



TITLE:

Improved anti-solid tumor response by humanized anti-podoplanin chimeric antigen receptor transduced human cytotoxic T cells in animal model( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Ishikawa, Akihiro

---

CITATION:

Ishikawa, Akihiro. Improved anti-solid tumor response by humanized anti-podoplanin chimeric antigen receptor transduced human cytotoxic T cells in animal model. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24490>

RIGHT:

京都大学	博士 ( 医学 )	氏名	石川 晃 大
論文題目	<b>Improved anti-solid tumor response by humanized anti-podoplanin chimeric antigen receptor transduced human cytotoxic T cells in animal model</b> (動物モデルにおけるヒト化抗ポドプランニン・キメラ抗原受容体発現ヒト細胞傷害性 T 細胞による固形腫瘍に対する抗腫瘍効果の改善)		
(論文内容の要旨)			
<u>&lt;背景&gt;</u> キメラ抗原受容体(CAR)はモノクローナル抗体由来の一本鎖抗体(scFvFc)の抗原認識部位と CD3z や共刺激分子を内包した受容体であり、CD19 抗原を特異的に認識する CAR を発現した T(CAR-T)細胞は CD19 陽性急性 B リンパ腫に対して優れた治療効果を発揮している。一方で、固形腫瘍においては CAR-T 細胞の治療効果が乏しいのが現状である。CAR-T 細胞による高い治療効果を得るためには患者体内で長期生存を達成することが課題だが、その解決策の一つに CAR 遺伝子に含まれるマウスやラット由来遺伝子配列をヒト化することが挙げられる。 Podoplanin (PDPN)はムチン型糖蛋白質の一種であり、脳腫瘍や骨肉腫など様々な悪性腫瘍に高発現していることから新しい治療標的として有望である。これまで、PDPN を特異的に認識するラットモノクローナル抗体である NZ-1 抗体から CAR が作製されており、NZ-1 CAR を発現した T(NZ-1 CAR-T)細胞はマウスモデルにおいて治療効果があることが報告されている。そこで本研究では治療効果の向上と将来の臨床応用を見据えて、NZ-1 遺伝子配列をヒト化した NZ-27 遺伝子から作製した CAR を発現した T (NZ-27 CAR-T)細胞のマウスモデルにおける抗腫瘍効果を NZ-1 CAR-T 細胞と比較することで NZ-27 CAR の有用性について評価した。			
<u>&lt;結果&gt;</u> PDPN 発現細胞への反応性を認めた NZ-1、NZ-27 抗体由来 scFvFc から作製した CAR 遺伝子をレトロウイルスベクターに挿入し、末梢血 T 細胞にレトロウイルスを用いて感染させ、陽性率 80%程度の CAR-T 細胞の導出に成功した。各 CAR-T 細胞は PDPN 発現細胞に対する細胞傷害活性とサイトカイン産生能を認め、特に NZ-27 CAR-T 細胞は NZ-1 CAR-T 細胞と比較して有意に細胞傷害活性とサイトカイン産生能が向上していた。 次に PDPN 陽性膠芽腫細胞株である LN319 細胞を免疫不全マウスに接種して皮下腫瘍を作製し、各 CAR-T 細胞を投与してその抗腫瘍効果を評価した。NZ-27 CAR-T 細胞投与群では投与後 14 日目において腫瘍内へ T 細胞の浸潤が観察され、腫瘍の増大を抑制したのに対し、NZ-1 CAR-T 細胞投与群では腫瘍内への T 細胞の浸潤が観察されず、腫瘍の増大を認めた。 上述した NZ-27 CAR による抗腫瘍効果向上の原因を探るため、各 CAR 遺伝子に myc タグを付与して活性化時にルシフェラーゼを発現するように遺伝子編集されたヒト急性 T 細胞性白血病細胞由来細胞株である Jurkat 細胞に発現させた。各 CAR 遺伝子の mRNA・タンパク質量は同程度であったのに対し、NZ-27 CAR の方が細胞表面へ多く発現していることを認めた。さらに、各 CAR を発現する Jurkat 細胞と PDPN 発現細胞を共培養した結果、NZ-27 CAR を発現する Jurkat 細胞の方が NZ-1 CAR を発現する Jurkat 細胞と比較して有意にルシフェラーゼの発光量が向上していることが分かり、NZ-27 CAR の方が PDPN 発現細胞に対して有意に活性能を向上させることが示唆された。			

<まとめ・今後の展開>

本研究で作製した NZ-1 CAR をヒト化した NZ-27 CAR は T 細胞表面への発現量が向上し、PDPN 発現細胞に対する抗腫瘍効果向上を示した。CAR を構成する scFv は、相補性決定領域 (CDR) とフレームワーク領域 (FR) を持ち、抗原特異性と安定性を担っている。本報告では NZ-1 CAR の CDR をヒトのコドン配列に最適化し、FR 配列をヒト IgG1 抗体であるトラスツズマブに変更して NZ-27 CAR を作製した。この変更により、NZ-1 および NZ-27 CAR の mRNA 転写量や総タンパク質量は有意な差は観察されなかったが、細胞膜上の CAR の発現量に有意な差が生じた。遺伝子が転写・翻訳された後、細胞内小器官で様々な翻訳後修飾が行われ、タンパク質の機能・局在・安定性が決定されることから、ヒト化による CDR や FR の翻訳後修飾が細胞膜上での発現量の差をもたらしたと推測された。この知見をより解析することによって新しいヒト化 CAR 創出が促進されること、PDPN 発現がん細胞に対する治療効果を向上させた NZ-27 CAR を用いた臨床応用が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

Podoplanin (PDPN)は様々な悪性腫瘍に高発現していることからがん免疫の治療標的として期待されている。PDPN を標的とした治療方法の一つとしてラット由来抗ヒト PDPN 抗体の一本鎖抗体(scFv)の抗原認識部位と CD3z および共刺激分子を内包した受容体であるキメラ抗原受容体(CAR)発現 T (CAR-T)細胞を用いた研究が報告されている。これ迄の知見から、同 CAR 遺伝子に含まれるラット由来遺伝子配列をヒト化することで CAR の免疫原性が低下し、体内での CAR-T 細胞の長期生存につながる事が予想されるが、CAR のヒト化が抗腫瘍効果に与える影響を正確に評価する必要がある。

本研究ではラット由来抗ヒト PDPN 抗体 NZ-1 の遺伝子をヒト化した NZ-27 から CAR を作製して T 細胞に発現させ、PDPN 発現腫瘍に対する抗腫瘍効果を評価した。NZ-27 CAR-T 細胞は NZ-1 CAR-T 細胞と比べ PDPN 発現細胞に対して有意に細胞傷害活性・サイトカイン産生能を向上させ、動物モデルにおける PDPN 発現腫瘍の増大を有意に抑制した。その一因として NZ-27 CAR は NZ-1 CAR と比べ T 細胞膜上への発現量が有意に向上することを見出した。

以上の研究は NZ-27 CAR を発現した T 細胞の抗腫瘍効果向上を通じてヒト化 CAR の治療効果改善の解明に貢献し、悪性腫瘍に多く発現する PDPN に対する有効的な治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 ( 医学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 1 月 13 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降