮したことを示唆した。

### **PRCC の同所性モデルにおける抗 c-metCAR-T 細胞の抗腫瘍効果の検討**

*In vivo*における抗 c-metCAR-T 細胞の抗腫瘍効果を検討するために、ヒト PRCC の同所性モデルを確立しました。A498-Luc を day0 に免疫不全 NSG マウスの左腎臓被膜下に注入し、day17 に CAR-T または UTD-T 細胞を静脈内投与しました。腫瘍細胞の成長・縮小は IVIS により評価を行った。 $3 \times 10^6$  個の CAR-T 細胞による治療は、腫瘍の増殖を明らかに抑制し、マウスの約 60%において腫瘍の完全退縮を認めた。(Fig. 3)。切除された腫瘍を用いた組織学的分析により、CAR-T 細胞の投与により CD8 陽性 T 細胞および CAR-T 細胞を含むリンパ球の腫瘍局所への浸潤を高度に誘導したことが明らかになった (Fig. 4)。対照的にこのようなリンパ球の浸潤は、UTD-T 細胞後の腫瘍組織にはほとんど観察されず、治療効果との相関を認めました。(Fig. 4)。これらの結果からは、ヒト PRCC の同所性モデルにおける抗 c-metCAR-T 細胞の治療の有効性が示唆された。その一方で、 $1 \times 10^6$  個の CAR-T 細胞による治療は、腫瘍の一時的な抑制を示したが、最終的には、UTD-T 細胞の場合と同様に制御不能な増殖をもたらした。(Fig. 3) この結果は抗 c-metCAR-T 細胞療法の改善の余地があることを示した。

### **アキシチニブと抗 c-metCAR-T 細胞療法の併用による治療効果の向上**

アキシチニブは、血管内皮増殖因子受容体 1 (VEGFR1)、VEGFR2、VEGFR3、血小板由来増殖因子受容体  $\beta$ 、および c-Kit をターゲットとした選択的キナーゼ阻害剤であり、CCRCC の治療に広く使用されている。アキシチニブによる PRCC の治療に関する大規模な臨床研究の結果は残っておらず、PRCC 患者への治療として一般には使用されていない。最近、アキシチニブとペンブロリズマブの併用療法がスニチニブの単剤

療法と比較して、進行性 CCRCC 患者の全生存期間と無増悪生存期間 (PFS) の両方を有意に延長したことが報告された (48, 49)。このことから我々は PRCC 同所性モデルにおける抗 c-met CAR-T 細胞とアキシチニブの併用療法の可能性について検討した。アキシチニブ単独治療もしくは UTD-T 細胞と組み合わせて使用した場合、抗腫瘍効果をほとんど示さなかった (Fig. 5)。対照的に、アキシチニブと抗 c-met CAR-T 細胞の組み合わせは、腫瘍増殖の顕著な抑制を示した。(Fig. 5)。この実験において CAR-T 細胞の投与量は  $1 \times 10^6$  であり、アキシチニブ併用しなかった場合に腫瘍増殖を制御できなかった設定であった。(Fig. 3)。これらの結果は、抗 c-met CAR-T 細胞とアキシチニブの組み合わせが PRCC 同所性モデルの治療効果を相乗的に増強したことを強く示唆した。

## 6. 考察

この研究では、最初に臨床検体を用いて PRCC の治療標的としての c-met の妥当性を評価し、c-met が実際にほとんどすべての臨床サンプルで発現していることを発見した。この発見から抗ヒト c-met CAR-T 細胞や免疫不全マウスの腎被膜下にヒト腫瘍細胞を注入したマウス同所性 PRCC モデルを作成し、抗腫瘍効果を評価することとしました。このモデルにおいて CAR-T 細胞の投与は、固形腫瘍に対して有意な抗腫瘍効果を誘発した。我々の知る限り、これは PRCC に対する抗 c-met CAR-T 細胞の治療可能性を実証する最初の報告です。さらに、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果がアキシチニブとの組み合わせで相乗的に増強されることを示した。これは、CAR-T 細胞とアキシチニブの併用による臨床的利益に関する最初の報告でもある。

現在、PRCC のいくつかの薬剤が開発中または臨床試験中である。c-met を標的とする TKI である Savolitinib は、患者由来の異種移植 (PDX) モデルを使用して、PRCC に対して劇的な抗腫瘍効果を発揮することが証明されている (50)。PDX モデルでは、サボリチニブは、RCC および非小細胞肺癌に対して承認されているスニチニブやクリゾチニブよりも優れた抗腫瘍活性を示されている。さらに、PRCC に対するサボリチニブの非盲検ランダム化第 3 相臨床試験 (SAVOIR, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03091192) での有望な結果が報告されている (51)。この臨床試験では、PFS の中央値は 2 つのグループ間で統計的に優位さはなかったものの、サボリチニブ治療群の PFS はスニチニブ治療群の PFS よりも長い傾向にあった (サボリチニブ 7.0 か月 vs スニチニブ 5.6 か月)。一般に TKI による長期単剤療法は最終的には治療抵抗性をもたらすことが知られているが、それに対して CAR-T 細胞療法を含む免疫療法は、治療への耐性を誘発することなく長期間の治療効果をもたらすことが期待されている (25-30) このことから、アキシチニブとの併用療法を含む CAR-T 細胞療法は、TKI を含む従来の療法に対して再発、難治性の進行性 PRCC の治療選択肢となりうると考えられる。

