学位論文（博士）

Therapeutic effects of anti-GM2 CAR-T cells expressing IL-7 and CCL19 for GM2-positive solid cancer in xenograft model

（異種移植モデルを用いた GM2 陽性固形がんに対する IL-7/CCL19 産生型抗 GM2 CAR-T 細胞療法の抗腫瘍効果の検討）

氏名　佐々木　貴宏
所属　山口大学大学院医学系研究科
医学専攻　病態制御内科学講座

令和 5 年 7 月

目　次

１．要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３

２．研究の背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３～４

３．目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４

４．方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５～７

⑴　対象　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５

⑵　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５～６

⑶　解析　・・・・・・・・・・・・・・・・・・７

５．結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７～９

６．考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９～１０

７．結語・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１１

８．謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１１

９．参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１２～１４

10．図・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１５～２３

１． 要旨

キメラ抗原受容体(CAR)-T 細胞療法は造血器腫瘍において優れた抗腫瘍効果を示している一方、固形がんにおいては臨床応用がまだなされていない。臨床応用におけるハードルとなっている理由の一つとして、固形がんでは適切な CAR ターゲットが欠如しているということにある。GM2 は糖鎖にシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の一群であるガングリオシドの一つであり、様々なタイプの固形がんにおいて過剰発現している。本研究では、我々が以前に開発したインターロイキン 7(IL-7)/ケモカインリガンド 19(CCL19)産生型ヒト CAR-T 細胞システムを用いて､GM2 が固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法のターゲットとなりうるかという点についてヒト肺小細胞がん異種移植マウスモデルを用いて探究した。IL-7/CCL19 産生型抗 GM2 CAR-T 細胞治療を行ったところ、GM2 陽性腫瘍の完全な退縮が観察され、腫瘍内部への豊富な T 細胞浸潤や長期のメモリー応答形成も観察されたが、有害事象は認めなかった。加えて、臨床において CAR-T 細胞使用時に問題となるサイトカイン放出症候群や神経毒性をコントロールする方法として､ガンシクロビル(GCV)投与によりアポトーシスが誘導される自殺システムである単純ヘルペスウイルス-チミジンキナーゼ(HSV-TK)を CAR-T 細胞に遺伝子導入した。HSV-TK 発現 IL-7/CCL19 産生型抗 GM2 CAR-T 細胞は、in vivo において GCV 投与により効果的に除去された。以上より、我々の研究は IL-7/CCL19 産生型ヒト抗 GM2 CAR-T 細胞の GM2 陽性固形がん治療への臨床応用における安全性を実証し、その有望な治療効果を明らかにした。

２． 研究の背景

近年、がん免疫療法の一つである、キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor：CAR)を遺伝子導入した T 細胞による CAR-T 細胞療法が注目されている。CAR とは、腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体の単鎖可変領域フラグメント(scFv)と、T 細胞受容体の細胞内シグナル伝達ドメインである CD3ζ鎖を融合させたキメラ分子であり、CAR を発現させた CAR-T 細胞は scFv で腫瘍抗原を認識すると活性化し、細胞傷害活性を発揮する。CAR は細胞内シグナル伝達ドメインの構造により 3 つの世代に分類され､CD3ζ鎖のみをシグナル伝達ドメインに用いた「第 1 世代」､CD3ζ鎖に加え CD28 あるいは CD137 などの T 細胞共刺激ドメインを一つ加えた「第 2 世代」、CD28 及び CD137 など異なる共刺激ドメインを複数組み込んだ「第 3 世代」がある(図 1)。第二世代以降の CAR-T 細胞は優れた抗腫瘍効果を有し、第二世代 CAR を用いた抗 CD19 CAR-T 細胞、及び抗 BCMA CAR-T 細胞は、それぞれ B 細胞腫瘍、及び多発性骨髄腫に対して著明な治療効果を示し、臨床応用されている(1-5)。その一方、固形がんに対する CAR-T 細胞療法の有効性は確立されていない。固形がん患者は全がん患者のうち 90%以上を占めるため、固形がんに対して有効性のある CAR-T 細胞を作製する次世代技術の開発が強く求められている。固形がんに対する CAR-T 細胞療法において十分な効果が得られないのは、固形がんが造血器腫瘍とは異なる特徴を有しているためである。第一に、固形がんは不均一性が強いため、正常細胞には発現せず、大多数の腫瘍細胞に選択的に発現しているターゲットを同定することが困難であることが挙げられる(6-8)。第二に、固形がんは腫瘍微小環境において様々な免疫抑制メカニズムによってもたらされる免疫学的バリアを有しており、CAR-T 細胞を含む免疫エフェクター細胞が適切な能力を発揮することが困難であることが挙げられる(6-8)。加えて、固形がんには線維性間質などの物理的バリアも存在しており、免疫細胞の腫瘍内部への集積、浸潤が

妨げられている(6-8)。

これらの障壁を克服するため、CAR-T 細胞における様々な技術開発が報告されている(6-8)。近年、我々のグループは、IL-7 と CCL19 を同時発現する改変型 CAR-T 細胞(以後、7×19 CAR-T 細胞と表記)を開発し、CCL19 の効果により T 細胞、及び樹状細胞の集積の活性化が引き起こされ、IL-7 により T 細胞の増殖、及びメモリー形成が促されることを報告した(9、10)。マウス由来同系マウス腫瘍モデルや患者由来異種移植腫瘍モデルを用いた様々ながん種において、7×19 CAR-T 細胞は従来の CAR-T 細胞に比べて有意に優れた抗腫瘍効果を示した(9、10)。7×19 CAR-T 細胞の高い治療効果は、少なくとも部分的に内在性の非 CAR-T 細胞に依存し(9、10)、他の armored CAR 技術とは異なる、特有のメカニズムを有することが示唆された。腫瘍抗原特異的 T 細胞受容体(TCR)を導入した T 細胞に IL-7、及び CCL19 を産生させた場合でも、マウスモデルにおいて抗腫瘍効果が高まることが観察された(11)。これらの知見は、IL-7 と CCL19 を同時産生させることが、固形がんに対するエフェクターT 細胞療法の治療効果を高める有力なプラットフォームになり得ることを示している。このコンセプトをより確かなものとするために、異なるターゲット分子を用いたさらなる研究が必要である。

GM2 は糖鎖にシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の一群であるガングリオシドの一つである(12)。200 種類以上のガングリオシドが発見されており、細胞表面に発現し、細胞膜形成や神経細胞分化、細胞接着、シグナル伝達などに重要な役割を担っていることが知られている(12、13)。ガングリオシドは神経組織に豊富に存在するが、GM1、GD1a、GD1b、GT1b、GQ1b がそのほとんどを占め、GM2 を含むその他のガングリオシドは正常神経組織にほとんど含まれない(12、13)。興味深いことに、GM2 は肺がんや大腸がん、卵巣がん、悪性胸膜中皮腫などの様々ながん組織において過剰発現しており(14-17)、GM2 はがん免疫療法の標的となり得ることが示されている。これまでに抗体依存性細胞傷害活性を強化した抗 GM2 モノクローナル抗体が開発され、第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験が行われており、効果は不十分であったが安全性は確認された(18)。GM2 とは異なるが、同様にガングリオシドをターゲットとしたがん免疫療法の例として、神経芽細胞腫、神経膠腫に対する抗 GD2 CAR-T 細胞療法がある(19、20)。臨床試験において、抗 GD2 CAR-T 細胞によって治療効果が見られた症例があった一方、明らかな神経毒性は観察されなかった(19、20)。これらの一連のエビデンスから、GM2 は様々な固形がんにおける新規 CAR-T 細胞療法のターゲットになり得ると予想した。

３． 目的

本研究の目的は、IL-7/CCL19 産生システムが CAR-T 細胞療法の治療効果を強化するプラットフォーム技術になるか、GM2 が固形がんにおける CAR ターゲットになりうるかを検討することであり、我々は本研究で抗 GM2 7×19 CAR-T 細胞を作製し、その治療効果についてヒト肺小細胞がんを接種した免疫不全マウスモデルにおいて評価した。加えて、抗 GM2 7×19 CAR-T 細胞のターゲット特異的長期メモリー応答の誘導に関しても検討した。さらに、ガンシクロビル投与に反応して CAR-T 細胞を除去するための自殺スイッチとして、 抗 GM2 7×19 CAR コンストラクトに組み込まれた単純ヘルペスウイルス-チミジンキナーゼ(HSV-TK)の効果を分析した。

