学位論文(博士)

Short-term manufacturing of IL-7/CCL19-expressing CAR-T cells enhances and prolongs therapeutic effects in solid tumor models

(IL-7/CCL19 を産生する CAR-T 細胞の短期培養は、固形腫瘍モデルにおいて治療効果を増強し、その持続期間を延長する)

氏名　酒井　康平

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 8 年 6 月

目　次

１．要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３

２．研究の背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・３～４

３．目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４

４．方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４～７

　(1) 対象 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４～５

　(2) 方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５～７

　(3) 統計 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７

５．結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７～１１

６．考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１２～１３

７．結語・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１３～１４

８．謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１４

９．参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１５～１７

10．図・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１８～３１

１．　要旨

CAR-T 細胞療法は一部の血液がんに対して注目すべき成果を上げているが、固形がんに対しての有効性は依然として限定的である。重要な戦略の一つとして迅速かつ高機能な CAR-T 細胞を作製するための製造方法の改良が挙げられる。我々は固形がんの治療のために開発した IL-7 と CCL19 を同時に発現する CAR-T 細胞(以降、7×19 CAR-T 細胞と表記)の製造法を改良した。増殖段階を省略した短期培養法により作製した 7×19 CAR-T 細胞(以降、Swift 7×19 CAR-T 細胞と表記)を、通常の培養法で作製した細胞(以降、Standard 7×19 CAR-T 細胞と表記)と比較した。Swift CAR-T 細胞はステムセルメモリーT 細胞やセントラルメモリーT 細胞を含む早期メモリー型の表現型の割合が高く、Standard CAR-T よりも優れたエフェクター機能を有していた。標的陽性腫瘍細胞による反復刺激ストレステストでは、Swift 7×19 CAR-T 細胞と Swift 従来型 CAR-T 細胞は初期には同様の抗腫瘍効果を示したが、反復刺激後は Swift 7×19 CAR-T のみが強力な抗腫瘍反応を維持した。さらに Swift 7×19 CAR-T 細胞は、Standard 7×19 CAR-T 細胞と比較し約 30 分の 1 の細胞数で in vivo 抗腫瘍活性を示し、悪性化を示す明らかな増殖を伴うことなく腫瘍の再投与に対する長期的な抵抗性を認めた。これらの結果は革新的な“Swift”短期培養法と 7×19 CAR-T 技術を組み合わせることで難治性固形がんに対する新たな治療選択肢を提供できる可能性を提示している。

２．　研究の背景

CAR-T 療法は造血器悪性腫瘍において従来の治療よりも優れた治療効果を発揮し、臨床応用が進んでいる(1-7)。しかし、依然として B-ALL や B 細胞リンパ腫、多発性骨髄腫において奏効の得られない症例や再発症例が認められる(1-7)。固形がんにおいては未だ治療効果が不十分であり、これまでに薬事承認されたものはなく、CAR-T 療法のさらなる改良が強く求められている(8-10)。また自家の CAR-T 細胞製造においては、医療機関で患者から採取したアフェレーシス検体を細胞調製施設へ輸送し、CAR 遺伝子の導入、拡大培養、品質試験などの工程を経た後に、医療機関に再度輸送されて使用されるが、これらのプロセスには比較的長い期間を要する(11)。そのため、CAR-T 製造期間中に患者の病態が増悪するリスクがあり(1, 3)、複雑かつ長期間の培養は製造コストの増大につながる(12)。

これらの CAR-T 細胞製造における課題に対する改良手段として、CAR-T 細胞製造時の体外培養プロセスを簡略化することでアフェレーシスから投与までの期間(Vein-to-vein time)を短縮できるだけでなく、より優れた抗腫瘍活性を示す CAR-T 細胞を誘導できる可能性が示唆されている(13-21)。現在、再発難治性の非ホジキン B 細胞性リンパ腫や B-ALL、多発性骨髄腫に対して、このような短期培養法にて製造された CAR-T 細胞を用いた臨床試験が進められており、低用量でも奏効が報告されている(14, 16, 17, 19)。また、このような改良は製造コストの削減にも繋がることが期待されている。

短期培養法として拡大培養フェーズを省略して作製した CAR-T は初期のメモリーフェノタイプであるステムセルメモリーやセントラルメモリー分画を豊富に含み(13, 15, 16)、増殖能や生存能が高いことを特徴としている(12, 14, 15, 17)。また、造血器腫瘍に対する CAR-T 療法での治療効果に相関するバイオマーカーとして、製造した CAR-T 細胞でステムセルメモリーやセントラルメモリー分画といった初期のメモリーフェノタイプが多く含まれることが報告されている(22-24)。以上より、初期メモリーフェノタイプの CAR-T 細胞は生体内での優れた増殖や長期の生存をもたらすことが示

唆され、短期培養による CAR-T 細胞の有効性が向上している理由と考えられる。

これまでの短期培養法での CAR-T 療法に関する報告の大部分は造血器腫瘍に対するものであり、固形腫瘍での応用例はない。一部、前臨床モデルでの報告はあるものの、通常型の CAR-T 細胞での検討に限定されている (25)。通常型の CAR-T 細胞はそもそも固形腫瘍に対する有効性が低く、短期培養法の適用のみでは固形腫瘍への応用は困難である可能性が高い。そこで我々は、固形がんに対して開発された免疫強化型 CAR-T(Armored CAR-T)を短期培養法により製造することにより、固形がんに対する抗腫瘍効果の向上を検討した。

我々のグループは、これまでにインターロイキン-7(IL-7)とケモカイン(C-C モチーフ) リガンド 19(CCL19)を同時に発現する免疫強化型 CAR-T 細胞(以降、7×19 CAR-T 細胞と表記)を開発し、多くの固形がん動物モデルでの優れた治療効果を実証してきた(26-29)。投与された 7×19 CAR-T 細胞は腫瘍局所にて CAR の標的である腫瘍関連分子を認識して CCL19 と IL-7 を産生し、CCL19 の作用により T 細胞と樹状細胞の遊走、IL-7 の作用により T 細胞の増殖と記憶形成を誘導する。その結果、腫瘍微小環境には多くの免疫細胞が浸潤し、それらには投与された 7×19 CAR-T 細胞のみならず、宿主由来の T 細胞も多く含まれており、これらの両方が抗腫瘍効果に重要な役割を発揮する。さらに、7×19 CAR-T 細胞の投与は腫瘍に対する長期的なメモリー応答を誘導し、その効果は CAR 標的分子を発現している腫瘍株と標的分子を持たない親株の両者で観察されている(26)。これは 7×19 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果にはエピトープスプレッディングの誘導が関与していることを示唆している(30)。また、患者腫瘍組織から樹立した腫瘍オルガノイドを接種した固形がんモデルにおいて、同一患者の末梢血から誘導した 7×19 CAR-T が高い治療効果を発揮することを報告した(29)。これらの報告はすべて通常の培養法により作製された 7×19 CAR-T であり、短期培養法で作製された 7×19 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果については未だ検討されていない。

３． 目的

本研究の目的は拡大培養フェーズを省略した短期培養法にて製造した 7×19 CAR-T 細胞が CAR-T 療法の治療効果を向上させるかを検討することであり、その免疫学的フェノタイプ、腫瘍傷害活性、固形がん動物モデルにおける治療効果について、通常の培養法にて製造した 7×19 CAR-T 細胞と比較した。加えて、CAR 標的分子を発現する腫瘍細胞を用いて CAR-T 細胞を反復して刺激するストレス試験を実施し、長期的な反応性や疲弊に対する抵抗性について解析した。さらに、長期生存マウスにおける CAR-T 細胞の生存数や機能について、短期培養法あるいは通常の培養法で作製した 7×19 CAR-T 細胞間で比較検討した。

４． 方法

（１）対象

マウスと細胞株

雌の 7-11 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 in vivo 実験で使用した。マウスは以前に報告したように、当施設の特定無菌環境下で飼育し(28, 29)、実験終了まで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 およびヒト肺腺がん細胞株である A549 は Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank(JCRB Cell Bank)から購入した。ヒト結腸腺がん細胞株である SW480 およびヒト肺中皮腫細胞株である MSTO211H、ヒト

膠芽腫細胞株であるU87MGはAmerican Type Culture Collection(ATCC)から購入した。GFPおよびルシフェラーゼを安定発現するMSTO211H細胞は、遺伝子改変後にSH800(ソニー)を用いた細胞選別により樹立された(以降、MSTO211H_GFP-Lucと表記)。ヒトEGFRvIIIを発現するU87MG(以降、U87MG_hEGFRvIIIと表記)は以前に報告したように樹立された(29)。

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(和光)を添加したRPMI-1640培地(Gibco)で培養した。MSTO211H_GFP-Luc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DMEM(Gibco)培地で培養した。U87MG細胞およびU87MG_hEGFRvIII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硫酸塩を添加したMEM(Gibco)培地で培養した。

（２）方法

CAR発現ベクターの設計

抗GM2および抗ヒトEGFRvIII単鎖可変領域フラグメント(scFv)は、以前に報告したように作製した(28, 29)。抗GM2 scFvをヒトCD8α膜貫通配列、ヒトCD28、4-1BB、及びCD3ζ細胞質内配列と融合させ、第3世代CARを構築し、MSGV1レトロウイルスベクターにクローニングした。2A自己切断リンカー配列を用いて、CARに加えてIL-7、CCL19、およびHSV-TKを発現させた。EGFRvIII scFvをヒトCD8α膜貫通配列、ヒト4-1BB、及びCD3ζ細胞質内配列と融合させ、第2世代CARを構築し、MSGV1レトロウイルスベクターにクローニングした。2A自己切断リンカー配列を用いて、CARに加えてIL-7、CCL19、およびHSV-TKを発現させた。

ヒトT細胞への遺伝子導入

ヒトT細胞への遺伝子導入を行うため、健康ドナーから採取したPBMCを、OKT3(eBioscience)とRetroNectin(タカラバイオ)を事前にコートした6ウェルプレート内で、OpTmizer(Gibco)にOpTmizer CTS、CTS Immune Cell血清代替液、L-グルタミン(Gibco)、 1%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(住友製薬)を添加した培養液を用いて、IL-2(Miltenyi Biotec)の存在下で68～72時間培養した。レトロウイルスは、CAR発現遺伝子とエンベロープ遺伝子を安定的に導入したプロデューサー細胞株によって産生された。レトロウイルスをRetroNectinの存在下で6ウェルプレートにコーティングして、活性化したPBMCを感染させた。感染は2回行われ、最初の感染ではIL-2を含むOpTmizerを用いて20～24時間行った。2回目はIL-2を含む新鮮な培地を用いてさらに4時間感染を行った。感染後、Swift CAR-T細胞は回収され、それ以上の培養を行わずに凍結保存された。Standard CAR-T細胞は、2回目の感染後に細胞を回収し、IL-2を含む新鮮な培地でさらに4日間培養して増殖させた後、回収して凍結保存した。非遺伝子導入T細胞は、レトロウイルスの感染はさせずに、他は同様の培養条件で作製した。CARの形質導入効率は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IL-7およびCCL19の産生は、以前に報告されたように測定した(27-29)。

フローサイトメトリー

非標識抗 GM2 モノクローナル抗体(細胞工学研究所)と、二次抗体として APC 標識抗マウス IgG 抗体(BioLegend)を用いることで細胞表面の GM2 発現を検出した。非標識抗 EGFRvIII モノクローナル抗体(細胞工学研究所)と、二次抗体として APC 標識抗マウス IgG 抗体を用いることで細胞表面の EGFRvIII 発現を検出した。製造した CAR-T 細胞の CAR 発現率の評価のため APC 標識抗ヒト CD8 モノクローナル抗体(clone HIT8a、BioLegend)、およびビオチン化抗 GM2 CAR または抗 EGFRvIII CAR 抗体(細胞工学研究所)と、それに続く PE または PE/Cy7 標識ストレプトアビジン(Biolegend)を用いて検出した。加えて CAR-T 細胞を PerCPCy5.5 標識抗ヒト CD4 モノクローナル抗体(clone OKT4、BioLegend)、FITC 標識抗ヒト CD45RA モノクローナル抗体(clone HI100、BioLegend)、および BV421 標識抗ヒト CCR7 モノクローナル抗体(clone 150503、BD bioscience)を用いて染色した。一部の実験では CAR-T 細胞にさらに PE 標識抗ヒト IL-7Rα(clone A019D5、BioLegend)を用いて染色した。

