



Title	CEAを標的抗原とするキメラ抗原受容体T細胞による膵臓癌への抗腫瘍効果の研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 理
Description	配架番号 : 2811
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15651号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90964
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAT0_Osamu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 佐藤 理

学 位 論 文 題 名

CEA を標的抗原とするキメラ抗原受容体 T 細胞による膵臓癌への抗腫瘍効果の研究
(Studies on the therapeutic effect of CEA targeting chimeric antigen receptor engineered T cells for pancreatic adenocarcinoma)

【背景と目的】膵臓癌（以下膵癌）は消化器癌の中で最も悪性度が高い癌種の 1 つであり、未だに外科的治療が長期生存を期待しうる唯一の治療法である。しかしながら、初診断時に手術適応のある患者は約 20% に過ぎず、また根治切除ができて術後の再発率は高く術後の 5 年生存率は 20- 40% と不良である。化学療法として様々な薬剤が開発されているが、その効果は限定的で重篤な副作用も懸念されており、全 5 年生存率は 12.5% 程度と極めて予後不良な悪性疾患である。そのため、抗腫瘍効果が高く副作用が少ない新規治療法の開発が期待され数多くの研究が行われているが、いずれにおいても決して良好な成績とは言えず、アンメットメディカルニーズのある代表的疾患の 1 つである。癌治療において手術、化学療法、放射線療法の 3 大療法に続く第 4 の治療法として免疫療法が長らく期待され、癌ワクチンや養子免疫療法など多くの臨床試験が行われてきた。近年、キメラ抗原受容体 T 細胞（chimeric antigen receptor engineered T cells: CAR-T）療法が血液腫瘍に対して顕著な治療効果を示して以来、関心が高まっている。しかし、固形腫瘍においては未だ有効な治療効果の報告が少なく、臨床応用へは至っていない。

本研究では、難治性癌である膵癌に対する CAR-T 療法の有効性を検証する事とした。標的抗原としては、腫瘍特異性が高くかつオフターゲット腫瘍毒性が低い抗原として、膵癌で高頻度に発現を認める carcinoembryonic antigen (CEA) を有効な標的抗原と考えた。今回、抗 CEA-CAR-T を作製し *in vitro*、*in vivo* で膵癌に対する抗腫瘍効果の検証を行った。また、膵癌切除症例の臨床データと病理学的所見から、将来的な CAR-T 療法の臨床応用に向けてバイオマーカーの探索も行った。

【材料と方法】 ヒト膵癌細胞株として MIA PaCa-2、PANC-1、Capan-1、AsPC-1、PK-9、BxPC-3、SUIT-2、KP1N、PCI-66 の 9 種類、対照として CEA 発現陽性が既知である胃癌細胞株 MKN45 を使用した。まず、各種細胞株において免疫蛍光染色、western blot analysis (W-B)、flowcytometry (FCM) を試行して CEA 発現の評価を行った。また、FCM による CEA に対する mean fluorescence intensity (MFI) から細胞あたりの CEA 分子数 (sites/ cell) を導き、高発現・中発現・低発現群に分類した。続いて、各細胞株に対して抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍効果を確認するため、まず *in vitro* で抗 CEA-CAR-T の機能アッセイを行った。抗 CEA-CAR-T と細胞株の共培養液中の IFN- γ 分泌を ELISA 法で解析し、さらに、細胞毒性アッセイとして共培養後の標的細胞の生細胞/死細胞率を FCM で解析した。また、可溶性 CEA (sCEA) が抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍効果に競合する可能性を考え、機能アッセイを高濃度 sCEA の存在下でも行った。次に、*in vitro* で抗腫瘍効果を認めた膵癌細胞株から CEA 高発現の BxPC-3、中発現の PK-9、低発現の PANC-1 を選択し、Luciferase 遺伝子を導入して膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを作製した。抗 CEA-CAR-T を静脈注射後に腫瘍を摘出し、病理学的検討を行った。また、2009- 2016 年の間に北海道大学病院消化器外科 II で切除された膵癌患者症例 151 人を対象に臨床データを集計し、その内 22 症例の tissue microarray (TMA) 標本の病理学的 CEA 染色からその臨床病理学的意義の検討を行った。