４． 方法

（１）対象

マウスと細胞株

雌の7-8週齢のNOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}B2m^{em1Tac}H2-Ab1^{tm1Doi}/Jic (NOG-ΔMHC)マウスを日本クレアから購入し、全てのin vivo実験で使用した。以前にも報告したように、マウスは当施設の特定無菌環境下で飼育し(10)、到着後一週間、または実験終了までの期間、エンロフロキサシンを経口投与した。全ての動物実験は山口大学動物実験委員会によって承認された。ヒト肺小細胞がん細胞株であるLu-135、ヒト骨髄腫細胞株であるKMS11、ルシフェラーゼを恒常的に発現するヒト肺腺がん細胞株であるA549-Lucは、それぞれJapanese Collection of Research Bioresources Cell Bank(JCRB Cell Bank)から購入した。ヒト中皮腫細胞株であるNCI-H2052、ヒト結腸腺がん細胞株であるSW480は、American Type Culture Collection(ATCC)から購入した。Lu-135細胞は10%熱失活ウシ胎児血清(fetal bovine serum ; FBS、Gemini BioProducts)、及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン(富士フィルム和光純薬)を添加したRPMI-1640培地(Gibco)で培養した。KMS11細胞、及びNCI-H2052細胞は、10%熱失活FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、25 mM HEPES(Sigma-Aldrich)、及び50 mM 2-メルカプトエタノール(Thermo Fisher Scientific)を添加したRPMI-1640培地で培養した。A549-Luc細胞、及びSW480細胞は、10%熱失活FBS、及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDulbecco’s modified Eagle’s medium(DMEM、Gibco)培地で培養した。

（２）方法

CAR発現ベクターの設計とヒトT細胞への遺伝子導入

抗GM2単鎖可変領域フラグメント(scFv)は、ヒト化抗GM2モノクローナル抗体に由来する重鎖及び軽鎖の可変領域配列を用いて設計した(16-18)。CARコンストラクトは、scFv、ヒトCD8α膜貫通配列、ヒトCD28、4-1BB、及びCD3ζ細胞質内配列を用いて設計し、レトロウイルスpMSGV1ベクターにクローニングされた(21、22)。CARに加えて、ヒトIL-7、CCL19、及びHSV-TKは2A自己切断リンカー配列を用いて発現させた。ヒトT細胞への遺伝子導入は以前に記載されている通りに実施した(10、22)。一部の実験では、エンベロープ遺伝子とともにCAR発現遺伝子を形質導入されたプロデューサー細胞によりレトロウイルスを産生した。CARの形質導入効率は、GM2 CARに対する抗イディオタイプモノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーにより解析した。培養上清中のヒトIL7、及びCCL19の産生は、以前に報告されたように測定した(10)。非遺伝子導入T細胞は、レトロウイルスベクターの感染を行わずに同様の培養条件で作製した。

フローサイトメトリー

非標識ヒト化抗GM2モノクローナル抗体(Creative Biolabs)と、二次抗体としてAPC標識抗ヒトIgG Fcモノクローナル抗体(clone HP6017、Biolegend)を用いることで細胞表面のGM2発現を検出した。CAR発現T細胞はAPC-Cy7標識抗CD3モノクローナル抗体(clone HIT3a、Biolegend)、PerCPCy5.5標識抗CD4モノクローナル抗体(clone OKT4、Biolegend)、APC標識抗CD8モノクローナル抗体(clone HIT8a、Biolegend)、

及び/または抗GM2 CARに対するビオチン化抗イディオタイプモノクローナル抗体(細胞工学研究所)と、それに続く PE 標識ストレプトアビジン(Biolegend)を用いて検出した。Zombie Yellow Viability Dye(Biolegend)及びPE標識抗CD45モノクローナル抗体(clone HI30、Biolegend)を用いてin vitro共培養分析後の生存免疫細胞及び非免疫細胞を検出した。Human TruStain FcX(Biolegend)を用いて、モノクローナル抗体のFcγ受容体に対する非特異的結合を阻害した。フローサイトメトリーデータは、以前の報告と同様に取得し、解析した(10)。

細胞毒性のin vitro分析

In vitroでの細胞傷害活性を評価するために、CAR-T細胞または非遺伝子導入T細胞(1×10^5 cells/well)と腫瘍細胞とを共培養し、以前の報告と同様に残存腫瘍細胞数やT細胞数、IFN-γ産生を解析した(10)。CARコンストラクト間でCAR陽性細胞の割合が異なるため、共培養前に非遺伝子導入T細胞を加えることで、同じCAR発現レベルとなるように調節した。

In vivo 抗腫瘍マウスモデル

0日目にNOG-ΔMHCマウスの右側腹部に5×10^6、または1×10^7個のLu-135腫瘍細胞を皮下接種した。3日後、1×10^7個のCAR-T細胞または非遺伝子導入T細胞を尾静脈から静脈内投与した。 CARコンストラクト間でCAR陽性細胞の割合が異なるため、投与前に非遺伝子導入T細胞を加えることで、同じCAR発現レベルとなるように調節した。腫瘍再接種実験においては、7×19 CAR-T細胞投与によりLu-135腫瘍を拒絶したNOG-ΔMHCの右側腹部に、1×10^7個のLu-135細胞、または3×10^6個のKMS11細胞を、左側腹部に5×10^6個のSW480細胞を皮下接種した。全てのin vivo実験において、腫瘍サイズは以前の報告と同様に測定し(10)、腫瘍体積が1500 mm^3を超えた場合にはマウスを安楽死させた。

組織病理学的分析

腫瘍組織へのT細胞浸潤を解析するため、CAR-T細胞の静脈内投与9日後に腫瘍を摘出し、10%ホルムアルデヒドで固定後、パラフィンで包埋した。組織切片はH&E染色、またはウサギ抗CD4モノクローナル抗体(clone SP35、Roche)、ウサギ抗CD8モノクローナル抗体(clone SP57、Roche)、ウサギ抗Granzyme Bポリクローナル抗体(Roche)、及びマウス抗PD-1モノクローナル抗体(clone NAT105、Roche)を用いた免疫組織化学染色で解析した。BZ-710蛍光顕微鏡、及びBZ-Xアナライザー(キーエンス)を用いてH&E染色検体及び免疫組織化学染色検体の顕微鏡的解析を行った。

HSV-TK自殺活性の分析

In vitroでHSV-TK活性を解析するために、HSV-TK発現CAR-T細胞、またはHSV-TK非発現CAR-T細胞を、0、0.1、1、10 μMの濃度のGCV(田辺三菱製薬工場)存在下で培養した。3日後、CAR-T細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。In vivoでHSV-TK活性を解析するために、0日目にNOG-ΔMHCマウスの右側腹部に1×10^7個のLu-135腫瘍細胞を皮下接種し、3日目に1×10^7個のHSV-TK発現CAR-T細胞を静脈内投与した。7日目、21日目に、マウスにGCV 100 mg/kgを腹腔内投与し、5日目、11日目、18日目、25日目にマウス末梢血単核細胞中のCAR-T細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。腫瘍のサイズはデジタルノギスを用いて週に2回測定した。

（３）統計

統計

In vitro 実験及び in vivo マウス生存分析の統計解析は、それぞれ両側スチューデントの t 検定及びログランク検定を用いて解析した。$P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

５．結果

IL-7、CCL19、HSV-TK を発現する抗 GM2 CAR-T 細胞の作製

GM2 陽性固形がんに対する抗 GM2 CAR-T 細胞の治療可能性を評価するため、まず我々は抗 GM2 scFv、ヒンジ、膜貫通領域、CD28、4-1BB、及び CD3ζシグナル伝達モチーフを含む第 3 世代 CAR コンストラクトを設計した(以後、Conv.CAR と表記)。HSV-TK 配列は、CAR コンストラクトに 2A 自己切断リンカー配列を結合することにより組み込み(図 2A)、GCV への暴露により自殺システムが引き起こされるようにした。我々がこれまでに報告しているように、IL-7、及び CCL19 を共発現させることで固形がんにおける CAR-T 細胞の治療効果は著明に向上することから(9、10)、我々はさらに、HSV-TK とともにヒト IL-7、CCL19 配列をコードする抗 GM2 コンストラクトを設計した(以後、7×19 CAR と表記)。ヒト末梢血単核細胞にレトロウイルスベクターを用いて Conv.CAR または 7×19 CAR を形質導入した場合、CAR 導入効率はそれぞれ約 89%及び約 85%であった(図 2B)。ヒト IL-7 及び CCL19 は 7×19 CAR-T 細胞の培養上清中に豊富に検出されたが、Conv.CAR-T 細胞や非遺伝子導入(以後、UTD と表記)T 細胞の培養上清中では検出されなかった(図 2C)。これらの結果により、抗 GM2 CAR コンストラクトが正常に作製されたことが立証された。

In vitro における抗 GM2 CAR-T 細胞の抗腫瘍反応

次に我々は、複数の内在性GM2陽性またはGM2陰性ヒト腫瘍細胞株に対する in vitro における抗腫瘍反応を見ることで、Conv.CAR-T 細胞及び 7×19 CAR-T 細胞の機能を評価した。GM2 陽性腫瘍として、ヒト肺小細胞がん細胞株である Lu-135、及びヒト肺腺がん細胞株である A549-Luc を使用した(図 3A)。GM2 陰性腫瘍として、ヒト中皮腫細胞株である NCI-H2052 を使用した。GM2 陽性である Lu-135 腫瘍または A549-Luc 腫瘍と Conv.CAR-T 細胞または 7×19 CAR-T 細胞を共培養した場合、UTD-T 細胞と比較して残存腫瘍細胞数が著明に減少した(図 3B)。一方で、GM2 陰性である NCI-H2052 腫瘍に対しては、Conv.CAR-T 細胞も 7×19 CAR-T 細胞も殺細胞活性を示さなかった。さらに、GM2 陽性である Lu-135 腫瘍または A549-Luc 腫瘍との共培養では、Conv.CAR-T 細胞及び 7×19 CAR-T 細胞からの IFN-γ分泌が検出されたが、UTD-T 細胞からの IFN-γ分泌は検出されなかった。一方で、NCI-H2052 との共培養では、Conv.CAR-T 細胞、及び 7×19 CAR -T 細胞からの IFN-γ分泌はほとんど検出されなかった(図 3C)。このモデルでは、7×19 CAR -T 細胞の IFN-γ 産生レベルは Conv.CAR-T 細胞よりも低かったが、異なるドナーで異なる腫瘍と共培養した場合には Conv.CAR-T 細胞と比べて 7×19 CAR-T 細胞の IFN-γ 分泌レベルは同等あるいは高かったため、IFN-γ分泌に IL-7、及び CCL19 の存在が必ずしも関与していたわけではない(データ未提示)。これらの結果から、抗 GM2 CAR-T 細胞は腫瘍細胞上の GM2 抗原に対して特異的な免疫応答を示すことが立証された。