CAR-T 細胞とアキシチニブの併用により誘発される治療効果の増強の根底にあるメカニズムは解明されていないが、CAR-T 細胞の腫瘍への浸潤はアキシチニブの作用により増加する可能性がある。一般に、静脈内注射された CAR-T 細胞の腫瘍組織への不十分な浸潤は、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の治療抵抗性の主な原因の 1 つである。一方、アキシチニブを含む VEGF と VEGFR の結合を阻害する TKI は免疫抑制性内皮細胞からなる腫瘍血管系を正常化することで、T 細胞と内皮の相互作用を増強し、腫瘍組織への T 細胞浸潤を増強することが報告されている (52-55)。さらに、アキシチニブは骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の免疫抑制能力を低下させる可能性がある (53)。

興味深いことに、アキシチニブは MDSC の抗原提示表現型への分化を誘導することも報告されている(47、53)。今回の実験系において使用した T 細胞が抗 c-met CAR-T を含む移入されたヒト T 細胞であり、マウスモデルにおいてマウス内皮細胞や抗原提示細胞との生理学的相互作用を起こさない。そのためこれらのメカニズムについての評価が難しい。評価のためには臨床検体を使用したさらなる実験が必要であり、今後の研究で検証を進めたい。

c-met の発現は癌に限定されず、上皮細胞、肝細胞、ニューロンを含むいくつかの正常な細胞型にも一部認められる。(10、56)。抗 c-met CAR-T 細胞の投与は、**on-target, off-tumor toxicity** を起こしうる。この研究では異種移植マウスモデルを採用したため、有害事象の誘発を評価することはできなかった。c-metCAR-T 細胞を使用した転移性乳がんの初期段階の臨床試験に関する以前の報告では、グレード 1 を超える薬物関連の有害事象は誘発されなかったことが示されている(31)。さらにこうした有害事象を避けるために自殺遺伝子(57-59)の導入など、安全性を改善するためのいくつかの遺伝子改変が CAR-T 細胞に適用されることが必要となるかもしれない。あるいは、投与される CAR-T 細胞の数を減らすことも、有害事象のリスクを減らすのに有益である可能性がある。ここで示されたように、免疫チェックポイント阻害剤、アキシチニブなどの TKI、または化学療法薬を含む他の薬剤と組み合わせることで必要な CAR-T 細胞数を減らすことがきるかもしれない。

異種 T 細胞応答による移植片対宿主病は、ヒト CAR-T 細胞が免疫不全マウスに移植される腫瘍モデルでは避けられない(60)。また、本研究ではドナー由来 T 細胞から CAR-T 細胞を作製したことから、HLA ミスマッチにより CAR-T 細胞の同種異系反応が誘導されたと推定された。したがって、*in vivo* モデルでの抗腫瘍効果は、腫瘍特異的反応と非特異的反応の両方の影響を受けている可能性があり、過大評価している可能性がある。ただし、UTD-T 細胞はモデルでほとんど抗腫瘍効果を発揮しなかったため、異種または同種異系反応による CAR-T 細胞の非特異的応答は無視できると考えられる。

この研究では、従来の CAR-T 細胞を使用し、同所性モデルで十分な抗腫瘍反応を誘導するには、比較的多数の CAR-T 細胞 ( $3 \times 10^6$  /mouse) が必要であった。治療効果を向上させるために、本研究では CAR-T 細胞とアキシチニブを併用した。他の報告では、固形腫瘍に対してより効率的に治療効果を発揮するために、独自の機能を付与した新規 CAR-T 細胞が作製されている。腫瘍組織の免疫抑制環境を克服するために、抗 PD-1 scFv を産生する能力を備えた CAR-T 細胞が開発されている(61、62)。そのほか、最近我々の研究室では固形腫瘍における CAR-T 細胞の浸潤、蓄積、および生存を強化するために、IL-7 と CCL19 を同時に発現する CAR-T 細胞を報告した(63)。抗腫瘍能力を高めるために、この研究で採用された抗 c-metCAR-T 細胞をそのような次世代の CAR システムに変換することも合理的である。

## 7. 結語

この研究では抗 c-met CAR-T 細胞療法が PRCC に適用可能であり、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果がアキシチニブとの組み合わせによって増強される可能性があることを初めて実証した。同系モデルや PDX モデルなど、別のモデルでの評価が今後必要と考えるが、これらの結果は、難治性 PRCC に対する抗 c-metCAR-T 細胞を使用した新しい治療法を明確に示唆します。