In vivo 実験のマウス脾臓細胞解析時は、ヒト T 細胞を識別するために、APC/Cy7 標識抗ヒト CD3 モノクローナル抗体(clone HIT3a、BioLegend)を用いて染色した。In vitro 共培養解析では CAR-T 細胞と腫瘍細胞を BV510 標識抗ヒト CD45 モノクローナル抗体(clone HI30、BioLegend)、PerCPCy5.5 標識抗ヒト CD4 モノクローナル抗体、BV421 標識抗ヒト CD8 モノクローナル抗体(clone HIT8a、BioLegend)、PE 標識抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体(clone MIH4、BD bioscience)、APC 標識抗 TIGIT モノクローナル抗体(clone MBSA43、Invitrogen)、Zombie Yellow Viability Dye(Biolegend)を用いて腫瘍細胞と免疫細胞を識別して T 細胞疲弊マーカーの発現レベルを評価した。Human TruStain FcX(Biolegend)を用いて、モノクローナル抗体の Fcγ受容体への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 CytoFLEX(Beckman Coulter)を用いて取得し、FlowJo ソフトウェア(FlowJo LLC)で解析した。

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、抗 GM2 Swift Conv. CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、Standard Conv. CAR-T 細胞、Standard 7×19 CAR-T 細胞または UTD-T 細胞(5×10^3～5×10^4 cells/well)を指定された E:T 比で腫瘍細胞(5×10^4 cells/well)とともに 96 ウェルプレート上で 2 日間共培養した。T 細胞と培地を除いた後、CellTiter-Glo® Luminescent assay (Promega)を用いて残存腫瘍細胞の生存率を測定した。IFN-γ産生量は以前に報告されたように解析した(28, 29)。

リアルタイムおよび長期の腫瘍細胞傷害活性について xCELLigence(Agilent)で検討した。2×10^4 cells/well の腫瘍細胞を CAR-T 細胞なしで 24 時間培養した後にそれぞれのウェルに 4×10^3 個の抗 GM2 Swift Conv. CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、Standard Conv. CAR-T 細胞または Standard 7×19 CAR-T 細胞を添加した。残存腫瘍細胞量を評価するために 180 時間まで 6 時間毎に細胞指数をモニタリングした。

in vitro ストレステストでは、0 日目に抗 GM2 Swift Conv. CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、Standard Conv. CAR-T 細胞または Standard 7×19 CAR-T 細胞(3×10^5 cells/well)を MSTO211H_GFP-Luc(1×10^5 cells/well)と共培養した。3、6、10、13、および 17 日目に培養上清の一部を回収し、各ウェルに 1×10^5 個の MSTO211H_GFP-Luc を添加した後、さらに培養を継続した。指定された時点で、フローサイトメトリーで残存腫瘍細胞数および T 細胞数、T 細胞上の疲弊マーカーの発現レベルを解析した。さらに、回収した培養上清中の IL-7 濃度を ELISA 法で測定した。

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 個の Lu-135 腫瘍細胞を皮下接種した。3 日後、腫瘍の形成が確認された後、抗 GM2 Swift Conv. CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、Standard Conv. CAR-T 細胞、Standard 7×19 CAR-T 細胞または非遺伝子導入 T 細胞を指定された用量で尾静脈から静脈内投与した。CAR コンストラクト間あるいは Swift と Standard CAR-T 細胞の間で 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、同等の CAR 発現レベルとなるように調節した。長期生存マウスから脾臓細胞を採取して、以前に報告された方法(29)に従って、フローサイトメトリーにより解析した。腫瘍再接種実験においては、3×10^5 個の Swift 7×19 CAR-T 細胞または 1×10^7 個の Standard 7×19 CAR-T 細胞の投与により Lu-135 腫瘍を拒絶した NOG-ΔMHC マウスの右側腹部に、5×10^6 個の Lu-135 細胞、左側腹部に 5×10^6 個の SW480 細胞を皮下接種した。

一部の実験では 0 日目に NOG-ΔMHC マウスの右側腹部に 3.5×10^5 個の U87MG_hEGFRvIII 腫瘍細胞を皮下接種した。10 日後、腫瘍の形成が確認された後、抗 hEGFRvIII Swift 7×19 CAR-T 細胞、Standard 7×19 CAR-T 細胞または非遺伝子導入 T 細胞を指定された用量で尾静脈から静脈内投与した。CAR コンストラクト間あるいは Swift と Standard CAR-T 細胞の間で 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、同等の CAR 発現レベルとなるように調節した。

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(27-29)、移植片対宿主病(GVHD)を発症したマウスは解析から除外した。本研究では個々のマウスを実験単位とした。全ての in vivo 実験においてマウスを治療群または対照群に無作為に割り当てた。

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 12 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 CCR7 モノクローナル抗体(クローン EPR23192-57、Abcam)を用いた免疫組織化学(IHC)染色により解析した。BZ-X710 顕微鏡および BZ-X アナライザー(キーエンス)を用いて H&E および IHC 染色サンプルの顕微鏡分析を行った。

（3）統計

全ての統計は JMP Pro18 および Microsoft Excel 2016 を用いて解析した。健康ドナー由来 T 細胞の機能解析データは正規分布に従うものと仮定した。群間の比較には対応のないスチューデントの t 検定を用いた。マウス生存分析の統計解析はログランク検定を用いて解析した。多重比較にはホルムの方法を用いた。$P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

５．結果

Swift CAR-T 細胞の作製および表現型の特徴

CAR-T 療法では一般的に十分な細胞数の確保が必要であり、そのために CAR-T 細胞の

製造で CAR 遺伝子導入後には細胞増殖のための拡大培養が実施される。我々は、IL-7 と CCL19 を同時に産生する 7×19 CAR-T 細胞を開発し、この革新的 CAR-T 細胞が従来型の CAR-T 細胞(以降、Conv. CAR-T 細胞と表記)と比べて固形がんに対して優れた治療効果を発揮することを報告してきた(26-29)。これらの報告では T 細胞活性化後にレトロウイルスベクターを用いて 1 回あるいは 2 回の遺伝子導入を行った後、さらに 4 日間の拡大培養フェーズを経て CAR-T 細胞を作製した(Standard CAR-T)(補図 1A)。今回我々は、7×19 CAR 遺伝子導入を実施してから 4 時間後に細胞を回収する新たな細胞培養プロトコールを開発し(補図 1B)、得られた 7×19 CAR-T 細胞の機能や抗腫瘍活性を解析した。本研究では、通常の培養法で作製した Standard CAR-T 細胞に対し、拡大培養を行わず短期間で作製した CAR-T 細胞を Swift CAR-T と定義した。

最初に、様々ながん細胞に過剰発現することが知られている GM2 を標的とした Anti-GM2 7×19 CAR あるいは Anti-GM2 Conv. CAR(28)を用いて Swift および Standard の CAR-T 細胞を作製し、それぞれの CAR 発現率や CD4/8 サブセット、メモリーフェノタイプを評価した。遺伝子導入をおこなっていない T 細胞(UTD T 細胞)を non-CAR control T 細胞として使用した。Conv. CAR 及び 7×19 CAR のいずれの遺伝子導入においても、通常培養で作製した Standard CAR-T 細胞及び短期培養で作製した Swift CAR-T 細胞ともに 90%以上の CAR 発現率を認めた(図 1A)。拡大培養を行った結果、Standard CAR-T 細胞は、Swift CAR-T 細胞と比較して、約 30〜35 倍多く CAR-T 細胞が作製された(補図 1C)。培養上清中の IL-7 および CCL19 の濃度は、Standard 7×19 CAR-T 細胞と比較して、Swift 7×19 CAR-T 細胞で有意に低かった(補図 1D および 1E)。この IL-7 および CCL19 レベルの低下は、1 ウェルあたりの CAR-T 細胞数に起因している可能性が高い。Swift 7×19 CAR-T 細胞では、Standard 7×19 CAR-T 細胞に比べて CD4 陽性 T 細胞の割合が高く(図 1B)、CD4 陽性及び CD8 陽性の CAR-T 細胞のいずれにおいても CCR7 陽性のステムセルメモリー分画とセントラルメモリー分画が 90%以上占めており、特に CCR7 陽性 CD45RA 陽性のステムセルメモリー分画が高い割合を占めた。一方で Standard CAR-T 細胞では CCR7 陽性の分画は 50%以下であった。これらの Swift と Standard 7×19 CAR-T 細胞間のフェノタイプの違いは Swift と Standard Conv. CAR-T 細胞の間にも同様に観察された。以上より、Swift CAR-T 細胞にはがんに対して高い治療効果と長期的な有効性を示す早期メモリーフェノタイプの細胞(23, 24, 31)を Standard CAR-T 細胞に比べて多く含んでいることが示唆された。

IL-7 と IL-7 受容体の相互作用は T 細胞の増殖や疲弊防止、記憶の誘導に重要であるが、7×19 CAR-T 細胞では定常的に IL-7 が分泌されるように設計していることから、レセプターである IL-7Rα の発現が占有や内在化により低下するリスクがある。そこで、IL-7Rα の発現レベルについて Swift と Standard CAR-T 細胞で比較したところ、Standard CAR-T 細胞では Conv. CAR-T 細胞と比較して 7×19 CAR-T 細胞での IL-7Rα の発現が著しく低下していた一方、Swift CAR-T 細胞では 7×19 CAR-T 細胞において Conv. CAR-T と比較して IL-7Rα 発現率の低下は比較的小さかった(図 1B)。このことから、Standard 7×19 CAR-T 細胞では自身が産生する IL-7 に長期間曝露されたことにより IL-7Rα 発現が抑制されたのに対し、Swift 7×19 CAR-T 細胞では培養期間が短いため、このような機序が起こらなかったと考えられる。以上より、短期培養法では IL-7 に対する反応性を維持し、抗腫瘍効果がより強い早期のメモリーフェノタイプを豊富に持つ CAR-T 細胞を作製できることが示唆された。

細胞培養において IL-2 の代わりに IL-7/IL-15 を使用するとステムセルメモリーおよびセントラルメモリーT 細胞の誘導が促進され(32)、持続的な抗腫瘍効果を持つ CAR-T 細胞の製造に有益であることが報告されている(33)。Standard または Swift

CAR-T 細胞の製造における外因性 IL-7 の効果を検証するために IL-2 を IL-7 に置き換えて細胞培養を行った。IL-7 の存在下で培養された Standard Conv. CAR-T 細胞(補図 1F)は IL-2 で培養された Standard Conv. CAR-T 細胞および Standard 7×19 CAR-T 細胞(図 1B)と比較して、CD4/8 比が高く、CCR7 陽性メモリーT 細胞サブセットの割合が増加した。対照的に Swift CAR-T 細胞では IL-2 で培養した場合でも高い CD4/8 比とメモリーT 細胞の増加が得られたため、IL-7 による効果は観察されなかった(図 1B、補図 1F)。これらの結果は、Swift CAR-T 細胞で実証されたように、培養期間を短縮することで、T 細胞培養における IL-2 の望ましくない影響を回避できることを示唆している。

短期培養法で作製された Swift CAR-T 細胞は in vitro での高い抗腫瘍活性を発揮する

次に CAR 標的陽性ヒト腫瘍細胞株に対する in vitro での抗腫瘍活性の測定により Swift CAR-T 細胞の機能を評価した(補図 2)。GM2 陽性腫瘍細胞株であるヒト悪性中皮腫細胞株 MSTO211H_GFP-Luc 細胞と Swift あるいは Standard で作製した Anti-GM2 Conv. CAR-T 細胞、7×19 CAR-T 細胞、あるいは UTD-T 細胞を共培養して腫瘍傷害活性と IFN-γ産生を解析した。Conv. CAR-T 細胞および 7×19 CAR-T 細胞ともに Swift CAR-T 細胞の方が Standard CAR-T 細胞よりも残存腫瘍細胞数が少なく（図 2A 左）、培養上清中の IFN-γ分泌量が有意に多かった(図 2B)。Swift Conv. CAR-T 細胞と Swift 7×19 CAR-T 細胞を比較すると抗腫瘍活性に大きな違いはなかった。GM2 陰性細胞株であるヒト結腸腺がん細胞株 SW480(補図 2) に対してはいずれの T 細胞も抗腫瘍活性を認めなかった(図 2A 右)。さらに、腫瘍傷害活性を経時的に観察するために xCELLigence を用いた解析を行った(図 2C)。GM2 陽性腫瘍細胞株として MSTO211H_GFP-Luc 及びヒト肺腺がん細胞株 A549(補図 2)を使用した。いずれの腫瘍細胞株に対しても Swift 7×19 CAR-T 細胞は Standard 7×19 CAR-T 細胞と比べてより早く、より強い傷害活性を認めた(図 2C)。Swift Conv. CAR-T 細胞と Standard Conv. CAR-T 細胞の比較においても同様の結果が観察された。Swift 7×19 CAR-T 細胞と Swift Conv. CAR-T 細胞の間では腫瘍傷害活性に差は認められなかった。これらの結果から Swift CAR-T 細胞は Standard CAR-T 細胞と比較して、in vitro においてより強い抗腫瘍活性を発揮することが示された。