In vivoでのヒト肺小細胞がんモデルにおける抗GM2 7×19 CAR-T細胞の治療効果

In vivoでの抗GM2 CAR-T細胞の抗腫瘍効果を検証するため、我々はヒト肺小細胞がん固形腫瘍モデルを開発した。0日目にLu-135を免疫不全NOG-ΔMHCマウスの側腹部に皮下接種し、3日目にConv.CAR-T細胞、7×19 CAR-T細胞またはUTD-T細胞を静脈内投与し、残りのマウスは未治療とした。Lu-135は7×19 CAR-T細胞投与群で完全に拒絶されたが、他の群では拒絶が見られなかった(図4A)。その結果に一致して、腫瘍接種マウスの生存率は、7×19 CAR-T細胞投与群で著明に延長したが、他の群では延長しなかった(図4B)。頭位傾斜、歩行障害、痙攣などの神経毒性は、治療を受けたいずれのマウスでも観察されなかった(データ未提示)。図3Bで示したように、Conv.CAR-T細胞も7×19 CAR-T細胞も、in vitroではGM2陽性腫瘍に対して同程度の細胞傷害活性を有していたが、ヒト肺小細胞がん異種移植モデルにおいてはConv.CAR-T細胞では治療効果が観察されず、7×19 CAR-T細胞においてのみ強力な治療効果を誘発できることがこの結果から示された。

7×19 CAR-T細胞投与マウスの腫瘍組織における豊富なT細胞浸潤

ヒト肺小細胞がん異種移植モデルにおいて、Conv.CAR-T細胞と7×19 CAR-T細胞が異なる治療効果を示すメカニズムを解析するため、我々は腫瘍組織に浸潤しているT細胞のレベルを解析した。なぜならば、我々の以前の研究で一部の腫瘍モデルにおいて、7×19 CAR-T細胞の治療効果が腫瘍組織内部に浸潤するT細胞の程度と関連していることが明らかとなったためである(9、10)。Conv.CAR-T細胞または7×19 CAR-T細胞で治療したマウスからLu-135腫瘍組織を摘出し、免疫組織化学染色を用いてT細胞の存在を解析した。CD4陽性及びCD8陽性ヒトT細胞の浸潤はConv.CAR-T細胞治療群と比較して7×19 CAR-T細胞治療群で有意に増加していることが判明し、CD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞よりも顕著に浸潤していた(図5A、B)。また、7×19 CAR-T細胞治療群のマウス腫瘍組織内には、Conv.CAR-T細胞治療群に比べグランザイムB陽性細胞浸潤が目立つことが判明し、いずれの治療群でもPD-1陽性細胞はほとんどないことが判明した(図6)。これらの結果は、GM2腫瘍抗原をターゲットとするCAR-T細胞にIL-7及びCCL19を同時発現させた場合にT細胞浸潤が強化され、浸潤T細胞は細胞傷害活性を有するが疲弊はしていないフェノタイプであることが示された。

7×19 CAR-T細胞治療により誘導されるGM2特異的メモリー応答

我々は以前に、マウス腫瘍モデル及びヒト腫瘍モデルの両方において、7×19 CAR-T細胞治療によって長期の抗腫瘍メモリー応答が形成されることを報告した(9、10)。従って、次に我々は抗GM2 7×19 CAR-T細胞もまたGM2陽性腫瘍に対する特異的なメモリー応答を誘導できるかどうかを検討した。抗GM2 7×19 CAR-T細胞治療によりLu-135を完全に拒絶したNOG-ΔMHCマウスを4週間以上飼育し、GM2陽性またはGM2陰性腫瘍を再接種した。コントロールとして、未処置NOG-ΔMHCマウスにも同様の方法で腫瘍を接種した。未処置マウスと比較し、腫瘍拒絶後マウスにおいて、Lu-135の増殖は有意に抑制されたが、GM2陰性ヒト結腸腫瘍細胞であるSW480の腫瘍増殖はこれらのマウスの間で同等であった(図7A)。免疫応答のターゲット特異性をさらに確認するため、別のLu-135拒絶後マウスに対して、GM2を発現するヒト多発性骨髄腫細胞株であるKMS11(図8)を再接種した。腫瘍拒絶マウスはKMS11の増殖を有意に抑制したが、SW480の増殖は抑制せず(図7B)、抗GM2 7×19 CAR-T細胞治療により誘導される長期のメモリー応答はGM2抗原特異的であることが示唆された。これらの観察に加え、腫瘍拒絶マウスのCD8陽性CAR-T細胞の約50%がCCR7陽性、CD45RA陽性のステムセ

ルメモリーの表現型を示した(データ未提示)。

GCVによるHSV-TK発現7×19 CAR-T細胞の除去

本研究で作製した抗GM2 7×19 CAR-T細胞は、必要に応じてCAR-T細胞を除去できるように、HSV-TK 自殺遺伝子が組み込まれている。HSV-TK の機能を確認するため、GCVの効果をin vitro及びin vivoで評価した。はじめに、HSV-TK発現またはHSV-TK非発現抗GM2 7×19 CAR-T細胞を、GCVが0、0.1、1、10 μMの濃度で含まれる培地で3日間培養した。HSV-TK発現7×19 CAR-T細胞において、GCV濃度依存性に残存CAR-T細胞数が有意に減少したが、HSV-TK非発現7×19 CAR-T細胞ではCAR-T細胞数は減少しなかった(図9A)。次に、in vivoでのHSV-TKの効果を評価するため、NOG-ΔMHCマウスに対して0日目にLu-135を皮下接種し、HSV-TK発現抗GM2 7×19 CAR-T細胞を3日目に静脈内投与後、マウスを2群に分け、一つの群には7日目、21日目にGCV 100 mg/kgを腹腔内投与し、残りの群にはGCVは投与しなかった。GCV投与群のマウスではGCV非投与群のマウスに比べ、マウス末梢血単核細胞中のCAR-T細胞の割合が有意に減少した(図9B)。さらに、7×19 CAR-T細胞によるLu-135増殖抑制効果は、GCV投与により減弱した(図9C)。これらの結果は、HSV-TKを組み込んだ抗GM2 7×19 CAR-T細胞がGCV投与に対して感受性があることを示し、in vivoにおいて7×19 CAR-T細胞の免疫学的機能をコントロールできることを示した。

６．考察

本研究では、従来の抗GM2 CAR-T細胞に対して抵抗性であるGM2陽性ヒト肺小細胞がん皮下接種免疫不全マウスモデルにおける、抗GM2 7×19 CAR-T細胞の強力な治療効果を明らかにした。治療効果は腫瘍組織への豊富なT細胞浸潤と腫瘍再増大を予防する長期の GM2 特異的免疫応答と相関していた。我々が知る限り、本研究は GM2 がCAR-T 細胞療法のターゲットになることを示した最初の報告である。さらに、本研究は種々の固形がんに対するCAR-T細胞に適応可能なプラットフォーム技術として、IL-7/CCL19産生システムの可能性を支持している。

我々の以前の研究で、CAR-T細胞、あるいはTCR-T細胞などの抗腫瘍エフェクターT細胞における IL-7、CCL19発現の遺伝子改変が腫瘍組織への豊富な免疫細胞浸潤及び長期の免疫応答を誘導することで、固形がんに対する治療効果を高めることを示した(9-11)。抗GM2 CAR-T細胞を使用した本研究で観察された結果は、以前の知見と一致している。本研究は腫瘍接種後3日目という腫瘍増殖初期段階でCAR-T細胞を投与するモデルを採用したため、将来的には腫瘍増殖後期段階での抗GM2 7×19 CAR-T細胞の治療効果を評価することも必要かつ重要である。GM2は様々ながん腫において過剰発現しているが、神経細胞あるいは非神経細胞を含む正常組織ではほとんど発現していない(12-17)。腫瘍細胞におけるGM2発現増加は、放射線耐性肺がんの浸潤性及び化学療法薬への耐性などの悪性度と相関することが報告されている(23、24)。腫瘍細胞上の GM2 は、T 細胞の機能不全及びアポトーシスを誘導することで免疫抑制効果を介在することも報告されている(25)。これらの生物学的特徴に基づいて、抗体依存性細胞傷害活性を媒介する抗 GM2 モノクローナル抗体や、抗腫瘍免疫応答を刺激する GM2ベースのワクチンなど、GM2 は様々な免疫療法のターゲットとして研究されてきた(16、17、26)。肺がん、多発性骨髄腫、悪性黒色腫の患者を対象としたこれらのアプローチによる臨床試験では、安全性への懸念は示されなかったが、臨床効果は不十分であった(18、26、27)。これらの結果は、より強力で認容性のあるGM2を標的とした免疫療法が必要であることを示しており、IL-7/CCL19産生型抗GM2 CAR-T細胞を研究

