

学位論文（博士）

Therapeutic Efficacy of IL-7/CCL19-Expressing CAR-T
Cells in Intractable Solid Tumor Models of Glioblastoma
and Pancreatic Cancer

（膠芽腫および膵臓がんの難治性固形がんモデルに
対する IL-7/CCL19 発現 CAR-T 細胞の治療効果）

氏名 太田 啓介

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和 6 年 10 月

目 次

1. 要旨	2
2. 研究の背景	4
3. 方法	8
4. 結果	1 8
5. 考察	2 6
6. 結語	3 1
7. 謝辞	3 2
8. 参考文献	3 3

1. 要旨

免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法や他の抗がん剤との併用療法は、様々な固形がんにおいて有望な治療効果を示したことから、新たな標準治療として台頭してきた。しかしながら、膠芽腫と膵臓がんは依然として免疫療法に抵抗性であり、最も予後不良な難治性がんである。我々は、これらの難治性がんに対する IL-7 と CCL19 を産生する次世代 CAR-T 細胞 (7×19 CAR-T) の治療効果を検討した。上皮成長因子受容体バリエーション III (EGFRvIII) 陽性膠芽腫と健常人ドナー PBMC から作製した抗 EGFRvIII CAR-T を用いたモデル、またはヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) 陽性膵臓がんオルガノイドと同患者 PBMC から作製した抗 HER2 CAR-T を用いたモデルにおいて、7×19 CAR-T の細胞傷害活性と治療効果を *in vitro* および *in vivo* で評価した。抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T は、EGFRvIII 陽性腫瘍に特異的な細胞傷害活性を示し、腫瘍組織における大量の T 細胞浸潤と腫瘍細胞死を伴う膠芽腫の完全拒絶反応を誘導し、結果としてマウスの生存期間を延長した。抗 HER2 7×19 CAR-T は、自家 HER2 陽性膵臓がんオルガノイドに対して強力な細胞傷害活性を示し、マウスの生存期間の延長とともに自家腫瘍の完全

拒絶反応を誘導した。これらの結果は、7×19 CAR-T が膠芽腫および膵臓がんの治療選択肢となる可能性を示唆している。我々の知る限り、本研究は、患者由来の腫瘍オルガノイドと同一患者のPBMCから作製した CAR-T を用いた自家モデルにおいて、不要な同種免疫応答が完全に排除された次世代 CAR-T の治療効果を実証した最初の研究である。

2. 研究の背景

様々な悪性腫瘍の全生存期間（OS）は、近年の免疫チェックポイント阻害薬（ICI）の進歩と他の抗がん剤との併用により改善されており、現在、進行がん患者の標準治療として承認されている(1, 2)。それにもかかわらず、膠芽腫と膵臓がんは、有効な免疫療法がないために、依然として最も予後不良な難治性固形がんの代表である。ICI に続いて、CAR-T 療法が新規の有望な免疫療法として登場し、進行性 B 細胞悪性腫瘍や多発性骨髄腫の患者において有意な有効性を示した(3-8)。しかし、現在の CAR-T 療法のアプローチは、膠芽腫や膵臓がん、その他の固形がんには効果がないままである(9, 10)。

膠芽腫は成人の中枢神経系腫瘍の約半数を占め、標準治療による 5 年生存率はわずか 5% と非常に予後不良である(11, 12)。ヒト上皮成長因子受容体 2（HER2）または上皮成長因子受容体バリエント III（EGFRvIII）を標的とする CAR-T 療法が、膠芽腫の治療法として研究されている(13-16)。16 人の患者を対象とした抗 HER2 CAR-T の第 I 相試験では、1 人が 9 カ月以上の部分奏効（PR）、7 人が 8 週～29 カ月の病勢安定（SD）、8 人が T 細胞注入後に進行し、その結果、OS

中央値は 11.1 カ月（95%信頼区間、4.1～27.2 カ月）であった(13)。
抗 EGFRvIII CAR-T の第 I 相試験では、18 例中 1 例が 59 ヶ月間生存したが、他の患者では腫瘍の縮小はみられなかった(15)。無増悪生存期間（PFS）中央値は 1.3 カ月、OS 中央値は 6.9 カ月であった。
全体として、膠芽腫に対する現在の CAR-T 療法の有効性は限られており、不十分である。

膵臓がんでは、現在の標準治療による 5 年生存率は約 10%（17）であり、CAR-T の臨床試験ではこれまで十分な効果が得られていない。11 人の膵がん患者を対象とした抗 HER2 CAR-T の第 I 相試験では、1 人が PR、5 人が SD を示し、PFS 中央値は 4.8 カ月であった(18)。メソセリン（MSLN）を標的とした CAR-T の第 I 相試験では、6 例中 2 例のみが SD を示し、PFS は 3.8 カ月と 5.4 カ月であった(19)。
これらを総合すると、膠芽腫や膵臓がんにおけるこれまでの CAR-T 療法の試みは、安全性に深刻な懸念は報告されていないものの、有効性において乏しい結果に終わっている。従って、これらの難治性腫瘍に対して CAR-T をより効果的にする新しい技術の開発が急務である。私たちのグループは、インターロイキン-7（IL-7）とケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 19（CCL19）を同時に産生する新規

CAR-T (7×19 CAR-T) を開発した(20-22)。7×19 CAR-T は、CCL19 の作用により T 細胞と樹状細胞の活発な遊走を誘導し、IL-7 の作用により T 細胞の増殖とメモリー形成を促進する。7×19 CAR-T の投与は、従来の CAR-T 細胞 (Conv. CAR-T) が全く、あるいはほとんど効果を示さなかった、同種マウス腫瘍や患者由来の異種移植腫瘍を用いた様々な固形腫瘍モデルにおいて、強力な治療効果を誘導した。我々は、7×19 CAR-T が内因性 T 細胞を腫瘍部位に動員し、cold tumor を hot tumor に変えること、そして内因性 T 細胞が治療による抗腫瘍効果の少なくとも一部を担っていることを報告し、他の Armored CAR-T 技術とは異なるユニークなメカニズムを示した。本研究の目標は、IL-7/CCL19 産生技術を応用して、抗 EGFRvIII または HER2 CAR-T を膠芽腫および膵臓がんに対してより攻撃的にし、治療効果を向上させることである。

ヒト固形がんを用いたほとんどの実験モデルでは、CAR-T は健康なドナーの PBMC から作製され、腫瘍と CAR-T の MHC は同一ではない。MHC の不一致は同種 T 細胞応答を誘導し、抗腫瘍効果を変化させる可能性があるため、CAR-T の機能や効果の評価が不正確になる。このような望ましくない影響を避けるためには、腫瘍と CAR-T が同

じ患者由来である自家移植モデルで実験を行うべきである。加えて、がん患者の T 細胞は大部分が機能不全に陥っており (23)、また、多発性骨髄腫患者の T 細胞数およびナイーブ/幹細胞メモリー (SCM) 表現型の比率は、健常ドナーのものと比べて低い(24)。この観点から、がん患者の PBMC から作製した CAR-T を用いて実験を行うことも重要である。そこで本研究では、患者由来の腫瘍オルガノイドを接種した免疫不全マウスに、同じ患者の PBMC から作製した CAR-T を投与する自家腫瘍モデルを確立した。我々の知る限り、本研究は固形がんの自己腫瘍モデルにおける CAR-T の有効性を検討した最初の報告である。

3. 方法

マウスと細胞株

7-8 週 齢 の 雌 性 NOD.Cg-PrkdcscidIl2^{l'gtm}1SugB2mem1TacH2-Ab1tm1Doi/Jic (NOG-ΔMHC) マウスを CLEA Japan (東京、日本) から購入し、*in vivo* 実験に使用した。マウスは、以前に報告されたように、当施設の特定の病原体フリー条件下で維持された (21,22)。到着後 1 週間または実験終了までエンロフロキサシンを経口投与した。すべての動物実験は、山口大学の Institutional Animal Care and Use Committee の承認を得た。ヒト膠芽腫細胞株 U87MG は ATCC (米国バージニア州マナサス) から購入した。U87MG は EGFRvIII を安定的に発現するように遺伝子改変され、山口大学で SH800 (Sony, Japan) を用いた細胞選別により EGFRvIII 陽性の U87MG が樹立された (U87MG EGFRvIII)。U87MG および U87MG EGFRvIII 細胞は、10% 熱不活化ウシ胎児血清 (FBS ; CCP、東京、日本)、および 1% 硫酸ペニシリン-ストレプトマイシン (和光、大阪、日本) を添加した MEM (Gibco、Grand Island、NY、USA) 培地で培養した。

CAR ベクターの設計とヒト T 細胞への遺伝子導入

抗 EGFRvIII mAb を産生するハイブリドーマは、EGFRvIII ペプチドをマウスに免疫して作製した（株式会社細胞工学研究所、日本、大阪）。抗 EGFRvIII 一本鎖可変フラグメント（scFv）は、ハイブリドーマの重鎖と軽鎖の可変領域配列から構成された。CAR コンストラクトは、抗 EGFRvIII scFv、ヒト CD8 α の膜貫通配列、ヒト 4-1BB および CD3 ζ の細胞質配列で設計され、レトロウイルス pMSGV1 ベクターにクローニングされた (25)。抗 HER2 ヒト scFv は、トラスツズマブの重鎖および軽鎖の可変領域配列を用いて設計した。CAR コンストラクトは、抗 HER2 scFv、ヒト CD8 α の膜貫通配列、ヒト 4-1BB、CD28 および CD3 ζ の細胞質配列で設計され、レトロウイルス pMSGV1 ベクターにクローニングされた。IL-7、CCL19、HSV-TK は、自己切断可能な 2A 配列の接続により、抗 EGFRvIII または抗 HER2 CAR に加えて発現された。ヒト T 細胞への遺伝子導入は、以前に記載されたように行われた (21,22,25,26)。簡単に説明すると、CAR 発現プラスミドを pAmpho エンベロープベクタープラスミド（Retro-X Universal Packaging System, Clontech, Mountain View, CA, USA）とともに GP2-293 パッケージング細胞にトランスフェクションすることにより、レトロウイルスベクターを作製した。レトロウ

イルスベクターを含む培養上清を回収し、RetroNectin（タカラバイオ、日本、滋賀）および抗 CD3 mAb（クローン OKT3、eBioscience、米国、カリフォルニア州サンディエゴ）の存在下で、健常ドナーまたはがん患者由来の活性化 PBMC への感染に使用した。細胞は、IL-2 の存在下、OpTmizer CTS、CTS Immune Cell 血清補充液、L-グルタミン（Gibco）、1%硫酸ペニシリン・ストレプトマイシン、アムホテリシン B（Bristol Myers Squibb, New York, NY, USA）を添加した OpTmizer（Gibco）で培養した。いくつかの実験では、レトロウイルスベクターは、パッケージング細胞株へのエンベロープ遺伝子とともに CAR 発現遺伝子の安定形質導入によって作製されたプロデュサー細胞株から採取した。CAR の導入効率はフローサイトメトリーで評価した。培養上清中のヒト IL-7 および CCL19 の産生は、既報のように測定した (21,22)。コントロールとして用いた未導入の活性化 T 細胞は、レトロウイルスを感染させずに同じ培養条件で作製した。

フローサイトメトリー

EGFRvIII の検出には、抗 EGFRvIII ハイブリドーマ（株式会社細

胞工学研究所)の上清から得た非標識抗 EGFRvIII mAb と、二次 APC 標識抗マウス IgG Ab (clone poly4053、BioLegend、San Diego、CA、USA) を用いた。HER2 の検出には、非共役トラスツズマブ (中外製薬株式会社、東京、日本) および二次 PE 標識抗ヒト IgG Ab (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いた。CAR 発現 T 細胞は、APC 標識抗ヒト CD8 mAb (クローン HIT8a、BioLegend) と、ビオチン標識抗 CAR リンカー Ab (株式会社細胞工学研究所)、PE 標識ストレプトアビジン (BioLegend) を用いて抗 EGFRvIII CAR を、ヒト組み換え ErbB2/Her2-Fc タンパク質 (R&D systems、ミネアポリス、米国)、PE 標識抗ヒト IgG Ab (Thermo Fisher Scientific) を用いて抗 HER2 CAR を検出した。CAR-T 細胞はさらに、APC/Cy7 標識抗ヒト CD3 mAb (クローン HIT3a、BioLegend)、PerCP/Cy5.5 標識抗ヒト CD4 mAb (クローン OKT4、BioLegend)、FITC 標識抗ヒト CD45RA mAb (クローン HI100、BioLegend)、BV421 標識抗ヒト CCR7 mAb (クローン 150503、BD Bioscience、Franklin Lakes、New Jersey、USA)、Zombie Yellow viability dye (BioLegend) および APC/Cy7-conjugated anti-human CD3 mAb (clone HIT3a, BioLegend) を用いて、*in vitro* 共培養アッセイ後の

生存免疫細胞および非免疫細胞を評価した。ヒト TruStain FcX (BioLegend) は、Fcγ レセプターと mAb 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 CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて取得し、得られたデータは FlowJo ソフトウェア (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA) で解析した。

U87MG EGFRvIII に対する *in vitro* 細胞毒性試験

in vitro での細胞傷害活性を評価するため、抗 EGFRvIII CAR-T 細胞または未導入の T 細胞を、EGFRvIII 陽性または陰性の腫瘍細胞と様々な比率で 2 日間共培養した。残存腫瘍細胞数および上清中のインターフェロン (IFN) -γ 産生量は、既報のように調べた (21,22)。CAR 陽性細胞の割合は CAR コンストラクトによって異なるが、共培養の前に非形質転換 T 細胞を加えることで同じレベルに調整した。

U87MG EGFRvIII に対する *in vivo* 抗腫瘍モデル

NOG-ΔMHC マウスに、0 日目に 3.5×10^5 U87MG EGFRvIII 腫瘍細胞を右脇腹に皮下接種した。10 日後、 3×10^6 または 1×10^7 抗

EGFRvIII CAR-T または未導入の T 細胞を尾静脈から静脈内注射した。CAR 陽性細胞の割合は CAR コンストラクトによって異なるが、注射前に非導入 T 細胞を加えることで同じレベルに調整した。腫瘍の大きさは既報のように評価し (21,22)、腫瘍径が 20mm を超えた時点でマウスを安楽死させた。体重減少を伴う進行性 GVHD に罹患したマウスは解析から除外した。本実験では、CAR-T または未導入の T 細胞の作製に、単一の健常ドナーの PBMC を用いた。

腫瘍組織における T 細胞浸潤を解析するため、CAR-T の静脈内投与 3 日後に腫瘍塊を切除し、10%ホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンに包埋した。組織切片を H&E 染色、またはウサギ抗 CD4 mAb (クローン SP35、Roche、バーゼル、スイス)、ウサギ抗 CD8 mAb (クローン SP57、Roche)、ウサギ抗 CCR7 mAb (クローン EPR23192-57、Abcam)、ウサギ抗カスパーゼ-3 mAb (クローン Asp175、Cell signaling technology)、およびマウス抗 EGFRvIII mAb (株式会社細胞工学研究所) を用いた免疫組織化学的 (IHC) 染色により解析した。H&E および IHC サンプルの顕微鏡分析は、BZ-X710 蛍光顕微鏡と BZ-X アナライザー (KEYENCE、大阪、日本) を用いて行った。

T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析のため、CAR-T 投与後 42 日にマウス脾臓から T 細胞を採取し、CAR 陽性細胞と CAR 陰性細胞にソートした。選別された T 細胞は ISOGEN-LS (NIPPON GENE、東京、日本) に溶解し、凍結保存した。RNA の精製と次世代シーケンサーによる解析は、Repertoire Genesis 社 (日本、茨城) が行った。

ヒト膵臓がんオルガノイドの樹立

オルガノイド樹立に使用した臨床サンプルは、山口大学医学部附属病院の患者から、IRB の承認後、インフォームド・コンセントを得て入手した。膵管腺がんの標本は、外科的切除と同時に採取され、オルガノイドの樹立には、既報に若干の修正を加えた方法を用いた (27,28)。まず、手術標本を十分に洗浄し、手術用はさみで 10 mm³ の断片に破碎した。この断片を Liberase TH (Roche) で 37°C、20 分間反応させ、赤血球溶解バッファー (Roche) とともにインキュベートして赤血球を除去した。処理した細胞を 10%FBS 含有リン酸緩衝生理食塩水で洗浄して消化酵素を失活させ、次いでインキュベートした。得られた膵がん細胞をマトリゲル (Corning, New York, USA)

に包埋し、基礎培地 (27,28)すなわち、ペニシリン／ストレプトマイシン、10mM HEPES、2mM GlutaMAX、1×B27 (Thermo Fisher Scientific)、10nM ガストリン I (Sigma, Burlington, Massachusetts, USA)、1mM N-アセチルシステイン (Sigma) を添加した Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12、50ng/ml マウス組換え EGF (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、50ng/ml ヒト組換え FGF2 (ペプロテック、クランベリー、ニュージャージー、米国)、100ng/ml ヒト組換え IGF1 (バイオレジェンド)、100ng/ml マウス組換えノギン (ペプロテック)、10%R-スポンジン-1 (R&D system)、25%Afamin/Wnt3a 無血清調整培地 (MBL、東京、日本)、500 nM A83-01 (R & D system)、および 10 uM Y-27632 (nacalai tesque、京都、日本)。膵臓がん由来オルガノイドを濃縮するため、培地から EGF、FGF2、IGF1 を除去するか、3 uM nutlin-3 (Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) を培地に添加した。樹立されたオルガノイドは、既報の通り凍結保存した (27,28)。

HER2 陽性膵臓がんオルガノイド細胞に対する *in vitro* 細胞毒性試験

in vitro での細胞傷害活性を評価するため、膵臓がん患者の PBMC から作製した抗 HER2 CAR-T 細胞および未導入 T 細胞を、同じ患者から樹立した膵臓がんオルガノイドと 4 日間共培養した。残存腫瘍細胞数および上清中の IFN- γ 産生量は、既報と同様に検討した (21,22)。CAR 陽性細胞の割合は CAR コンストラクトによって異なるが、共培養の前に形質転換していない T 細胞を加えることで同じレベルに調整した。

HER2 陽性膵臓がんオルガノイドを用いた *in vivo* 抗腫瘍マウスモデル

in vivo モデルでは、0 日目に NOG- Δ MHC マウスを右脇腹に皮下接種し、 1×10^6 膵臓がんオルガノイド細胞をマトリゲル（コーニング社製）とハンクス平衡塩溶液（HBSS；サーモフィッシューサイエントフィック社製）50：50 からなる 100 μ L 溶液に入れた。マウスは、10 日目に同じ患者の PMBC から作製した 5×10^6 CAR-T を静脈内注射されるか、あるいは無処置とした。CAR 陽性細胞の割合は CAR コンストラクトによって異なるが、注射前に非形質転換 T 細胞を加

えることで同じレベルに調整した。腫瘍の大きさは既報のように評価し (21,22)、腫瘍径が 15mm を超えた時点でマウスを安楽死させた。

移植したオルガノイドにおける HER2 発現を解析するために、マウスから腫瘍塊を切除し、10%ホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンに包埋した。組織切片をウサギ抗 HER2 mAb (クローン 4B5、Roche) を用いた IHC 染色で解析した。外科的切除によって得られ、オルガノイド樹立に使用された元の腫瘍標本もまた、IHC 染色によって HER2 発現について分析された。IHC サンプルの顕微鏡分析は、BZ-X710 蛍光顕微鏡と BZ-X アナライザーを用いて行った。

統計

in vitro 実験および *in vivo* マウス生存アッセイの統計解析は、それぞれ両側 Student の t 検定および Log-rank 検定によって検討した。 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

4. 結果

IL-7 と CCL19 を発現する抗 EGFRvIII CAR-T の作製と機能解析

我々のこれまでの研究で、いくつかの固形がんモデルにおいて 7×19 CAR-T の治療効果が有意に向上することが明らかにされている (20-22)。7×19 CAR-T の治療効果を EGFRvIII 陽性膠芽腫に応用するため、抗 EGFRvIII scFv、ヒンジおよび膜貫通領域、4-1BB、CD3ζ シグナルモチーフ、IL-7 および CCL19 配列の共発現を含む第二世代 CAR コンストラクトを設計した (補足図 1A)。コントロールとして、Conv. CAR も構築した。ヒト PBMC に Conv. CAR または 7×19 CAR のレトロウイルスベクターでヒト PBMC を形質導入した場合、CAR の形質導入効率はそれぞれ 56.8% と 63.6% であった (補足図 1B)。未導入の T 細胞 (UTD) を非 CAR コントロール T 細胞として用いた。ヒト IL-7 および CCL19 は、7×19 CAR-T の培養上清に豊富に検出されたが、Conv. CAR-T および UTD では検出されなかった (補足図 1C)。これらの結果から、抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T の作製に成功したことが確認された。

次に、U87MG および U87MG の EGFRvIII 膠芽腫細胞株と共培養することで、抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T の機能を *in vitro* で評価した

(図 1A)。U87MG EGFRvIII 腫瘍の残存細胞数は、Conv. CAR-T または 7×19 CAR-T との共培養後に有意に減少したが、UTD は減少しなかった。一方、EGFRvIII 陰性の U87MG 腫瘍を共培養に用いた場合、腫瘍細胞の減少は検出されなかったか、またはわずかなレベルで観察された (図 1B)。共培養後、7×19 CAR-T の細胞数は Conv. CAR-T の細胞数は、Conv. CAR-T の細胞数よりも有意に多かった (図 1C)。IL-7 は CAR-T の増殖と生存を促進する役割を担っていることが知られており、我々の過去の論文の結果とも一致する (20)。さらに、U87MG EGFRvIII 腫瘍との共培養では、Conv. および 7×19 CAR-T による IFN- γ 産生が観察されたが、7×19 CAR-T による IFN- γ 産生レベルは Conv. CAR-T よりも高くなっていた (図 1D)。Conv. または 7×19 CAR-T 細胞を U87MG 腫瘍と共培養した場合、IFN- γ はほとんど検出されなかった。これらの結果から、抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T の EGFRvIII 抗原特異的免疫応答が確認された。

ヒト膠芽腫の固形腫瘍モデルにおける抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T の強力な治療効果

抗 EGFRvIII CAR-T の *in vivo* での治療効果を調べるため、ヒト膠

芽腫の確立済み固形腫瘍モデルを開発した。U87MG EGFRvIII を 0 日目に免疫不全 NOG- Δ MHC マウスの側腹部に皮下接種し、続いて Conv. CAR-T、7 $\times$ 19 CAR-T、または UTD を 10 日目に投与した。U87MG EGFRvIII は、7 $\times$ 19 CAR-T で処置した全てのマウスで完全に拒絶された (図 2A)。一方、Conv. CAR-T で治療したマウスでは、13 匹中 3 匹で腫瘍が拒絶されたが、1 匹で再発した。7 $\times$ 19 CAR-T の腫瘍抑制効果は、より少ない数の 7 $\times$ 19 CAR-T、すなわち 3×10^6 細胞でマウスを処理した場合にも観察され、その効果は 1×10^7 細胞で処理した場合に比べ低かった (補足図 2) が、7 $\times$ 19 CAR-T の効力は Conv. CAR-T より少なくとも 3 倍は高いことが示唆された。7 $\times$ 19 CAR-T の投与により、腫瘍を接種したマウスの生存期間は、Conv. CAR-T と比較して有意に生存期間が延長した (図 2B)。これらの結果は、7 $\times$ 19 CAR-T がヒト膠芽腫の異種移植固形腫瘍モデルにおいて強力な治療効果を誘導することを示しており、他の固形腫瘍モデルにおける 7 $\times$ 19 CAR-T のこれまでの知見と一致している (20-22)。

抗 EGFRvIII 7 $\times$ 19 CAR-T 治療による腫瘍組織への T 細胞浸潤と腫瘍細胞死の促進

7×19 CAR-T の免疫学的メカニズムを解明するため、7×19 CAR-T、Conv. CAR-T、Conv. CAR-T、UTD を投与したマウスから腫瘍組織を摘出し、IHC 染色により T 細胞の浸潤、腫瘍細胞死、EGFRvIII の発現を解析した。7×19 CAR-T で治療したマウスの腫瘍組織では、T 細胞、特に CD8 陽性 T 細胞の大量浸潤が観察され、Conv. CAR-T 治療によるものよりも顕著であった（図 3）。さらに、7×19 CAR-T を投与したマウスの腫瘍組織では、CCR7 陽性幹細胞メモリー（SCM）およびセントラルメモリー T 細胞の数が増加する傾向がみられたが、統計学的有意差には至らなかった。カスパーゼ-3 の発現によって検出される腫瘍溶解は、7×19 CAR-T 投与わずか 3 日で誘導されていた。さらに、腫瘍組織における EGFRvIII 陽性細胞の割合は、Conv. CAR-T と比較して、7×19 CAR-T による治療によって有意に減少した。これらの結果は、7×19 CAR-T 治療が腫瘍組織における大量の T 細胞浸潤と EGFRvIII 陽性膠芽腫の排除を速やかに誘導することを示していた。

7×19 CAR-T の抗腫瘍メカニズムをさらに解明するため、その細胞表現型を解析した。Conv. CAR-T と比較して、7×19 CAR-T、特に CD4 陽性 CAR-T は、マウスへの注入前に SCM 表現型の高い割合を

含んでいた（補足図 3）。この特徴的な表現型は、マウスへの注入後も *in vivo* で維持されており、IL-7 および/または CCL19 が CAR-T 細胞を SCM 表現型に維持したことを示唆している。SCM 表現型は、養子免疫療法において効果的な細胞源であることが知られている。（29,30）。腫瘍組織における CCR7 陽性 T 細胞の増加（図 3）と合わせて考えると、SCM 表現型の誘導は、7×19 CAR-T の抗腫瘍効果増強の潜在的なメカニズムの一つである可能性がある。

7×19CAR-T を投与したマウスにおける T 細胞クローナリティの解析

7×19CAR-T がどのようにその効果を発揮するのかをさらに解析するために、次に、CAR-T 細胞と非 CAR-T 細胞の T 細胞クローナリティの変化を投与前後で調べた。まず、PBMC から作製した抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T を CAR 陽性集団と陰性集団にソートし、TCR レパトア解析を行い、投与前のデータを得た。次に、抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T を投与して U87MG EGFRvIII を拒絶したマウスから脾臓細胞を採取し、TCR レパトア解析のために CAR 陽性 T 細胞と CAR 陰性 T 細胞にソートして投与後のデータを得た。CAR 陽性 T 細胞における TCR α 鎖および β 鎖レパトアの多様性は、投与前に比べて投

与後に著しく減少し、ほぼオリゴクローナルな集団となった（図 4）。さらに、TCR α 鎖と β 鎖のレパトアの多様性は、CAR 陽性 T 細胞ほどではないが、投与後の CAR 陰性 T 細胞でも減少していた。これらの所見から、7 $\times$ 19 CAR-T では限られた数のクローンが活性化、増殖し、メモリー T 細胞となって抗腫瘍応答を媒介することが示唆され、7 $\times$ 19 CAR-T の効果によって非 CAR-T 細胞の免疫応答も変化することが示唆された。

患者 PBMC 由来抗 HER2 CAR-T 細胞の自家膵臓がんオルガノイドに対する *in vitro* 抗腫瘍効果

これまでの実験では、CAR-T の治療効果やメカニズムについて、実際の臨床場面とは異なる条件である健常ドナー由来 PBMC や同種腫瘍細胞株を用いたマウスモデルを用いて検討されてきた。次に、臨床に近いモデルでより正確に評価するために、がん患者由来 PBMC から作製した 7 $\times$ 19 CAR-T の自己がん細胞に対する効果を検討することを試みた。そのために、まず手術で切除した膵臓がんの患者由来オルガノイドを樹立し、フローサイトメトリーでスクリーニングして CAR 標的の抗原を検出した。細胞表面に HER2 が発現し

ている膵臓がんオルガノイドを同定し（図 5A）、NOG- Δ MHC マウスへの接種に用いた。また、自家患者の PBMC から抗 HER2 Conv. または 7 $\times$ 19 CAR-T を作製した（補足図 4A-C）。HER2 陽性の膵臓がんオルガノイドを Conv. または 7 $\times$ 19 CAR-T と共培養したところ、残存腫瘍細胞数は UTD と比較して有意に減少した（図 5B、C）。さらに、Conv. および 7 $\times$ 19 CAR-T による IFN- γ 産生が、HER2 陽性膵臓がんオルガノイドとの共培養において検出されたが、UTD は検出されなかった（図 5D）。残存腫瘍数と IFN- γ 産生レベルは、Conv. と 7 $\times$ 19 CAR-T の間で同等であった。これらの結果から、患者の PBMC から作製した CAR-T が *in vitro* で自己膵臓がんオルガノイドに対して抗腫瘍反応を誘導することが確認された。

患者の PBMC から作製した 7 $\times$ 19 CAR-T の *in vivo* における自己膵臓がんオルガノイドに対する強力な治療効果

次に、患者の PBMC から作製した抗 HER2 CAR-T の、自己 HER2 陽性膵臓がんオルガノイドに対する治療効果を *in vivo* で調べた。NOG- Δ MHC マウスに膵臓がんオルガノイドを皮下接種してできた固形腫瘍塊における HER2 の発現を IHC 染色で確認した（図 6A）。

樹立された腫瘍塊の腺上皮における HER2 の発現パターンは、オルガノイド作製に用いた外科的切除標本における発現パターンと一致した（補足図 4D）。

HER2 陽性膵臓がんオルガノイドを皮下接種した NOG- Δ MHC マウスに、抗 HER2 Conv.細胞または 7 $\times$ 19 CAR-T 細胞を静脈内投与するか、あるいは無処置とした。7 $\times$ 19 CAR-T の投与により、樹立された腫瘍塊は完全に拒絶された（図 6B）が、Conv. CAR-T 投与群は、未処置群と比較してわずかな腫瘍縮小を示したのみであった。同様に、マウスの生存期間は未治療群と比較して 7 $\times$ 19 CAR-T 投与によって有意に延長したが、Conv. CAR-T の投与では延長しなかった（図 6C）。これらの結果は、膵臓がん患者の PBMC から作製された 7 $\times$ 19 CAR-T が、*in vivo* で樹立された自己膵臓がんに対して強力な治療効果を誘導することを示した。

5. 考察

本研究では、動物モデルにおいて、EGFRvIII 陽性膠芽腫および HER2 陽性膵臓がんに対する 7×19 CAR-T 細胞の強力な治療効果を明らかにした。この効果は、腫瘍組織における免疫細胞の大量浸潤とともに、CAR-T 細胞における SCM 表現型の割合の増加および TCR レパトアの偏りと関連していた。これら結果は、7×19 CAR-T が、ICI 抵抗性で難治性の固形がんであり、予後が非常に悪い膠芽腫と膵臓がんに対する新しい治療選択肢となる可能性を示唆している。

我々のこれまでの研究から、7×19 CAR-T 細胞は腫瘍組織において CAR 陰性 T 細胞を含む免疫細胞の大量浸潤と長期記憶応答を誘導し、固形がんに対する治療効果を有意に増強することが明らかになっている (20-22)。本研究では、7×19 CAR-T 療法が、マウスへの投与 3 日後という早い段階で、腫瘍部位への T 細胞浸潤と腫瘍細胞死を誘導することを見出した。カスパーゼ-3 は初期のアポトーシスマーカーであるが、カスパーゼ-3 が陽性に染色された領域と EGFRvIII が陰性に染色された領域は必ずしも一致しなかった。加えて、炎症後線維化のような腫瘍死を示す組織変化は、この時点では H&E 染色では認められなかった。これらの結果から、EGFRvIII 陽性細胞の減

少は細胞死とは直接関係ない可能性があり、今回の所見の理由としては抗原の消失やダウンレギュレーションの可能性は否定できない。また、7×19 CAR-T は Conv. CAR-T と比較して SCM 表現型が相対的に増加し、*in vivo* 投与後もその特徴を維持していた。この点に関して、特に CD4 陽性 T 細胞において、幹細胞様表現型と自己複製能を持つ分化度の低い T 細胞の生成に関する IL-7 の機能が指摘されている (31,32)。加えて、SCM 表現型を持つ低分化 T 細胞は、養子免疫療法により効果的な細胞源として報告されている (29,30)。本研究で得られた知見は、7×19 CAR-T が産生する IL-7 の重要性と、IL-7 に応答する T 細胞の表現型の変化が抗腫瘍効果の増強に重要であることを強調しており、これらの先行報告と一致している。この点で、7×19 CAR-T によって産生された IFN- γ は、Conv. CAR-T によって産生された IFN- γ よりも相対的に高かったことは興味深い (図 1D)。この知見の潜在的なメカニズムとして、我々の培養条件で誘導された 7×19 CAR-T は、SCM とエフェクターの表現型が同時に増加するというユニークな特徴を示した (補足図 3)。

マウス CAR-T を用いた我々の以前の研究では、7×19 CAR-T を投与すると、腫瘍拒絶マウスにおいて CAR 陽性および陰性 T 細胞の両

方で TCR レパトアの偏りが誘導されることが示された (20)。本研究では、この現象の再現性がヒト PBMC 由来の 7×19 CAR-T で確認された。CAR 陽性 T 細胞に関しては、投与された CAR-T 細胞のすべてではなく、限られたクローンのみが活性化と増殖を受け、抗腫瘍反応を発揮し、長期記憶 T 細胞となることが示唆された。この考えは、10 年間追跡された CAR-T 臨床試験に関する最近の研究で得られた知見と一致する (33)。CAR 陰性 T 細胞に関しては、我々は以前に 7×19 CAR-T 治療マウスの腫瘍組織で CAR 陰性 T 細胞の浸潤が増加したことを報告している (21,22)。7×19 CAR-T によって産生された IL-7 と CCL19 は、腫瘍抗原に反応する限られた TCR を発現する CAR 陰性 T 細胞の蓄積と増殖を誘導することが示唆された。しかし、現時点では、CAR 陰性 T 細胞の TCR レパトアの偏りのメカニズムとして、1) 注射されたヒト T 細胞のマウス組織に対する異種反応、2) 注射された T 細胞の恒常的増殖、などの他の可能性も否定できない。

CAR-T の機能や治療の可能性を評価するモデルとしては、実験材料の入手性がはるかに高いことから、健康なドナー由来の PBMC や確立された腫瘍細胞株が一般的に用いられている。しかし、このよ

うなモデルでは、MHC のミスマッチに起因する腫瘍細胞に対する T 細胞の同種応答が CAR-T 細胞による抗腫瘍反応に加えて生じるため、望ましくない効果を引き起こす可能性がある。さらに、健康なドナー由来の CAR-T 細胞は、化学療法薬や放射線照射を含む抗がん治療への曝露によって免疫系が傷害されているがん患者由来の CAR-T 細胞と比較して、より強い応答を生じる可能性があり、そのため、健康なドナー由来の CAR-T 細胞を使用すると、効果が過大評価される可能性がある。これらの問題に対処するため、我々は、外科的切除標本から樹立した患者由来の膵臓がんオルガノイドと、同じ患者の PBMC から作製した CAR-T 細胞を用いて、自己移植モデルにおける 7×19 CAR-T を評価した。このような自家移植モデルを用いた今回の研究において、7×19 CAR-T は Conv. CAR-T よりも優れた抗腫瘍効果を示し、7×19 CAR 技術の真正な有効性が示唆された。我々の知る限り、固形がんの自家モデルにおいて Armored CAR-T の抗腫瘍効果を実証した既報はない。この自家モデルは、患者自身の腫瘍細胞由来オルガノイドに対する患者の PBMC から作製した CAR-T 細胞の有効性を予測するスクリーニング系としても有用であり、がん患者に対する最適な治療法の重要な選択過程となるであろう。

本研究では、EGFRvIII 陽性膠芽腫の皮下注射を用いたモデルを用いたが、最近のいくつかの研究では、マウスに腫瘍を頭蓋内投与する膠芽腫の同所性モデルが報告されている (34-36)。これらの同所性モデルにおいて、CAR-T の頭蓋内投与は静脈内投与よりも優れた抗腫瘍効果を示し、IL-15 を産生するように改良した CAR-T の使用や、IL-12 の腫瘍内投与と組み合わせることで、同所性モデルにおいて静脈内投与された CAR-T の治療効果が高まった。EGFRvIII 陽性膠芽腫の同所性モデルにおける 7×19 CAR-T 治療（静脈内投与または頭蓋内投与）の治療可能性とその基礎メカニズムについては、今後調査し、報告する予定である。

以上のことから、IL-7/CCL19 産生技術は、EGFRvIII や HER2 を標的とした CAR-T に強力な抗腫瘍効果をもたらし、膠芽腫や膵臓がんなどの難治性固形がんに対する CAR-T に応用できることが明らかになった。7×19 CAR-T の有効性は、オルガノイドの作製に患者由来の腫瘍を、CAR-T の作製に患者自身の PBMC をそれぞれ用いた自家移植モデルで確認された。これらを総合すると、7×19 CAR-T は難治性固形がんの治療における革新的で有望な治療選択肢となりうる。

6. 結語

IL-7/CCL19 産生技術は、EGFRvIII や HER2 を標的とした CAR-T に強力な抗腫瘍効果をもたらし、膠芽腫や膵臓がんなどの難治性固形がんに対する CAR-T に応用できることが明らかになった。

7. 謝辞

本研究にご協力いただいた山口大学医学部附属病院の患者およびスタッフの方々に感謝する。

8. 参考文献

1. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018;**359**(6382):1350-5 doi 10.1126/science.aar4060.
2. Sun Q, Hong Z, Zhang C, Wang L, Han Z, Ma D. Immune checkpoint therapy for solid tumours: clinical dilemmas and future trends. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023;**8**(1) doi 10.1038/s41392-023-01522-4.
3. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, *et al.* Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet* 2020;**396**(10254):839-52 doi [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31366-0).
4. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, *et al.* Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *The Lancet* 2021;**398**(10297):314-24 doi [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00933-8).

5. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2018;**378**(5):439-48 doi 10.1056/nejmoa1709866.
6. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, *et al.* Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2021;**384**(8):705-16 doi 10.1056/NEJMoa2024850.
7. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2017;**377**(26):2531-44 doi 10.1056/nejmoa1707447.
8. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, *et al.* KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2020;**382**(14):1331-42 doi 10.1056/NEJMoa1914347.
9. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*

2020;**17**(3):147-67 doi 10.1038/s41571-019-0297-y.

10. Larson RC, Maus MV. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer* 2021;**21**(3):145-61 doi 10.1038/s41568-020-00323-z.
11. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, *et al.* Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017;**318**(23):2306-16 doi 10.1001/jama.2017.18718.
12. Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Sandhu N, Knox SJ. A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Frontiers in Oncology* 2021;**10**.
13. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielałowicz K, Kalra M, Landi D, *et al.* HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma. *JAMA Oncology* 2017;**3**(8):1094 doi 10.1001/jamaoncol.2017.0184.
14. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine* 2016;**375**(26):2561-9 doi

10.1056/NEJMoa1610497.

15. Goff SL, Morgan RA, Yang JC, Sherry RM, Robbins PF, Restifo NP, *et al.* Pilot Trial of Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor–transduced T Cells Targeting EGFRvIII in Patients With Glioblastoma. *Journal of Immunotherapy* 2019;**42**(4):126-35 doi 10.1097/cji.0000000000000260.
16. Kringel R, Lamszus K, Mohme M. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Glioblastoma-Current Concepts and Promising Future. *Cells* 2023;**12**(13) doi 10.3390/cells12131770.
17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2019;**69**(1):7-34 doi 10.3322/caac.21551.
18. Feng K, Liu Y, Guo Y, Qiu J, Wu Z, Dai H, *et al.* Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell* 2018;**9**(10):838-47 doi 10.1007/s13238-017-0440-4.
19. Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, *et al.* Activity of Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial.

