2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

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 －2標的3作用機序を持つiPS応用Off-the-shelf化－	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、⑧他家γδT細胞		

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
三 原　圭 一 朗	藤 田 医 科 大 学 国際再生医療センター	教　　授	研究代表者 総括

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
川　瀬　孝　和	藤 田 医 科 大 学 国際再生医療センター	准 教 授	実験・論文作成
久　保　貴　紀	安 田 女 子 大 学 薬　学　部	准 教 授	実験・データ整理
榎　本　篤	名古屋大学大学院 腫 瘍 病 理 学	教　　授	実験・データ整理
今　井　千　速	富　山　大　学 医 学 部 小 児 科	教　　授	実験・データ整理
服　部　裕　次	藤 田 医 科 大 学 国際再生医療センター	助　　教	実験・データ整理

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

キメラ抗原レセプターT細胞(CAR-T細胞)療法は再発難治B細胞性血液腫瘍患者に対し、寛解率・予後において画期的な結果をもたらした。しかし、固形がん患者ではCAR-T細胞療法の効果は限定的である。これは主に以下の要因が考えられている。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)が極めて多く、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おり、疲弊化が進行する。2) TMEには制御性T細胞(Treg)が非常に多い。3)TMEには免疫抑制機能を有するM2マクロファージが多く、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。4) 抗原認識部位であるCARのscFv(single chain Fv)は通常マウス由来であり、患者の持つ免疫によって排除されやすい。5) CARに対する抗原の発現低下がみられ、耐性化しやすい。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している。また、腫瘍を標的にするばかりでなく、TMEも改善させる必要がある。

以上より、我々は希少癌である骨軟部腫瘍細胞、CAFに共発現するMeflin抗原に着目し、CAR-T細胞を作成した。マウス由来scFv(m)抗Meflin-CAR-T細胞は効果的に骨肉腫細胞、横紋筋肉腫細胞をin vitroで傷害した。さらに、ヒト由来(h)抗Meflin抗体をクローニングし、ヒト由来(h)抗Meflin-CAR-T細胞も作成した。このh抗Meflin-CAR-T細胞は上記腫瘍細胞に対し、m抗Meflin-CAR-T細胞と同等の抗腫瘍効果を示した。次に、マクロファージのSIRPα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。抗CD47抗体はヒトおよびマウスのM2マクロファージの細胞数の低下・M1様マクロファージへのシフトによる貪食作用の促進などの効果が報告されている。CD47は悪性腫瘍細胞に発現が高く、抗CD47抗体療法は固形がん患者の予後を改善したばかりでなく、副作用は許容範囲内である。我々はm抗CD47-CAR-T細胞およびh抗CD47-CAR-T細胞を作成し、白血病細胞・骨髄腫細胞に対しin vitroおよびin vivoで抗腫瘍効果を確認した。

off-the-shelf化というコンセプトに従い、killer活性を有するiPS由来再生CTL(iPS-rCTL)にCARベクター(抗CD38-CARおよび抗CD19-CAR)を導入し、抗腫瘍効果を検討した。CAR-iPS-rCTLの抗腫瘍効果は概して不安定であり、iPS使用における高額な使用料等も考慮し、iPS-rCTL以外のエフェクター細胞としてγδT細胞の使用を検討した。iPS-rCTLを使用する場合、MHC拘束性細胞障害を示すため、MHCを一致させるか、TRAC遺伝子(T Cell Receptor Alpha Constant)およびCD52をノックアウトする必要があるが、γδT細胞はMHC非拘束性細胞障害を示し、疲弊化にきわめて抵抗性である。しかし、γδT細胞は末梢血では非常に少ない分画であるため、増殖により十分な量を確保できるかが問題となる。そこで、γδT細胞をin vitroで増殖可能かどうか検討した。末梢血50mlから大人複数人分以上に相当するγδT細胞の増殖培養に成功し、しかもγδT細胞は同じCARを有するiPS-rCTLよりも高い抗腫瘍効果を安定的に認めた。さらに2025年7月4日、骨髄腫細胞株に対しh抗CD47-CAR-γδT細胞はin vivoにおいて明らかな抗腫瘍効果を示した。