開発する動機となった。

GM2 に加えて、GD2、GD3、GM3、fucosyl-GM1 を含む複数のガングリオシドが、がん細胞で過剰発現し、少なくとも部分的にがんの悪性特性と関連していることが知られている(28)。ガングリオシドを標的とした抗悪性腫瘍薬が研究されており、抗 GD2 CAR-T 細胞が最も先進的な免疫細胞療法の一つである。神経芽細胞腫または神経膠腫患者に抗 GD2 CAR-T 細胞を投与した場合に、用量制限毒性を示すことなく、臨床的及び画像上の反応が見られた症例もあった(19、20)。従って、ガングリオシドを過剰発現するがん細胞に対する CAR-T 細胞療法は有望なアプローチであるが、ガングリオシドは中枢、及び末梢神経組織で高レベルから低レベルまで発現しているため、神経毒性は治療の重大な懸念事項である。神経芽細胞腫の前臨床異種移植モデルでは、親和性を強化した抗 GD2 scFv を発現する CAR-T 細胞を 3×10^6 個投与した場合に、致命的な脳炎を伴う神経毒性が誘発されることが示された(29)。本研究においては、IL7/CCL19 発現抗 GM2 CAR-T 細胞を 1×10^7 個投与したが神経毒性に関連する症状は認めず、我々のアプローチの臨床適応性をさらに支持する結果となっている。ガングリオシドを標的とする CAR-T 細胞が、神経組織において抗腫瘍細胞毒性及び on-target off-tumor 毒性をどのように区別しているかに関しての正確なメカニズムは不明のままであるが、GM3 及び GM1 で例示されるように、腫瘍細胞と正常細胞における細胞膜上のガングリオシド発現強度や構造の違いに起因している可能性がある(30、31)。

CAR-T 細胞療法の重要な臨床上の問題の一つは、CAR-T 細胞の過剰な活性化により引き起こされる重篤な有害事象であるサイトカイン放出症候群(cytokine-release syndrome; CRS)、及び免疫エフェクター細胞関連神経毒性症候群(immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome; ICANS)をいかにコントロールするかということである(32、33)。さらに、on-target off-tumor 毒性もまた克服すべき重要な有害事象の一つである(32、33)。臨床的重症度を評価するためのスコアリングシステムやトシリズマブ投与など、CRS に対する治療戦略は確立されつつあるが、ICANS 及び on-target off-tumor 毒性をより適切にコントロールするには、in vivo で CAR-T 細胞の機能を制御するためのさらなるアプローチが必要である。この目的のため、自殺遺伝子の発現や、モノクローナル抗体により認識されるエピトープ配列を組み込むことなどが、in vivo で選択的に CAR-T 細胞を除去できる方法として提案されている(34-37)。本研究において我々は、HSV-TK を発現する抗 GM2 7×19 CAR-T 細胞を作製し、GCV 投与により CAR-T 細胞が効果的に除去され、in vivo で CAR-T 細胞の機能が減弱されることを確認した。マウス及びヒトにおける GCV の薬物動態を評価した以前の研究に基づいた場合(38、39)、本研究で使用した用量で GCV を投与した場合のマウス血漿 GCV 濃度は、標準量の GCV で治療されたヒト血漿 GCV 濃度よりも低いことが予想されるため、本研究でのマウスモデルでの結果はヒトに対しても外挿性があることを示している。従って、HSV-TK 自殺システムの導入は、7×19 CAR-T 細胞療法の臨床的安全性を改善するための有用なアプローチになり得ると考えられる。

７．結語

本研究は、GM2陽性固形がんの治療に対して、我々の開発したIL-7/CCL19発現CAR-T細胞技術を用いることで、GM2が有望な治療標的となりうることを明らかにした。抗GM2 7×19 CAR-T細胞のさらなる技術向上や、固形がん患者に対する治療効果、及び安全性を臨床試験で評価することが、次世代の免疫療法の確立のために重要であり、強く求められている。

８．謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導ご鞭撻頂いた山口大学医学部大学院医学系研究科免疫学講座 玉田 耕治教授、佐古田 幸美先生、安達 圭志先生、徳永 良洋先生、技術支援を頂いた同講座 黒澤 宏美氏、伊田 三保子氏、中村 七海氏、大橋 玲子氏、河合亜紀氏、抗GM2モノクローナル抗体の配列情報を提供頂いた協和キリン株式会社様に心より感謝申し上げる。また、本研究を行うにあたってご支援・ご助言頂いた谷澤 幸生先生(現山口大学学長)に深く感謝申し上げる。

９．参考文献

1) Maude, S.L., et al., Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018; **378**: 439-448.
2) Schuster, S.J., et al., Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2019; **380**: 45-56.
3) Park, J.H., et al., Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018; **378**: 449-459.
4) 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.
5) Raje, N., et al., Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2019; **380**: 1726-1737.
6) Guedan, S., M. Ruella, and C.H. June, Emerging Cellular Therapies for Cancer. *Annu Rev Immunol* 2019; **37**: 145-171.
7) Hong, M., J.D. Clubb, and Y.Y. Chen, Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell* 2020; **38**: 473-488.
8) Larson, R.C. and M.V. Maus, Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer* 2021; **21**: 145-161.
9) 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.
10) Goto, S., et al., Enhanced anti-tumor efficacy of IL-7/CCL19-producing human CAR-T cells in orthotopic and patient-derived xenograft tumor models. *Cancer Immunol Immunother* 2021; **70**: 2503-2515.
11) Tokunaga, Y., et al., Enhanced Antitumor Responses of Tumor Antigen-Specific TCR T Cells Genetically Engineered to Produce IL7 and CCL19. *Mol Cancer Ther* 2022; **21**: 138-148.
12) Schnaar, R.L., The Biology of Gangliosides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 2019; **76**: 113-148.
13) Leal, A.F., et al., GM2 Gangliosidoses: Clinical Features, Pathophysiological Aspects, and Current Therapies. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 6213
14) Miyake, M., et al., Generation of two murine monoclonal antibodies that can discriminate N-glycolyl and N-acetyl neuraminic acid residues of GM2 gangliosides. *Cancer Res* 1988; **48**: 6154-60.
15) Nishinaka, Y., M.H. Ravindranath, and R.F. Irie, Development of a human monoclonal antibody to ganglioside G(M2) with potential for cancer treatment. *Cancer Res* 1996; **56**: 5666-71.
16) Yamada, T., et al., Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 antibody against multiple organ metastasis produced by GM2-expressing small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci* 2011; **102**: 2157-63.
17) Li, Q., et al., Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibodies against malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci* 2015; **106**: 102-7.

18) Baz, R.C., et al., Phase I Study of Anti-GM2 Ganglioside Monoclonal Antibody BIW-8962 as Monotherapy in Patients with Previously Treated Multiple Myeloma. *Oncol Ther* 2016; **4**: 287-301.
19) Richards, R.M., E. Sotillo, and R.G. Majzner, CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol* 2018; **9**: 2380.
20) Majzner, R.G., et al., GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature* 2022; **603**: 934-941.
21) 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**: 843-51.
22) Tamada, K., et al., Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 6436-45.
23) Ishihara, S., et al., Glycosphingolipid GM2 induces invasiveness in irradiation-tolerant lung cancer cells. *Cell Struct Funct* 2018; **43**: 177-185.
24) Kiura, K., et al., An alteration of ganglioside composition in cisplatin-resistant lung cancer cell line. *Anticancer Res* 1998; **18**: 2957-60.
25) Biswas, K., et al., GM2 expression in renal cell carcinoma: potential role in tumor-induced T-cell dysfunction. *Cancer Res* 2006; **66**: 6816-25.
26) Eggermont, A.M., et al., Adjuvant ganglioside GM2-KLH/QS-21 vaccination versus observation after resection of primary tumor > 1.5 mm in patients with stage II melanoma: results of the EORTC 18961 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 3831-7.
27) Park, K., et al., BIW-8962, an Anti-GM2 Ganglioside Monoclonal Antibody, in Previously Treated Advanced/Recurrent Lung Cancer: a Phase Ⅰ/Ⅱ Study. *J Cancer Biol Therap* 2018; **4**: 191-201.
28) Krengel, U. and P.A. Bousquet, Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front Immunol* 2014; **5**: 325.
29) Richman, S.A., et al., High-Affinity GD2-Specific CAR T Cells Induce Fatal Encephalitis in a Preclinical Neuroblastoma Model. *Cancer Immunol Res* 2018; **6**: 36-46.
30) Nores, G.A., et al., Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody, and GM3 lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen. *J Immunol* 1987; **139**: 3171-6.
31) Lingwood, D., et al., Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nat Chem Biol* 2011; **7**: 260-2.
32) Rafiq, S., C.S. Hackett, and R.J. Brentjens, Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; **17**: 147-167.
33) Neelapu, S.S., et al., Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; **15**: 47-62.

