

## 2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

|           |                                                                    |       |            |     |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|-------|------------|-----|
| 学 校 名     | 藤 田 医 科 大 学                                                        | 研究所名等 | 国際再生医療センター |     |
| 研 究 課 題   | 骨軟部腫瘍細胞と腫瘍微小環境を標的としたCAR-T細胞の開発<br>ー2標的3作用機序を持つiPS応用Off-the-shelf化ー |       | 研 究 分 野    | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①免疫療法、②細胞療法、③がん微小環境、④CAR-T、⑤骨軟部腫瘍、⑥希少がん、⑦iPS                       |       |            |     |

### ○研究代表者

| 氏 名       | 所 属                                | 職 名 | 役 割 分 担  |
|-----------|------------------------------------|-----|----------|
| 三 原 圭 一 朗 | 藤 田 医 科 大 学<br>国 際 再 生 医 療 セ ン タ ー | 教 授 | 研究代表者・総括 |

### ○研究分担者

[illegible]

# 骨軟部腫瘍細胞と腫瘍微小環境を標的とした CAR-T 細胞の開発 － 2 標的 3 作用機序を持つ iPS 応用 Off-the-shelf 化 －

## 1. 研究の目的

キメラ型抗原レセプターT 細胞(CAR-T 細胞)療法は B 細胞に発現する CD19 に対する抗 CD19-CAR-T 細胞療法により再発難治急性 B 細胞リンパ性白血病患者および再発難治 B 細胞性リンパ腫患者に対し、寛解率はそれぞれ 70-90%以上、30-50%以上という画期的な結果をもたらした。しかし、固形がん患者において、CAR-T 細胞療法の効果は限定的である。これは主に以下の原因と考えられている。1) 固形がんにおいて腫瘍微小環境(TME) にはがん関連線維芽細胞(CAF)が極めておおく、血管が乏しく、CAR-T 細胞の腫瘍細胞へのアクセスが限られている。2) TME には制御性 T 細胞(Treg)が非常に多い。3) TME には腫瘍関連マクロファージ(TAM)が極めて多く、これは免疫抑制機能を有する M2 マクロファージであり、一方で抗腫瘍効果を示す M1 マクロファージの数は著減している。近年、この M2 マクロファージを低下させると担癌マウスの生存延長がみられたとの報告もある。さらに、4) CAR の scFv(single chain Fv)はマウス由来であり、患者の持つ免疫によって排除されやすく、CAR-T 細胞が長期に生存できない。また、5) CAR に対する抗原の発現低下がみられ、耐性化しやすく、また、そもそもクローンの数が血液腫瘍よりも多いと考えられている。これに対し、2 つ以上の抗原に対する、dual targeting CAR-T 細胞療法は予後を明らかに改善するとの報告が蓄積されつつある。

以上より、まず、我々は希少癌と考えられる骨軟部腫瘍細胞に発現し、CAF にも発現する Meflin 抗原に着目し、CAR-T 細胞を作成した。予備実験では抗 Meflin-CAR-T 細胞は効果的に骨肉腫細胞、横紋筋肉腫細胞に対し、抗腫瘍効果を示した。次に、我々はマクロファージの SIRP $\alpha$  と結合し、悪性腫瘍細胞に高発現する don' t eat me signal(DEMS)に関与する CD47 に着目した。これまで抗 CD47 抗体はヒトおよびマウスにおいて M2 マクロファージの貪食作用へのシフトのみならず M1 マクロファージの貪食作用の促進などの効果も報告されている。CD47 遺伝子はヒト遺伝子プロファイリングにおいて悪性腫瘍細胞に特に発現が高く、抗 CD47 抗体療法では臨床的に特に固形がん患者の予後を改善したばかりでなく、副作用は許容範囲である。この分子に対し、我々は抗 CD47-CAR-T 細胞(scFv はマウス由来)を作成した。白血病細胞などの CD47 陽性細胞に対し、高効率で腫瘍細胞を障害した。我々はさらに、ヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞(scFv はヒト由来)を作成し、今後抗腫瘍効果を確認予定である。