この研究ではCD47/Meflinの発現が高く、再発難治で予後不良な希少がん・骨軟部腫瘍を対象とし、h抗CD47-h抗Meflin-dual targeting CAR-γδT細胞を開発する。この細胞は骨軟部腫瘍細胞に対し、直接的な抗腫瘍作用とM2マクロファージの数の低下および貪食機能を活性化させ、さらにCAFも抑制するという間接効果を有す”dual targeting triple effect”が期待できる。scFvを含めヒト由来であるためoff-the-shelfを考えた便宜性の高い投与が可能となり、価格の低減化も期待できる。

2. 研究の計画

前年度においてoff-the-shelf化というコンセプトに従い、iPS-rCTLにCARベクター(抗CD38-CARおよび抗CD19-CAR)を導入し、抗腫瘍効果を検討した。CAR-iPS-rCTL細胞の抗腫瘍効果は概して不安定であり、iPS-rCTL以外のエフェクター細胞を使用することとし、γδT細胞の使用を検討した。まず、γδT細胞は末梢血では非常に少ない分画であるため、γδT細

胞を in vitro で増殖可能かどうか検討した。末梢血 50ml から大人複数人分以上(2.5～5x108x 複数人分(3～5 人))に相当するγδT 細胞の増殖培養に成功し、しかもγδT 細胞は同じ CAR を有する iPS-rCTL よりも高い抗腫瘍効果を安定的に認めた。

h 抗 CD47-CAR-γδT 細胞、h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞の抗腫瘍効果を確認したため、h 抗 CD47-h 抗 Meflin-dual targeting CAR ウイルスベクターを作成し、γδT 細胞に遺伝子導入する。dual-targeting CAR の発現を確認するには、抗 CD47-CAR の scFv はλ light chain 由来であり、抗 Meflin-CAR の scFv はκ light chain 由来であるため、λおよびκの抗体で検出できる。CD47 および Meflin 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て h 抗 CD47-h 抗 Meflin-dual targeting CAR-γδT 細胞の抗腫瘍効果を in vitro にて解析する。また、患者由来単球/マクロファージの活性化・抗腫瘍効果への評価も重ねて解析を行う。

3. 研究の成果

まず、h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞は 2 種類の骨肉腫細胞株(Meflin 陽性)、1 種類の横紋筋肉腫細胞株(Meflin 陽性)に対し、in vitro で顕著な抗腫瘍効果を発揮した（xCELLigence を使用した)。そこで、in vivo において HS-OS1(骨肉腫細胞株)を移植した xenografted model を作成し、in vivo imaging で抗腫瘍効果を検討した。In vivo imaging において腫瘍増殖をほぼ完全に抑制した。しかし、マウスにおいて下痢により、マウスが衰弱し、死亡した。今度は腫瘍を移植しない NOG マウスにおいても同様に下痢が認められた。これらのことから h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞における off-target 効果により起こった副作用と考えられた。小腸にも Meflin がわずかに発現が認められたことから、Meflin に対して low affinity の別のクローンを使った h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞を作成、使用し、in vitro 実験を同様に行った。抗腫瘍効果は前回使用した high affinity h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞の抗腫瘍効果とほぼ同等であった（むしろ、強い傾向)。次に、in vivo において NOG マウス（腫瘍細胞を移植していない）で low affinity h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞の off-target 効果を確認した。マウスは下痢などを全く起こさず､副作用･副反応は全く見られなかった｡low affinity h 抗 Meflin-CAR-γδT 細胞を使用し、HS-OS1 細胞を移植した xenografted マウスで実験を行っている。予備的結果であるが、抗腫瘍効果が認められ、副作用も全く認められていない。

h 抗 CD47-CAR-γδT 細胞の抗腫瘍効果を in vitro で確認したことから悪性腫瘍細胞移植 xenografted マウスでその効果を in vivo imaging で解析した。ところが、抗腫瘍効果は極めて弱く、マウス生存には影響を与えなかった。h 抗 CD47-CAR-γδT 細胞が認識する epitope と違う部位を認識する別の h 抗 CD47-CAR-γδT 細胞を使用し、解析中である。

4. 研究の反省・考察

In vivo での解析により dual CAR-γδT 細胞を作成することにしていたが、どちらもクローンを変更することになった。しかし、affinity の違いにより効果・副作用が大きく異なることが明らかとなった。別の h 抗 CD47-CAR-γδT 細胞の結果を踏まえ、dual CAR-γδT 細胞を作成する予定である。同時に、この 2 つの CAR を投与した xenografted マウスでも実験を行う予定である。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし