

<特集「がん治療における分子標的：その課題と未来展望」>

小児がんに対する遺伝子改変細胞療法 ：基礎開発から臨床応用までの道程

柳生 茂希*, 家原 知子

京都府立医科大学大学院医学研究科小児科学

Chimeric Antigen Receptor-T Cell Therapy for Pediatric Cancer — From Bench to the Clinical Development

Shigeki Yagyu and Tomoko Iehara

Department of Pediatrics,

Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science

抄 録

遺伝子改変型キメラ抗原受容体T細胞療法（CAR-T療法）の臨床応用は、B細胞性腫瘍の治療戦略を劇的に変えることとなった。現在、骨髄性腫瘍や固形腫瘍への応用が進んでいるものの、その有効性は限定的であり、その基礎的メカニズムの解明と克服に向けて様々な研究が行われている。

本稿では、CAR-T細胞の開発とがんに対する臨床応用の現状について概観するとともに、特に、製造プロセスの開発や分子標的薬との併用療法によるCAR-T細胞の有効性向上に対するわれわれの取り組みについて解説する。

キーワード：CAR-T細胞療法、分子標的薬、ピギーバックトランスポゾン、ステムセルメモリーT細胞。

Abstract

The clinical application of chimeric antigen receptor T cell therapy (CAR-T therapy) has dramatically changed the therapeutic strategy for B-cell tumors and is now being applied to myeloid and solid tumors. Nevertheless, the efficacy of CAR-T cell therapy for myeloid and solid tumors has been limited, and various studies are underway to elucidate and overcome the underlying mechanisms. In this article, we overview the current status of CAR-T cell development and clinical application to cancer, with a particular focus on the development of manufacturing processes and efforts to improve the efficacy of CAR-T cells in combination therapy with molecular-targeted drugs.

Key Words: CAR-T cells, Molecular-targeting drug, *piggyBac* transposon, Stem cell memory-like T cells.

令和4年12月29日受付 令和5年2月8日受理

*連絡先 柳生茂希 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地

shigeky@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.132.02.119

はじめに

遺伝子改変T細胞 (Chimeric Antigen Receptor T cells; CAR-T細胞) は、T細胞がもつT細胞受容体 (T cell receptor; TCR) に対して遺伝子改変を加え、腫瘍細胞の膜表面に発現する腫瘍抗原を、直接的かつ選択的に認識させ抗腫瘍効果を発揮する。CAR-T細胞療法は、再発・難治性B細胞性腫瘍に対して画期的な治療効果が報告されたことから^{1,3)}、一部の製剤はすでに製造販売承認され、難治性B細胞性腫瘍に対するブレイクスルー治療となった。現在、多くの製薬企業によるCAR-T細胞製剤開発競争が行われており、多発性骨髄腫、骨髄性白血病、固形腫瘍に対する臨床開発も進んでいる。一方で、B細胞性腫瘍に対する劇的な治療効果とは異なり、現時点では骨髄性腫瘍や固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の効果は限定的である。そのため、CAR分子の構造改変や製造法の最適化、さらなる遺伝子改変の追加、薬剤との併用療法など、CAR-T細胞療法の効果を向上させる研究開発が行われている。また、最近の研究の成果から、細胞分化の状態やT細胞の形質、免疫疲弊の状態など、治療に用いられるCAR-T細胞の特性が臨床効果に大きく影響すること、また、CAR-T細胞の遺伝子改変法やその後の製造過程がCAR-T細胞の特性に影響を与えうることが明らかになってきており、臨床効果の高い特性を持つCAR-T細胞の製法開発も行われてきた。

本稿では、がんに対するCAR-T細胞開発の現状と臨床応用について、特に、製造プロセスの開発や分子標的薬との併用療法によるCAR-T細胞の有効性向上に対するわれわれの取り組みについて解説する。

CAR-T細胞の活性化がT細胞形質や抗腫瘍効果に与える影響

CAR-T細胞はT細胞を用いた遺伝子改変細胞であるため、CAR-T細胞の機能は、CARたんぱく質の構造や抗原との結合性に加え、T細胞の分化状態、形質、免疫疲弊の程度に大きく依存する。T細胞は、胸腺で分化成熟し、抗原刺激を

受けずに自己増殖する未熟なナイーブT細胞から、抗原刺激を受けて活性化、分化することで、ステムセルメモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞など、分化状態に応じた様々な亜群が存在する。CAR-T細胞においても、抗原刺激の強度やサイトカインによる刺激など、活性化される細胞外環境によりCAR-T細胞の分化の方向性と程度が決定される。また、T細胞と同様、CAR-T細胞も、強く持続的な抗原刺激による活性化を受けることでエフェクター細胞へと分化し、最終的にアポトーシスに至る。

ステムセルメモリーT細胞やセントラルメモリーT細胞は、ケモカインレセプターの一つであるCCR7や接着因子の一つであるCD62L、共刺激因子であるCD28などの発現で特徴づけられており、抗原刺激により速やかに増殖し、その一部はエフェクターメモリー細胞に分化する。エフェクターメモリーT細胞ではCCR7やCD62Lなどの接着因子の発現が低下し、抗原刺激により炎症性サイトカインを産生することで強い抗腫瘍効果を示すが、その後免疫疲弊を生じ、アポトーシスに至る。興味深いことに、患者に投与されるCAR-T細胞の形質や免疫疲弊因子の発現が、CAR-T細胞療法の治療効果を決定する因子として極めて重要であることが明らかになった^{4,5)}。B細胞性慢性リンパ性白血病を対象としたCD19 CAR-T細胞臨床試験での解析では、奏功群と非奏功群で腫瘍細胞の生物学的特性については大きな差異が認められなかったものの、患者より樹立されたCAR-T細胞製剤の形質に大きな違いが認められた⁴⁾。奏功群患者から樹立されたCAR-T細胞製剤では、ステムセルメモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞の割合が多く、免疫疲弊マーカーであるPD-1、Tim-3、LAG3発現がより低く抑えられていたが、非奏功群患者より樹立されたCAR-T細胞では、エフェクター細胞の割合が多く、免疫疲弊マーカーであるPD-1の高発現が認められた⁴⁾。この結果は、CAR-T細胞療法の効果を向上させるためには、よりメモリー機能が高く、疲弊が少ない、質の良いCAR-T細胞を製造する必要がある