そこで、CD47 および Meflin の発現が高く、特に再発難治ではさらなる治療に難渋する骨軟部腫瘍患者を対象とし、ヒト由来抗 CD47-抗 Meflin-CAR-T 細胞を開発する。この細胞は CD47 および Meflin を発現する骨軟部腫瘍細胞に対し、直接的な抗腫瘍作用と TME における M2 マクロファージの貪食機能を活性化させ、さらに CAF も抑制するという”dual あるいは triple targeting effect”を期待している。ヒト由来抗 CD47-CAR ベクターは固形腫瘍のバックボーンベクターとしても利用できる可能性があり、さらに同時に off-the-shelf を考えた便宜性の高い killer 活性を有する iPS 由来再生 CTL にこのベクターを挿入することも考えている。

## 2. 研究の計画

### 1) マウス由来およびヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞の作製および解析

CD47 蛋白をマウスに移植し、脾臓を摘出し、ファージライブラリースクリーニングによって得られた重鎖および軽鎖の可変領域の遺伝子情報を基にして作成されたマウス由来抗 CD47-CAR レトロウイルスベクターを作成した。共刺激分子は特許に関与しない CD28 を選択した。このマウス由来抗 CD47-CAR レトロウイルスベクターをヒト T 細胞株(Hut78)に遺伝子導入し、まず、細胞表面にある CAR の発現を定法に従い確認した。Goat-anti-mouse-IgG-APC(PerCP, PE)および抗リンカー抗体-APC にて CAR の発現が細胞表面に確認された。また、このマウス由来抗 CD47-CAR-T 細胞との共培養において CD47 高発現急性リンパ性白血病細胞株(NALM6)に対し、明らかな抗腫瘍効果を確認した。CD47 高発現骨軟部腫瘍細胞株および患者由来腫瘍細胞に対し、マウス由来抗 CD47-CAR-T 細胞との共培養により in vitro でその解析を行う。解析はリアルタイム細胞アナライザー(xCELLigence)で行う。また、ヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞おい

て、CAR の発現は Goat-anti-human-IgG-APC (PerCP, PE) および抗リンカー抗体-APC にて CAR の発現を確認する。さらにマウス由来抗 CD47-CAR-T 細胞と同様に CD47 高発現骨軟部腫瘍細胞株および患者由来腫瘍細胞との共培養による抗腫瘍効果を in vitro にて確認する。患者由来単球/マクロファージの活性化・抗腫瘍効果への影響も重ねて解析を行い、マウス由来抗 CD47-CAR-T 細胞とヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞の比較も行う。

#### 2) 抗 Meflin-CAR-T 細胞の作製および解析

抗 Meflin 抗体を産生するハイブリドーマより得られた重鎖および軽鎖の可変領域の遺伝子情報(共同研究者・榎本より提供)から抗 Meflin-CAR レトロウイルスベクターを作成した。ヒト T 細胞株 Jurkat に遺伝子導入したあと、Goat-anti-mouse-IgG 抗体および抗リンカー抗体にて抗 Meflin-CAR-T 細胞の発現が細胞表面に確認された。また、Meflin 高発現骨軟部腫瘍細胞株(HS-OS-1 骨肉腫細胞株および KYM-1 横紋筋肉腫細胞株)に対し、抗 Meflin-CAR-T 細胞は予備的実験にてこれらの細胞に対し、抗腫瘍効果を示した。以後は、Meflin 高発現骨軟部腫瘍細胞株および患者由来腫瘍細胞を用い、さらにリアルタイム細胞アナライザーを利用し、この CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を in vitro で詳しく解析する。

#### 3) マウス由来/ヒト由来抗 Meflin-CAR-T 細胞およびマウス由来/ヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞の in vivo 解析

luciferase 遺伝子を導入した骨軟部腫瘍細胞株(すでに作成済み)を移植した NOG マウスを用いて、マウス由来/ヒト由来抗 Meflin-CAR-T 細胞およびマウス由来/ヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を in vivo で確認する。