34) Casucci, M., et al., Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Front Immunol* 2018; **9**: 507.
35) Straathof, K.C., et al., An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005; **105**: 4247-54.
36) Griffioen, M., et al., Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy. *Haematologica* 2009; **94**: 1316-20.
37) Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 2011; **118**: 1255-63.
38) Boujemla, I., et al., Pharmacokinetics and tissue diffusion of ganciclovir in mice and rats. *Antiviral Res* 2016; **132**: 111-5.
39) Sommadossi, J.P., et al., Clinical pharmacokinetics of ganciclovir in patients with normal and impaired renal function. *Rev Infect Dis* 1988; **10 Suppl 3**: S507-14.

１０．図

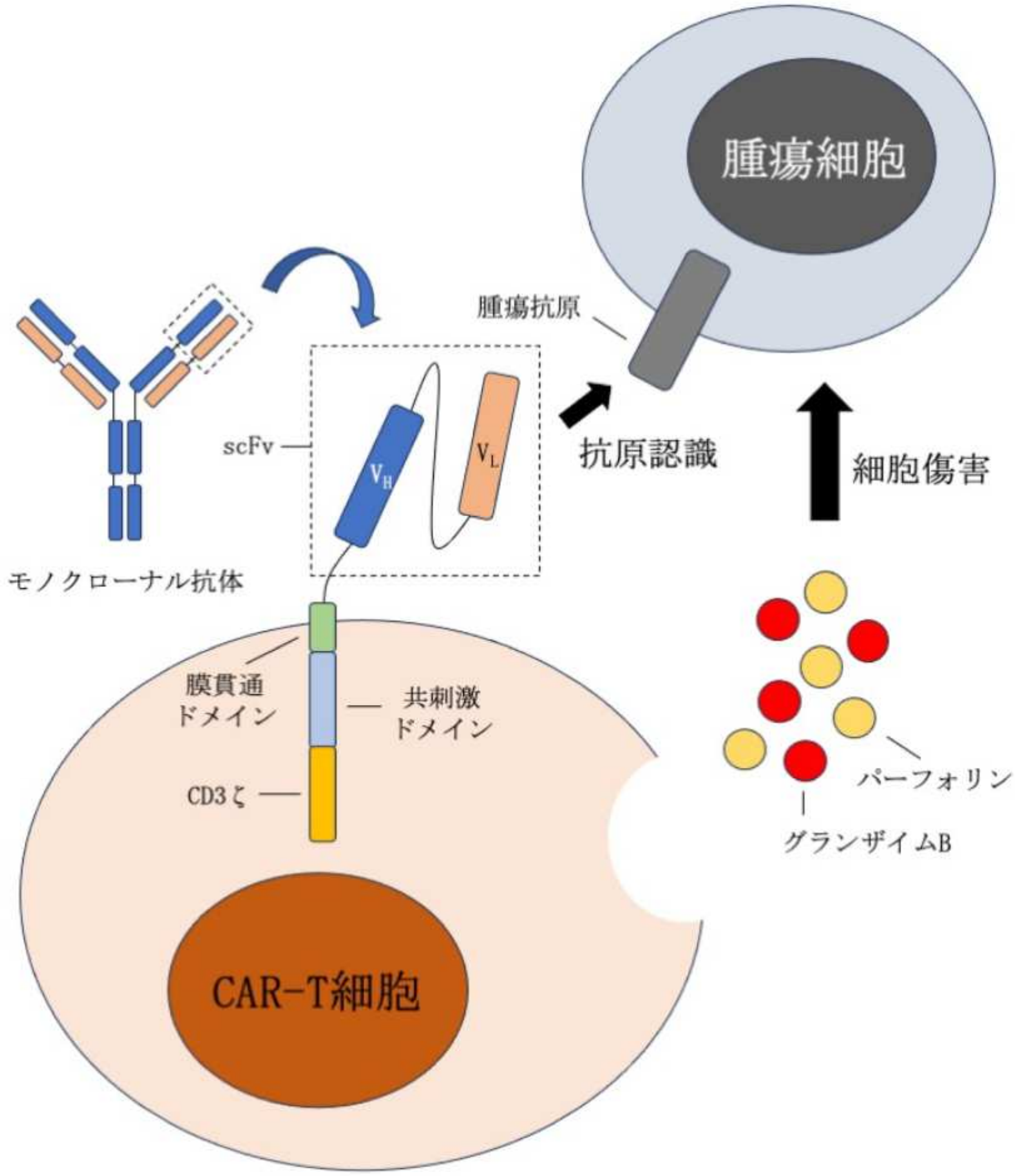

図 1. 第 2 世代 CAR-T 細胞の概要図。CAR-T 細胞はモノクローナル抗体由来の単鎖可変領域フラグメント(scFv)で腫瘍抗原を認識すると活性化し、パーフォリンやグランザイム B などを分泌することで細胞傷害活性を発揮する。
(参考文献 8 図 1 を改変)

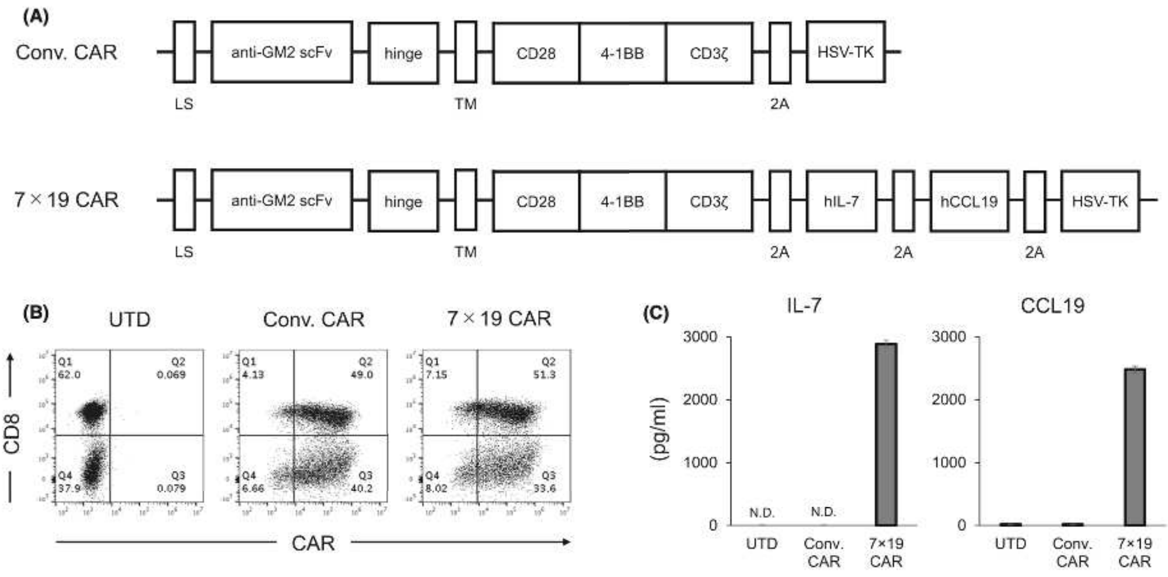

図 2. IL-7、CCL19 及びヘルペス単純ウイルス-チミジンキナーゼ発現抗 GM2 CAR-T 細胞の作製と特徴。(A)GM2 に対する Conv.CAR と 7×19 CAR の模式図。LS;リーダー配列、TM;膜貫通領域。(B)Conv.CAR または 7×19 CAR を形質導入したヒト末梢血単核細胞を抗 GM2 scFv に対する抗イディオタイプ抗体及び抗 CD8 抗体で染色し、CAR 発現を検出した。UTD-T 細胞を陰性対照として評価した。各象限における細胞の割合を示した。(C) Conv.CAR-T 細胞及び 7×19 CAR-T 細胞の培養上清を遺伝子導入 4 日後に回収し、ELISA を用いて IL-7 及び CCL19 の濃度を測定した。コントロールとして、同時点の UTD-T 細胞の培養上清を測定した 3 つのサンプルの平均±標準誤差としてデータを表示した。N.D.;未検出。