ことを示唆している。

CAR-T細胞は、抗原による刺激で活性化され、抗腫瘍効果を発揮するが、CAR-T細胞が過剰に活性化されることで、分化や免疫疲弊が惹起され、持続的な抗腫瘍効果が消失する。CAR-T細胞の活性化には、CARたんぱくと抗原分子の会合とそれに伴うCARたんぱくの凝集によって、CD3と鎖内に3箇所存在する、ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ドメインとその下流のZAP70がリン酸化を受け、Raf/MAPK経路、JNK/p38MAPK経路、NFAT経路など、細胞内シグナル伝達経路が活性化することが必要である。また、これらの細胞内シグナルが過剰に活性化することにより、PD-1に代表される抑制性シグナル受容体の発現を亢進させるが、PD-1受容体が活性化すると、TCR/CD3複合体の下流シグナルであるZAP70の活性化が抑制され、T細胞の細胞傷害活性が低下する免疫疲弊の状態に陥る (図1)。

Feuchtらは、ITAMのリン酸化に関与する配列のうち、細胞膜近傍のITAMを1箇所残し、遠位に存在する2箇所のITAMがリン酸化されないように遺伝子配列を改変したCD19 CAR-T細胞

(1XX CAR-T細胞) について報告している⁶⁾。1XX CAR-T細胞は、従来のCD19 CAR-T細胞と比較して、抗原刺激を受けてもITAMが1箇所しかリン酸化されないため、引き続いて生じるT細胞の活性化能は低下する反面、過剰な活性化が生じないことから免疫疲弊に至らず、持続的な抗腫瘍効果を発揮することが示された。この結果は、CARたんぱくのCD3と鎖の活性化とその下流である細胞内シグナル伝達系を調節することで、CAR-T細胞の細胞傷害活性は保ちつつ、過剰活性化による免疫疲弊を抑制しうる可能性があることを示している。

われわれのグループも、ITAMドメイン改変ではなく、ITAMドメイン活性化の下流であり、T細胞活性化に重要であるRaf/MAPK経路を、MEK阻害剤であるトラメチニブによって抑制することで、CAR-T細胞の過剰活性化とそれに伴う免疫疲弊が抑制でき、持続的な抗腫瘍効果が発揮されることを報告した⁷⁾。小児がんのひとつである神経芽腫に高発現し、抗体療法やCAR-T細胞の標的となる糖脂質であるdisialoganglioside (GD2) 特異的CAR-T細胞 (GD2 CAR-T細胞) をモデルとして、神経芽腫に対するGD2

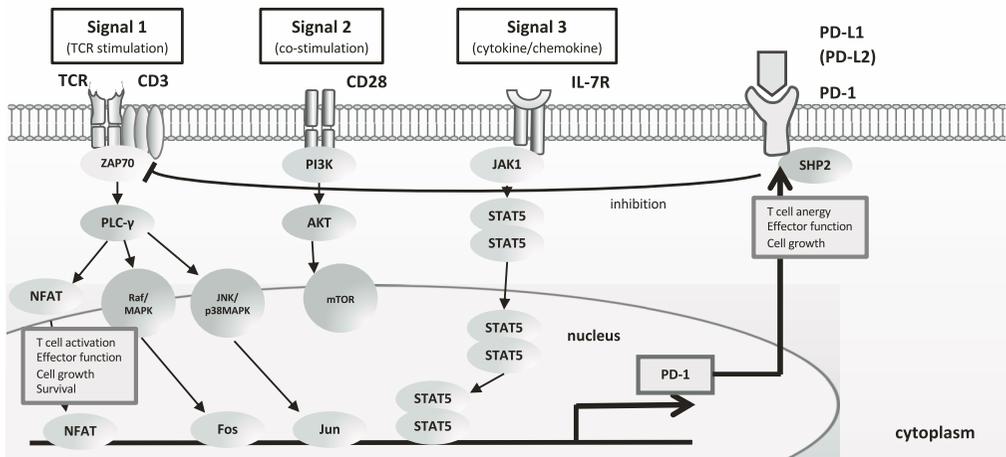


図1 T細胞の活性化にかかわるシグナル伝達経路

T細胞は、抗原刺激によるTCRシグナル (Signal 1) に加え、CD28や4-1BBに代表される共刺激 (Signal 2)、サイトカインシグナル (Signal 3) によって活性化される。TCRに抗原刺激が加わると、ZAP70のリン酸化を契機に、下流のNFAT、Raf/MAPK、JNK/p38MAPK経路などのシグナル伝達経路が活性化することが知られている。