短期培養法で作製された Swift CAR-T 細胞は優れた in vivo での腫瘍治療効果を発揮する

続いて、Swift CAR-T 細胞の in vivo での腫瘍治療効果を検証した。0 日目に Lu-135(GM2 陽性小細胞肺癌細胞株)(補図 3A)を免疫不全 NOG-ΔMHC マウスの側腹部に皮下接種し、3 日目に Swift あるいは Standard の抗 GM2 CAR-T 細胞を静脈内投与した。Standard 7×19 CAR-T 細胞では、1×10^7 個投与により 80%のマウスで腫瘍が拒絶される(図 3A 左)が、3×10^5 個投与では腫瘍が拒絶されないことを確認した(図 3A 右、補図 3B)。一方、Swift 7×19 CAR-T 細胞では 3×10^5 個投与群ですべてのマウスで腫瘍が拒絶され、この効果は Swift Conv. CAR-T 細胞や Swift UTD-T 細胞では認められなかった(図 3B、補図 3B)。3×10^5 個投与での生存期間の比較においては、Swift 7×19 CAR-T 細胞群は Swift Conv. CAR-T 細胞群や Standard 7×19 CAR-T 細胞群、Swift UTD-T 細胞群と比較して有意に生存期間の延長を認めた(図 3C)。

3×10^5 個を投与した Standard 7×19 CAR-T 細胞群と Swift 7×19 CAR-T 細胞群の腫瘍局所への浸潤 T 細胞を免疫染色で解析した結果、Swift 7×19 CAR-T 群では CD4

陽性細胞及びCD8陽性細胞の両者とも著明な浸潤を認めたが、Standard 7×19 CAR-T細胞群では殆ど腫瘍浸潤T細胞を認めなかった(補図4A、4B)。また、Swift 7×19 CAR-T細胞群ではCCR7陽性の細胞が腫瘍内に浸潤していることが明らかとなった(補図4A、4B)。

Swift CAR-T細胞により抗腫瘍効果が増強する現象がGM2に対するCAR-Tに限定されたものではなく、普遍化できることを確認するために、CARの標的分子をhEGFRvIIIに変更し、かつCARの細胞内コンストラクトを第三世代(CD28及び4-1BB)から第二世代(4-1BB)に変更して作製したCAR-T細胞にて検討した。EGFRvⅢ陽性の腫瘍であるU87MG EGFRvⅢ(補図3C)をDay 0に皮下接種したNOG-ΔMHCマウスに対して、Day10にSwift 7×19 CAR-T細胞、Standard 7×19 CAR-T細胞、あるいはSwift UTD-T細胞を1×10^6個を投与した結果、Swift 7×19 CAR-T細胞群においてのみ有意に高い腫瘍治療効果が認められた(図3D、3E、補図3D)。これらの結果から、Swift 7×19 CAR-T細胞の優れた抗腫瘍効果はCARの標的分子やCARコンストラクトには依存せず、様々なCAR-T細胞に共通して有益であることを示唆している。さらに、これらの細胞は、接種後10日経過して確立した腫瘍に対しても有効であることが示された。

Swift 7×19 CAR-T細胞は腫瘍細胞存在下で長期間生存し、持続的な抗腫瘍活性を有する

Swift CAR-T細胞の大部分はIL-7受容体を発現した早期メモリーフェノタイプであることから、免疫疲弊に抵抗性であり、高い抗腫瘍活性を維持できる可能性が考えられた。この点について検討するため、Standard あるいは Swift で作製した Anti-GM2 Conv.又は7×19 CAR-T細胞に、GM2陽性であるMSTO211H_GFP_Luc腫瘍細胞を3ー4日毎に反復して加え、継続的に共培養する「ストレス試験」を実施し、6日目、13日目、および20日目に残存腫瘍細胞数とT細胞数を測定した(図4A)。最初２回の腫瘍細胞添加の終了後である6日目までは、Swift CAR-T細胞では、Conv.あるいは7×19 CAR-T細胞にかかわらず、Standard CAR-T細胞よりも残存腫瘍細胞数が少なく、この結果は図2に示された抗腫瘍活性の結果と一致するものであった(図4A 左上)。3回目の腫瘍細胞添加以降においては、Swift Conv. CAR-T細胞では残存腫瘍細胞数が増加したのに対し、Swift 7×19 CAR-T細胞では引き続き残存腫瘍細胞数が少なく、高い抗腫瘍活性が維持されていることが示された。この結果と相関して、Swift Conv. CAR-T細胞とSwift 7×19 CAR-T細胞は両者ともDay 6まではStandard CAR-T細胞よりも優れた増殖を示し、その後はSwift Conv. CAR-T細胞の増殖は低下した一方でSwift 7×19 CAR-T細胞は腫瘍細胞に対する持続的な増殖反応を示した(図4A 右上)。このような結果は、CD4陽性及びCD8陽性のT細胞分画のそれぞれにおいて認められた(図4A下)。

次に、ストレス試験において、それぞれのCAR-T細胞での疲弊マーカーの変化を経時的に解析した。共培養開始前の時点ではSwift Conv. CAR-T細胞およびSwift 7×19 CAR-T細胞上のPD-1、TIGITの発現はStandard Conv. CAR-T細胞およびStandard 7×19 CAR-T細胞よりも高かった。しかし腫瘍細胞添加を繰り返すことにより Swift Conv. CAR-T細胞およびSwift 7×19 CAR-T細胞のこれらの分子発現レベルは徐々に低下し、5回目の刺激後にはStandard CAR-T細胞よりも低くなった(図4B)。一方で、Standard Conv. CAR-T細胞およびStandard 7×19 CAR-T細胞では腫瘍細胞添加の回数が増加するにつれてPD-1及びTIGITの発現の上昇を認めた。どの時点においても、Swift及びStandardともにConv.と7×19 CAR-T細胞の間でPD-1、TIGITの発現率に差はなかった。

ストレス試験において、Swift 7×19 CAR-T 細胞では 3 回目の腫瘍細胞添加以降でも増殖が維持された機序について解析するため、共培養上清中の IL-7 濃度を測定し、Standard 7×19 CAR-T 細胞の場合と比較した。すべての時点において、Swift 7×19 CAR-T 細胞では Standard 7×19 CAR-T 細胞よりも有意に高いレベルの IL-7 濃度が検出された(図 4C)。両群とも 10 日目までは IL-7 濃度が上昇したが、Standard 7×19 CAR-T 細胞では IL-7 濃度が徐々に低下して 3 日目に検出されたレベルよりも低くなった。対照的に Swift 7×19 CAR-T 細胞では実験終了まで高濃度の IL-7 が維持された。以上より、Swift 7×19 CAR-T 細胞はステムセルメモリー及びセントラルメモリー分画を豊富に含むことにより培養初期の細胞増殖が増強され、反復的な腫瘍細胞との培養においても持続的に IL-7 が産生されることにより長期間の細胞増殖や抗腫瘍活性が持続していると考えられた。

Swift 7×19 CAR-T 細胞は長期間マウス体内に残存し、腫瘍再発を抑制する。

ストレス試験の結果より、Swift 7×19 CAR-T 細胞は in vivo においても長期間生体内に生存し、抗腫瘍効果を発揮することが期待された。そこで、図 3 に示すように Swift 7×19 CAR-T 細胞を 3×10^5 個投与して腫瘍を拒絶したマウスと、Standard 7×19 CAR-T 細胞を 1×10^7 個投与して腫瘍を拒絶したマウスにおいて、49 日目に脾臓を摘出して残存 T 細胞について解析した。その結果、Swift 7×19 CAR-T 細胞投与群では Standard 7×19 CAR-T 細胞投与群と比較して CD3 陽性細胞が多く残存しており、この傾向は CAR 陰性 CD3 陽性 T 細胞および CAR 陽性 CD3 陽性 T 細胞の両方で観察された(図 5A)。また、Swift 7×19 CAR-T 細胞投与群では Standard 7×19 CAR-T 細胞投与群と比べて、CAR 陽性及び CAR 陰性の残存 T 細胞における CCR7 陽性細胞の割合が高いことが判明した(図 5B および補図 5A)。以上より、Swift 7×19 CAR-T 細胞投与群ではメモリーT 細胞がマウス体内に長期間残存しており、より強力な再発抑制効果を有することが推測された。

Swift 7×19 CAR-T 細胞投与群における再発抑制効果を検証するために、腫瘍を拒絶したマウスに対する腫瘍細胞の再接種試験を実施した(図 5C)。Swift 7×19 CAR-T 細胞を 3×10^5 個投与して腫瘍を拒絶したマウスと、Standard 7×19 CAR-T 細胞を 1×10^7 個投与して腫瘍を拒絶したマウスに対して Day 60 に GM2 陽性または陰性の腫瘍を再接種したところ、GM2 陽性 Lu-135 は Swift 7×19 CAR-T 細胞投与群では 40%のマウスで腫瘍拒絶を認めたのに対し、Standard 7×19 CAR-T 細胞投与群では約 27%のマウスにて腫瘍が拒絶された(図 5C)。各群での腫瘍体積を比較したところ、Swift 7×19 CAR-T 投与群では Standard 7×19 CAR-T 投与群と比べて有意に腫瘍増殖の抑制を認めた(図 5D)。GM2 陰性 SW480 ではどちらも腫瘍増殖は抑制されなかった(補図 5A)。以上より、Swift 7×19 CAR-T 細胞は、腫瘍再発に対して強力かつ長期的な防御免疫を誘導することが示された。

Swift 7×19 CAR-T 細胞が腫瘍化して抗原非存在下で自律的な増殖をしていないかを確認するために Swift 7×19 CAR-T 細胞を 3×10^5 個投与して腫瘍を拒絶したマウスと、Standard 7×19 CAR-T 細胞を 1×10^7 個投与して腫瘍を拒絶したマウスの脾臓解析を 182 日目に行った。Swift 7×19 CAR-T 細胞を投与されたマウスにおける残存 T 細胞数は、49 日目に比べて有意に減少しており、Standard 7×19 CAR-T 細胞を投与されたマウスにおける数値とほぼ同等であった(図 5A および 5E)。これらの結果は、長期生存 Swift 7×19 CAR-T 細胞において自律的増殖は観察されなかったことを示している。

６．考察

本研究では固形がんに対するCAR-T療法の治療効果を高め、維持するためにArmored CAR-T 細胞の製造プロセスの改善について検討した。CAR 遺伝子導入後に拡大培養フェーズを経ずに短期培養で作製されたSwift CAR-T細胞はステムセルメモリーおよびセントラルメモリーを含む初期メモリー分画が優位であり、強力な抗腫瘍効果を示した。Swift 7×19 CAR-T細胞は、腫瘍細胞による反復刺激に対して持続的な反応性を示し、固形腫瘍モデルにおいてStandard 7×19 CAR-T細胞よりも有意に優れた治療効果を示した。さらに、Swift 7×19 CAR-T細胞による治療で腫瘍拒絶に成功したマウスでは、長期生存メモリーT 細胞が豊富に保持されており、その後の腫瘍再接種に対する抵抗性が強化されていた。これまでの研究では、サイトカインArmored CAR-T細胞や短期培養によって誘導されるステムセルメモリーT 細胞による抗腫瘍効果の向上が個別に示されていたが、本研究は、短期製造システムがArmored CAR-T細胞の抗腫瘍機能をさらに増強する点でも有用であることを示す新たな知見を提供した。

初期メモリーT 細胞は、その強力な分化・増殖能力で広く知られており、したがって養子細胞療法の有望な供給源と考えられている(23, 31)。本研究では、初期メモリーT細胞が示す強化されたエフェクター機能、つまり強力な細胞傷害性およびIFN-γ分泌の亢進をより明確に実証している。この効果について、2 つのメカニズムが提案される。1) Swift CAR-T細胞は抗原認識後に急速に増殖し、エフェクター細胞へと分化すること、2) 初期メモリー表現型を持つSwift CAR-T細胞は、本質的に強力なエフェクター機能を有していることである。これらの仮説は未確認であり、さらなる検討が必要であるが、構成型プロモーターによって駆動される Swift 7×19 CAR-T 細胞による IL-7 産生は、刺激前(補図 1D)と比較して、腫瘍刺激後(図 4C)に著しく増加し、これらが急速かつ大量に増殖していることを示唆している。一方、xCELLigence システムを用いたリアルタイム細胞毒性アッセイにより、Swift CAR-T細胞は共培養開始時からStandard CAR-T細胞よりも強い細胞傷害活性を示した(図2C)。これは、Swift CAR-T細胞が強い腫瘍溶解活性を発揮する可能性を示唆している。

