

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	村山 雄大
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 1075 号
学位授与の日付	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Effectiveness of 4-1BB-costimulated HER2-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy for synovial sarcoma. (滑膜肉腫に対する HER2 を標的とした CAR-T 細胞療法)
論文審査委員	主査 教授 西條 康夫 副査 教授 片貝 智哉 副査 准教授 渡部 聡

### 博士論文の要旨

#### 【背景】

滑膜肉腫は思春期から若年成人に好発する悪性軟部腫瘍であり、広範切除術により根治を目指す、転移・再発した場合は高率で死亡に至る。

近年、滑膜肉腫に対する免疫治療として、がん精巢抗原 NY-ESO-1 を標的とした T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) -T 療法の研究が行われている。この治療法は臨床試験で一定の効果を挙げているが、TCR-T 細胞は標的認識に HLA を使用するため、TCR と患者の HLA が適合する必要がある。海外で行われた第 I/II 相臨床試験では、120 名の滑膜肉腫患者を対象に HLA-A\*02 および NY-ESO-1 の発現をスクリーニングした結果、対象となりえた陽性患者は 15 名のみであった。さらに我々は以前、滑膜肉腫患者の約 30% で HLA クラス I の発現が欠損または低下していることを報告しており、腫瘍が細胞傷害性 T 細胞からの攻撃を回避するメカニズムの一つであると考えている。このように TCR-T 細胞療法は、HLA 適合患者のみにしか使用できず、さらに腫瘍の免疫逃避によって効果の減弱も考えられるという欠点がある。

これに対して、キメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor : CAR) は HLA を介さずに腫瘍特異抗原を認識する人工受容体である。T 細胞表面に発現した CAR が腫瘍細胞表面の抗原に結合すると、T 細胞活性化シグナルが伝達され、パーフォリン・グランザイム経路により腫瘍細胞がアポトーシスに導かれる。TCR-T 細胞療法は HLA 適合患者のみにしか使用できないのに対して、CAR-T 細胞療法は HLA に拘束されないという利点がある。

ヒト上皮成長因子受容体 2 (Human epidermal growth factor receptor 2 : HER2) は乳癌、胃癌をはじめとして様々な上皮系癌での過剰発現が知られているが、滑膜肉腫の臨床検体においても 20~50% で陽性となることが過去に報告されている。我々は滑膜肉腫において HER2 が有効な標的抗原となりうると考え、in vitro で HER2 を標的とした CAR-T 細胞療法の滑膜肉腫に対する効果を検討した。

#### 【方法】

滑膜肉腫の原因となる融合遺伝子 SS18-SSX1/2 を持つ 3 種類の滑膜肉腫細胞株 SY0-1、HS-SY-II、Yamato-

SS を対象とし、細胞表面を PE anti-human HER2 antibody で染色して HER2 蛋白発現をフローサイトメトリーで調査した。

HER2 CAR の構造は抗原結合部位である単鎖抗体「FRP5」、ヒンジ・膜貫通部位「CD8 $\alpha$ 」、共刺激因子「4-1BB」 T 細胞受容体シグナル「CD3 $\zeta$ 」と設計し、これらの DNA 断片を SOE PCR 法で結合して新規 HER2 CAR 遺伝子を作成した。健康者から採血を行い、CD3 陽性 T 細胞を分離した後、抗 CD3/抗 CD28 抗体ビーズおよび IL-2 で刺激して培養した。レトロウイルスベクターを使用して HER2 CAR 遺伝子を T 細胞へ導入し、HER2 CAR-T 細胞を作成した。遺伝子導入後さらに IL-2 を用いて 2~3 週間ほど HER2 CAR-T 細胞を培養してから、滑膜肉腫細胞株と共培養し、特異的反応と抗腫瘍効果を測定した。

#### 【結果】

フローサイトメトリーの結果、すべての滑膜肉腫細胞株において細胞表面の HER2 蛋白は高発現していた。我々が作成した新規 CAR 遺伝子を導入した HER2 CAR-T 細胞は増殖能、CAR 発現ともに CD19 CAR-T 細胞 (B 細胞性白血病/リンパ腫の治療薬：一般名「Tisagenlecleucel」) と比較して遜色ないことを確認した。

Cytokine secretion assay において、HER2 CAR-T 細胞はコントロール細胞 (CAR 遺伝子を持たない空レトロウイルスベクターを導入した T 細胞) と比較して有意に高値の IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  を培養液中に分泌することを確認した。