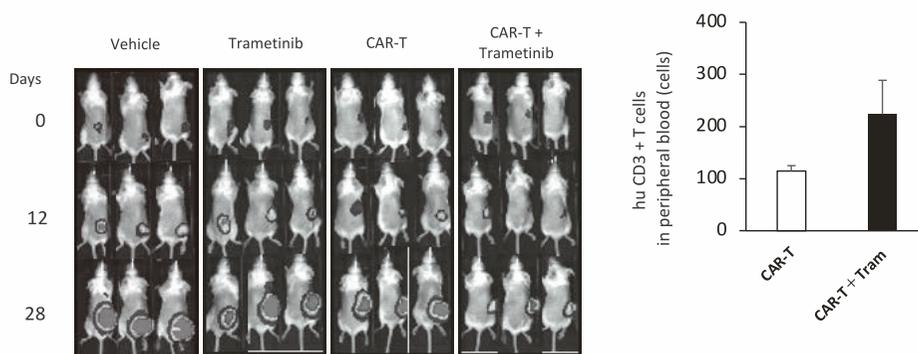
CAR-T細胞とトラメチニブの併用効果について検討を行ったところ、GD2 CAR-T細胞は神経芽腫に対して迅速かつ強力な *in vitro* 抗腫瘍効果を示したが、トラメチニブの併用により、GD2 CAR-T細胞の活性化が抑制され、抗腫瘍効果がコントロールできることが明らかとなった。その結果、PD-1/Tim-3/LAG3など免疫疲弊マーカーの発現も抑制されたが、興味深いことに、トラメチニブ併用下でも、抗原刺激に伴うGD2 CAR-T細胞の増殖活性は抑制されなかった。また、トラメチニブとGD2 CAR-T細胞の併用効果の検証のため、Raf/MAPK経路に変異を持たず、トラメチニブに耐性を示す神経芽腫細胞株SH-SY5Yを免疫不全マウスに接種し、トラメチニブ、GD2 CAR-T細胞、またはこれらの併用で治療を行ったところ、トラメチニブ、GD2 CAR-T細胞併用群で治療効果の増強が認められた(図2)。さらに、トラメチニブ、GD2 CAR-T細胞併用群では、治療後のマウス体内におけるCAR-T細胞のpersistenceが増強していたことから、トラメチニブ併用により、CAR-T細胞の過剰活性化と免疫疲弊が抑制されたことによって、

CAR-T細胞が持続的に抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された⁷⁾。この他にも、CD3ζ分子の下流をSrcキナーゼ阻害剤であるDasatinibで抑制することで、CAR-T細胞の過剰活性化と免疫疲弊をコントロールできるという報告⁸⁾など、分子標的薬を用いることでCAR-T細胞の活性化や形質、免疫疲弊を調整し、抗腫瘍効果の増強を図る研究が相次いでおり、今後、分子標的薬とCAR-T細胞の併用による臨床開発が期待される。

非ウイルス遺伝子改変法による CAR-T細胞製造とT細胞形質

現在臨床応用が進んでいるCAR-T細胞製剤のほとんどは、レトロウイルス、レンチウイルスなどウイルスベクターを用いた遺伝子改変法で製造されている。ウイルスベクターを用いた遺伝子改変法の利点として、高い遺伝子導入効率が見られるが、特にレトロウイルスベクターは分裂期の細胞に遺伝子導入されるため、T細胞に対する遺伝子導入時には、抗CD3抗体などによるT細胞の活性化が必須である。一方で、

SH-SY5Y (Raf/MEK経路変異なし)担がんマウスにおける
トラメチニブとGD2 CAR-T細胞の併用効果



(Tomida A et al. Cancer Sci 2021より図を一部改変)

図2 神経芽腫細胞に対するトラメチニブとGD2 CAR-T細胞の併用効果

Raf/MAPK経路に変異を持たず、トラメチニブ耐性である神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y) 担がん免疫不全マウスに対して、トラメチニブ、GD2 CAR-T細胞を投与したところ、併用群で抗腫瘍効果が増強し、末梢血中のヒトCD3陽性T細胞のpersistenceが増強した。

抗体を用いたT細胞の活性化は、その後のT細胞の分化や免疫疲弊と密接に関わり、CAR-T細胞の最終的な形質に大きく影響する。実際に、レトロウイルスによる遺伝子導入時の抗CD3/CD28抗体によるT細胞活性化によって、CAR-T細胞が分化し、最終産物中のメモリー機能が低下することが報告されている⁹⁾。前述のように、最終産物のメモリーT細胞割合がCAR-T細胞製剤の薬効と密接に関わる⁴⁾ことから、CAR-T細胞の形質を損ねない製造法の開発研究が喫緊の課題となっている。

われわれのグループは、T細胞の過剰活性化を伴わないCAR-T細胞製造法として、ピギーバック (*piggyBac*; PB) トランスポゾンベクターを用いたCAR-T細胞製造に取り組んでいる。トランスポゾンとは、進化の過程で保存されてきた、遺伝子転位を引き起こす短い遺伝子配列の総称である。遺伝子転位酵素 (Transposase; トランスポゼース) の働きにより、遺伝子転位酵素認識配列部位で遺伝子が切り出され、転位を引き起こす。この遺伝子転位機能を用いて、遺伝子改変技術に応用する研究が進められてきた。なかでも、われわれは、昆虫であるイラクサギンウワバから発見されたPBトランスポゾンを用いた遺伝子改変技術に着目し、CAR-T細胞製造への応用を行っている。PBトランスポゾンは、ウイルスベクターと比較して、導入できる遺伝子サイズが大きい、がん原遺伝子内やプロモーター領域に挿入される可能性がレトロウイルスベクターと比較して少ない、ウイルスベクターと比較してその製造が安価かつ簡易である、など、遺伝子改変技術としての利点が多いが、遺伝子導入のためには、エレクトロポレーション法等の技術と組み合わせる必要があり、導入効率はウイルスベクターと比較して高くない、という欠点もある。

PBトランスポゾンベクターは、Inverted Tandem Repeat (ITR) と呼ばれる逆向き反復配列に挟まれる形で、目的遺伝子が挿入されている。また、PBトランスポゾン転位酵素であるPBトランスポゼースは、PBトランスポゾンベクター内のITRを認識し、目的遺伝子の切除と