Swift CAR-T細胞のもう一つの特徴は、Standard CAR-T細胞と比較してCD4/CD8比が高いことである(図 1B)。この点に関して、最近の研究では、持続的な臨床効果に対するCD4陽性CAR-T細胞の重要な寄与が実証されている(34, 35)。CD4陽性CAR-T細胞は、直接的な細胞傷害作用、CD8陽性T細胞、NK細胞、その他の免疫細胞を刺激するサイトカインや表面分子の発現、およびサイトカイン産生による腫瘍微小環境における血管新生阻害など、複数の経路を介して抗腫瘍効果を発揮する可能性がある。特に、CD4陽性CAR-T細胞由来のIFN-γによるアポトーシス促進作用が、抗腫瘍活性において極めて重要な役割を果たすことが報告されている(35)。これと一致して、Swift CAR-T細胞は、Standard CAR-T細胞と比較して15〜20倍高いIFN-γを産生することができた(図2B)。したがって、Swift CAR-T細胞におけるCD4陽性細胞群の増加は、ヘルパー機能だけでなく、腫瘍細胞に対する直接的な作用を通じて、強力な抗腫瘍効果と関連している可能性がある。Swift CAR-T細胞およびStandard CAR-T細胞のいずれにおいても、IL-7/CCL19 遺伝子の発現は IFN-γの産生レベルに影響を与えなかった(図2B)。これは、Swift CAR-T細胞におけるIFN-γ産生の増強が、サイトカイン環境を含む外因的要因ではなく、細胞固有の特性に依存していることを示唆している。

初期記憶T細胞は疲弊に対して抵抗性であると考えられており(24)、この特性は本研究で実施したストレステストでも観察された。3 回目の腫瘍刺激後、Swift Conv. CAR-T細胞は、PD-1およびTIGITの発現増加を伴わずに、反応性の漸進的な低下を示した(図 4A)。これは、反応性の低下がT細胞の疲弊に起因するものではなく、むしろ

利用可能な成長因子の不足に起因することを示唆している。対照的に、Swift 7×19 CAR-T 細胞は、早期メモリーフェノタイプの誘導による疲弊の回避と、成長因子 IL-7 の自律的産生(図 4A-C)の両方によって、強力な腫瘍反応性を維持している。培養期間を短縮することのもう一つの利点は、外因性成長因子への曝露が限定的になることであり、これは対応する受容体の発現を維持するために重要である。これと一致して、Swift 7×19 CAR-T 細胞では、Standard 7×19 CAR-T 細胞と比較して IL-7Rα の発現が高水準に維持されている(図 1B、右)。この受容体発現の維持は、他の内因性および外因性の増殖シグナルにも応用できる可能性がある。

CAR-T 細胞が、特に固形腫瘍において強力かつ長期的な治療効果を達成するためには、細胞溶解/エフェクター機能の向上、腫瘍微小環境における抗腫瘍活性の維持、および十分な記憶応答の生成が求められる。本研究において、Swift 7×19 CAR-T 細胞のみがこれらの要件を満たすことができた。なぜなら、この細胞は強力な細胞傷害活性と IFN-γ 産生(図 2)、ストレステストにおける持続的な増殖と腫瘍傷害(図 4)、および長期生存マウスにおける記憶 T 細胞の増加(図 5)を実証したからである。その結果、3×10^5 個の Swift 7×19 CAR-T 細胞は、in vivo で強力な抗腫瘍効果を示し、1×10^7 個の Standard 7×19 CAR-T 細胞に匹敵する治療成績を達成するとともに、腫瘍再投与に対して強化された耐性を示した。血液悪性腫瘍については、7×19 CAR-T 細胞が、再発または難治性の大細胞型 B 細胞リンパ腫患者において、管理可能な安全性プロファイルで持続的な反応を誘導できることが報告されている(36)。しかし、短期の Swift 培養の適用によって、血液悪性腫瘍における 7×19 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果がさらに向上するかどうかは、まだ解明されていない。この疑問については、今後の研究で検討される可能性がある。

Swift 7×19 CAR-T 細胞は、急速な細胞増殖と強力な細胞傷害活性を示し、免疫調節因子として IL-7 および CCL19 を産生する。CAR-T 療法に伴う典型的な有害事象であるサイトカイン放出症候群(CRS)および免疫エフェクター細胞関連神経毒性症候群(ICANS)の増悪リスクには、十分な注意を払う必要がある。これらの問題への対策として、本研究で使用した Swift 7×19 CAR-T 細胞には HSV-TK 自殺システム(28)が組み込まれており、CAR-T 細胞を枯渇させることで有害事象を制御する手段が確保されている。さらに、2023 年、米国食品医薬品局(FDA)は、BCMA または CD19 を標的とする自家 CAR-T 療法後に T 細胞悪性腫瘍が発生する深刻なリスクを強調する安全性情報(Safety Communication)を発表した(37)。CD19 CAR-T 療法を受けた患者で T 細胞リンパ腫の症例が報告されているが、その後の分析では CAR トランスジーンの組み込みの証拠は認められなかった (38)。Swift 7×19 CAR-T 細胞のように、高い増殖能と長期の持続性を有する遺伝子改変細胞を使用する場合、腫瘍形成のリスクを評価し、T 細胞悪性腫瘍の発症を注意深く監視することが極めて重要である。Swift 7×19 CAR-T 細胞治療後に腫瘍の完全拒絶を達成した長期生存マウスでは、脾臓の T 細胞数は 49 日目の 10 の 7 乗レベルから 182 日目には 10 の 4 乗レベルへと減少し、1000 倍の減少を示した(図 5A および 5E)。重要なことに、異常増殖の兆候は検出されず、これは注入された T 細胞の悪性化を否定するものである。

7. 結語

本研究は、IL-7 および CCL19 を共発現させるための CAR-T 細胞技術と短期培養法を統合することが、固形腫瘍に対する免疫療法として有望な治療戦略であることを示した。今後は、Swift 7×19 CAR-T 細胞の更なる設計最適化を進めるとともに、様々な CAR 構築体や他の Armored システムへの適応拡大を検討する必要がある。さらに、固

形腫瘍を対象とした臨床試験において、その安全性と治療効果を慎重に評価することが重要である。

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、技術支援を頂いた同講座 黒澤 宏美氏、中村 七海氏、大橋 玲子氏、河合 亜紀氏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、ご助言頂いた山口大学医学部大学院医学系研究科病態制御内科学講座 太田 康晴教授に深く感謝申し上げる。

９．参考文献

1. 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. N Engl J Med. 2018;378(5):439-48.
2. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2019;380(1):45-56.
3. Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2018;378(5):449-59.
4. 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. N Engl J Med. 2017;377(26):2531-44.
5. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2019;380(18):1726-37.
6. 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. Lancet. 2020;396(10254):839-52.
7. Munshi NC, Anderson LD, Jr., Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2021;384(8):705-16.
8. 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.
9. Yong CSM, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. Immunol Cell Biol. 2017;95(4):356-63.
10. Hou AJ, Chen LC, Chen YY. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment. Nat Rev Drug Discov. 2021;20(7):531-50.
11. Tyagarajan S, Spencer T, Smith J. Optimizing CAR-T Cell Manufacturing Processes during Pivotal Clinical Trials. Mol Ther Methods Clin Dev. 2020;16:136-44.
12. Cliff ERS, Kelkar AH, Russler-Germain DA, Tessema FA, Raymakers AJN, Feldman WB, et al. High Cost of Chimeric Antigen Receptor T-Cells: Challenges and Solutions. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2023;43:e397912.
13. Ghassemi S, Nunez-Cruz S, O'Connor RS, Fraietta JA, Patel PR, Scholler J, et al. Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. Cancer Immunol Res. 2018;6(9):1100-9.
14. Ravi G, Richard S, Kumar S, Atrash S, Liedtke M, Kaur G, et al. Phase 1 clinical trial

of B-Cell Maturation Antigen (BCMA) NEX-T(R) Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell therapy CC-98633/BMS-986354 in participants with triple-class exposed multiple myeloma. Leukemia. 2025;39(4):816-26.
15. Ghassemi S, Durgin JS, Nunez-Cruz S, Patel J, Leferovich J, Pinzone M, et al. Rapid manufacturing of non-activated potent CAR T cells. Nat Biomed Eng. 2022;6(2):118-28.
16. Yang J, He J, Zhang X, Li J, Wang Z, Zhang Y, et al. Next-day manufacture of a novel anti-CD19 CAR-T therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia: first-in-human clinical study. Blood Cancer J. 2022;12(7):104.
17. Dickinson MJ, Barba P, Jager U, Shah NN, Blaise D, Briones J, et al. A Novel Autologous CAR-T Therapy, YTB323, with Preserved T-cell Stemness Shows Enhanced CAR T-cell Efficacy in Preclinical and Early Clinical Development. Cancer Discov. 2023;13(9):1982-97.
18. Zhang X, Lv X, Song Y. Short-term culture with IL-2 is beneficial for potent memory chimeric antigen receptor T cell production. Biochem Biophys Res Commun. 2018;495(2):1833-8.
19. Tsao ST, Gu M, Xiong Q, Deng Y, Deng T, Fu C, et al. Rapidly Manufactured CAR-T with Conserved Cell Stemness and Distinctive Cytokine-Secreting Profile Shows Improved Anti-Tumor Efficacy. Vaccines (Basel). 2024;12(12).
20. Wang J, Caimi PF. CAR assembly line: Taking CAR T-cell manufacturing to the next level. Best Pract Res Clin Haematol. 2024;37(4):101595.
21. Chen S, Liu D. Rapid manufacturing of CAR-T therapy: strategies and impact. Trends Biotechnol. 2024.
22. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. Leukemia. 2016;30(2):492-500.
23. Deng Q, Han G, Puebla-Osorio N, Ma MCJ, Strati P, Chasen B, et al. Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas. Nat Med. 2020;26(12):1878-87.
24. Arcangeli S, Bove C, Mezzanotte C, Camisa B, Falcone L, Manfredi F, et al. CAR T cell manufacturing from naive/stem memory T lymphocytes enhances antitumor responses while curtailing cytokine release syndrome. J Clin Invest. 2022;132(12).
25. Deng T, Deng Y, Tsao ST, Xiong Q, Yao Y, Liu C, et al. Rapidly-manufactured CD276 CAR-T cells exhibit enhanced persistence and efficacy in pancreatic cancer. J Transl Med. 2024;22(1):633.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. Ohta K, Sakoda Y, Adachi K, Shinozaki T, Nakajima M, Yasuda H, et al. Therapeutic Efficacy of IL7/CCL19-Expressing CAR-T Cells in Intractable Solid Tumor Models of Glioblastoma and Pancreatic Cancer. Cancer Res Commun. 2024;4(9):2514-24.
30. Adachi K, Sakoda Y, Kaisho T, Tamada K. CAR-T cells co-expressing IL-7 and CCL19 promote epitope spreading to enhance antitumor immunity. Cancer Immunol Immunother. 2026;75(3):68.
31. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. Nat Med. 2018;24(5):563-71.
32. 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.
33. Zhou J, Jin L, Wang F, Zhang Y, Liu B, Zhao T. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects. Protein Cell. 2019;10(10):764-9.
34. 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.
35. Boulch M, Cazaux M, Cuffel A, Guerin MV, Garcia Z, Alonso R, et al. Tumor-intrinsic sensitivity to the pro-apoptotic effects of IFN-gamma is a major determinant of CD4(+) CAR T-cell antitumor activity. Nat Cancer. 2023;4(7):968-83.
36. Lei W, Zhao A, Liu H, Yang C, Wei C, Guo S, et al. Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells expressing inducible IL-7 and CCL19 in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma. Cell Discov. 2024;10(1):5.
37. FDA. FDA Investigating Serious Risk of T-cell Malignancy Following BCMA-Directed or CD19-Directed Autologous Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell Immunotherapies. 2023.
38. Ghilardi G, Fraietta JA, Gerson JN, Van Deerlin VM, Morrissette JJD, Caponetti GC, et al. T cell lymphoma and secondary primary malignancy risk after commercial CAR T cell therapy. Nat Med. 2024;30(4):984-9.