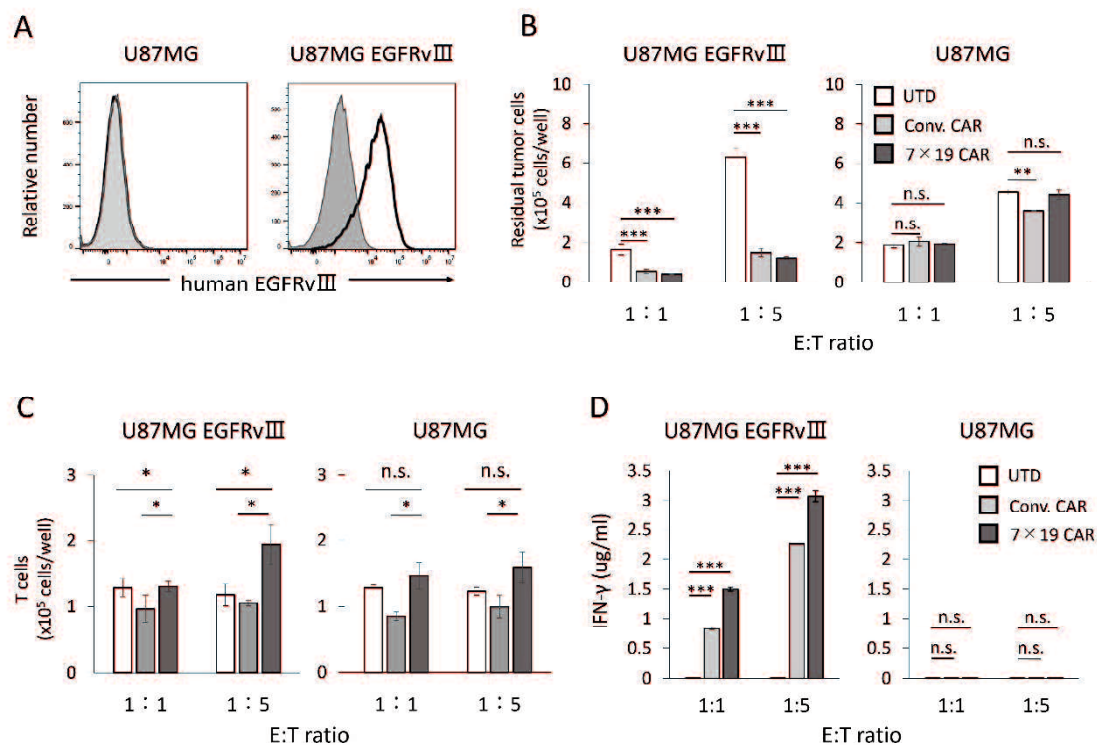
- Gastroenterology* 2018;**155**(1):29-32 doi 10.1053/j.gastro.2018.03.029.
20. Adachi K, Kano Y, Nagai T, Okuyama N, Sakoda Y, Tamada K. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol* 2018;**36**(4):346-51 doi 10.1038/nbt.4086.
21. Goto S, Sakoda Y, Adachi K, Sekido Y, Yano S, Eto M, *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**(9):2503-15 doi 10.1007/s00262-021-02853-3.
22. Sasaki T, Sakoda Y, Adachi K, Tokunaga Y, Tamada K. Therapeutic effects of anti-GM2 CAR-T cells expressing IL-7 and CCL19 for GM2-positive solid cancer in xenograft model. *Cancer Med* 2023;**12**(11):12569-80 doi 10.1002/cam4.5907.
23. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, *et al.* Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* 2016;**45**(2):389-401 doi 10.1016/j.immuni.2016.07.011.
24. Graham C, Jozwik A, Pepper A, Benjamin R. Allogeneic CAR-T Cells:

- More than Ease of Access? *Cells* 2018;**7**(10):155 doi 10.3390/cells7100155.
25. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, *et al.* Redirecting Gene-Modified T Cells toward Various Cancer Types Using Tagged Antibodies. *Clinical Cancer Research* 2012;**18**(23):6436-45 doi 10.1158/1078-0432.ccr-12-1449.
 26. Mori JI, Adachi K, Sakoda Y, Sasaki T, Goto S, Matsumoto H, *et al.* Anti-tumor efficacy of human anti-c-met CAR-T cells against papillary renal cell carcinoma in an orthotopic model. *Cancer Sci* 2021;**112**(4):1417-28 doi 10.1111/cas.14835.
 27. Fujii M, Matano M, Nanki K, Sato T. Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. *Nat Protoc* 2015;**10**(10):1474-85 doi 10.1038/nprot.2015.088.
 28. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, *et al.* Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell* 2018;**22**(3):454-67 e6 doi 10.1016/j.stem.2017.12.009.
 29. Arcangeli S, Falcone L, Camisa B, De Girardi F, Biondi M, Giglio F, *et*

- al.* Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Frontiers in Immunology* 2020;**11** doi 10.3389/fimmu.2020.01217.
30. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, *et al.* Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood* 2014;**123**(24):3750-9 doi 10.1182/blood-2014-01-552174.
31. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provasi E, *et al.* IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* 2013;**121**(4):573-84 doi <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431718>.
32. Li L, Li Q, Yan Z-X, Sheng L-S, Fu D, Xu P, *et al.* Transgenic expression of IL-7 regulates CAR-T cell metabolism and enhances in vivo persistence against tumor cells. *Scientific Reports* 2022;**12**(1) doi 10.1038/s41598-022-16616-2.
33. Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, Porter DL, Chen C, Collins MA, *et al.* Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature* 2022;**602**(7897):503-9 doi 10.1038/s41586-021-04390-6.

34. Prapa M, Chiavelli C, Golinelli G, Grisendi G, Bestagno M, Di Tinco R, *et al.* GD2 CAR T cells against human glioblastoma. *npj Precision Oncology* 2021;**5**(1) doi 10.1038/s41698-021-00233-9.
35. Gargett T, Ebert LM, Truong NTH, Kollis PM, Sedivakova K, Yu W, *et al.* GD2-targeting CAR-T cells enhanced by transgenic IL-15 expression are an effective and clinically feasible therapy for glioblastoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;**10**(9):e005187 doi 10.1136/jitc-2022-005187.
36. Agliardi G, Liuzzi AR, Hotblack A, De Feo D, Núñez N, Stowe CL, *et al.* Intratumoral IL-12 delivery empowers CAR-T cell immunotherapy in a pre-clinical model of glioblastoma. *Nature Communications* 2021;**12**(1) doi 10.1038/s41467-020-20599-x.

図 1



Conv. CAR および 7×19 CAR-T 細胞の in vitro における EGFRvIII 特異的免疫応答

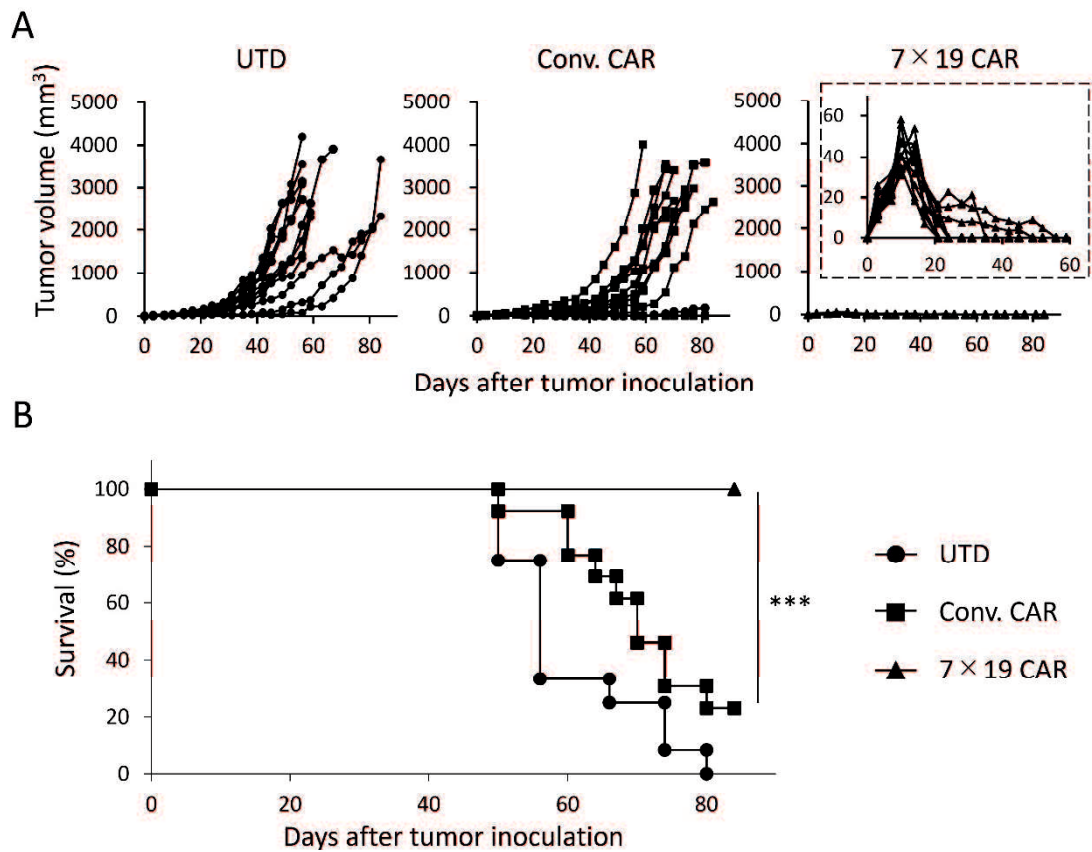
(A) U87MG 膠芽腫細胞株において、フローサイトメトリーで EGFRvIII の発現を評価した。2 本のヒストグラムは、それぞれ抗 EGFRvIII Ab による染色と抗マウス IgG Ab のみによる染色を示す。

(B)(C) Conv. CAR-T 細胞、7×19 CAR-T 細胞、または UTD T 細胞を、エフェクター対標的 (E:T) 比 1:1 および 1:5 で、指示した腫瘍細胞と 2 日間共培養した。共培養後の残存腫瘍細胞数 (B) と T 細胞数

(C) をフローサイトメトリーで解析した。データは3連サンプルの平均 $\pm$ SD で示す。(D) (B) の共培養の上清を採取し、ELISA で IFN- γ の濃度を評価した。データは 3 連サンプルの平均 $\pm$ SD で示す。