### 3. 研究の成果

#### 1) マウス由来およびヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞の作製および解析

2025 年 4 月までに以下の成果があった。ヒトファージライブラリスクリーニングによってヒト抗 CD47 抗体をクローニングし、ヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞作成した。ヒト由来抗 CD47-CAR の発現は Goat-anti-human-IgG-APC (PerCP, PE) および抗リンカー抗体-APC にて CAR の発現を確認した。CAR 遺伝子導入時の T 細胞刺激時に CD47 を発現し、fratricide により効果が減弱するため、それを避けるために iPS-rCTL 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞を使用し、ヒト由来抗 CD47-CAR-iPS-rCTL 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞を作成し、以後はこれらの細胞を使用した。ヒト由来抗 CD47-CAR-iPS-rCTL 細胞、ヒト由来抗 CD47-CAR- $\gamma\delta$ T 細胞それぞれとの共培養において CD47 を高発現する急性リンパ性白血病細胞株(NALM6)および骨髄腫細胞株(KMM1)に対し、明らかな抗腫瘍効果を確認した。また、急性骨髄性白血病細胞株でも同様に抗腫瘍効果を認めた。

#### 2) 抗 Meflin-CAR-T 細胞の作製および解析

2025 年 4 月までに以下の成果があった。ヒト抗 Meflin 抗体をヒトファージライブラリスクリーニングによってクローニングし、得られた重鎖および軽鎖の可変領域の遺伝子情報を基にしてヒト由来抗 Meflin-CAR-T 細胞を 3 種類(low, middle, high affinity)作成した。ヒト由来抗 Meflin-CAR-T 細胞と骨軟部腫瘍細胞株の共培養系を用いてリアルタイム細胞アナライザーにより骨肉腫細胞株(HS-OS1)および横紋筋肉腫細胞株(KYM)に対する抗腫瘍効果を確認した(middle および high affinity)。

#### 3) マウス由来/ヒト由来抗 Meflin-CAR-T 細胞およびマウス由来/ヒト由来抗 CD47-CAR-T 細胞の in vivo 解析

ヒト由来抗 CD47-CAR- $\gamma\delta$ T 細胞は KMM1-Luc 細胞を移植した xenograft マウスモデルにおいて明らかな抗腫瘍効果を示し、副作用・副反応はほとんど発生しなかった。

### 4. 研究の反省・考察

ヒト由来 CD47-CAR-rCTL 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞は効果的に急性リンパ性白血病細胞および骨髄腫細胞に対し、明らかな抗腫瘍効果を示した。昨年、抗 CD47 抗体である magrolimab がマクロファージを強く活性化し、CAR-T 細胞を含む T 細胞を貪食することが報告された。それは magrolimab のもつ Fc がマクロファージを活性化することによって起こったものであり、抑制

性の Fc をもつ evorpacept ではそのような貪食作用は見られず、第 2 相試験までにおいて明らかな副作用・副反応は見られず、有効性も示された。つまり、CD47 は明らかに抗腫瘍の標的分子であり、Fc を持たない抗 CD47-CAR-iPS-rCTL および $\gamma\delta$ T 細胞は最適な治療モダリティーと考えられる。また、抗 Meflin-CAR-T 細胞においても腫瘍微小環境を変えると考えられ、膀胱癌細胞（Meflin を持たない）などでも in vivo で研究をすすめる。また、これらの標的に対する dual-CAR- $\gamma\delta$ T 細胞を作成し、POC を確認する。昨年度の進行度は良好であったが、iPS-rCTL 細胞は iPS の質に極めて強く依存し、安定性のある CAR-iPS-rCTL 細胞が作成されなかったことから、安定的な結果を示した $\gamma\delta$ T 細胞を主に使用し、実験をすすめる。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

第50回日本骨髓腫細胞学会 優秀演題に採択

### (3) 出版物

なし