## 8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、技術支援を頂いた免疫学講座の梅津 大輔先生、飯田 恵康先生、黒澤 宏美さん、伊田 三保子さん、岡田 奈々さん、宮本真紀子さん、立壁賢さん、中村 七海さんに感謝致します。

## 9. 参考文献

1. Wang, L. et al. Molecular subtyping of metastatic renal cell carcinoma: implications for targeted therapy. *Mol Cancer*. 2014;13:39.
2. Yang, X.J. et al. A molecular classification of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65:5628-5637.
3. Sanders, M.E., Mick, R., Tomaszewski, J.E. & Barr, F.G. Unique patterns of allelic imbalance distinguish type 1 from type 2 sporadic papillary renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2002;161:997-1005.
4. Linehan, W.M. et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2016;374:135-145.
5. Vikram, R. et al. Papillary renal cell carcinoma: radiologic-pathologic correlation and spectrum of disease. *Radiographics*. 2009;29:741-754; discussion 755-747.
6. Delahunt, B. et al. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol*. 2001;32:590-595.
7. Courthod, G., Tucci, M., Di Maio, M. & Scagliotti, G.V. Papillary renal cell carcinoma: A review of the current therapeutic landscape. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;96:100-112.
8. Aparicio, L.M.A., Fernandez, I.P. & Cassinello, J. Tyrosine kinase inhibitors reprogramming immunity in renal cell carcinoma: rethinking cancer immunotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:1175-1182.
9. Bylicki, O., Paleiron, N., Assié, J.B. & Chouaïd, C. Targeting the MET-Signaling Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date. *Onco Targets Ther*. 2020;13:5691-5706.
10. Sakai, K., Aoki, S. & Matsumoto, K. Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. *J Biochem*. 2015;157:271-284.
11. Organ, S.L. & Tsao, M.S. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3:S7-s19.
12. Bottaro, D.P. et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*. 1991;251:802-804.
13. Ghossein, R.A. et al. Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer*. 1998;82:1513-1520.
14. Awad, M.M. et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol*. 2016;34:721-730.

15. Linehan, W.M. et al. Genetic basis of cancer of the kidney: disease-specific approaches to therapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6282s-6289s.
16. Linehan, W.M., Srinivasan, R. & Schmidt, L.S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol.* 2010;7:277-285.
17. Gibney, G.T. et al. c-Met is a prognostic marker and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2013;24:343-349.
18. Shaw, A.T. et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:2385-2394.
19. Camidge, D.R. et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2012;13:1011-1019.
20. Sweeney, P., El-Naggar, A.K., Lin, S.H. & Pisters, L.L. Biological significance of c-met over expression in papillary renal cell carcinoma. *J Urol.* 2002;168:51-55.
21. Schöffski, P. et al. Crizotinib achieves long-lasting disease control in advanced papillary renal-cell carcinoma type 1 patients with MET mutations or amplification. EORTC 90101 CREATE trial. *Eur J Cancer.* 2017;87:147-163.
22. Choueiri, T.K. et al. Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35:2993-3001.
23. Maude, S.L., Teachey, D.T., Porter, D.L. & Grupp, S.A. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125:4017-4023.
24. Jackson, H.J., Rafiq, S. & Brentjens, R.J. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13:370-383.
25. Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365:725-733.
26. Grupp, S.A. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368:1509-1518.
27. Maude, S.L. et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371:1507-1517.
28. Schuster, S.J. et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019;380:45-56.
29. Neelapu, S.S. et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377:2531-2544.
30. Locke, F.L. et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther.* 2017;25:285-295.
31. Tchou, J. et al. Safety and Efficacy of Intratumoral Injections of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2017;5:1152-1161.
32. Newick, K., O'Brien, S., Moon, E. & Albelda, S.M. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med.* 2017;68:139-152.