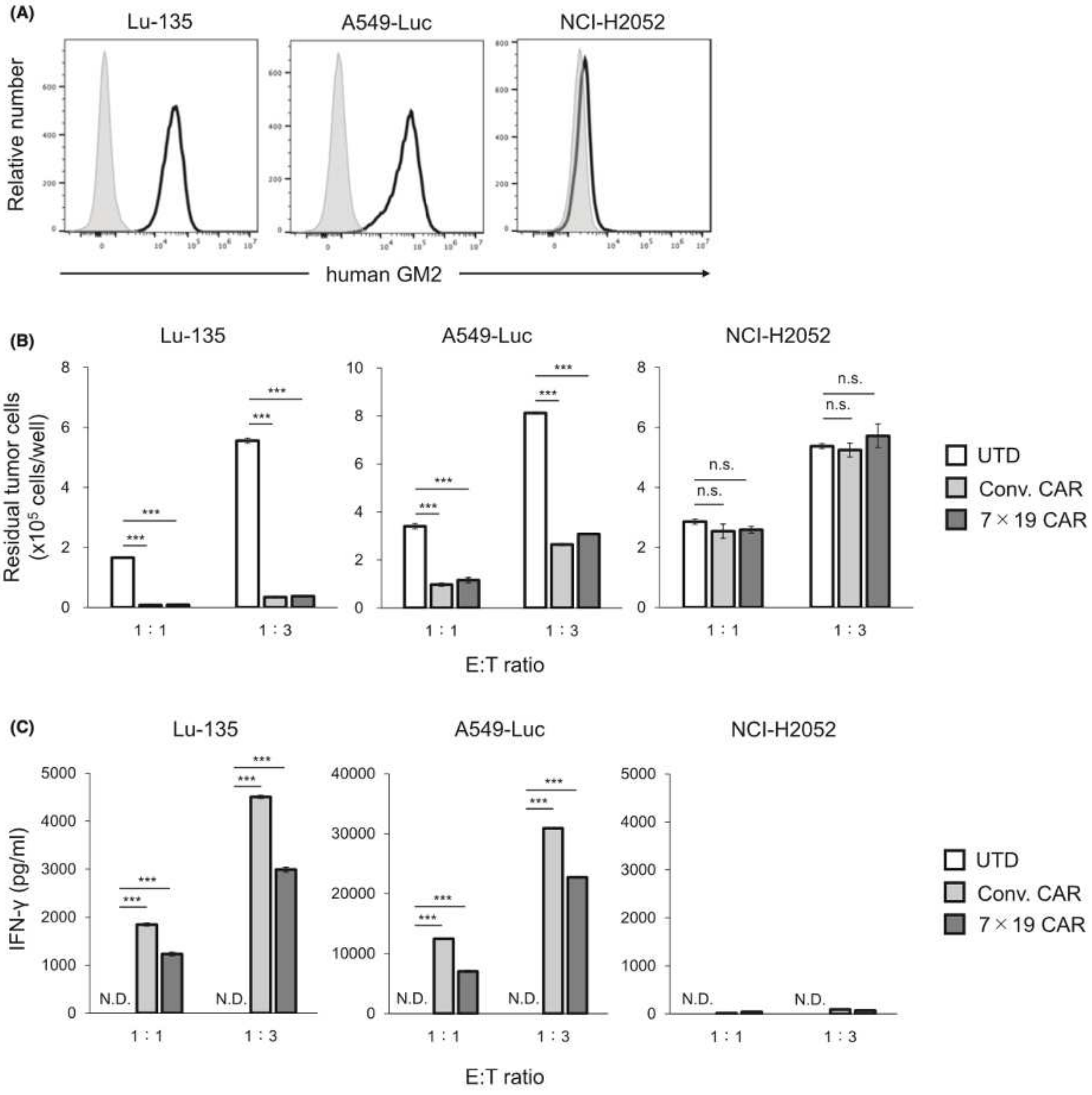

図 3. in vitro での Conv.CAR-T 細胞及び 7×19 CAR-T 細胞の GM2 特異的免疫応答。(A)ヒト固形がん細胞株における内在性 GM2 の細胞表面発現を、フローサイトメトリーを用いて評価した。白抜き、及び塗りつぶしのヒストグラムは、それぞれヒト化抗 GM2 抗体による染色あるいは非染色後に続き、抗ヒト IgG 抗体で染色した結果を示した。(B) Conv.CAR-T 細胞、7×19 CAR-T 細胞または UTD-T 細胞を腫瘍細胞と 1:1、1:3 のエフェクター/ターゲット比で 2 日間共培養した。共培養後の残存腫瘍細胞数をフローサイトメトリーで解析した。3 つのサンプルの平均±標準誤差としてデータを表示した。(C)(B)で記載した共培養細胞の培養上清を回収し、IFN-γ濃度を ELISA で評価した。3 つのサンプルの平均±標準誤差としてデータを表示した。***;p<0.001、N.D.;未検出、n.s.;有意差なし。

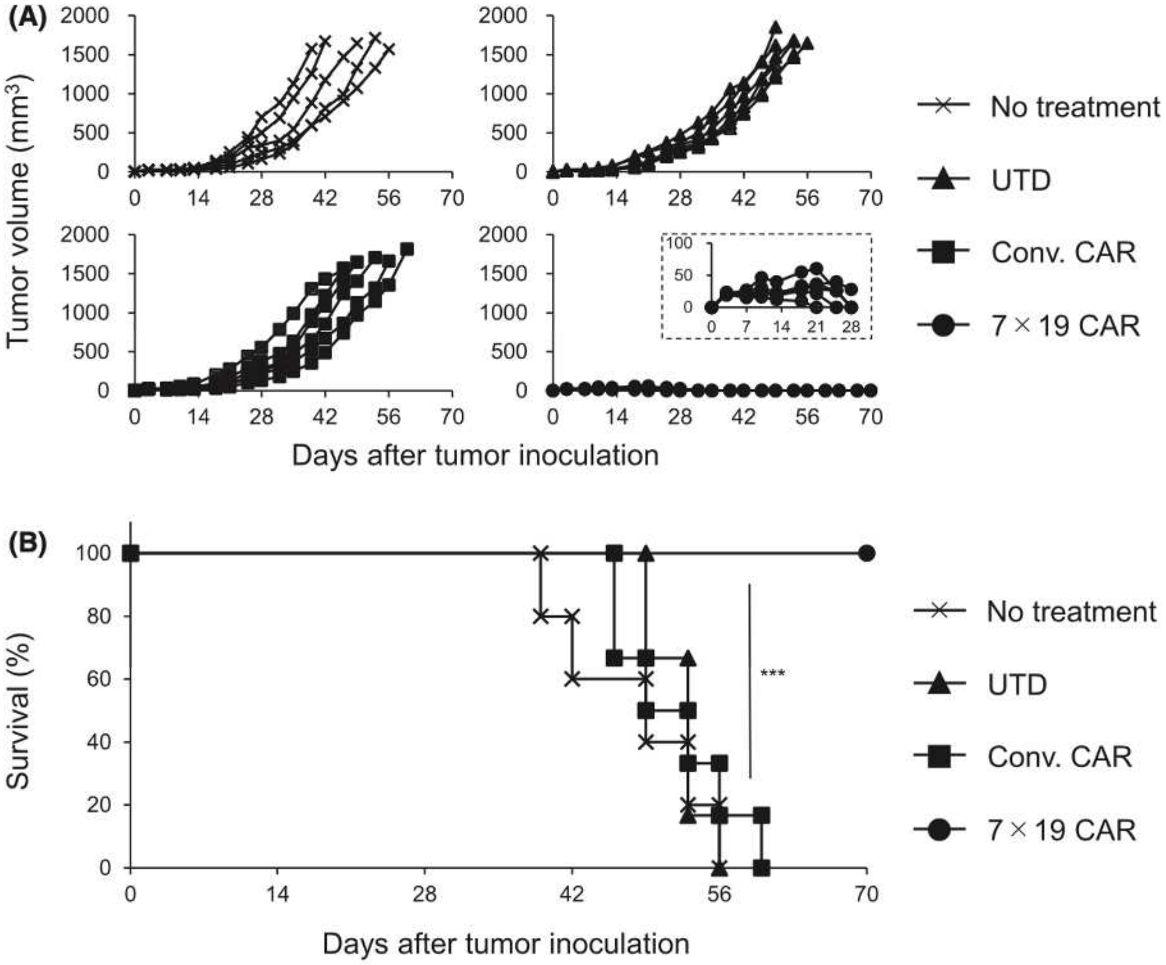

図 4. ヒト肺小細胞がん異種移植モデルにおける 7×19 CAR-T 細胞の強力な治療効果。NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 5×10^6 個の Lu-135 腫瘍細胞を皮下接種し、3 日目に 1×10^7 個の Conv.CAR-T 細胞、7×19 CAR-T 細胞または UTD-T 細胞を静脈内投与し、残りのマウスは未治療群とした。その後、腫瘍サイズ(A)、及びマウス生存率(B)を評価した(未治療群:n = 5、UTD-T 細胞群:n = 6、Conv.CAR-T 細胞群:n = 6、7×19 CAR-T 細胞群:n = 6)。(A)において、個々のマウスの腫瘍体積を各折れ線で示した。7×19 CAR-T 細胞治療マウスにおける最初の 28 日間の腫瘍体積は挿入図に示した。***;p<0.001。