１０．図

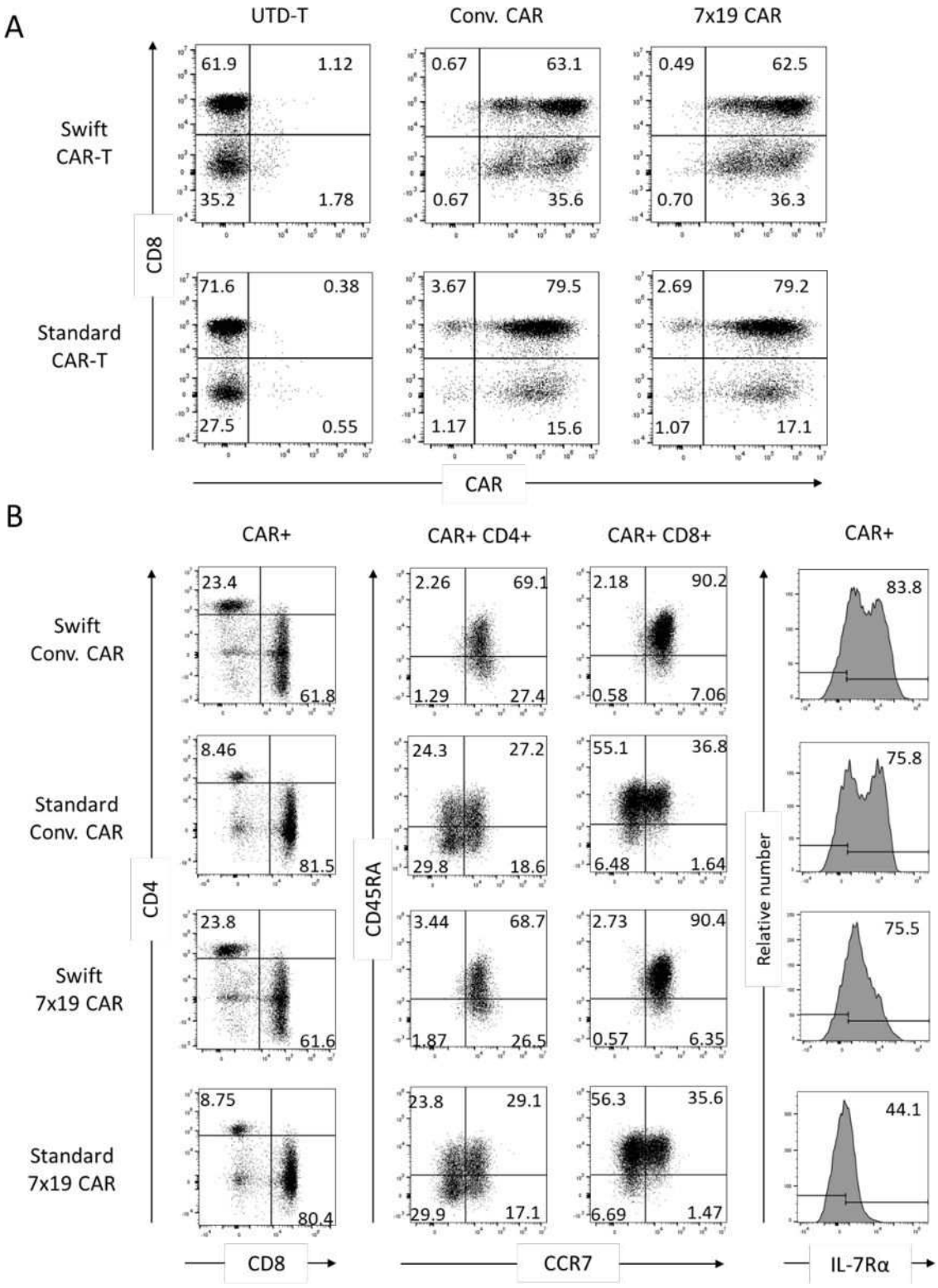

A
UTD-T
Conv. CAR
7x19 CAR
Swift CAR-T
Standard CAR-T
CD8
CAR
61.9
1.12
35.2
1.78
0.67
63.1
0.67
35.6
0.49
62.5
0.70
36.3
71.6
0.38
27.5
0.55
3.67
79.5
1.17
15.6
2.69
79.2
1.07
17.1
B
CAR+
CAR+ CD4+
CAR+ CD8+
CAR+
Swift Conv. CAR
Standard Conv. CAR
Swift 7x19 CAR
Standard 7x19 CAR
CD4
CD45RA
Relative number
CD8
CCR7
IL-7Rα
23.4
61.8
2.26
69.1
1.29
27.4
2.18
90.2
0.58
7.06
83.8
8.46
81.5
24.3
27.2
29.8
18.6
55.1
36.8
6.48
1.64
75.8
23.8
61.6
3.44
68.7
1.87
26.5
2.73
90.4
0.57
6.35
75.5
8.75
80.4
23.8
29.1
29.9
17.1
56.3
35.6
6.69
1.47
44.1

図 1. Swift CAR-T 細胞の表現型解析

(A) Swift または Standard 法により Anti-GM2 Conv. CAR または 7×19 CAR を導入したヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、抗 GM2 CAR 抗体および抗 hCD8 抗体で染色して、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。(B) Swift Conv. CAR-T 細胞、Standard Conv. CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、または Standard 7×19 CAR-T 細胞を、抗 GM2 CAR 抗体、抗 hCD4 抗体、抗 hCD8 抗体、抗 hCD45RA 抗体、抗 hCCR7 抗体、および抗 hIL-7Rα抗体で染色した。CAR+細胞における hCD4、hCD8 の発現(左)、CAR+、hCD4+細胞(左中央)、または CAR+、hCD8+細胞(右中央)における hCD45RA および hCCR7 の発現を示す代表的なフローサイトメトリープロットを示す。CAR+細胞における IL-7Rαの発現を示す代表的なフローサイトメトリーヒストグラム(右)を示す。各象限における細胞の割合を示した。

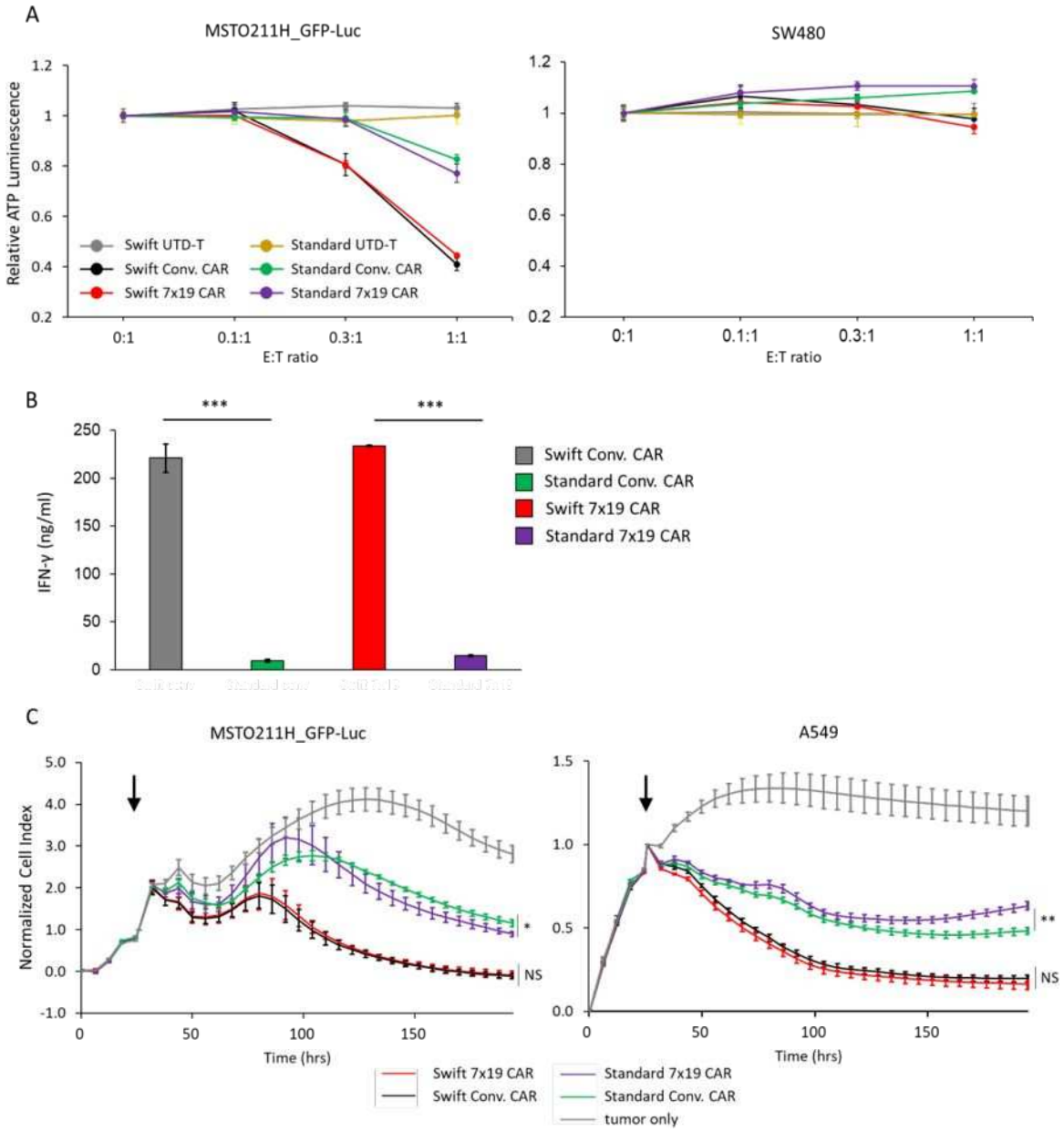


図 2. Swift または Standard 抗 GM2 CAR-T 細胞による in vitro での標的特異的免疫応答

(A)抗 GM2 Swift Conv. CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、または Standard Conv. CAR-T 細胞、Standard 7×19 CAR-T 細胞を、エフェクター対ターゲット(E:T)比 0:1、0.1:1、0.3:1、および 1:1 で、指定された腫瘍細胞と 2 日間共培養した。共培養後の残存腫瘍細胞を ATP アッセイにより分析した。データは 3 回分の測定値の平均±標準偏差(SD)として示す。(B)(A)に記載した通り、MSTO211H_GFP-Luc を用いた共培養上清を回収し、ELISA で IFN-γの濃度を測定した。データは 3 回分の測定値の平均±SD として示す。***P < 0.001。(C)腫瘍細胞株の培養を 0 日目に開始し、図中の下向き矢印で示す通り、1 日目に抗 GM2 CAR-T 細胞を E:T 比 1:5 で添加した。共培養は 8 日目まで維持され、Normalized Cell Index は xCELLigence システムにより評価した。*P < 0.05、**P < 0.01。