33. Zhang, E., Gu, J. & Xu, H. Prospects for chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for solid tumors. *Mol Cancer*. 2018;17:7.
34. Guedan, S., Ruella, M. & June, C.H. Emerging Cellular Therapies for Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:145-171.
35. Rafiq, S., Hackett, C.S. & Brentjens, R.J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17:147-167.
36. Lefèvre, M. et al. Adult papillary renal tumor with oncocytic cells: clinicopathologic, immunohistochemical, and cytogenetic features of 10 cases. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1576-1581.
37. Ishihara, H. et al. Genetic and epigenetic profiling indicates the proximal tubule origin of renal cancers in end-stage renal disease. *Cancer Sci*. 2020;111:4276-4287.
38. Mikami, S. et al. Classification of solid renal tumor with oncocytic/eosinophilic cytoplasm: is hybrid oncocytic/chromophobe renal tumor a subtype of oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, or a distinct tumor entity? *Ann Transl Med*. 2019;7:S350.
39. Ohashi, R. et al. Classic Chromophobe Renal Cell Carcinoma Incur a Larger Number of Chromosomal Losses Than Seen in the Eosinophilic Subtype. *Cancers (Basel)*. 2019;11:
40. Furuya, M., Hasumi, H., Yao, M. & Nagashima, Y. Birt-Hogg-Dubé syndrome-associated renal cell carcinoma: Histopathological features and diagnostic conundrum. *Cancer Sci*. 2020;111:15-22.
41. Tamada, K. et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin Cancer Res*. 2012;18:6436-6445.
42. Morgan, R.A. et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18:843-851.
43. Johnson, L.A. et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009;114:535-546.
44. Wilmes, L.J. et al. AG-013736, a novel inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinases, inhibits breast cancer growth and decreases vascular permeability as detected by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*. 2007;25:319-327.
45. Fenton, B.M. & Paoni, S.F. The addition of AG-013736 to fractionated radiation improves tumor response without functionally normalizing the tumor vasculature. *Cancer Res*. 2007;67:9921-9928.
46. Hu-Lowe, D.D. et al. Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3. *Clin Cancer Res*. 2008;14:7272-7283.
47. Yuan, H. et al. Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Biomed*



- Pharmacother.* 2014;68:751-756.
48. Rini, B.I. et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380:1116-1127.
  49. Atkins, M.B. et al. Axitinib in combination with pembrolizumab in patients with advanced renal cell cancer: a non-randomised, open-label, dose-finding, and dose-expansion phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2018;19:405-415.
  50. Schuller, A.G. et al. The MET Inhibitor AZD6094 (Savolitinib, HMPL-504) Induces Regression in Papillary Renal Cell Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models. *Clin Cancer Res.* 2015;21:2811-2819.
  51. Choueiri, T.K. et al. Efficacy of Savolitinib vs Sunitinib in Patients With MET-Driven Papillary Renal Cell Carcinoma: The SAVOIR Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020;6:1247-1255.
  52. Shrimali, R.K. et al. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 2010;70:6171-6180.
  53. Du Four, S. et al. Axitinib increases the infiltration of immune cells and reduces the suppressive capacity of monocytic MDSCs in an intracranial mouse melanoma model. *Oncoimmunology.* 2015;4:e998107.
  54. Huang, Y. et al. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:17561-17566.
  55. Georganaki, M., van Hooren, L. & Dimberg, A. Vascular Targeting to Increase the Efficiency of Immune Checkpoint Blockade in Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:3081.
  56. Cui, J.J. Targeting receptor tyrosine kinase MET in cancer: small molecule inhibitors and clinical progress. *J Med Chem.* 2014;57:4427-4453.
  57. Duong, C.P., Yong, C.S., Kershaw, M.H., Slaney, C.Y. & Darcy, P.K. Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. *Mol Immunol.* 2015;67:46-57.
  58. Lal, S., Lauer, U.M., Niethammer, D., Beck, J.F. & Schlegel, P.G. Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunol Today.* 2000;21:48-54.
  59. Greco, R. et al. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front Pharmacol.* 2015;6:95.
  60. Walsh, N.C. et al. Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:187-215.
  61. Nakajima, M., Sakoda, Y., Adachi, K., Nagano, H. & Tamada, K. Improved survival of chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) and tumor-specific T cells caused by anti-programmed cell death protein 1 single-chain variable fragment-producing CAR-T cells. *Cancer Sci.* 2019;110:3079-3088.
  62. Rafiq, S. et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo. *Nat Biotechnol.* 2018;36:847-856.

63. Adachi, K. et al. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol.* 2018;36:346-351.

**TABLE 1** Patient baseline characteristics

Factor	Number	%
<b>Age</b>		
66≥	19	57.60%
66<	14	42.40%
<b>Gender</b>		
Male	24	72.70%
Female	9	27.30%
<b>Subtype</b>		
Type-1	8	24.20%
Type-2	19	57.60%
Oncocytic variant	6	18.20%
<b>cT</b>		
T1a	19	57.60%
T1b	8	24.20%
T2	6	18.20%
≥T3	0	0%
<b>cN</b>		
0	33	100%
≥1	0	0%
<b>cM</b>		
0	33	100%
1	0	0%

**TABLE 2** Expression of c-met on clinical specimens

PRCC subtype	c-met protein expression (using IHC)			
	0	1	2	3
Type-1	0/8 (0%)	0/8 (0%)	4/8 (50.0%)	4/8 (50.0%)
Type-2	0/19 (0%)	1/19 (5.3%)	3/19 (15.8%)	15/19 (78.9%)
Oncocytic variant	1/6 (16.7%)	1/6 (16.7%)	0/6 (0%)	4/6 (66.6%)
<b>Total</b>	<b>1/33 (3.0%)</b>	<b>2/33 (6.1%)</b>	<b>7/33 (21.2%)</b>	<b>23/33 (69.7%)</b>