ゲノムDNAへのTTAA領域への特異的な組み込みを触媒する。WilsonらによってPBトランスポゼースのヒト細胞株における遺伝子転位能が確認されて以来¹⁰⁾、PBを用いたCAR-T細胞製造への応用開発が進んできた。PB法によるCAR-T細胞製造では、まず、目的のCAR遺伝子の両端にITRが組み込まれたPBトランスポゾンベクターと、PBトランスポゼース発現ベクターを、エレクトロポレーション法で標的遺伝子に導入し、その後遺伝子導入細胞を培養、増幅させることで製造される。中沢らは、PBトランスポゾンベクターと野生型PBトランスポゼースを組み合わせることによってCAR-T細胞製造が可能であることを初めて報告したが、その遺伝子導入効率は約20-40%と、ウイルスベクターによるCAR-T細胞製造と比較すると十分ではなく¹¹⁾、長期間の培養やセレクションマーカーによるCAR陽性細胞のセレクションが必要であった。そこで、これらの問題を解決し、CAR遺伝子導入効率を向上させるために、種々の製造工程改良が研究されてきた。

CAR-T細胞製造の際には、エレクトロポレーション法によるCAR遺伝子導入前後に、抗CD3/CD28抗体を用いてT細胞を活性化させ、培養、増幅させることが一般的に行われている。一方で、遺伝子導入時のエレクトロポレーションによる物理的な細胞傷害やDNAプラスミドによる細胞毒性を受けたT細胞においては、抗体刺激による強力なT細胞刺激がActivation-induced cell deathを惹起することが知られている。盛田・西尾らは、PBトランスポゾンによるCAR-T細胞製造効率が低い原因として、遺伝子導入後のT細胞が抗CD3/CD28抗体による強力な刺激を受けることで過剰に活性化し、アポトーシスが惹起される可能性を考慮し、PB法によるCD19 CAR-T細胞製造の際に、抗CD3/CD28抗体によるT細胞刺激の代わりにウイルス抗原でパルスした自己末梢血単核球をフィーダー細胞として共培養することで、CD19 CAR遺伝子発現を著しく高めることに成功した¹²⁾。さらにわれわれは、CAR-T細胞の標的抗原となる膜たんぱく、CD80、CD137L (4-1BBL) が強制発現さ

れた自己末梢血単核球をフィーダー細胞として CAR-T細胞と共培養することで、CD19のみならず HER2, EPHB4, FLT3 など多種多様な標的をもつ CAR-T細胞の製造が可能であることを報告した¹³⁻¹⁶⁾。興味深いことに、PB法を用いて製造された CAR-T細胞製剤は、標的抗原に関わらず、Naïve (T_N)、もしくは Stem cell memory-like (T_{SCM}) と呼ばれる未熟な T細胞分画に富むことが相次いで報告されている^{7),12,17)}。この理由として、われわれは、PB法を用いて非刺激末梢血単核球に CAR 遺伝子を導入した場合、CD45RA陽性 T細胞に優位に遺伝子導入されること、また、その後の培養過程の中で、CAR 遺伝子が導入された CD45RA陽性 T細胞が優位に増殖し、これらがメモリー T細胞としての機能を有することを明らかにしている¹⁶⁾。先述の通り CAR-T細胞における T_N/T_{SCM}分画は、抗原刺激による免疫疲弊や分化による抗腫瘍効果の減弱が生じにくく抗腫瘍効果の持続に重要と考えられており、CAR-T細胞の効果との相関が示唆されているため⁴⁾⁵⁾、PB法による CAR-T細胞の表現型は理想的といえる。

PB法を用いた CAR-T細胞療法の臨床応用

PB法による CD19 CAR-T細胞は、現時点で、日本 (UMIN Clinical Trials registry ID: UMIN 000030984)、中国 (NCT04289220) で第 I 相試験が実施されている。いずれの試験も、製造法や用いている PB トランスポゼースが異なるものの、エレクトロポレーション法による CAR 遺伝子導入が行われ、その後体外で培養、増幅された後に、再発・難治性 B細胞性腫瘍患者に投与され、現時点で用量制限毒性は報告されていない¹⁸⁾。

また、再発・難治性の多発性骨髄腫患者を対象に、PB法を用いて BCMA を標的とする CAR-T細胞の第 I 相試験が実施された (NCT03288493)。Fludarabine, cyclophosphamide によるリンパ球除去療法の後に、90名の患者に対して自家末梢血単核球由来の BCMA CAR-T細胞 (P-BCMA-101) が、単剤、あるいは rituximab や lenalido-

mide との併用で投与された。Rituximab あるいは lenalidomide 併用群においてそれぞれ overall response rate が 73%, 71% であり、用量制限毒性はみられなかったことが報告されている¹⁹⁾。

CD19 CAR-T細胞の高い治療効果を受けて、急性骨髄性白血病 (AML) に対する CAR-T細胞療法の開発も進んできた。AML細胞は B細胞性腫瘍とは異なり、組織型毎に発現抗原が不均一であること、同じ組織型であっても患者毎に発現抗原が不均一であることから、適切な標的抗原の選択が困難である。実際に、Lewis Y, CD33, CD38, NKG2DL, CD123, CLL-1などを標的とした CAR-T細胞製剤が臨床試験で評価され、一定の有効性と安全性が確認された製剤もあるものの、期待されたほどの効果を示す製剤は開発されていない。長谷川・齋藤らは、一部の AML細胞に発現する GMR を標的とする CAR-T細胞の開発について報告している。GMR は CD116 (GMR α 鎖) と CD131 (β γ 鎖) の複合体から構成される GM-CSF の受容体で、顆粒球、単球、マクロファージ、樹状細胞および骨髄球系前駆細胞に発現がみられるが、AML患者の腫瘍検体において 29例中 24例 (83%) に GMR が発現していること、特に FAB 分類 M4~M7 では 13例中 13例 (100%) で GMR の発現が認められることが報告された¹⁷⁾。また、AML細胞では CD116 と CD131 の高次複合体からなる活性型 GMR が発現しているが、CD116 や CD131 に対する一本鎖抗体ではなく、GMR に対する自然リガンド (GM-CSF) を改変して CAR たんぱくの抗原結合領域として応用することで、高次複合体である活性型 GMR と高い結合性を持つ CAR たんぱくを作製することに成功した。これを PB法で非刺激末梢血単核球に導入することで PB GMR CAR-T細胞を作製したところ、GMR 高発現 AML 腫瘍細胞株に対して強力な *in vitro*, *in vivo* 抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった¹⁷⁾。興味深いことに、GMR 結合領域として用いた GM-CSF たんぱくのうち、21番目のアミノ酸をグルタミン酸 (E) から リシン (K) に置換し (E21K)、スパーサー領域に flexible linker (G4S) を用いることで、正常血液細胞への細胞

