

主論文の要旨

CAR T Cells Targeting Podoplanin Reduce Orthotopic Glioblastomas in Mouse Brains

ポドプラニンに対する CAR T 細胞はマウス脳への
移植膠芽腫を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：若林 俊彦 教授)

椎名 諭

【緒言】

膠芽腫 (glioblastoma ; GBM) は最も予後の悪い成人の原発性脳腫瘍である。最大限の手術及び放射線化学療法を行っても、5年生存率が10%以下であり、新たな治療法の開発が望まれている。近年、種々の悪性腫瘍において免疫療法が注目されており、膠芽腫に対してもその効果が期待されている。免疫療法の一つにキメラ抗原受容体 (CAR) T細胞療法がある。CARは、癌抗原を特異的に認識する抗体とT細胞受容体の細胞内シグナルのハイブリッドである。CARをT細胞に発現させることにより、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) に依存しない腫瘍特異的細胞障害性T細胞を大量に作製することが可能になる。CARに共刺激分子を組み込むことにより、抗腫瘍効果を増強した、第2、第3世代のCARが報告されている。

膠芽腫に発現するEGFRvIII、HER2、IL13R α 2といった種々の腫瘍抗原に対するCARの報告があるが、膠芽腫は様々な表現型を持っており、新たな腫瘍抗原に対するCARの作製は治療上有利となる。

ポドプラニン(Plodoplatin)は頭頸部、食道、肺、子宮頸部の扁平上皮癌、精巣セミノーマ、悪性中皮腫など多くの悪性腫瘍に発現しており、膠芽腫を含む星細胞系腫瘍においては、悪性度に応じて発現が上昇しており、膠芽腫の標的として適している。

【方法】

膠芽腫の摘出標本79例について、ポドプラニンの発現を免疫染色にて評価した。種々の膠芽腫細胞株におけるポドプラニンの発現をRT-PCR、免疫蛍光染色にて評価した。ポドプラニンに対するモノクローナル抗体NZ-1を基に、CAR遺伝子を人工合成し(NZ-1-CAR)、健常ドナーから得たヒトT細胞に遺伝子導入した(NZ-1-CAR T細胞)。NZ-1-CARのT細胞表面への発現をフローサイトメトリーにて確認した。NZ-1-CAR T細胞の機能をカルセインアッセイ、ELISA、細胞内サイトカイン染色にて評価した。免疫不全マウス(NOGマウス)の脳内にポドプラニン陽性膠芽腫細胞株を移植後、CAR T細胞を尾静脈より全身投与し、腫瘍細胞への分布を評価した。また、非治療群(PBS投与)、mock-CAR T細胞群、NZ-1-CAR T細胞群において、腫瘍サイズをMRIにて経時的に観察し、生存期間の評価を行った。

【結果】

79例の膠芽腫摘出標本に対してポドプラニンの免疫染色を行うと、22例(27.8%)で陽性であった(図1A)。膠芽腫のサブタイプの中で、特に予後の悪いmesenchymalタイプで陽性率が高かった(図1B)。膠芽腫細胞株においてポドプラニンの発現率はばらつきがあり、U87MGでは、ポドプラニン強陽性で今回陽性コントロールとしたLN319の約10%程度であった(図1C)。免疫蛍光染色ではRT-PCRと同様の結果であった(図1D)。

ポドプラニンに対するモノクローナル抗体NZ-1を基に、CAR遺伝子を人工合成し(NZ-1-CAR)(図2A)、T細胞に遺伝子導入した(NZ-1-CAR T細胞)。導入効率は

約 40%であった (図 2B)。

NZ-1-CAR T 細胞の細胞傷害性をカルセインアッセイにて評価したところ、ポドプラニン陽性膠芽腫細胞株である LN319 や U87MG に対して、E/T 比に従って、有意に細胞傷害性が認められた。一方、ポドプラニンをノックアウトした LN319、U87MG では有意差は認められなかった。摘出した膠芽腫を培養した primary cultured GBM (pcGBM) においても細胞傷害性が認められた (図 3A)。NZ-1-CAR T 細胞と LN319、U87MG を共培養することにより、mock-CAR T 細胞に比し、IFN γ の産生量が有意に多く、NZ-1-CAR T 細胞がポドプラニンを特異的に認識していることが示された (図 3B)。NZ-1-CAR T 細胞と LN319、U87MG を共培養すると CD4 陽性 T 細胞は IFN γ 、IL-2 の産生が亢進し、CD107a の発現が上昇した。一方、CD8 陽性 T 細胞は主に TNF α を産生した (図 3C)。

Mock-CAR T 細胞をマウスへ全身投与後 12 日目において、脳腫瘍内部にヒト CD3 陽性細胞は認められなかった。NZ-1-CAR T 細胞群では 22 日後、38 日後において、脳腫瘍内部にヒト CD3 陽性細胞が認められた (図 4B)。それ故、NZ-1-CAR T 細胞は少なくとも 38 日間は脳腫瘍内に分布していることが示された。

NZ-1-CAR T 細胞群では約 60%のマウスで腫瘍の増大が抑制された (図 5B、C)。生存期間の中央値は非治療群、mock-CAR T 細胞群、NZ-1-CAR T 細胞群において、それぞれ 59 日、56.5 日、79 日であった。NZ-1-CAR T 細胞群では有意に生存期間の延長が認められた (図 5D)。

【考察】

今回我々は、ポドプラニンに対する第 3 世代の CAR を作製し、レンチウイルスを用いてヒト T 細胞に発現させることに成功した。この CAR を導入した T 細胞は、*in vitro* においてポドプラニン陽性膠芽腫に対して特異的で、効果的であった。この T 細胞を全身投与することにより、脳内に膠芽腫細胞株を移植したマウスの生存期間が有意に延長した。

本研究及びこれまでの報告にて、膠芽腫の約 30%にポドプラニンが発現していることが示され、中でも特に予後の悪い mesenchymal タイプの膠芽腫で発現が亢進しており、ポドプラニンをターゲットとする CAR T 細胞療法は膠芽腫治療に有望である。

近年、CTLA4 や PD-1 等の免疫チェックポイントをターゲットとした免疫療法が注目されており、抗 PD-1 抗体と CAR の併用療法の報告もある。これら免疫チェックポイント阻害薬と NZ-1-CAR T 細胞との併用療法は新たな治療戦略として期待される。

ポドプラニンはリンパ管内皮細胞や肺胞上皮細胞などの正常細胞にも発現しているため、NZ-1-CAR T 細胞が正常細胞も傷害してしまうという欠点がある。我々は既に癌に発現しているポドプラニンのみを認識する癌特異的モノクローナル抗体 (CasMab) を開発しており、今後この抗体を基にして、正常細胞を傷害しない CAR T 細胞の作製を行う予定である。

【結語】

今回我々は、ポドプラニンに対する CAR を作製し、この CAR を導入した T 細胞は膠芽腫に対して抗腫瘍効果を示した。ポドプラニンを標的とする CAR T 細胞療法は膠芽腫治療に有望であり、新たな治療法の開発が期待される。