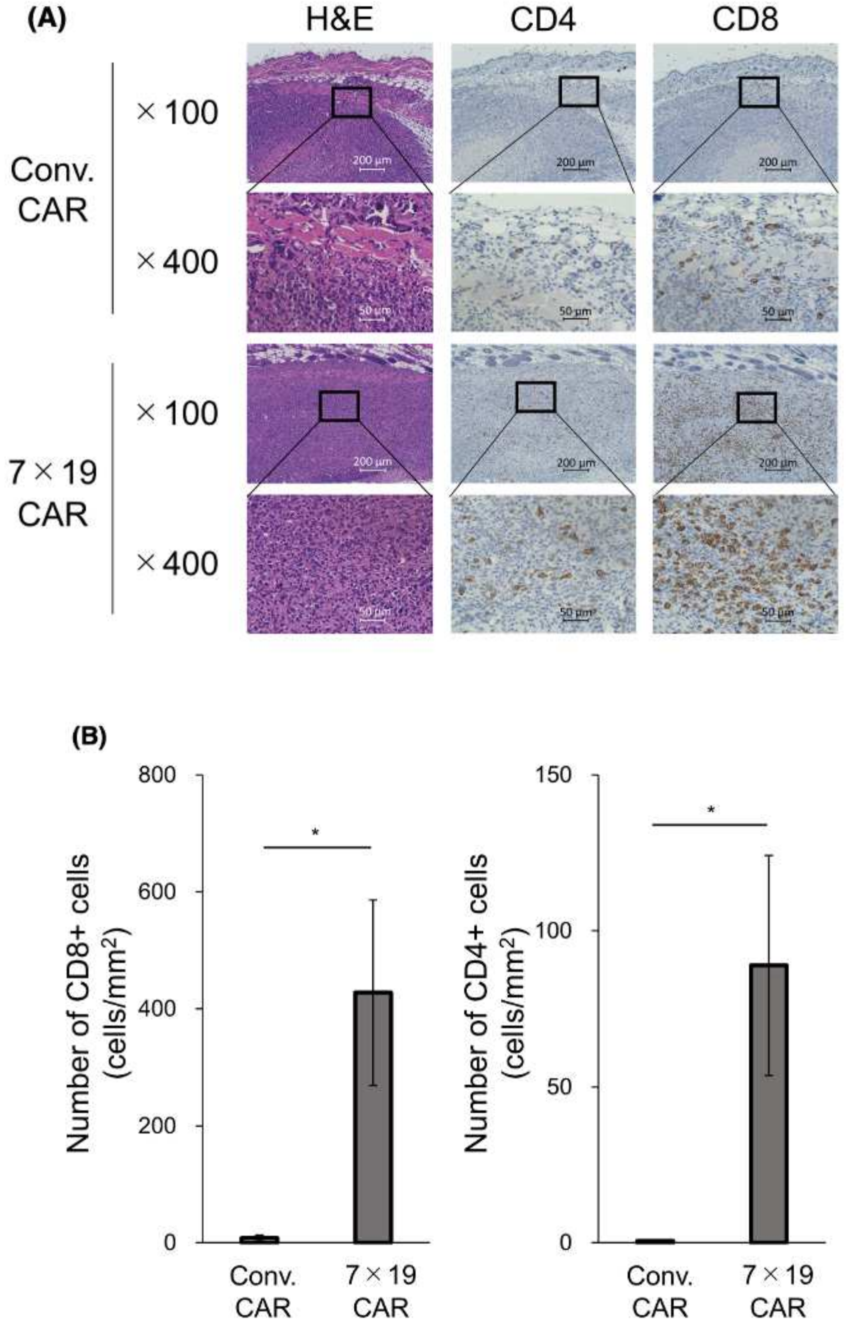

図 5. 7×19 CAR-T 細胞治療による腫瘍組織への T 細胞の豊富な浸潤。NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 1×10^7 個の Lu-135 細胞を皮下接種し、3 日目に 1×10^7 個の Conv.CAR-T 細胞または 7×19 CAR-T 細胞を静脈内投与した。12 日目に腫瘍組織を摘出し、それぞれの腫瘍組織から FFPE 切片を作製し、H&E 染色及び免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色では、ウサギ抗ヒト CD4 モノクローナル抗体及びウサギ抗ヒト CD8 モノクローナル抗体を使用した。100 倍及び 400 倍の倍率で顕微鏡を用いて観察し、染色された細胞を解析した。(A)代表的な画像を提示する。スケールバーにより、200 μm(100 倍)、または 50 μm(400 倍)を示す。(B)腫瘍面積(mm^2)あたりの染色細胞の数は、BZ-X アナライザーソフトウェアによって計算した。平均±標準誤差としてデータを表示した(各グループ n = 6)。*;$p<0.05$。

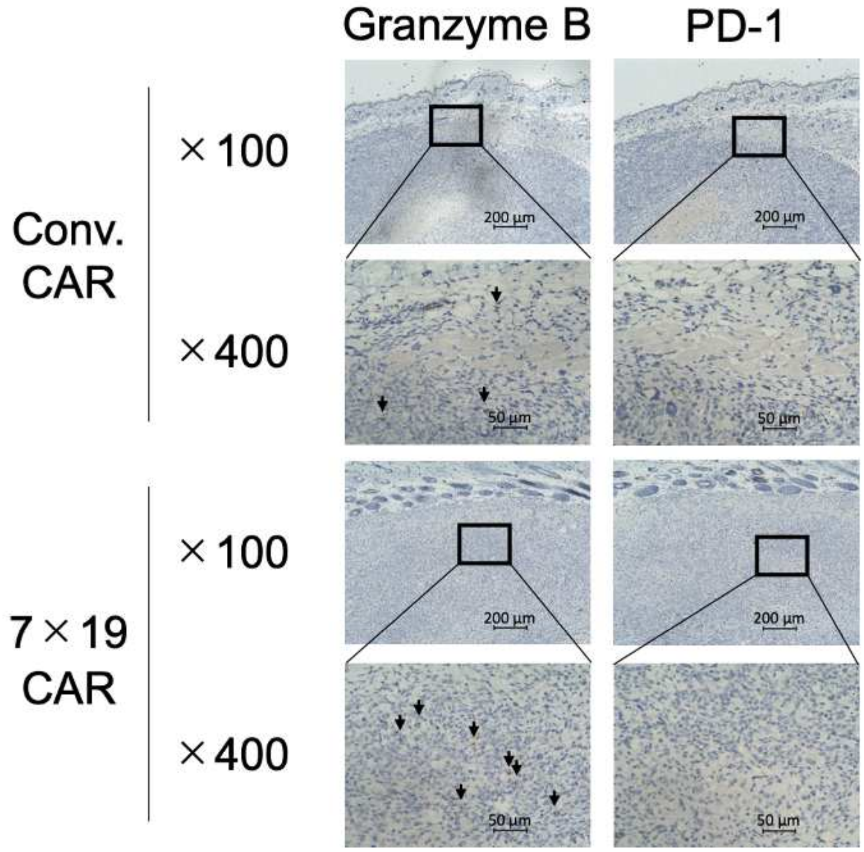

図 6. 腫瘍組織における T 細胞上のグランザイム B、及び PD-1 の発現。NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 1×10^7 個の Lu-135 細胞を皮下接種し、3 日目に 1×10^7 個の Conv.CAR-T 細胞、または 7×19 CAR-T 細胞を静脈内投与した。12 日目に腫瘍組織を摘出し、それぞれの腫瘍組織から FFPE 切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色では、ウサギ抗ヒトグランザイム B ポリクローナル抗体及びマウス抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体を使用した。100 倍及び 400 倍の倍率で顕微鏡を用いて観察し、染色された細胞を解析した代表的な画像を提示する。グランザイム B 陽性細胞を矢印にて示す。スケールバーは 200 μm(100 倍)または 50 μm(400 倍)を示す。