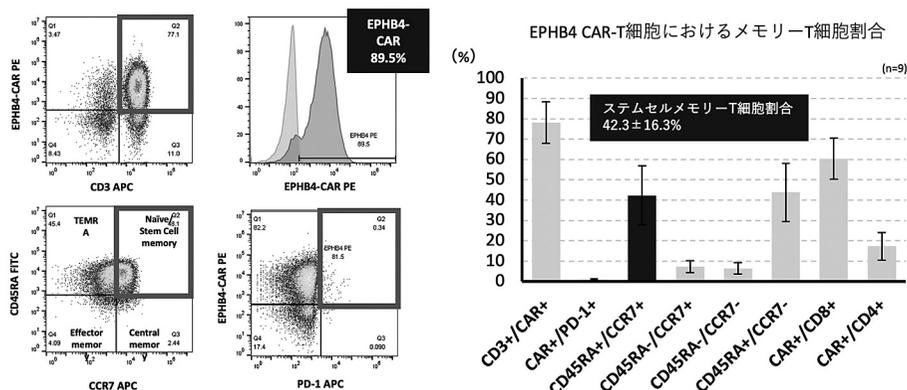
傷害活性を強めることなく、AML細胞への細胞傷害活性が向上することが示されている¹⁷⁾。これらの結果を踏まえ、再発・治療不応性CD116陽性骨髄系腫瘍（主にAMLと若年性骨髄単球性白血病）患者を対象とした、PB GMR CART細胞の安全性・有効性を評価する第I/II相医師主導治験（JRCT2033210029）が実施されており、その結果が待たれる。

固形腫瘍に対する臨床試験としては、再発・難治性非小細胞肺癌患者に対して、PB法を用いたEGFRを標的とするCART細胞の第I相試験の結果が発表された（NCT03182816）。9人の患者が、患者由来末梢血単核球より作製されたCART細胞の投与を受け、重篤な有害事象の報告はなかったものの、その効果は限定的であり、1例の部分奏効が認められたのみであった²⁰⁾。一方で、去勢不応前立腺がん患者に対して、PB法による前立腺特異的膜抗原（PSMA）を標的としたCART細胞療法の第I相試験（NCT04249947）の有望な中間解析結果が発表されている²¹⁾。本試験で用いられたCART細胞も、先述のとおりT_{SCM}分画に富んでいることが報告されており、持続的な抗腫瘍効果が期待されていた。この報告では、CART細胞療法を受けた17例のうち、解析可能であった14例の安全性、有効性について評価された。グレード3以上のサイトカイン放出症候群（CRS）が14%、免疫エフェクター細胞関連神経毒性症候群（ICANS）が7%に認められたが、いずれも回復可能であり、その他の急性期有害事象も許容可能であった。さらに、71%でPSA値の低下を認め、14例中12例にobjective responseを認め、報告時点で1例の完全寛解例を認めたと報告されている²¹⁾。

HER2は固形腫瘍に対するCART細胞療法の治療標的として広く研究が進んでいる。海外では、ウイルスベクターを用いて製造されたHER2特異的CART細胞療法の臨床試験が複数実施されており、高い安全性と、一部寛解例が報告されている。中沢らは、PB法を用いたHER2 CART細胞が、HER2陽性腫瘍担がんマウスの生存を延長することを報告した¹¹⁾。さらにわれわれは、

自己末梢血単核球由来の抗原提示フィーダー細胞を用いることで、PB法によるHER2 CART細胞製造におけるCAR発現率、増殖率が向上すること、T_N/T_{SCM}の分画を豊富に含み、HER2陽性肉腫担がんマウスに対して強力かつ持続的な抗腫瘍効果を示すことを報告した¹⁴⁾。これらの知見を踏まえ、国内で、再発・難治性骨軟部肉腫、婦人科悪性腫瘍患者を対象として、HER2を標的としたPB法によるCART細胞療法の第I相試験が実施中である。

さらにわれわれは、悪性骨軟部腫瘍や乳がん、卵巣がんなど、多くの悪性固形腫瘍に高発現している癌胎児性抗原であるEphrin type-B receptor 4（EPHB4）受容体を特異的に認識し、殺傷するCART細胞を開発している。EPHB4は、7番染色体に位置するEPHB4遺伝子によってコードされる分子量185KDの受容体型チロシンキナーゼである。自然リガンドであるEphrin B2（EFNB2）とともに細胞膜上に発現されるが、主には胎生期の血管形成に関わるとされており、細胞接着や細胞運動を調節する役割を果たすものの²²⁾、一部の臓器を除いては成熟組織にはほとんど発現が見られないか、極めて低いことが報告されている。一方で、EPHB4は免疫組織化学染色法などにより、悪性骨軟部腫瘍、乳がん、卵巣がん、肺がん、前立腺がん、大腸がん等の腫瘍細胞表面上に過剰発現していることが報告されており^{23,30)}、これらががん細胞増殖促進並びにがん細胞の悪化に積極的関与をしていると推定されている。EPHB4は、骨軟部腫瘍、特に横紋筋肉腫ではEPHB4の発現と予後との関連も示唆されており²⁵⁾²⁹⁾、リガンド非依存的な活性化が悪性化と関与していることが報告されていることから、治療のターゲットとなりうる分子と考えられている。われわれは、PB法を用いてEPHB4陽性細胞を特異的に認識し、殺傷することができるCART細胞（PB EPHB4 CART細胞）を作製し、EPHB4陽性の横紋筋肉腫、骨肉腫、乳がん細胞株に対して、強力かつ持続的な抗腫瘍効果を示すことを報告した¹³⁾。PB EPHB4 CART細胞も、PB法を用いたCART細胞の特徴である、T_{SCM}細胞優位かつ持続的な抗原刺激下