Colorimetric assay において、Mock では抗腫瘍効果は観察されなかったのに対し、HER2 CAR-T 細胞はすべての滑膜肉腫細胞株に対して用量依存性に抗腫瘍効果を発揮した。Real time cell analyzer では HER2 CAR-T 細胞と Mock の抗腫瘍効果の差を経時的変化として観察することができ、また end point において統計学的に有意な増殖抑制がみられた。

#### 【考察】

CD19 を標的とした CAR-T 細胞療法が血液悪性腫瘍の分野で発明・実用化され、日本でも 2019 年から Tisagenlecleucel が使用可能となっている。それに続いて現在では様々な標的抗原を狙い上皮系癌や小児肉腫 (骨肉腫、横紋筋肉腫など) といった固形腫瘍へ CAR-T 細胞を応用することを目指す研究が多く行われている。HER2 を標的とした CAR-T 細胞療法は小児肉腫に対して臨床試験が開始されており、限定的ではあるものの横紋筋肉腫の症例で寛解を示したという報告がある。

過去の文献において HER2 CAR 遺伝子の抗原結合部位に使用される抗 HER2 抗体のクローンは「4D5」「FRP5」「CHA21」という 3 種類のいずれかが使用されている。このうち 4D5 は Trastuzumab と同様であるが、その抗原親和性の高さから正常組織に微量発現する HER2 を攻撃して臓器障害を引き起こした合併症が過去の臨床試験で報告されて以降は避けられており、現在の臨床試験で使用されているものは FRP5 が主流であり、本研究でも FRP5 を使用している。共刺激因子には「CD28」と「4-1BB」の 2 種類があり、白血病に対する CD19 CAR-T 細胞療法の臨床試験からは、CD28 を有する CAR-T 細胞は投与初期の増殖に優れるが短期間で体内から消失するのに対し、4-1BB を有する CAR-T 細胞は初期の増殖速度は遅いが体内で長期間生存できるという違いが報告されている。小児肉腫に対する HER2 CAR-T 細胞療法の臨床試験では CD28 が使用されているが、本研究では Tisagenlecleucel の成功例をもとに 4-1BB を採用した。以上から我々の作成した FRP5/4-1BB CAR は理論的には生体内で安全かつ長期間生存して作用すると考えるが、本研究では CD28 と 4-1BB の比較検討ができていない点、また in vivo での検討を行っていない点は課題である。

その他の limitation として、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法は単一の標的抗原を狙うのみでは不十分である可能性が挙げられる。この点に関しては今後の検討課題であるが、申請者は NK 細胞関連受容体を標的とした CAR-T 細胞の滑膜肉腫に対する有用性をすでに確認しており、HER2 を含む複数抗原を認識できる新たな CAR の開発に取り組む予定である。

本研究は in vitro study であり前述のように limitation も多いが、上皮系癌と比べて研究対象となりに

くい希少疾患の滑膜肉腫に対して CAR-T 細胞療法の効果を検討した世界で初めての報告であり、今後の治療開発につながると考えている。

#### 審査結果の要旨

ヒト上皮成長因子受容体 2 (Human epidermal growth factor receptor 2 : HER2) は乳癌をはじめとして様々な上皮系癌での過剰発現が知られているが、滑膜肉腫においても 20~50%で陽性となる。村山氏は滑膜肉腫において HER2 が有効な標的抗原となりうると考え、in vitro で HER2 を標的とした CAR-T 細胞療法の滑膜肉腫に対する効果を検討した。

HER2 抗原結合部位である単鎖抗体「FRP5」、ヒンジ・膜貫通部位「CD8 $\alpha$ 」、共刺激因子「4-1BB」T 細胞受容体シグナル「CD3 $\zeta$ 」と設計し、新規 HER2 CAR 遺伝子を作成した。健常者から採血を行い、CD3 陽性 T 細胞を分離した後、レトロウイルスベクターを使用して HER2 CAR 遺伝子を T 細胞へ導入し、HER2 CAR-T 細胞を作成した。さらに IL-2 を用いて 2~3 週間ほど HER2 CAR-T 細胞を培養してから、滑膜肉腫細胞株と共培養し、特異的反応と抗腫瘍効果を測定した。

滑膜肉腫細胞 3 株において細胞表面の HER2 蛋白は高発現していた。HER2 CAR-T 細胞はコントロール細胞と比較して有意に高値の IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  を培養液中に分泌することを確認した。また、HER2 CAR-T 細胞はすべての滑膜肉腫細胞株に対して用量依存性に抗腫瘍効果を発揮した。

本研究は、滑膜肉腫に対して、HER2 抗原をターゲットとした CAR-T 細胞が高い抗腫瘍効果を示すことを、初めて証明した。よって、学位論文として十分に価値がある研究であることを認める。