【結果】 ヒト膵癌細胞株の CEA 発現評価の結果から、BxPC-3 を CEA 高発現、Capan-1、AsPC-1、PK-9 を CEA 中発現、MIA PaCa-2、PANC-1、SUIT-2、KP1N、PCI-66 を CEA 低発現群として定義した。各細胞株を抗 CEA-CAR-T と共培養して機能アッセイを行ったところ、ELISA 法では CEA 高・中発現群である BxPC-3、Capan-1、AsPC-1、PK-9 において IFN- γ の分泌増加を有意に認め、この IFN- γ の分泌量は標的 CEA の分子数と相関関係を認めた。続いて細胞毒性アッセイを行い、CEA 分子数が多い上位 3 つの細胞株 BxPC-3、Capan-1、MKN45 で有意な細胞障害活性を認めた。MKN45 と BxPC-3 においては CAR-T 用量依存的に有意な細胞障害活性を認めたが、中発現群である AsPC-1 と PK-9 では有意差を認めなかった。いずれの機能アッセイにおいても、少なくとも 1000 ng/ml までの sCEA 濃度では抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍効果の減退を認めなかった。次に、膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを用いた *in vivo* 治療実験では、BxPC-3 モデルにおいて CAR-T 投与後の 14、21 日目に腫瘍の Luciferase シグナルに有意な抑制傾向を認めた。PK-9 モデルでは 21 日目で CAR-T 投与群の Luciferase シグナルが抑制されたが、有意差は認めなかった。いずれの群においても治療経過観察中に有意な副作用は認めなかった。21 日目の犠牲死後、摘出標本の病理組織学的検討では、BxPC-3 モデルと PK-9 モデルにおいて CD8+ リンパ球が腫瘍内部に浸潤する傾向を認めた。また、膵癌患者の臨床データと標本 CEA 染色の解析では、術前血清 CEA 値と CEA 染色強度に有意な相関関係は認めなかった。一方で、CEA 発現細胞の heterogeneity を術前血清 CEA 値、CEA 染色強度のそれぞれの相関解析をすると、heterogeneity は CEA 染色強度との間に有意な相関関係を認めた。

【考察】 様々な細胞膜表面 CEA 発現強度の膵癌細胞株と抗 CEA-CAR-T の機能アッセイの結果から、抗 CEA-CAR-T は標的細胞の CEA 抗原量依存性に、また、抗 CEA-CAR-T 用量依存性に有意な抗腫瘍効果を示すと考えられた。sCEA による抗 CEA-CAR-T の競合は、膵癌患者の血清 CEA 値ではほぼなり得ない濃度で認めたため、実臨床で血清 CEA が抗 CEA-CAR-T の活性に大きな影響を及ぼす可能性は低いと推察した。さらに、膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルへの抗 CEA-CAR-T の単回静脈内投与による *in vivo* 治療実験でも、抗原量依存性に抗腫瘍効果を示す事が示唆された。病理組織学的検討では腫瘍内部に CD8+ リンパ球が浸潤する傾向を認めたが、抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍効果との相関は認めなかった。この腫瘍内へのリンパ球の浸潤は、抗 CEA-CAR-T 輸注による抗腫瘍効果や腫瘍に対する非特異的なリンパ球遊走の結果が考えられ、浸潤したリンパ球の機能解析は今後の課題である。また、本実験の抗 CEA-CAR-T 投与量ではいずれのマウスモデルにおいて有意な副作用を認めなかったが、*in vivo* 実験での抗 CEA-CAR-T 用量依存性と安全性についての検証も今後の課題である。膵癌患者の臨床データと病理組織学的 CEA 染色の解析を行うと、CEA 染色強度が強いと CEA 発現の heterogeneity が低いという相関関係を認めた。膵癌が難治性疾患と言われている要因の 1 つが標的抗原の heterogeneity の高さである事が知られているため、CEA 染色強度の評価が将来的に抗 CEA-CAR-T 療法の治療対象となる患者を選択するためのバイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。さらに、CEA 染色のコンパニオン診断の開発や、リキッドバイオプシーにおける分子異常検出の開発など、これらを組み合わせる事で、将来的に膵癌患者の抗 CEA-CAR-T 療法の臨床応用において重要な新しいアプローチの可能性が考えられる。

【結論】 細胞膜表面 CEA を発現している膵癌細胞に対して、細胞膜表面 CEA を標的とする CAR 導入 T 細胞は *in vitro* 実験において標的抗原量依存性に抗腫瘍効果を示した。CEA 高発現の膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを使用した *in vivo* 治療実験においても副作用なく抗腫瘍効果を示した。また、検体の病理組織学的 CEA 染色の強度は、将来的に膵癌症例に対する抗 CEA-CAR-T 療法の臨床応用における患者選択の指標となり得ると考えられた。