(Kubo H et al. Mol Ther Oncolytics 2021より図を一部改変)

図3 PB EPHB4 CAR-T細胞の形質

健康人の末梢血単核球よりPB法で作製したEPHB4 CAR-T細胞の形質を示す。CD45RA/CCR7陽性のT_N/T_{SCM}細胞が優位であるほか、PD-1発現が極めて低値である。

でも免疫疲弊を生じにくいという形質を有していることが明らかとなった(図3)。さらに、EPHB4は非ヒト霊長類やマウスとの相同性が極めて高く、PB EPHB4 CAR-T細胞のCARたんぱくがマウスやカンクイザルEPHB4とも結合性を有することから、マウス、カンクイザルを用いたPB EPHB4 CAR-T細胞の安全性試験結果が報告され、明らかなOn target/Off tumor毒性が見られないことが報告された¹³⁾³¹⁾。これらの結果を踏まえ、再発・難治性のEPHB4陽性悪性固形腫瘍を対象としたPB EPHB4 CAR-T細胞の安全性と有効性を評価する第一相試験が計画中である。

おわりに

CAR-T細胞の開発は、我が国は長く欧米の後塵を拝してきたが、現在は大手製薬企業やバイオベンチャーが競ってCAR-T細胞開発に参入してきており、近い将来、わが国発の新規CAR-T細胞の製品化が期待される。PB法を含めた非ウイルス遺伝子改変CAR-T細胞の開発も、われわれ

れ含む多くの研究者の努力によって、製造効率と品質が飛躍的に向上し、実用化に近づきつつあり、従来のウイルス遺伝子改変CAR-T細胞が抱える問題点を克服しうる新たな細胞製品としての期待が大きい。今後は、複数の細胞ソースを用いた遺伝子改変細胞や、複数の抗原を標的とするdual-targeting CAR-T細胞、さらに、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤との併用など、新規技術を融合させることによって既存の治療法では限界があった難治性がん患者に対しても、効果が期待できる治療法が開発されてくると予想される。B細胞性腫瘍のみならず、骨髄性腫瘍や固形腫瘍に対しても、CAR-T細胞療法がブレイクスルー治療として普及することを期待したい。

柳生茂希は、ブライトパス・バイオ(株)より学術指導契約、AGC Inc.より、共同研究費を受領している。家原知子は、開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Leibold D, Pulsipher MA & Grupp SA. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 378: 439-448, 2018.
- 2) Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, Mcsweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wieszorek J & Go WY. Axicabtagene Ciloleucel CAR-T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 377: 2531-2544, 2017.
- 3) Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, Mehta A, Purev E, Maloney DG, Andreadis C, Sehgal A, Solomon SR, Ghosh N, Albertson TM, Garcia J, Kostic A, Mallaney M, Ogasawara K, Newhall K, Kim Y, Li D & Siddiqi T. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001) : a multicentre seamless design study. *Lancet.* 396: 839-852, 2020.
- 4) Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, Boesteanu AC, Wang Y, O'Connor RS, Hwang W-T, Pequignot E, Ambrose DE, Zhang C, Wilcox N, Bedoya F, Dorfmeier C, Chen F, Tian L, Parakandi H, Gupta M, Young RM, Johnson FB, Kulikovskaya I, Liu L, Xu J, Kassim SH, Davis MM, Levine BL, Frey NV, Siegel DL, Huang AC, Wherry EJ, Bitter H, Brogdon JL, Porter DL, June CH & Melenhorst JJ. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 24: 563-571, 2018.
- 5) Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, Liu H, Creighton CJ, Gee AP, Heslop HE, Rooney CM, Savoldo B & Dotti G. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood.* 123: 3750-3759, 2014.
- 6) Feucht J, Sun J, Eyquem J, Ho YJ, Zhao Z, Leibold J, Dobrin A, Cabriolu A, Hamieh M & Sadelain M. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nat Med.* 25: 82-88, 2019.
- 7) Tomida A, Yagyu S, Nakamura K, Kubo H, Yamashima K, Nakazawa Y, Hosoi H & Iehara T. Inhibition of MEK pathway enhances the antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against neuroblastoma. *Cancer Sci.* 112: 4026-4036, 2021.
- 8) Weber EW, Parker KR, Sotillo E, Lynn RC, Anbunathan H, Lattin J, Good Z, Belk JA, Daniel B, Klysz D, Malipatolla M, Xu P, Bashti M, Heitzeneder S, Labanieh L, Vandris P, Majzner RG, Qi Y, Sandor K, Chen LC, Prabhu S, Gentles AJ, Wandless TJ, Satpathy AT, Chang HY & Mackall CL. Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science.* 372: eaba1786., 2021.
- 9) Kagoya Y, Nakatsugawa M, Ochi T, Cen Y, Guo T, Anczurowski M, Saso K, Butler MO & Hirano N. Transient stimulation expands superior antitumor T cells for adoptive therapy. *JCI Insight.* 2: e89580, 2017.
- 10) Wilson MH, Coates CJ & George AL. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther.* 15: 139-145, 2007.
- 11) Nakazawa Y, Huye LE, Salsman VS, Leen AM, Ahmed N, Rollins L, Dotti G, Gottschalk SM, Wilson MH & Rooney CM. PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther.* 19: 2133-2143, 2011.
- 12) Morita D, Nishio N, Saito S, Tanaka M, Kawashima N, Okuno Y, Suzuki S, Matsuda K, Maeda Y, Wilson MH, Dotti G, Rooney CM, Takahashi Y & Nakazawa Y. Enhanced Expression of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor in piggyBac Transposon-Engineered T Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 8: 131-140, 2018.
- 13) Kubo H, Yagyu S, Nakamura K, Yamashima K, Tomida A, Kikuchi K, Iehara T, Nakazawa Y & Hosoi H.