P<0.005、*P<0.001、n.s.有意差なし。

図 2



ヒト膠芽腫の樹立前固形腫瘍モデルにおける 7×19 CAR-T の強力な治療効果

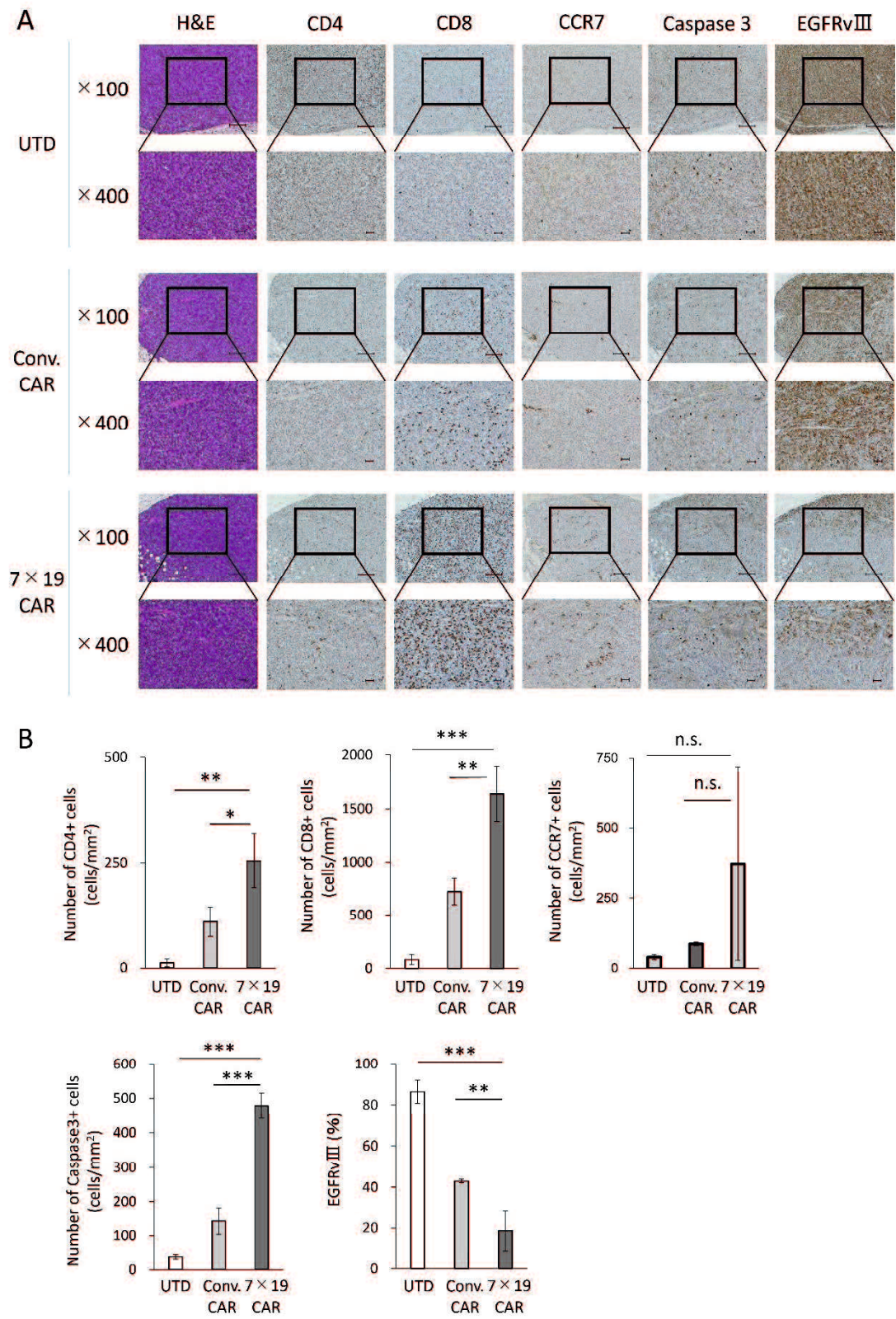
NOG-ΔMHC マウスに、0 日目に 3.5×10^5 U87MG EGFRvIII 腫瘍細胞を皮下接種し、10 日目に 1×10^7 Conv. CAR-T、7×19 CAR-T、または UTD を静脈内注射した。その後、腫瘍の大きさ (A) およびマウスの生存率 (B) を評価した (UTD および 7×19 CAR-T 群では各 $n=12$ 、Conv. CAR-T 群では $n=13$)。CAR-T 群、 n 値は biological

replicates)。A) において、各線は個々のマウスの腫瘍体積を示す。

7×19 CAR-T 投与マウスの初期 56 日間の腫瘍体積を挿入図に示す。

*** $P < 0.001$.

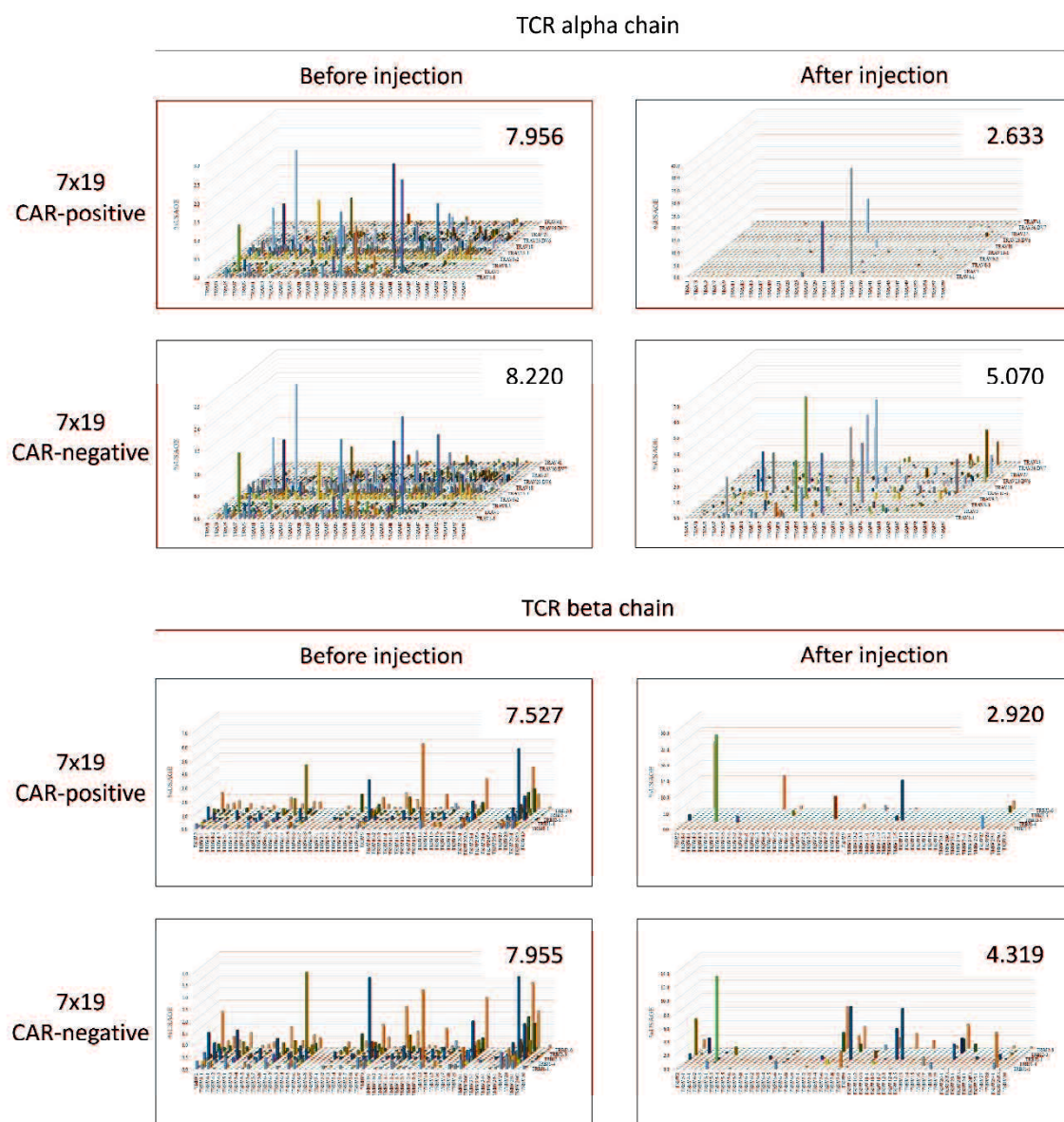
図 3



7×19 CAR-T 治療による腫瘍組織への T 細胞の大量浸潤と抗腫瘍効果

NOG-ΔMHC マウスに 0 日目に 3.5×10^5 U87MG EGFRvIII 細胞を皮下接種し、その後 10 日目に 1×10^7 UTD、Conv.10 日目に 1×10^7 UTD、Conv. CAR-T、または 7×19 CAR-T 細胞を静脈内注射した。13 日目にマウスから腫瘍組織を切除し、ウサギ抗ヒト CD4、CD8、CCR7、カスパーゼ-3 mAb およびマウス抗ヒト EGFRvIII mAb を用いた H&E 染色および IHC 染色のためのホルマリン固定・パラフィン包埋スライスを作製した。染色した細胞を 100 倍および 400 倍の顕微鏡検査で可視化して観察した。(A) 代表的な画像を示す。スケールバーは 200μm (100 倍) または 50μm (400 倍) の長さを示す。(B) BZ-X analyzer ソフトウェアにより、腫瘍面積あたりの染色細胞数 (mm²) または染色面積の割合を算出した。データは 3 連サンプル (各群 n=3、生物学的反復) の平均値±SD で示した。P<0.05、***P<0.01、***P<0.001、n.s.有意差なし。