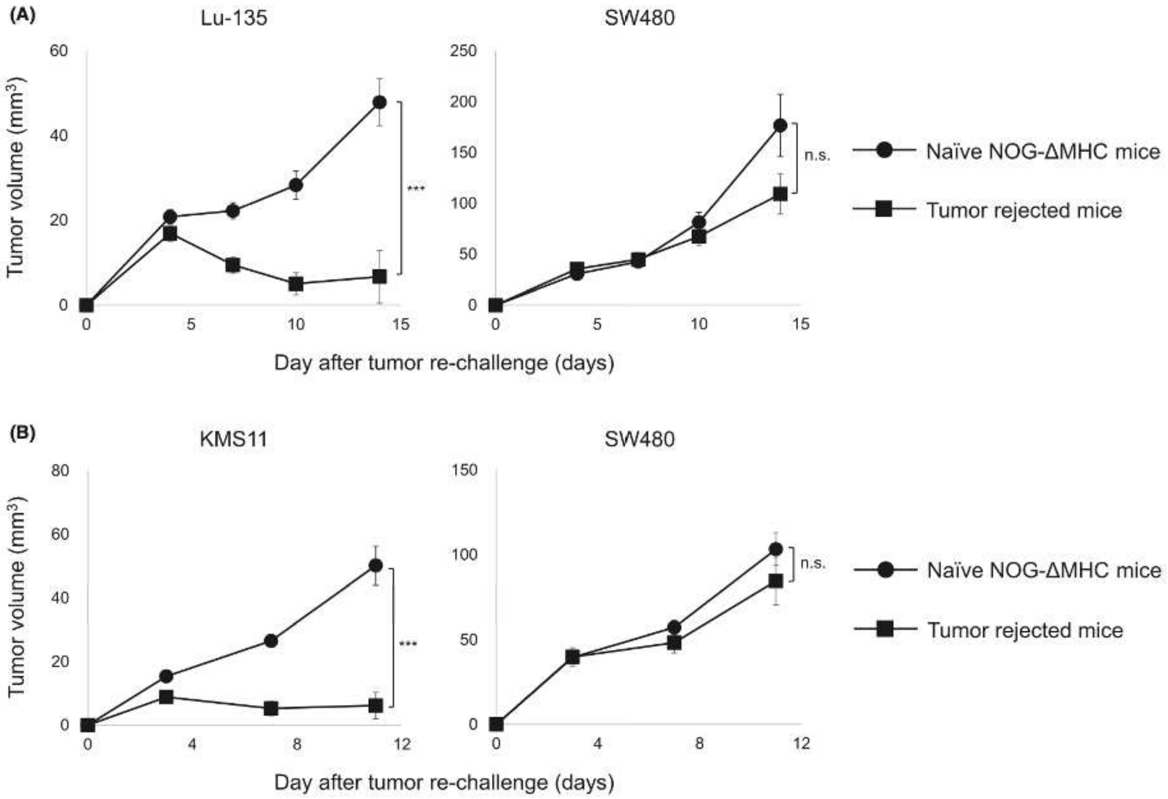

図 7. 7×19 CAR-T 細胞治療によるターゲット特異的長期メモリー応答の形成。NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 1×10^{7}個の Lu-135 細胞を皮下接種し、3 日目に 1×10^{7}個の 7×19 CAR-T 細胞を静脈内投与した。(A)28 日目に、腫瘍を完全に拒絶したマウスの右側腹部に 1×10^{7}個の Lu-135 腫瘍細胞を、左側腹部に 5×10^{6}個の SW480 腫瘍細胞を再接種した。コントロールとして、未処置 NOG-ΔMHC マウスに同様の方法で Lu-135 腫瘍細胞、及び SW480 腫瘍細胞を皮下接種した(腫瘍拒絶マウス:n = 6、未処置マウス:n = 4)。(B)35 日目に、腫瘍を完全に拒絶したマウスの右側腹部に 3×10^{6}個の KMS11 腫瘍細胞を、左側腹部に 5×10^{6}個の SW480 腫瘍細胞を再接種した。コントロールとして、未処置 NOG-ΔMHC マウスに同様の方法で KMS11 腫瘍細胞、及び SW480 腫瘍細胞を皮下接種した(腫瘍拒絶マウス:n = 4、未処置マウス:n = 5)。デジタルノギスを用いて週に 2 回腫瘍サイズを測定した。平均±標準誤差として腫瘍体積を表示した。***;$p<0.001$、n.s.;有意差なし。

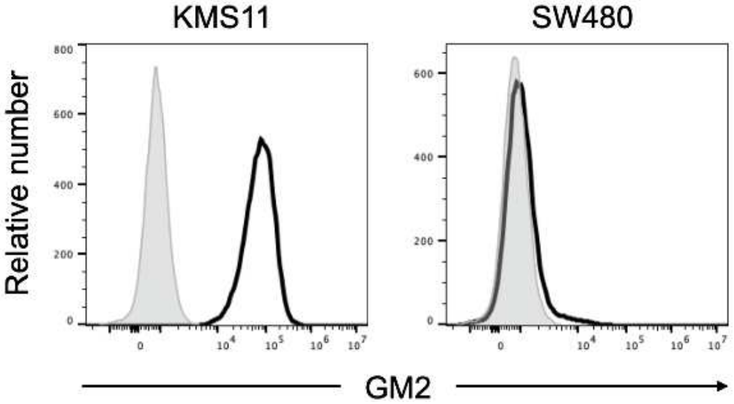

図 8. KMS11 及び SW480 における細胞表面 GM2 の発現。ヒト多発性骨髄腫細胞株である KMS11 及びヒト結腸がん細胞株である SW480 の GM2 発現レベルを、フローサイトメトリーを用いて評価した。白抜き、及び塗りつぶしのヒストグラムは、それぞれヒト化抗 GM2 抗体による染色あるいは非染色後に続き、抗ヒト IgG 抗体で染色した結果を示す。

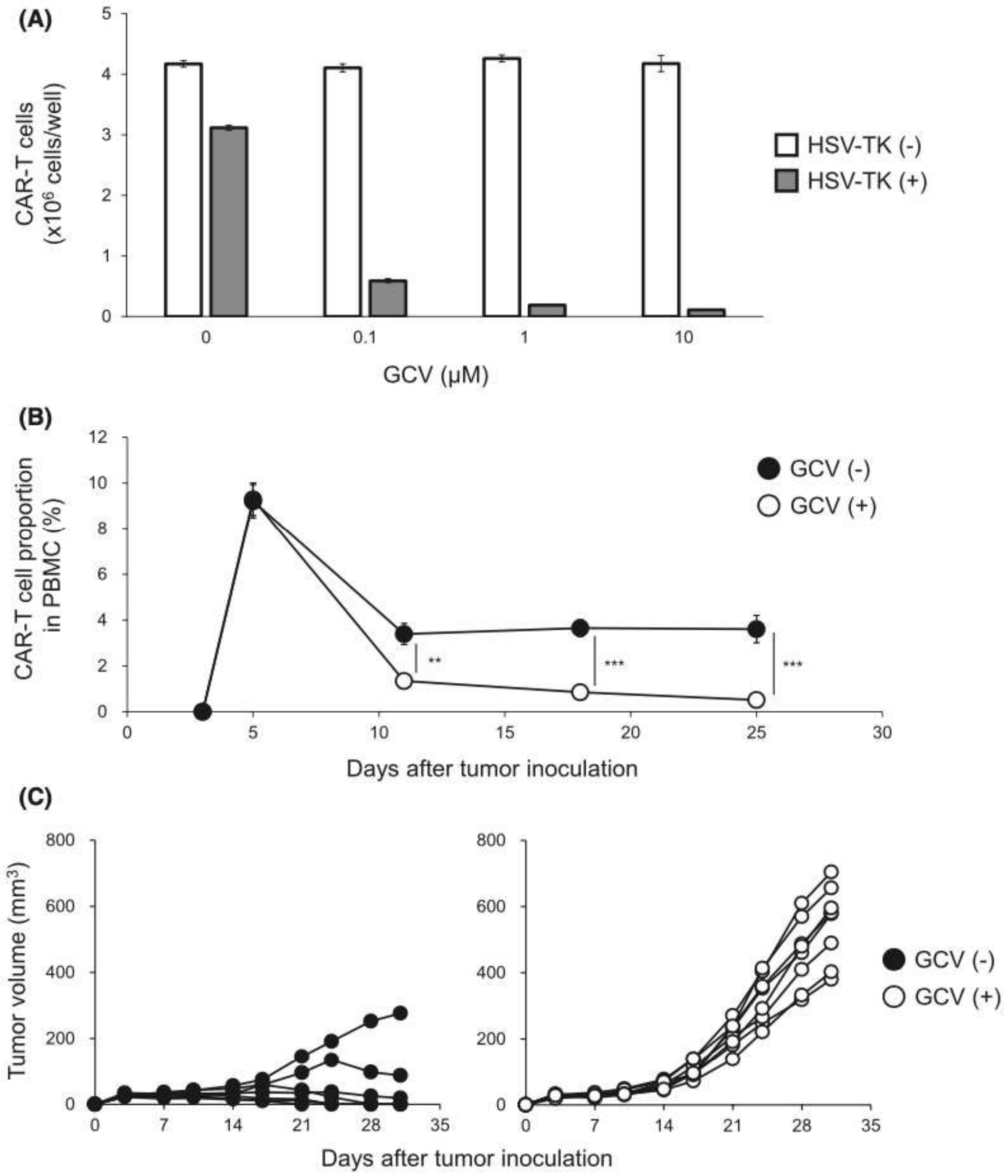

図 9. GCV 投与による HSV-TK 発現 7×19 CAR-T 細胞の除去。(A)HSV-TK 自殺遺伝子発現または HSV-TK 非発現抗 GM2 7×19 CAR-T 細胞を、GCV が 0、0.1、1、10 μM の濃度で含まれる培地で 3 日間培養した。残存 CAR-T 細胞数をフローサイトメトリーで解析した。3 つのサンプルの平均±標準誤差としてデータを表示した。(B、C)NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 1×10^7 個の Lu-135 細胞を皮下接種し、3 日目に 1×10^7 個の HSV-TK 発現 7×19 CAR-T 細胞を静脈内投与し、7 日目、及び 21 日目に 100 mg/kg の GCV を腹腔内投与した。(B)マウス末梢血単核細胞中の CAR-T 細胞の割合はフローサイトメトリーによって評価した。平均±標準誤差としてデータを表示した(GCV 投与マウス:n = 8、GCV 非投与マウス:n = 7)。**;p<0.01、***;p<0.001。(C)GCV 投与マウス群及び非投与マウス群にて、デジタルノギスを用いて週に 2 回腫瘍サイズを測定した。個々のマウスの腫瘍体積をそれぞれの折れ線で示した。

この学位論文は、Takahiro Sasaki, Yukimi Sakoda, Keishi Adachi, Yoshihiro Tokunaga, Koji Tamada. Therapeutic effects of anti-GM2 CAR-T cells expressing IL-7 and CCL19 for GM2-positive solid cancer in xenograft model. Cancer medicine. doi: 10.1002/cam4.5907 に原著論文として発表したものから、データを引用して作成しました。