**Figure 1**

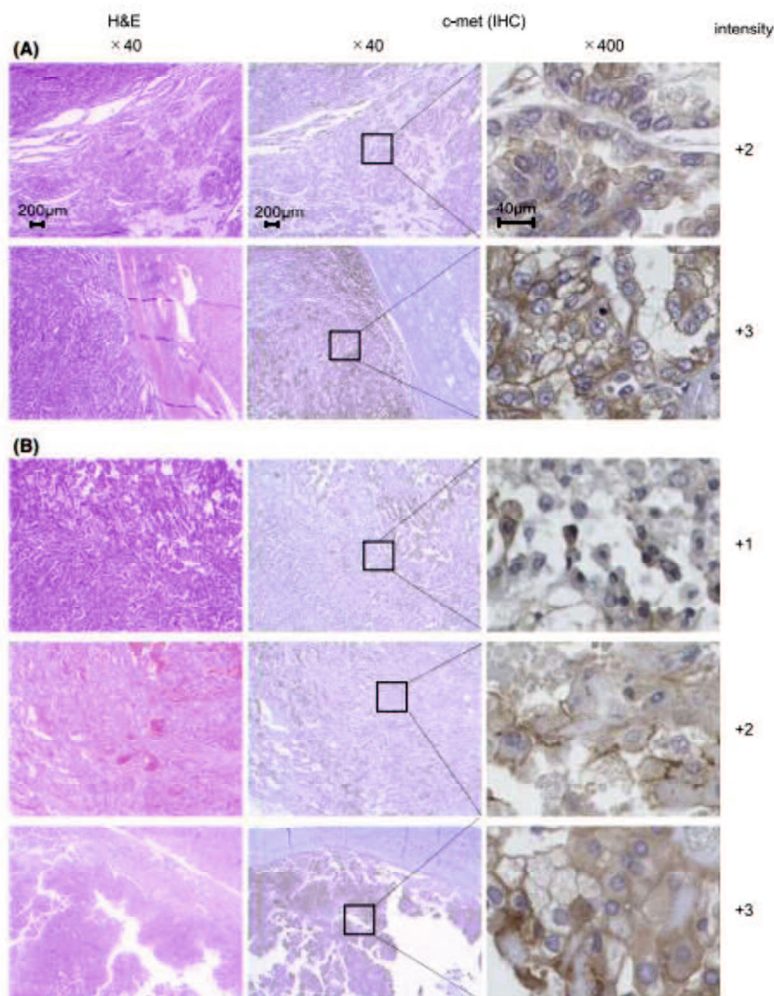


Figure 2

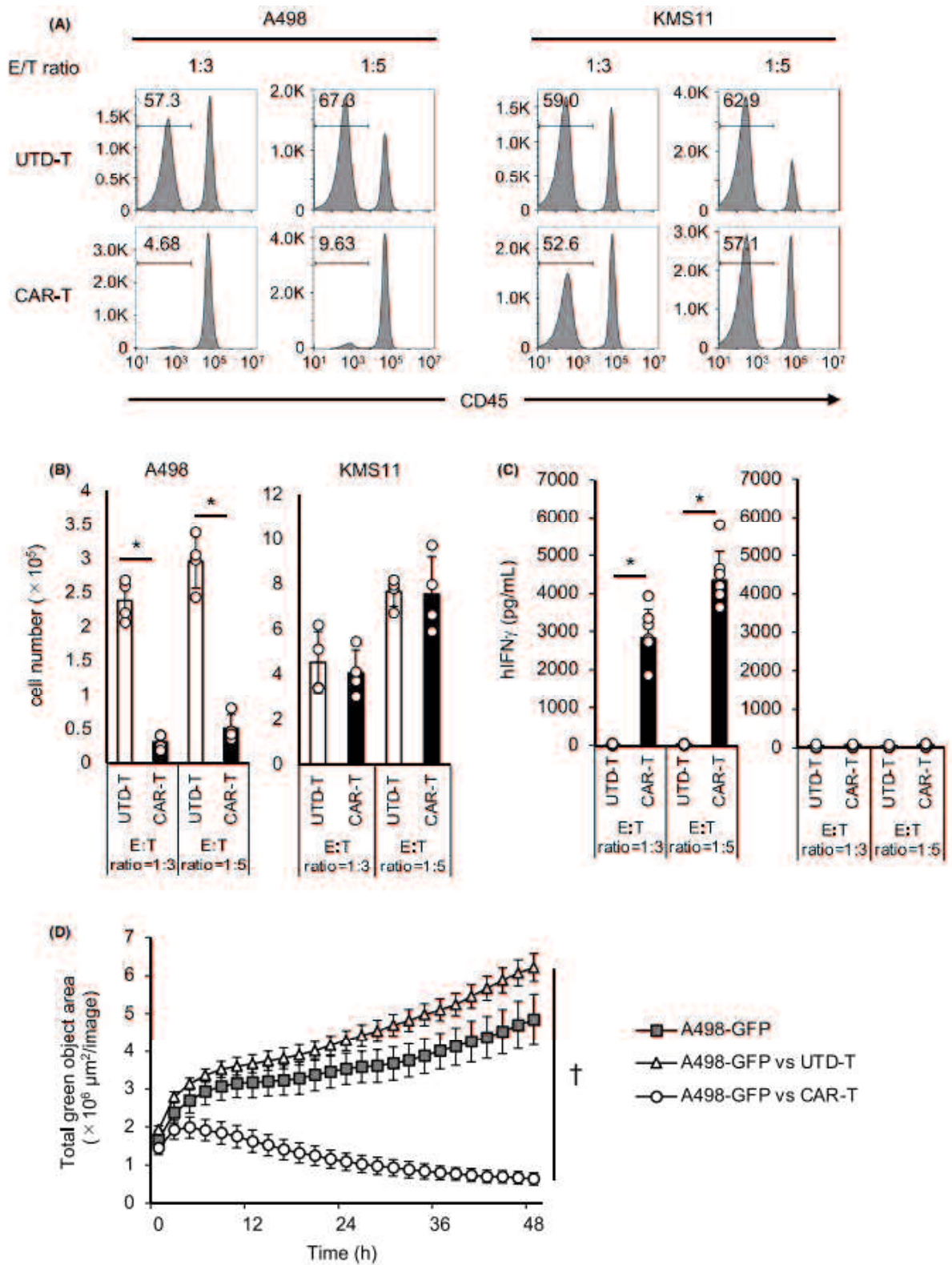