図 4



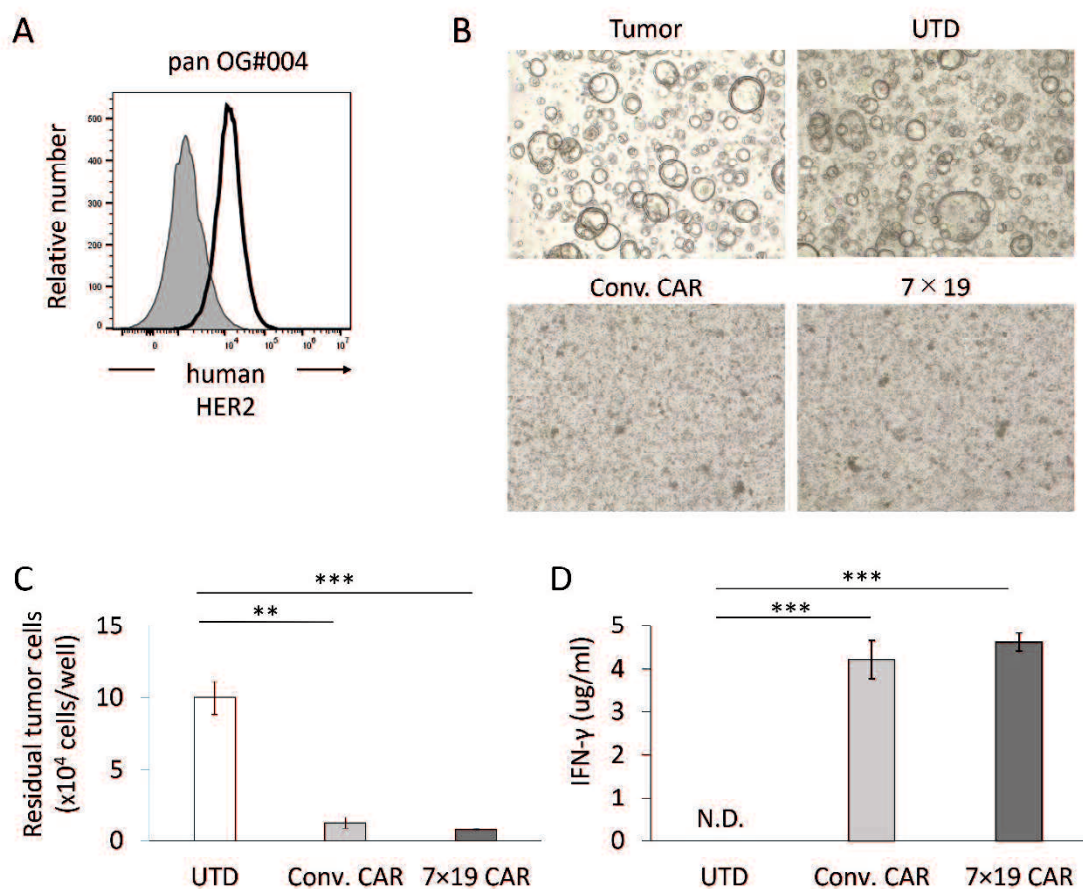
7×19 CAR-T 注射前後の T 細胞における TCR レパトアの多様性

PBMC から作製した 7×19 CAR-T を CAR 陽性または陰性 T 細胞に選別し、TCR α 鎖および β 鎖のレパトアを解析した (Before injection)。

抗 EGFRvIII 7×19 CAR-T の投与により U87MG EGFRvIII を拒絶した

マウスから、腫瘍接種 42 日後に脾臓細胞を採取した。脾臓細胞を CAR 陽性または陰性 T 細胞に選別し、TCR α 鎖および β 鎖レパトアを解析した (After injection)。TCR レパトアを次世代シーケンサーで解析し、V 領域と J 領域の使用頻度を 3D グラフで表示した。グラフ中の数字は、Shannon-Weaver index H として計算された多様性指数 (数字が小さいほど多様性が低いことを示す) を表す。各群 3 サンプルの代表的なデータを示す。

図 5

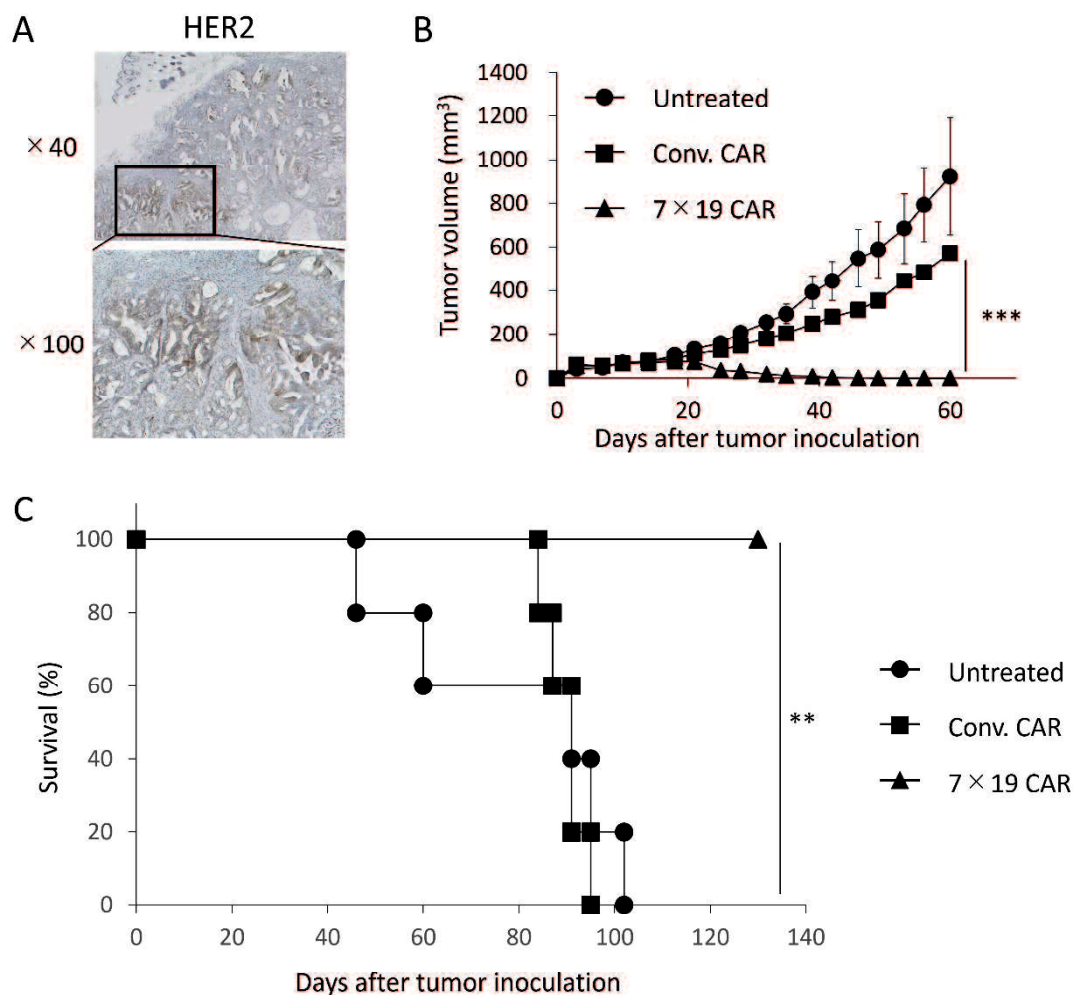


患者由来膵臓がんオルガノイドに対する自家 Conv.および 7×19 CAR-T の in vitro での反応

(A) フローサイトメトリーにより、患者由来の膵臓がんオルガノイドにおける内因性 HER2 発現を評価した。2 本のヒストグラムは、それぞれヒト化抗 HER2 Ab による染色と抗ヒト IgG Ab のみによる染色を示す。(B-D) 抗 HER2 Conv.または 7×19 CAR-T、あるいは UTD を、E:T 比 1:1 で、HER2 陽性膵臓がんオルガノイドと 4 日間共培養

した。(B) 共培養 4 日後の形態学的画像を示す。(C) 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。データは 3 連サンプルの平均 $\pm$ SD で示す。(D) 共培養4日後に上清を回収し、ELISA により IFN- γ 濃度を評価した。データは 3 連サンプルの平均 $\pm$ SD で示す。 **P<0.01、 ***P<0.001、 N.D. ; 検出限界以下。

図 6

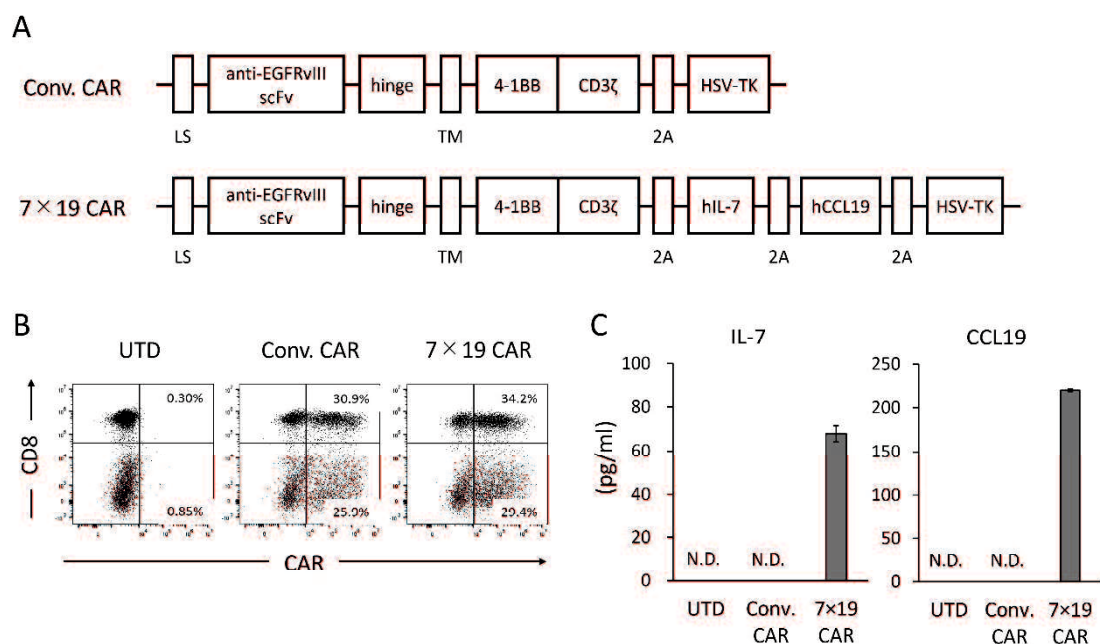


自家膵臓がんオルガノイドにおける患者 PBMC 由来 7×19 CAR-T の強力な治療効果

(A) 1×10^6 膵臓がんオルガノイドを皮下接種することにより、NOG- Δ MHC に腫瘍塊を樹立した。88 日後、樹立した腫瘍塊を切除し、IHC 染色により HER2 発現を調べた。(B, C) NOG- Δ MHC マウスに 1×10^6 膵臓がんオルガノイドを 0 日目に皮下接種し、 5×10^6 抗 HER2