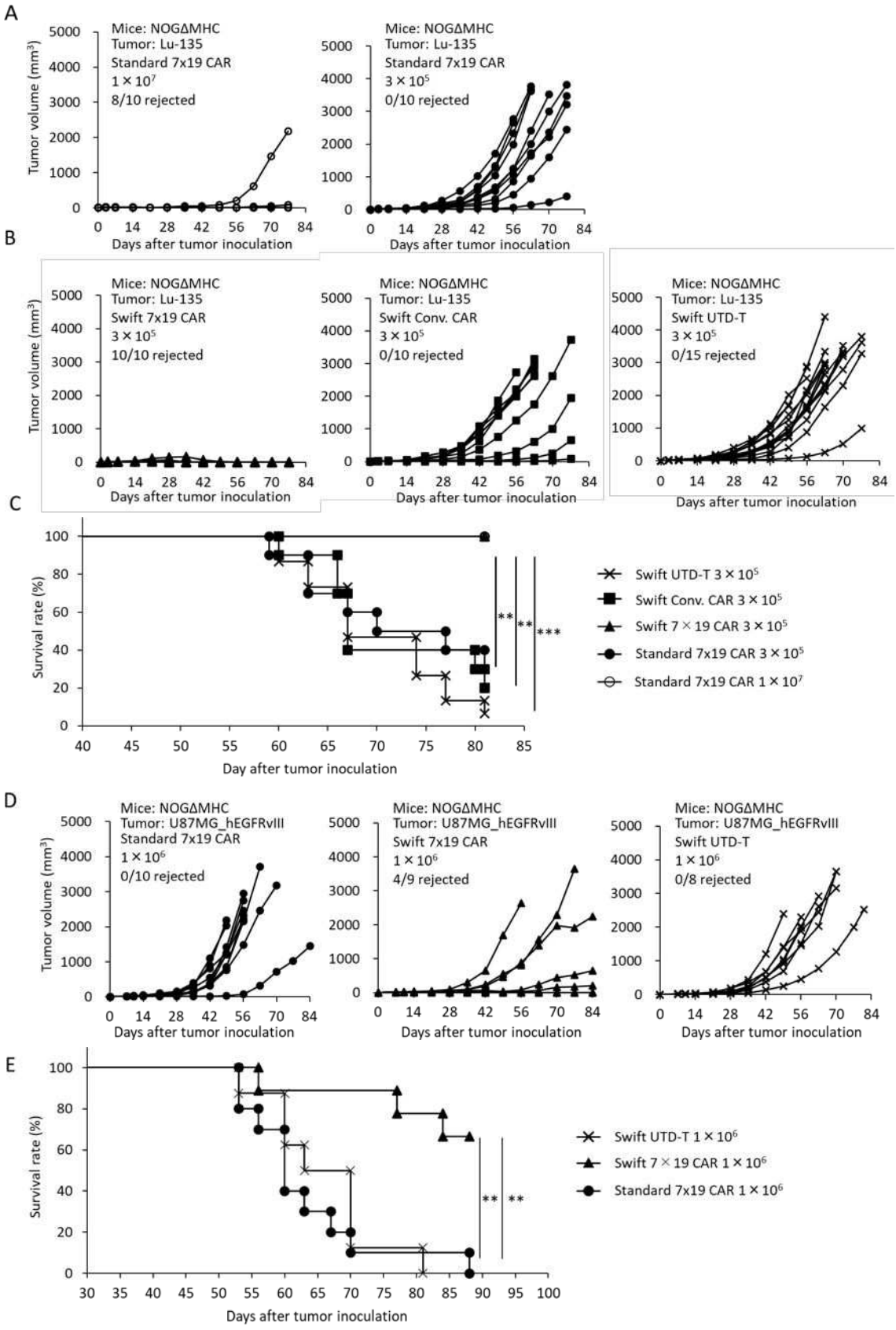

A
Mice: NOGΔMHC
Tumor: Lu-135
Standard 7x19 CAR
1 × 10^7
8/10 rejected
Mice: NOGΔMHC
Tumor: Lu-135
Standard 7x19 CAR
3 × 10^5
0/10 rejected
Tumor volume (mm³)
Days after tumor inoculation
B
Mice: NOGΔMHC
Tumor: Lu-135
Swift 7x19 CAR
3 × 10^5
10/10 rejected
Mice: NOGΔMHC
Tumor: Lu-135
Swift Conv. CAR
3 × 10^5
0/10 rejected
Mice: NOGΔMHC
Tumor: Lu-135
Swift UTD-T
3 × 10^5
0/15 rejected
C
Survival rate (%)
Day after tumor inoculation
**
**
***
Swift UTD-T 3 × 10^5
Swift Conv. CAR 3 × 10^5
Swift 7 × 19 CAR 3 × 10^5
Standard 7x19 CAR 3 × 10^5
Standard 7x19 CAR 1 × 10^7
D
Mice: NOGΔMHC
Tumor: U87MG_hEGFRvIII
Standard 7x19 CAR
1 × 10^6
0/10 rejected
Mice: NOGΔMHC
Tumor: U87MG_hEGFRvIII
Swift 7x19 CAR
1 × 10^6
4/9 rejected
Mice: NOGΔMHC
Tumor: U87MG_hEGFRvIII
Swift UTD-T
1 × 10^6
0/8 rejected
E
Survival rate (%)
Days after tumor inoculation
**
**
Swift UTD-T 1 × 10^6
Swift 7 × 19 CAR 1 × 10^6
Standard 7x19 CAR 1 × 10^6

図 3. マウス腫瘍モデルにおける Swift 7×19 CAR-T 細胞の強力な抗腫瘍効果

(A-C)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 日目に指定された細胞数の Anti-GM2 CAR-T 細胞を静脈内投与した。その後、腫瘍サイズ(A-B)およびマウスの生存率(C)を評価した。治療条件は以下の通りである：(A)Standard 7×19 CAR-T 細胞　左：1×10^{7}個(n=10)右：3×10^{5}個(n=10)。Swift 法で製造された細胞：(B)左：Swift 7×19 CAR-T 細胞 3×10^{5}個(n=10)、中央：Swift Conv. CAR-T 細胞 3×10^{5}(n=10)、右：Swift UTD-T 細胞 3×10^{5}個(n=15)。(A)(B) において、各線は個々のマウスの腫瘍体積を示しており、使用したマウスおよび腫瘍細胞の種類、ならびに 77 日目の腫瘍拒絶マウスの数をグラフ内に示している。(D-E) NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 3.5×10^{5}個の U87MG_hEGFRvIII 腫瘍細胞を皮下接種し、10 日目に 1×10^{6}個の抗 hEGFRvIII CAR-T 細胞を静脈内注射して治療した。その後、腫瘍サイズ(D)およびマウスの生存率(E)を評価した。治療条件は以下の通りである。(D)左：抗 hEGFRvIII Standard 7×19 CAR-T 細胞 1×10^{6}個(n=10)、中央：Swift 7×19 CAR-T 細胞 1×10^{6}個(n=9)、右：Swift UTD-T 細胞 1×10^{6}個(n=8)。(D)において、各線は個々のマウスの腫瘍体積を示しており、使用したマウスおよび腫瘍細胞の種類、ならびに 84 日目の腫瘍拒絶マウスの数をグラフ内に示している。**P < 0.01、***P < 0.001。

Figure 4

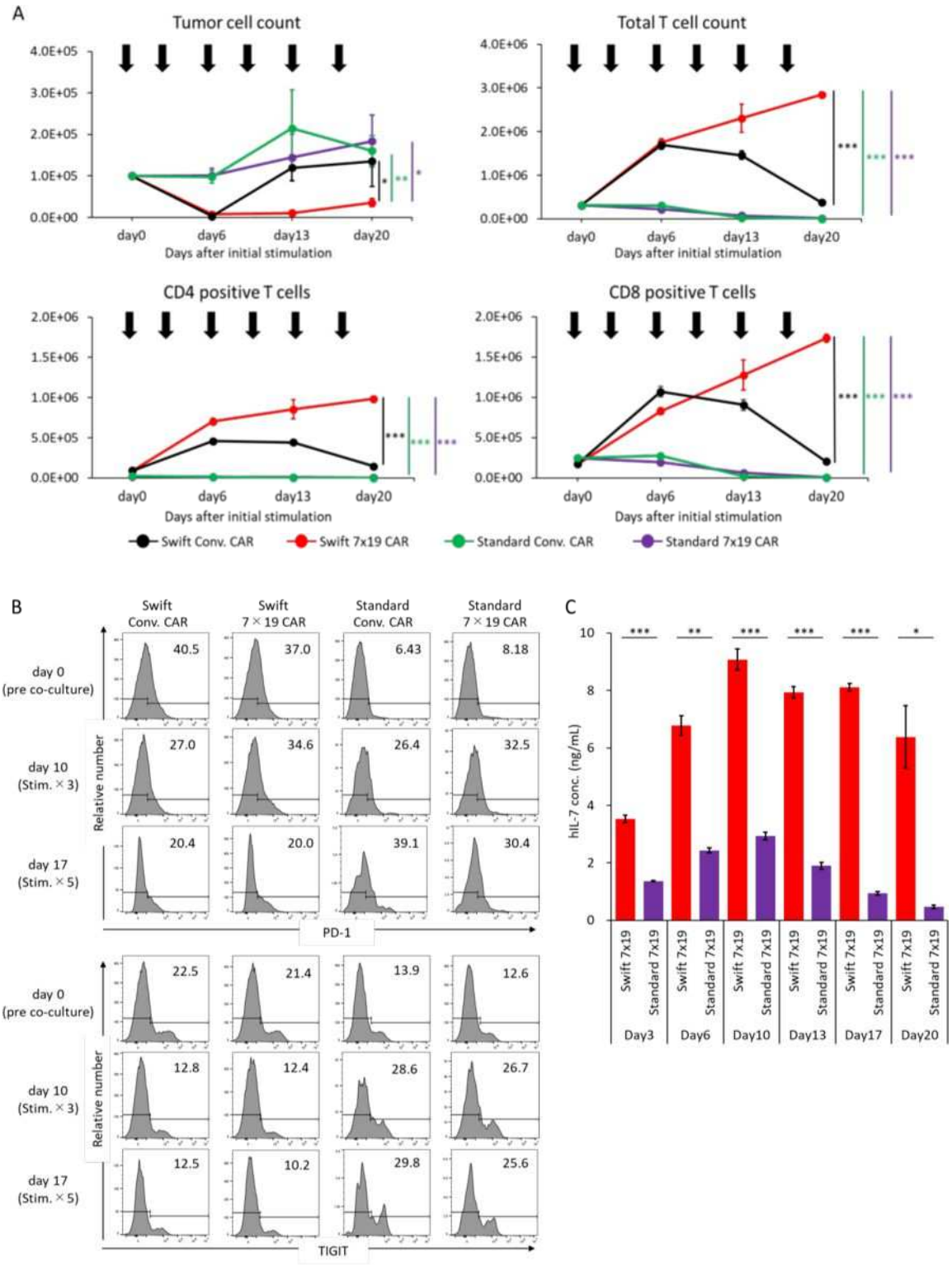

A
Tumor cell count
Total T cell count
CD4 positive T cells
CD8 positive T cells
Days after initial stimulation
day0
day6
day13
day20
Swift Conv. CAR
Swift 7x19 CAR
Standard Conv. CAR
Standard 7x19 CAR
B
Swift Conv. CAR
Swift 7×19 CAR
Standard Conv. CAR
Standard 7×19 CAR
day 0 (pre co-culture)
day 10 (Stim.×3)
day 17 (Stim.×5)
Relative number
PD-1
TIGIT
C
hIL-7 conc. (ng/mL)
Swift 7x19
Standard 7x19
Day3
Day6
Day10
Day13
Day17
Day20

図 4. 反復抗原刺激下における Swift 7×19 CAR-T 細胞の持続的な抗腫瘍効果および細胞増殖能の解析

(A-C)Swift Anti-GM2 Conv. CAR-T 細胞、 Swift 7×19 CAR-T 細胞、Standard Conv. CAR-T 細胞、または Standard 7×19 CAR-T 細胞を、GM2 陽性 MSTO211H_GFP-Luc 細胞による反復刺激条件下で培養した。(A)各ウェルに、0、3、6、10、13、および 17 日目に MSTO211H_GFP-Luc 細胞を添加した(図中の下向き矢印で示す)。腫瘍細胞数(左上)、総 T 細胞数(右上)、CD4 陽性 T 細胞数(左下)、および CD8 陽性 T 細胞数(右下)を 0、6、13、および 20 日目に評価した。各グラフは、3 回分のサンプル平均±標準偏差を示している。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001。(B)0 日、10 日、および 17 日に解析した CAR-T 細胞の PD-1(上)または TIGIT(下)の発現を代表的なフローサイトメトリーヒストグラムで示す。(C)共培養細胞の上清を 3、6、10、13、17、および 20 日目に回収し、ELISA 法により IL-7 濃度を測定した。データは 3 回測定したサンプルの平均±標準偏差として示されている。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001。