Figure 3

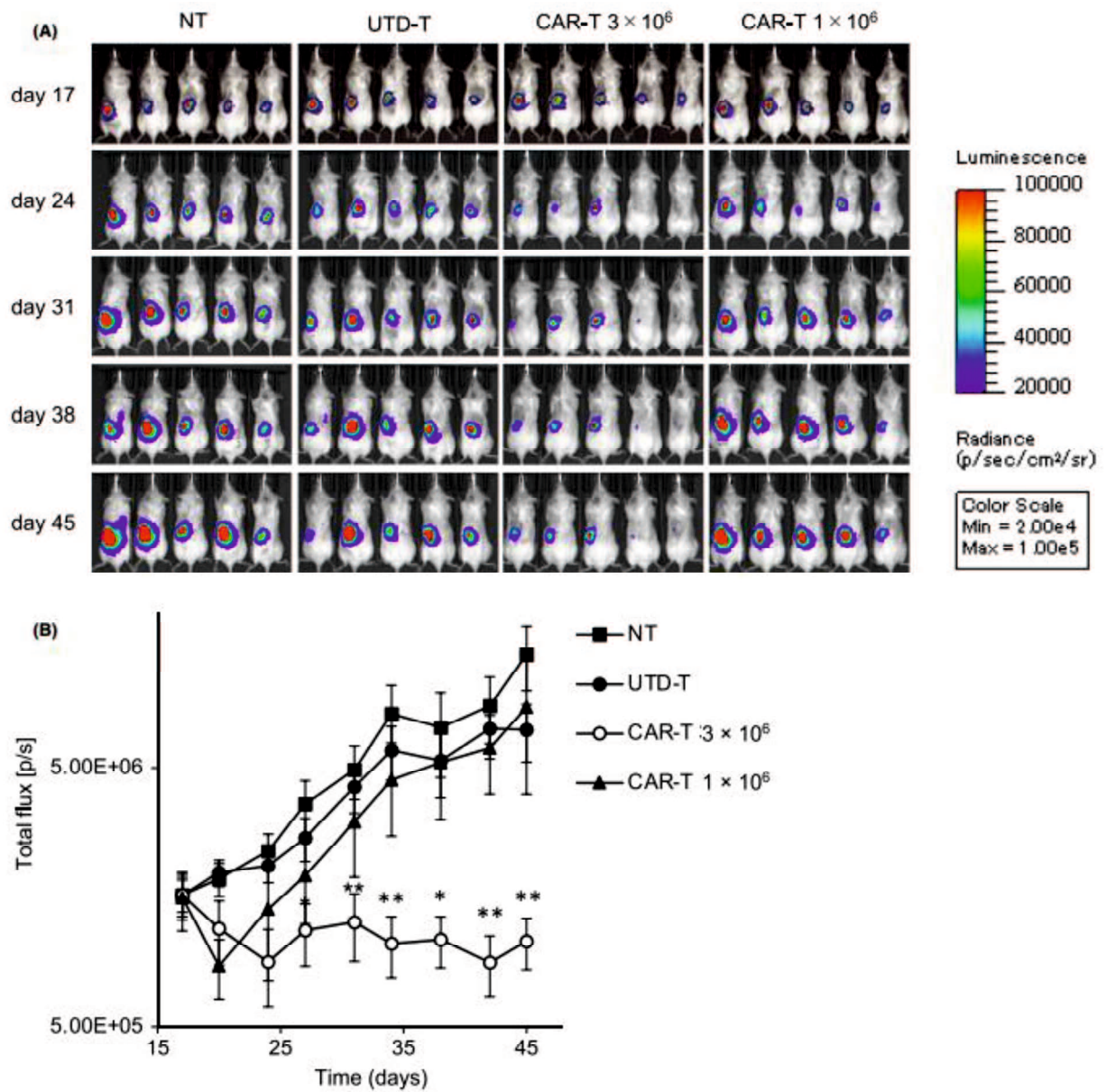


Figure 4

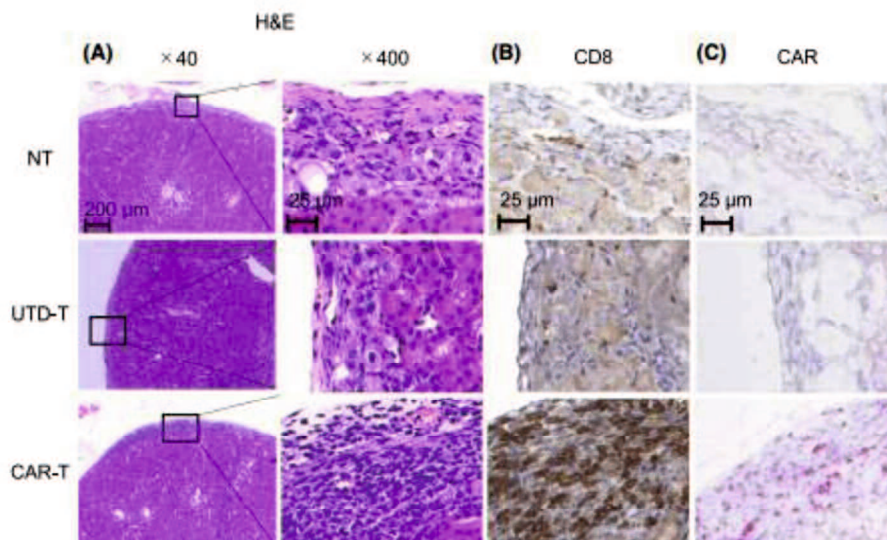