- Development of non-viral, ligand-dependent, EPHB4-specific chimeric antigen receptor T cells for treatment of rhabdomyosarcoma. *Mol Ther Oncolytics*. 20: 646-658, 2021.
- 14) Nakamura K, Yagyu S, Hirota S, Tomida A, Kondo M, Shigeura T, Hasegawa A, Tanaka M & Nakazawa Y. Autologous antigen-presenting cells efficiently expand piggyBac transposon CART cells with predominant memory phenotype. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 21: 315-324, 2021.
 - 15) Suematsu M, Yagyu S, Yoshida H, Ozone S, Nakazawa Y, Sugita K, Imamura T & Iehara T. Targeting FLT3-specific chimeric antigen receptor T cells for acute lymphoblastic leukemia with KMT2A rearrangement. *Cancer Immunol Immunother*. 2022.
 - 16) Suematsu M, Yagyu S, Nagao N, Kubota S, Shimizu Y, Tanaka M, Nakazawa Y & Imamura T. PiggyBac Transposon-Mediated CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Derived From CD45RA-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells Possess Potent and Sustained Antileukemic Function. *Front Immunol*. 13: 770132, 2022.
 - 17) Hasegawa A, Saito S, Narimatsu S, Nakano S, Nagai M, Ohnoda H, Inada Y, Morokawa H, Nakashima I, Morita D, Ide Y, Matsuda K, Tashiro H, Yagyu S, Tanaka M & Nakazawa Y. Mutated GM-CSF-based CART cells targeting CD116/CD131 complexes exhibit enhanced anti-tumor effects against acute myeloid leukaemia. *Clin Transl Immunology*. 10: e1282, 2021.
 - 18) Nishio N, Hanajiri R, Ishikawa Y, Murata M, Taniguchi R, Hamada M, Nishikawa E, Kawashima N, Narita A, Muramatsu H & Takahashi Y. A Phase I Study of CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Generated By the PiggyBac Transposon Vector for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 138: 1381, 2021.
 - 19) Costello C, Derman B, Kocoglu M, Deol A, Abbas Ali A, Gregory T, Dholaria B, Berdeja J, Cohen A, Patel K, Siegel D, Nath R, McArthur K, McCaigue J, Martin C, Ghodussi M, Namini H, Ostertag E, Spear M, Belani R & Shah N. Clinical Trials of BCMA-Targeted CART Cells Utilizing a Novel Non-Viral Transposon System. *Blood*. 138: 3858, 2021.
 - 20) Zhang Y, Zhang Z, Ding Y, Fang Y, Wang P, Chu W, Jin Z, Yang X, Wang J, Lou J & Qian Q. Phase I clinical trial of EGFR-specific CART cells generated by the piggyBac transposon system in advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 147: 3725-3734, 2021.
 - 21) Slovin S, Dorff T, Falchook G, Wei X, Gao X, McKay R, Oh D, Wibmer A, Spear M, McCaigue J, Shedlock D, Dhar M, Coronella J, Martin C, Ghodussi M, Murphy A & EM O. Phase 1 study of P-PSMA-101 CAR-T cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *J Clin Oncol*. 40: 98, 2022.
 - 22) Helbling PM, Saulnier DME & Brandli AW. The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development*. 127: 269-278, 2000.
 - 23) Xia G, Kumar SR, Masood R, Zhu S, Reddy R, Krasnoperov V, Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL, Pinski JK, Daneshmand S, Buscarini M, Stein JP, Zhong C, Broek D, Roy-Burman P & Gill PS. EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Res*. 65: 4623-4632, 2005.
 - 24) Kumar SR, Masood R, Spanuth WA, Singh J, Schemnet J, Kleiber G, Jennings N, Deavers M, Krasnoperov V, Dubeau L, Weaver FA, Sood AK & Gill PS. The receptor tyrosine kinase EphB4 is overexpressed in ovarian cancer, provides survival signals and predicts poor outcome. *Br J Cancer*. 96: 1083-1091, 2007.
 - 25) Berardi AC, Marsilio S, Rofani C, Salvucci O, Altavista P, Perla FM, Diomedei-Camassei F, Uccini S, Kokai G, Landuzzi L, McDowell HP & Dominici C. Up-regulation of EphB and Ephrin-B Expression in Rhabdomyosarcoma. *Anticancer Res*. 28:2008.
 - 26) Chen T, Liu X, Yi S, Zhang J, Ge J & Liu Z. EphB4 is overexpressed in gliomas and promotes the growth of glioma cells. *Tumour Biol*. 34: 379-385, 2013.
 - 27) Liu R, Ferguson BD, Zhou Y, Naga K, Salgia R, Gill PS & Krasnoperov V. EphB4 as a therapeutic target in mesothelioma. *BMC Cancer*. 13:2013.
 - 28) Ferguson BD, Liu R, Rolle CE, Tan YHC, Krasnoperov V, Kanteti R, Tretiakova MS, Cervantes GM, Hasina R, Hseu RD, Iafrate AJ, Karrison T, Ferguson MK, Husain AN, Faoro L, Vokes EE, Gill PS & Salgia R. The EphB4 Receptor Tyrosine Kinase Promotes Lung Cancer Growth: A Potential Novel Therapeutic Target. *PLoS ONE*. 8:2013.
 - 29) Aslam MI, Abraham J, Mansoor A, Druker BJ, Tyner JW & Keller C. PDGFR β reverses EphB4 signaling in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111: 6383-6388, 2014.
 - 30) Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, Sato E & Tamaya T. Overexpression of ephrinB2 and EphB4 in tumor advancement of uterine endometrial cancers. *Ann*