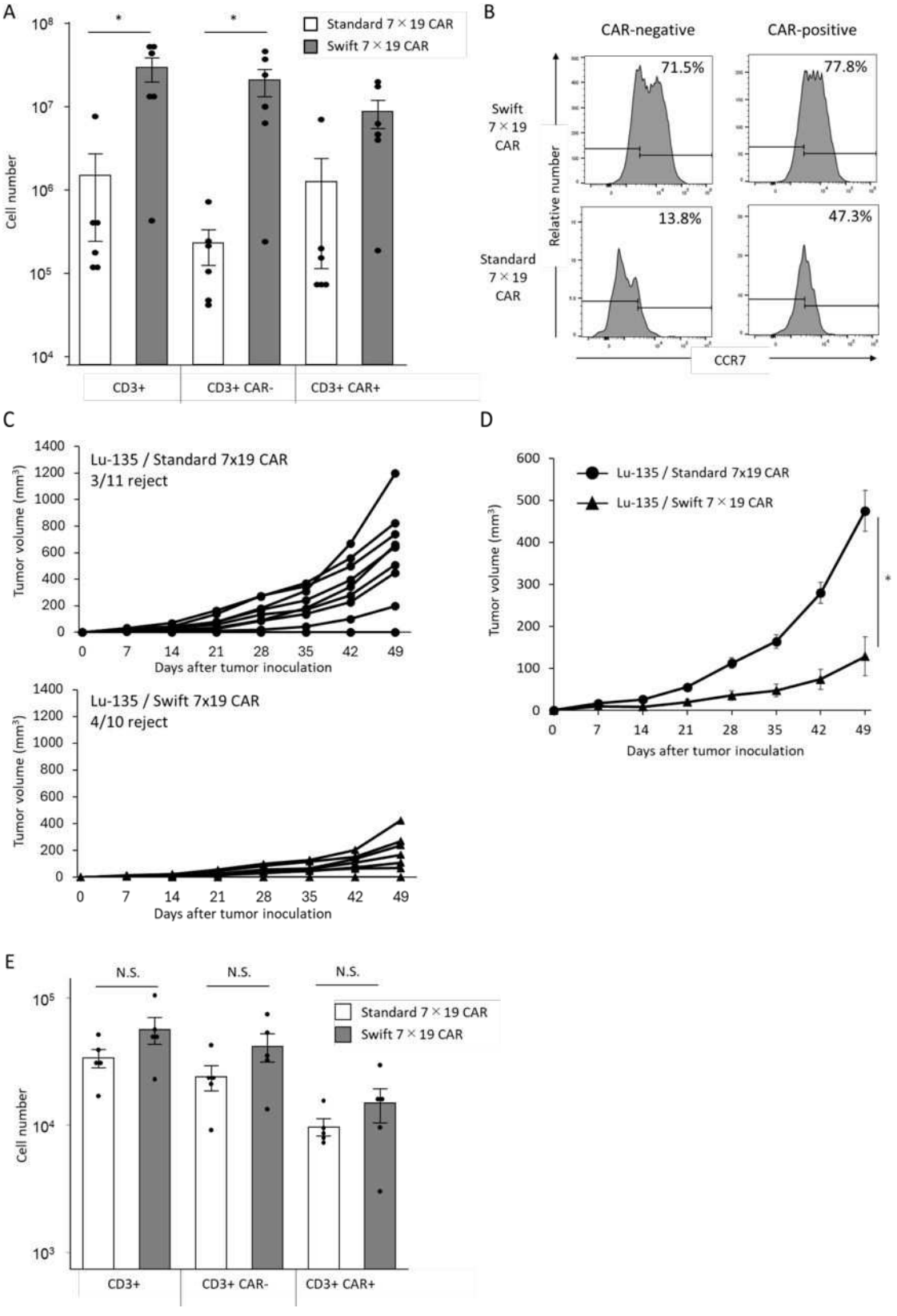
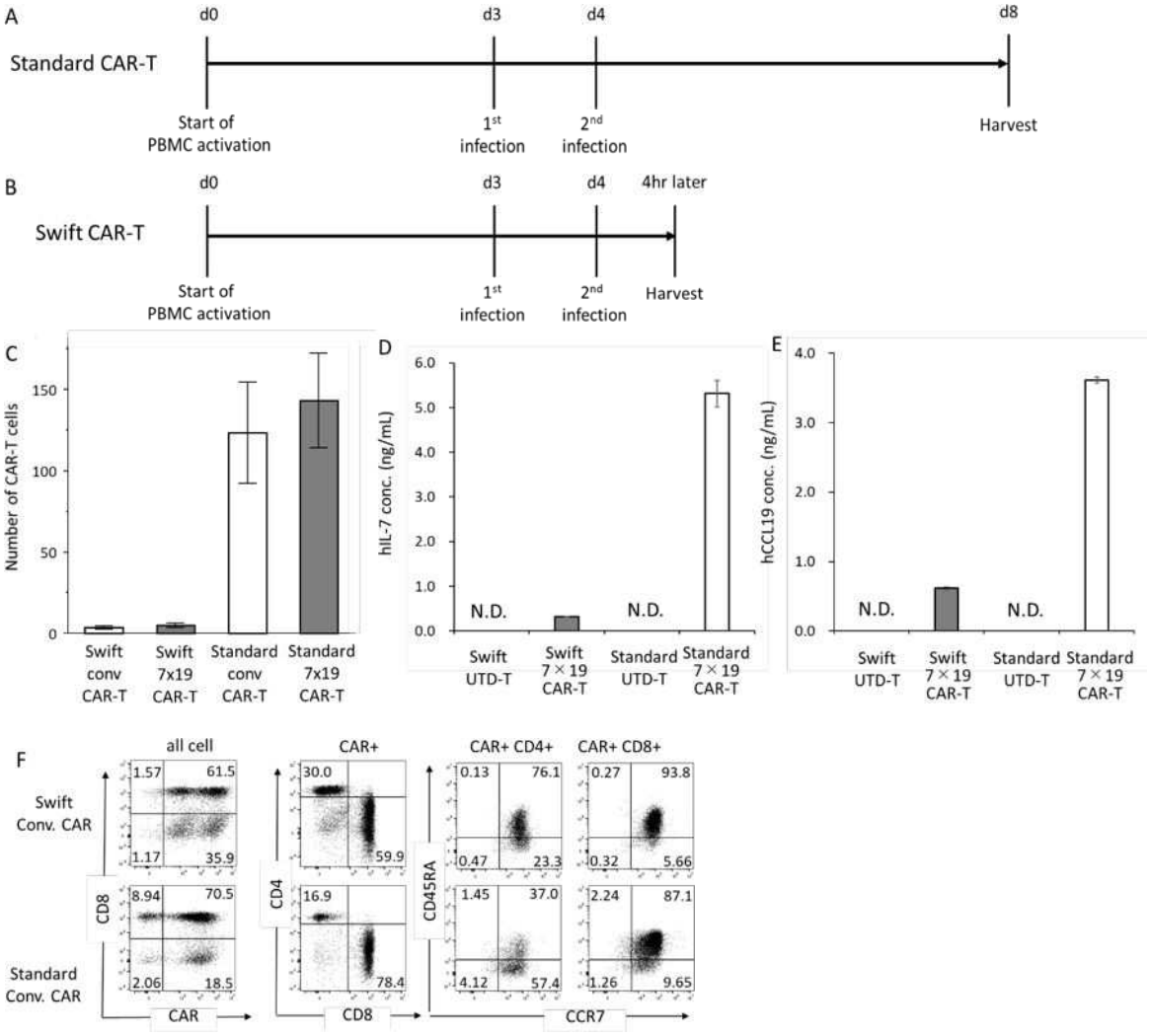

A
Standard 7 × 19 CAR
Swift 7 × 19 CAR
Cell number
CD3+
CD3+ CAR-
CD3+ CAR+
B
CAR-negative
CAR-positive
Swift 7 × 19 CAR
Standard 7 × 19 CAR
71.5%
77.8%
13.8%
47.3%
Relative number
CCR7
C
Lu-135 / Standard 7x19 CAR
3/11 reject
Lu-135 / Swift 7x19 CAR
4/10 reject
Tumor volume (mm³)
Days after tumor inoculation
D
Lu-135 / Standard 7x19 CAR
Lu-135 / Swift 7 × 19 CAR
Tumor volume (mm³)
Days after tumor inoculation
E
N.S.
Standard 7 × 19 CAR
Swift 7 × 19 CAR
Cell number
CD3+
CD3+ CAR-
CD3+ CAR+

図 5. Swift 7×19 CAR-T 細胞による治療による標的特異的長期記憶応答の誘導

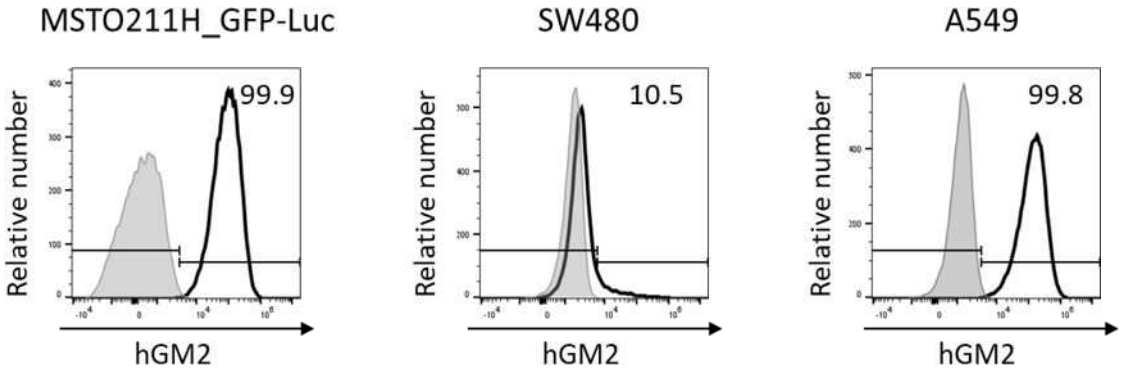
NOG-ΔMHC マウスに対して 0 日目に Lu-135 細胞を 5×10^6個皮下接種した後、3 日目に、抗 GM2 Standard 7×19 CAR-T 細胞を 1×10^7個、または Swift 7×19 CAR-T 細胞を 3×10^5個、静脈内投与した。(A、B)腫瘍が完全に退縮したマウスを 49 日目に安楽死させ、脾臓を摘出した(各群 n=6)。(A)脾臓内の CD3 陽性細胞総数、CD3 陽性/CAR 陰性、および CD3 陽性/CAR 陽性のサブセットの細胞数を分析した。データは平均±標準誤差および個体ごとのプロットとして示している。(B)CD3 陽性/CAR 陰性細胞(左列)および CD3 陽性/CAR 陽性細胞(右列)における CCR7 発現の代表的なフローサイトメトリーヒストグラムを示す。(C、D)腫瘍が完全消失したマウスに対し、60 日目に右側腹部に 5×10^6個の Lu-135 腫瘍細胞、左側腹部に 5×10^6個の SW480 腫瘍細胞を皮下に再投与した(Standard 7×19 CAR-T 細胞群：n=11、 Swift 7×19 CAR-T 細胞群：n=10)。(C)各線は個々のマウスの Lu-135 腫瘍体積を示す。(D)Lu-135 腫瘍体積の平均値を平均±標準誤差(SE)として示す。*P ＜ 0.05。

(E)腫瘍が完全に退縮したマウスの脾臓を 182 日目に摘出し、フローサイトメトリーにより解析した(各群 n=5)。脾臓内の CD3 陽性細胞総数、および CD3 陽性/CAR 陰性、CD3 陽性/CAR 陽性の各サブセットの細胞数を解析した。データは平均±標準誤差および個体ごとのプロットとして示す。N.S.：有意差なし。