Figure 5

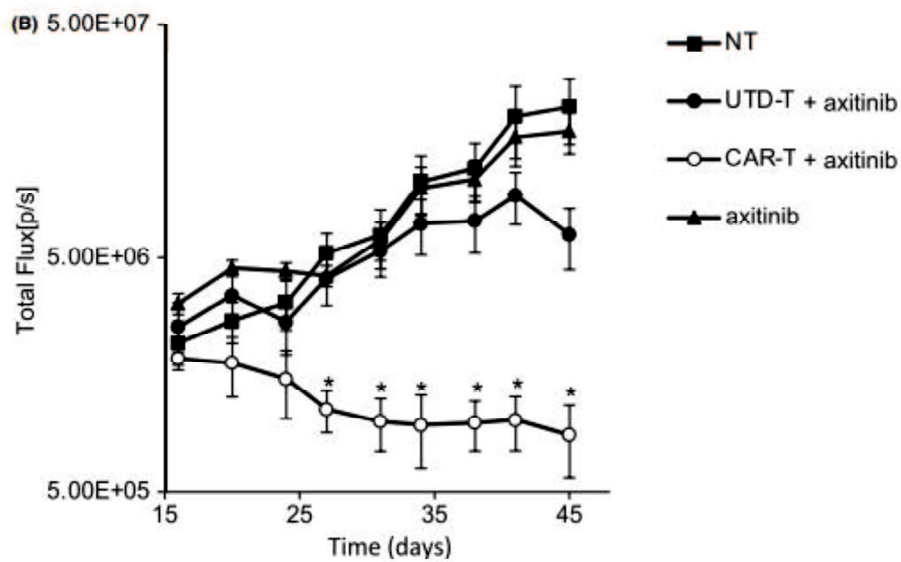
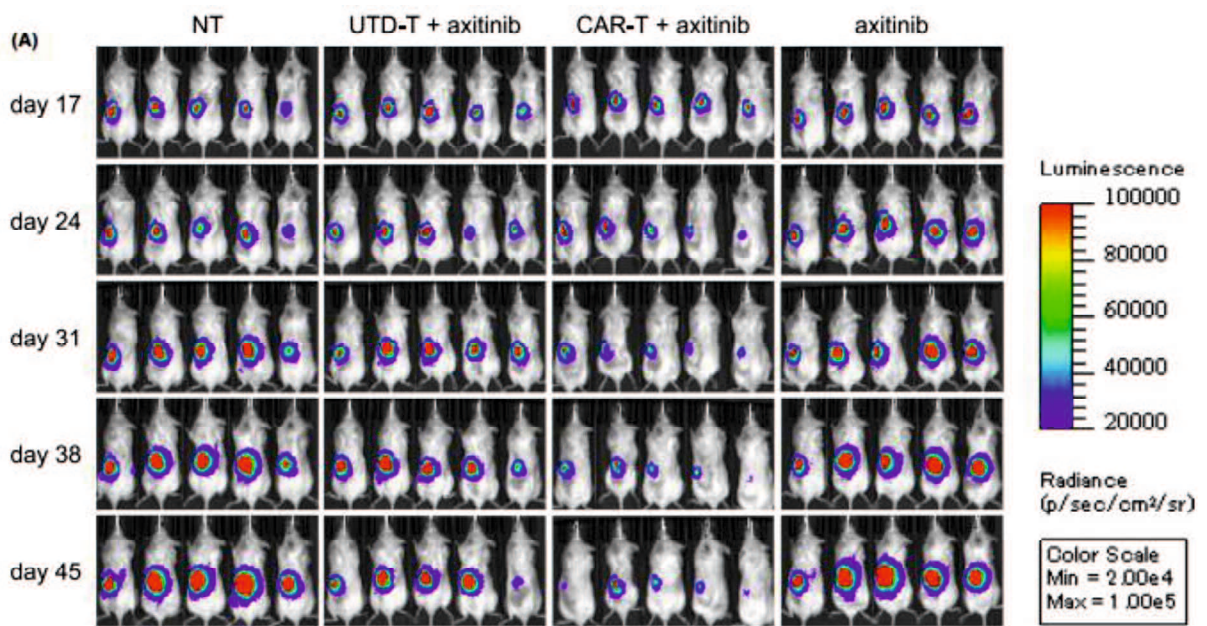