- Oncol. 18: 485-490, 2007.
- 31) Yagyu S, Mochizuki H, Yamashima K, Kubo H, Saito S, Tanaka M, Sakamoto K, Shimoi A & Nakazawa Y. A lymphodepleted non-human primate model for the assessment of acute on-target and off-tumor toxicity of human chimeric antigen receptor-T cells. Clin Transl Immunology. 10, 2021.

著者プロフィール



柳生 茂希 Shigeki Yagyu

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科 小児科学 講師（学内）

略 歴：2000年3月 京都府立医科大学医学部医学科卒業

2000年4月 京都府立医科大学 小児科

2005年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科入学

2009年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科卒業

2009年4月 京都府立与謝の海病院小児科勤務

2011年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児発達医学 助教

2013年2月 Postdoctoral Associate, Baylor College of Medicine,
Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA

2015年8月 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児科学 助教

2019年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児科学 講師（学内）

専門分野：小児がん，遺伝子細胞治療

- 主な業績：1. Suematsu M, Yagyu S, Nagao N, Kubota S, Shimizu Y, Tanaka M, Nakazawa Y, Imamura T. PiggyBac Transposon-Mediated CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Derived From CD45RA-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells Possess Potent and Sustained Antileukemic Function. *Front. Immunol.* 13: 770132. doi: 10.3389/fimmu.2022.770132, 2022.
2. Tomida A, Yagyu S, Nakamura K, Kubo H, Yamashima K, Nakazawa Y, Hosoi H, Iehara T. Inhibition of MEK pathway enhances the antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against neuroblastoma. *Cancer Sci.* 112: 4026-4036, 2021.
3. Yagyu S, Mochizuki H, Yamashima K, Kubo H, Saito S, Tanaka M, Sakamoto K, Shimoi A, Nakazawa Y. Lymphodepleted non-human primate model for the assessment of acute on-target and off-target toxicity of human CAR-T cells. *Clin Transl Immunol* 10: e1291, 2021.
4. Hasegawa A, Saito A, Narimatsu S, Nakano S, Nagai M, Ohnota H, Inada Y, Morokawa H, Nakashima I, Morita D, Ide Y, Matsuda K, Tashiro H, Yagyu S, Tanaka M, Nakazawa Y. Mutated GM-CSF-based CAR T-cells targeting CD116/CD131 complexes exhibit enhanced anti-tumor effects against AML. *Clin Transl Immunol* 10: e1282, 2021.
5. Nakamura K, Yagyu S, Hirota S, Tomida A, Kondo M, Shigeura T, Hasegawa A, Tanaka M, Nakazawa Y. Autologous antigen-presenting cells efficiently expand piggyBac transposon chimeric antigen receptor T cells with predominant memory phenotype. *Mol Ther Methods Clin Dev* 21: 315-324, 2021.
6. Kubo H, Yagyu S, Nakamura K, Yamashima K, Tomida A, Kikuchi K, Iehara T, Nakazawa Y, Hosoi H. Development of non-viral, ligand-dependent, EPHB4-specific chimeric antigen receptor T cells for treatment of rhabdomyosarcoma. *Mol Ther Oncolytics* 20: 646-658, 2021.
7. Morokawa H, Yagyu S, Hasegawa A, Tanaka M, Saito S, Mochizuki H, Sakamoto K, Shimoi A, Nakazawa Y. Autologous non-human primate model for the safety assessment of piggyBac transposon-mediated chimeric-antigen receptor T cells on granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Clin Transl Immunol* 9: e1207, 2020.
8. Yagyu S, Hoyos V, Del Bufalo F, Brenner MK. Multiple mechanisms determine the sensitivity of human-induced pluripotent stem cells to the inducible caspase-9 safety switch. *Mol Ther. Methods Clin Dev* 16003, 2016.
9. Hoyos V, Del Bufalo F, Yagyu S, Ando M, Dotti G, Suzuki M, Bouchier-Hayes L, Alemany R, Brenner MK. Mesenchymal Stromal Cells for Linked Delivery of Oncolytic and Apoptotic Adenoviruses to Non-small-cell Lung Cancers. *Mol Ther.* 23: 1497-1506, 2015.
10. Yagyu S, Hoyos V, Del Bufalo F, Brenner MK. An Inducible Caspase-9 Suicide Gene to Improve the Safety of Therapy Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Ther.* 23: 1475-1485, 2015.
11. Yagyu S, Iehara T, Gotoh T, Miyachi M, Katsumi Y, Kikuchi K, Tsuchiya K, Osone S, Kuroda H, Sugimoto T, Sawada T, Hosoi H. Preoperative analysis of 11q loss using circulating tumor-released DNA in serum: a novel diagnostic tool for therapy stratification of neuroblastoma. *Cancer Lett.* 309: 185-189, 2011.
12. Yagyu S, Gotoh T, Iehara T, Miyachi M, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, Tamura S, Tsuchiya K, Imamura T, Misawa-Furihata A, Sugimoto T, Sawada T, Hosoi H. Circulating methylated-DCCR2 gene in serum as an indicator of prognosis and therapeutic efficacy in patients with MYCN nonamplified neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 14: 7011-7019, 2008.