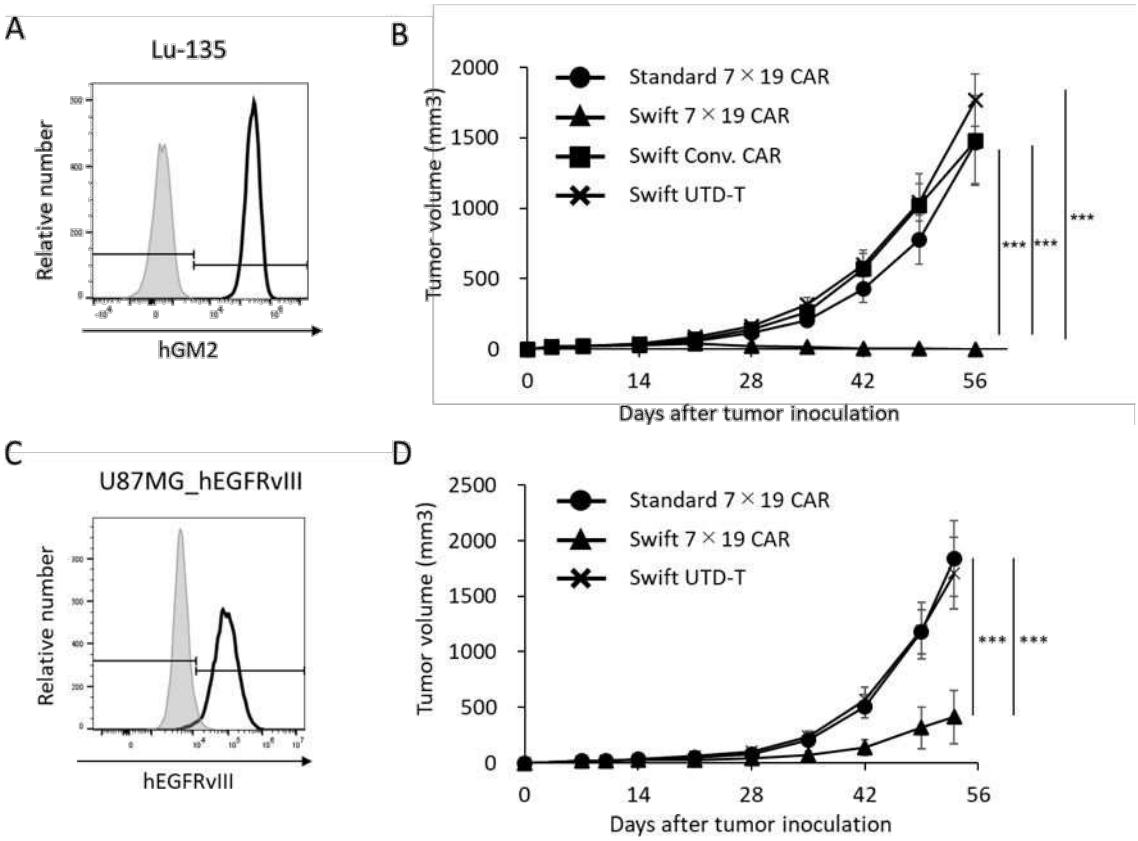
補図 1. Swift CAR-T 細胞の培養法および評価

(A,B) Standard CAR-T 細胞(A)および Swift CAR-T 細胞(B)の製造工程の概略図を示す。(C)1PBMC あたりに生成された CAR-T 細胞数を示す。データは平均±標準偏差を示す。(D, E)Swift UTD-T、Swift 7×19 CAR-T、Standard UTD-T、または Standard 7×19 CAR-T 細胞からの培養上清を製造終了時に回収し、ELISA 法により IL-7(D)および CCL19(E)の濃度を測定した。データは 3 回分のサンプル平均±標準偏差(SD)として示す。N.D.：検出されず。(F)IL-2 の代わりに IL-7 を用いて Swift または Standard 法により Anti-GM2 Conv. CAR を形質導入したヒト PBMC を Anti-GM2 CAR、hCD4、hCD8、hCD45RA、および hCCR7 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。抗 GM2 CAR の発現を示す代表的なデータとして、抗 hCD8 抗体との共発現(左)、CAR 陽性細胞における hCD4 および hCD8(中央)、CAR 陽性 hCD4 陽性細胞または CAR 陽性 hCD8 陽性細胞における hCD45RA および hCCR7(右)を示した。



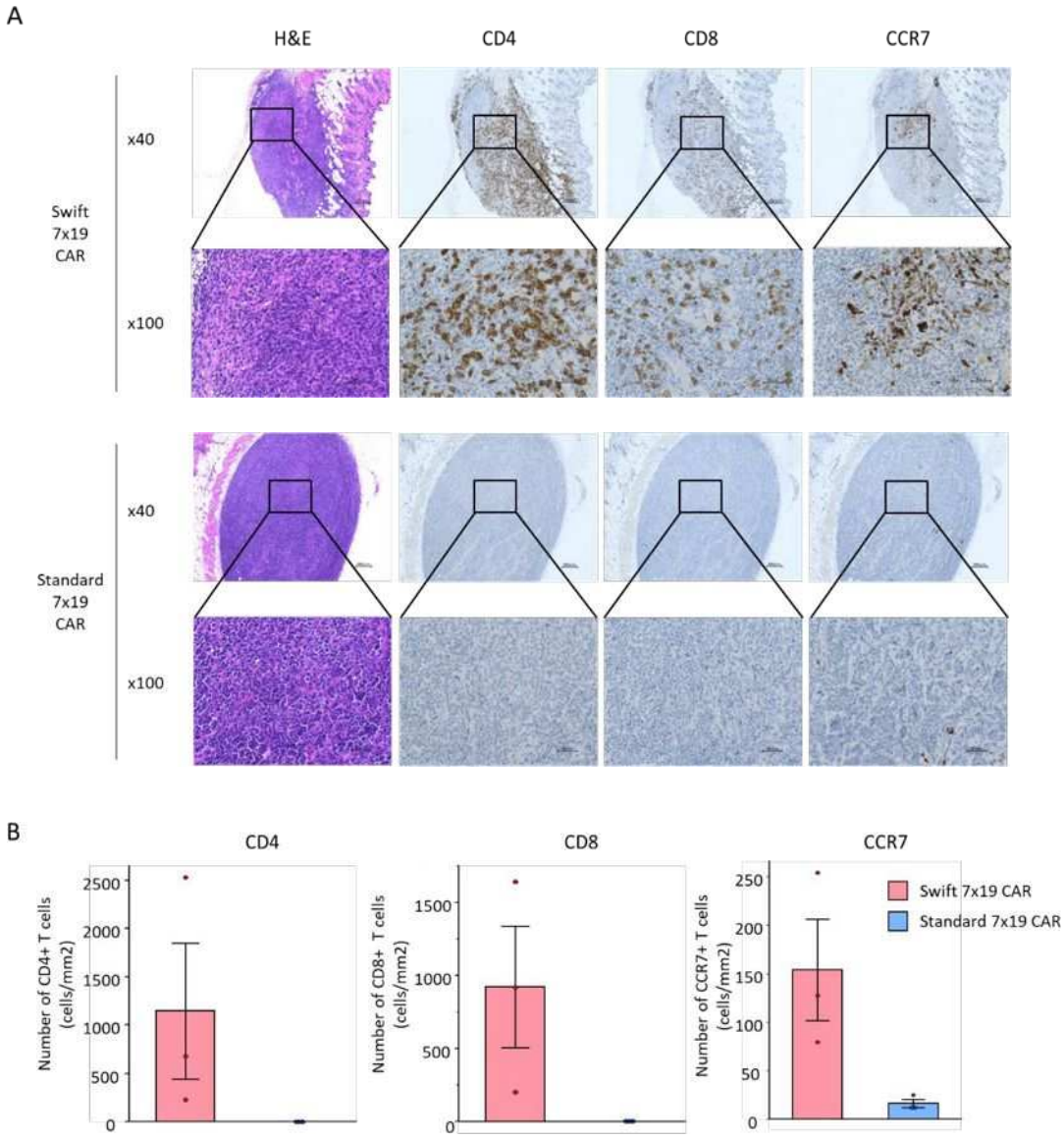
補図 2. 共培養実験に使用した腫瘍細胞株における hGM2 の発現

3 つのヒト固形がん細胞株について、フローサイトメトリーを用いて hGM2 の表面発現を評価した。白抜きおよ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、抗マウス IgG 抗体で染色した結果を示している。



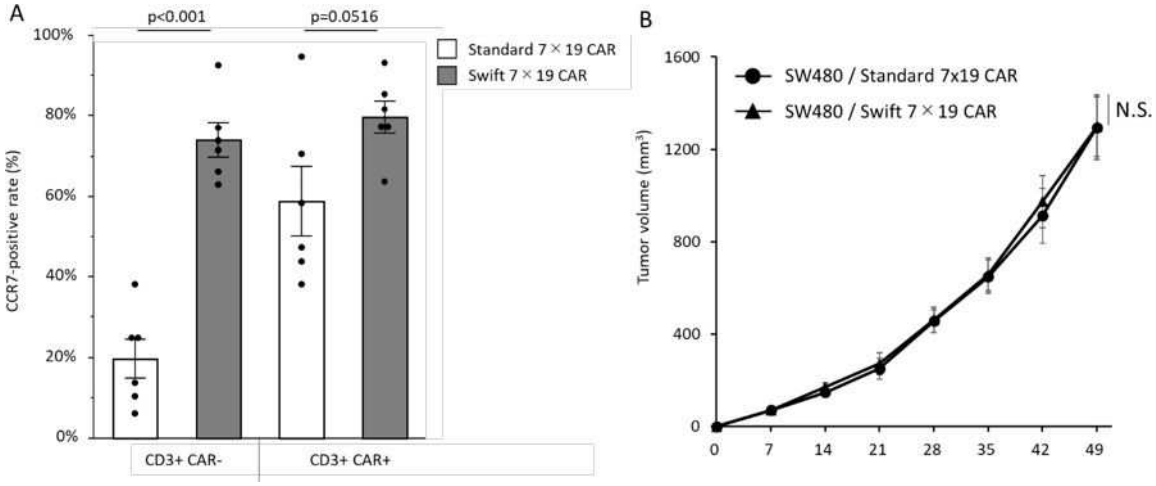
補図 3. Swift CAR-T 細胞の in vivo 実験における治療効果

(A)in vivo 実験に使用した Lu-135 細胞における hGM2 の表面発現を、フローサイトメトリーにより評価した。白抜きおよ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、抗マウス IgG 抗体で染色した結果を示している。(B)NOG-ΔMHC マウスに、0 日目に Lu-135 細胞 5×10^6個を皮下接種し、続いて 3 日目に Standard 7×19 CAR-T 細胞、Swift 7×19 CAR-T 細胞、Swift Conv. CAR-T 細胞、または Swift UTD-T 細胞を各 3×10^5個ずつ静脈内投与した。腫瘍体積は平均±標準誤差(SE)として示す。(C)in vivo 実験に使用した U87MG_hEGFRvIII 細胞における hEGFRvIII の表面発現をフローサイトメトリーにより評価した。白抜きおよび塗りつぶしのヒストグラムはそれぞれ抗 hEGFRvIII 抗体による染色あるいは非染色後に続き、抗マウス IgG 抗体で染色した結果を示している。(D) NOG-ΔMHC マウスに、0 日目に 3.5×10^5個の U87MG_hEGFRvIII 腫瘍細胞を皮下接種し、続いて 10 日目に 1×10^6個の Standard 7×19 CAR-T 細胞、Swift anti-hEGFRvIII 7×19 CAR-T 細胞、または Swift UTD-T 細胞を静脈内投与した。腫瘍体積は平均±標準誤差(SE)で示す。**P ＜ 0.01、***P ＜ 0.001



補図 4. Swift CAR-T 細胞による治療に伴う腫瘍組織への T 細胞の大量浸潤

NOG-ΔMHC マウスに、0 日目に 5×10⁶個の Lu-135 細胞を皮下接種し、続いて 3 日目に 3×10⁵個の抗 GM2 Standard 7×19 CAR-T 細胞または Swift 7×19 CAR-T 細胞を静脈内投与した。15 日目にマウスから腫瘍組織を切除し、各腫瘍組織から FFPE 切片を作成し、H&E 染色および抗ヒト CD4、抗ヒト CD8、抗ヒト CCR7 モノクローナル抗体を用いた IHC 染色により解析した。染色切片を 40 倍および 100 倍の倍率で顕微鏡観察を行った。(A)代表的な画像を示す。スケールバーは長さ 200μm(×40)または 50μm(×100)を示す。(B) 腫瘍領域(mm²)あたりの染色細胞数は、BZ-X アナライザーソフトウェアを用いて算出した。データは平均±標準誤差(各群 n=3)として示す。



補図 5. 長期生存マウスにおける残存 Swift 7×19 CAR-T 細胞の解析

NOG-ΔMHC マウスに対して、0 日目に 5×10⁶個の Lu-135 細胞を皮下接種した後、3 日目に 1×107 個の抗 GM2 Stanadrd 7×19 CAR-T 細胞または 3×10⁵個の Swift 7×19 CAR-T 細胞を静脈内投与した。(A)腫瘍が完全消失したマウスを 49 日目に安楽死させ、脾臓を摘出し、CD3 陽性/CAR 陰性および CD3 陽性/CAR 陽性のサブセットにおける CCR7 陽性細胞の割合を分析した(各群 n=6)。データは平均±標準誤差および個体値プロットとして示されている。P 値が示されている。(B)腫瘍が完全退縮したマウスに対し、60 日目に右側腹部に 5×10⁶個の Lu-135 腫瘍細胞、左側腹部に 5×10⁶個の SW480 腫瘍細胞を皮下に再投与した(Standard 7×19 CAR-T 細胞群：n=11、Swift 7×19 CAR-T 細胞群：n=10)。SW480 腫瘍体積の平均値は平均±標準誤差(SE)として示されている。N.S.：有意差なし。

この学位論文は Kohei Sakai, Yukimi Sakoda, Keishi Adachi, Yasuharu Ohta, Koji Tamada. Short-term manufacturing of IL-7/CCL19-expressing CAR-T cells enhances and prolongs therapeutic effects in solid tumor models. Molecular Cancer Therapeutics. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-25-1389 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。