Figure S1

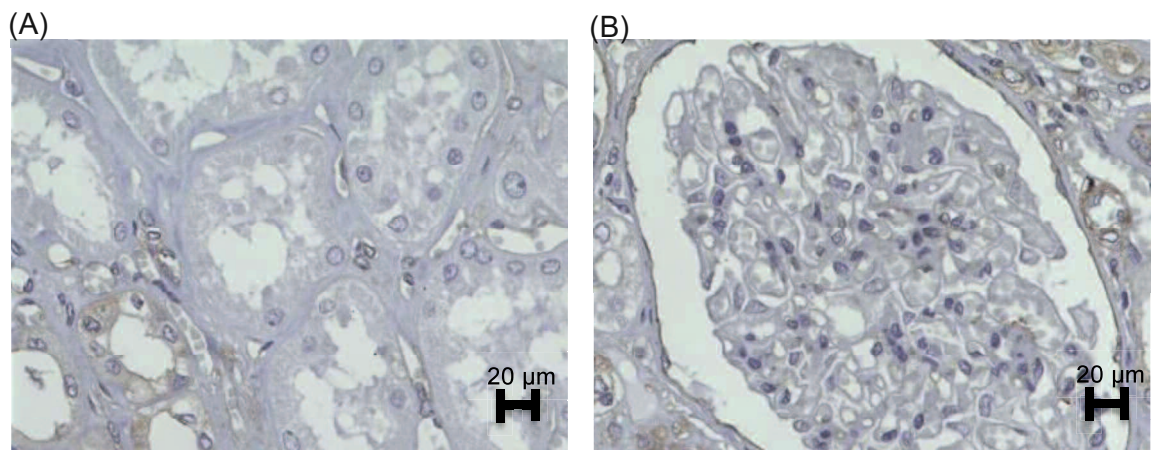
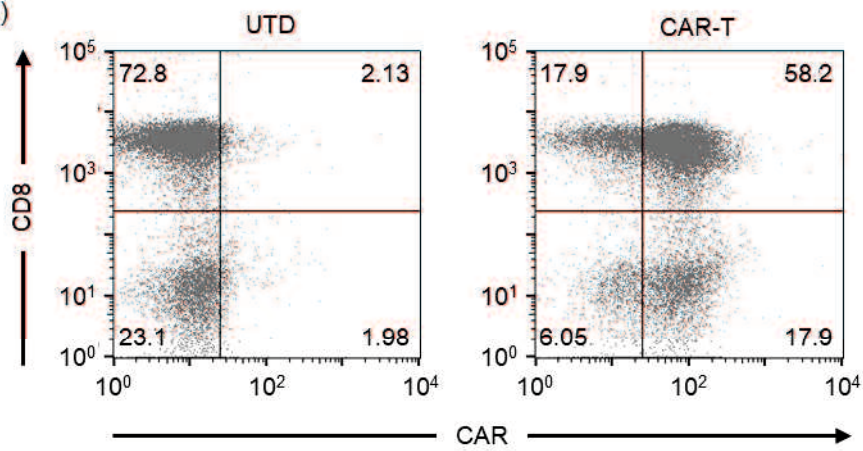


Figure S2

(A)



(B)



(C)