Conv. CAR-T または 7×19 CAR-T を静脈内注射した。10 日目に CAR-T 細胞または 7×19 CAR-T 細胞を静脈内注射した。その後、腫瘍の大きさ (B) およびマウスの生存率 (C) を評価した (全群各 n=5、biological replicates)。**p < 0.01、***p < 0.001。

補足図 1



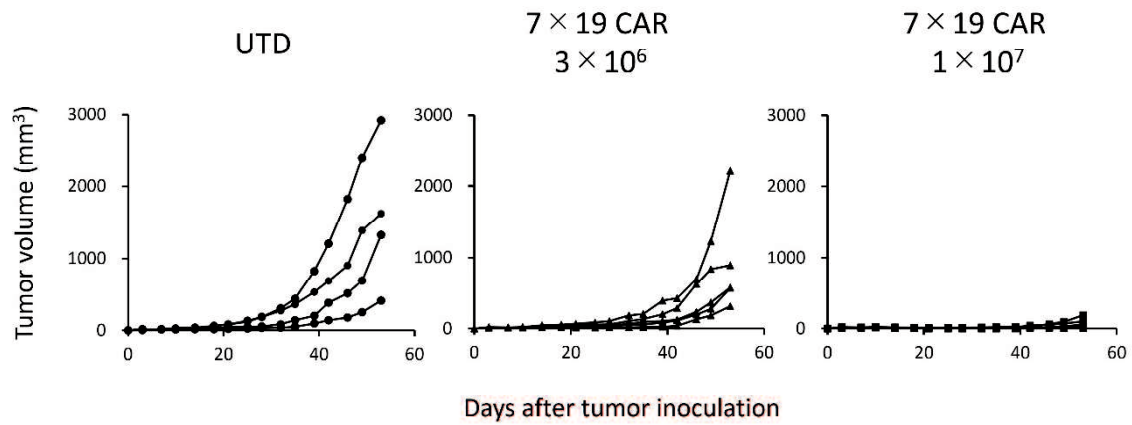
IL-7 と CCL19 を発現する抗 EGFRvIII CAR-T 細胞の作製と特性

(A) EGFRvIII に対する Conv. CAR と 7×19 CAR の模式図を示す。LS ; リーダー配列、TM ; 膜貫通領域、2A ; 自己切断可能な 2A リンカー。

(B) Conv. CAR または 7×19 CAR を導入したヒト PBMC を抗 CAR リンカーAb で染色し、抗 CD8Ab とともに CAR 発現を検出した。陰性対照として UTD を調べた。

(C) Conv. CAR-T 細胞および 7×19 CAR-T 細胞の培養上清を、遺伝子導入の 4 日後に採取し、IL-7 および CCL19 の濃度を ELISA で測定した。コントロールとして、同じ時点で UTD から得た培養上清を調べた。データは 3 連サンプルの平均±標準偏差 (SD) で示した。N.D. ; 検出限界以下。

補足図 2

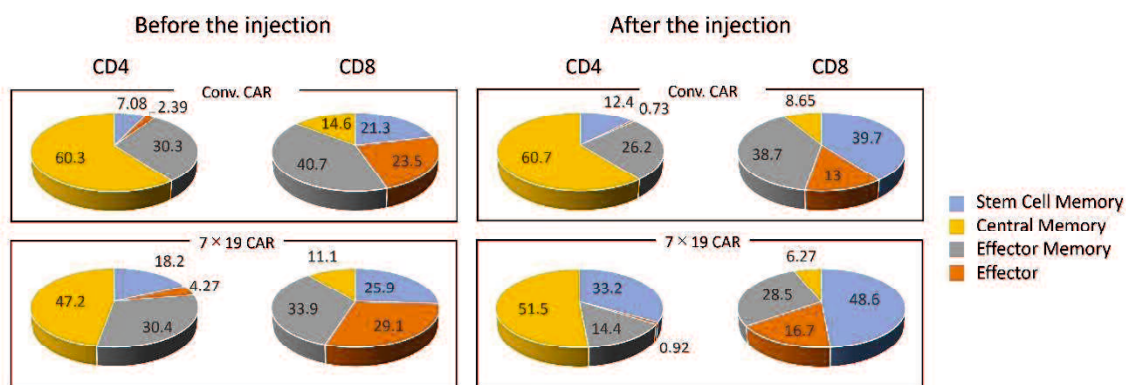


ヒト膠芽腫の樹立前固形腫瘍モデルにおける少ない数の 7×19

CAR-T による治療効果

NOG-ΔMHC マウスに、0 日目に 3.5×10^5 個の U87MG EGFRvIII 腫瘍細胞を皮下接種し、10 日目に UTD、 3×10^6 , or 1×10^7 個の 7×19 CAR-T を静脈内注射した。その後、腫瘍サイズを週 2 回評価した (7×19 CAR-T 群では各 n=5、UTD 群では n=4、n 値は biological replicates)。各線は個々のマウスの腫瘍体積を示す。

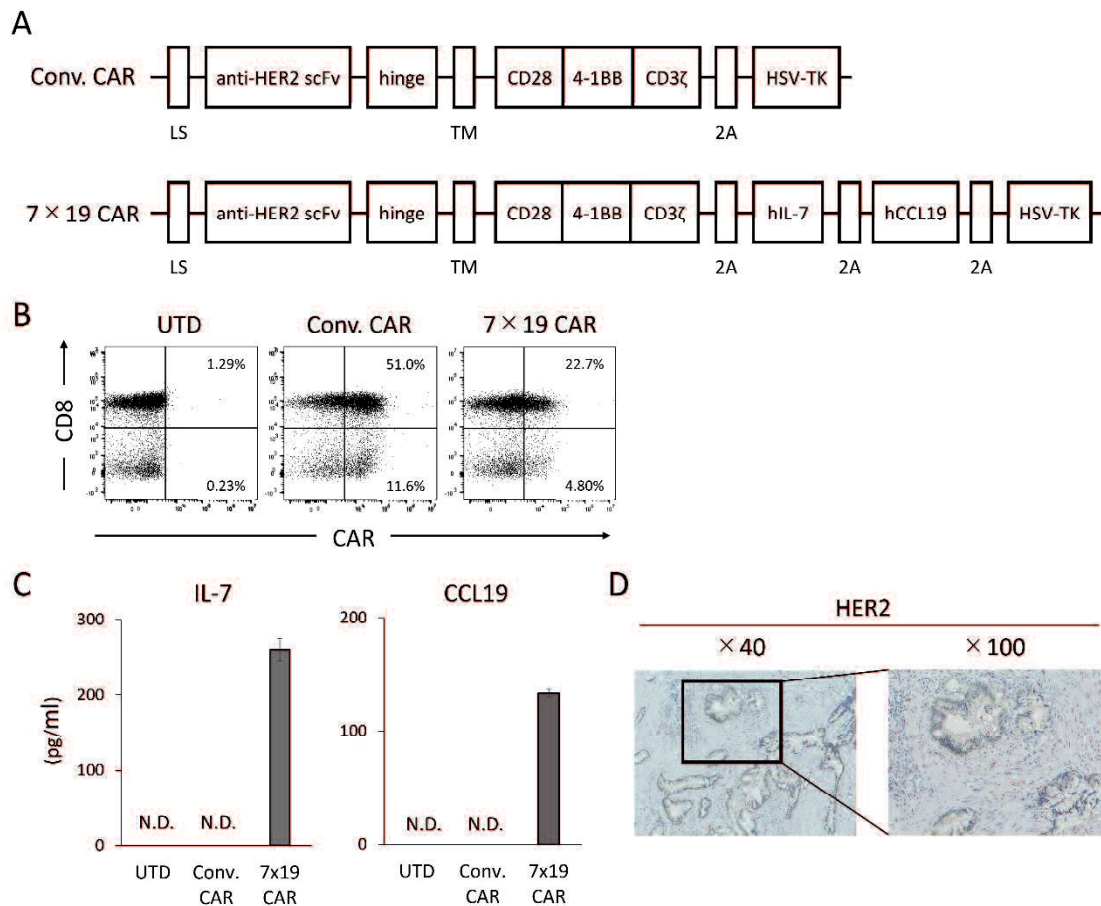
補足図 3



7×19 CAR-T の免疫表現型解析

マウスに注入する前に、Conv. または 7×19 CAR-T をフローサイトメトリーで分析し、CD4 および CD8 集団とともに、幹細胞メモリー、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、およびエフェクター表現型の割合を調べた。in vivo 実験では、マウスに U87MG EGFRvIII 細胞を 0 日目に皮下接種し、その後 Conv. CAR-T または 7×19 CAR-T を 10 日目に静脈内注射した。13 日目にマウスから脾臓を採取し、上記と同様に CAR-T 細胞の表現型を解析した。免疫表現型は以下のように定義された；幹細胞メモリー：CD45RA⁺CCR7⁺、セントラルメモリー：CD45RA⁻CCR7⁺、エフェクターメモリー：CD45RA⁻CCR7⁻、エフェクター：CD45RA⁺CCR7⁻。

補足図 4



IL-7 と CCL19 を発現する抗 HER2 CAR-T 細胞の作製と機能評価

(A) HER2 に対する Conv. CAR と 7 × 19 CAR の模式図を示す。LS ; リーダー配列、TM ; 膜貫通領域、2A ; 自己切断可能な 2A リンカー。(B) Conv. CAR または 7 × 19 CAR で形質導入した患者の PBMC をヒト組換え HER2-Fc 融合タンパク質で染色し、次いで抗ヒト IgG Fc Ab で CAR 発現を検出し、抗 CD8 Ab を加えた。陰性対照として UTD を調べた。(C) Conv. CAR-T および 7 × 19 CAR-T 細胞の培養上清を、遺伝子導入

の4日後に採取し、IL-7 および CCL19 の濃度を ELISA で測定した。

コントロールとして、同時期に UTD から得た培養上清を調べた。データは3連サンプルの平均値 $\pm$ SD で示した。N. D. ; 検出限界以下。

(D) 患者の外科的切除標本からの膀胱がん組織における HER2 の IHC 染色の画像を示す。