



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15651
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90976
Type	doctoral thesis
File Information	SATO_Osamu.pdf



学 位 論 文

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)

2023 年 9 月

北 海 道 大 学

佐藤 理

学 位 論 文

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)

2023 年 9 月

北 海 道 大 学

佐藤 理

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
実験方法	9 頁
実験結果	22 頁
考察	42 頁
総括および結論	46 頁
謝辞	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Osamu Sato, Takahiro Tsuchikawa, Takuma Kato, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Yuta Takeuchi, Katsunori Sasaki, Toru Nakamura, Kazufumi Umemoto, Tomohiro Suzuki, Linan Wang, Yizheng Wang, Kanako C. Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Hiroshi Shiku and Satoshi Hirano

Tumor Growth Suppression of Pancreatic Cancer Orthotopic Xenograft Model by CEA-Targeting CAR-T Cells

Cancers, 15 • 601, (2023)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

佐藤 理, 土川貴裕, 武内優太, 佐々木勝則, 王 立楠, 岡本幸子,
天石泰典, 峰野純一, 畑中 豊, 加藤琢磨, 珠玖 洋, 平野 聡

ヒト膵癌同所移植マウスモデルを用いた CEA 標的キメラ抗原受容体発現 T 細胞
(CAR-T) 輸注療法による抗腫瘍効果の評価

第 23 回 日本がん免疫学会総会, 2019 年 8 月 21-23 日・高知

要旨

【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の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効果が低い抗原として、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い、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 用量が多いほど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 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体重減少や血中サイトカイン上昇は認めなかった。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 発現量が多い細胞において有意に抗腫瘍効果を示した。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、標的 CEA 発現量が多い細胞において有意に抗腫瘍効果を示した。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体重減少や血中サイトカイン上昇を認めなかったが、*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発現量が高い細胞において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、体重減少や血中サイトカイン上昇は来さずに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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CAR-T	chimeric antigen receptor engineered T cells
CEA	carcinoembryonic antigen
CFSE	carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
CRS	cytokine release syndrome
E: T	Effector : Target
FCM	flowcytometry
FDA	Food and Drug Administration
GPI	glycosylphosphatidylinositol
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
NGMC	non-gene modified cells
OS	overall survival
sCEA	soluble carcinoembryonic antigen
scFv	single-chain variable fragment
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCR-T	T cell receptor therapy
TMA	tissue microarray
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
W-B	western blot analysis
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D

緒言

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つである。他の主要な消化器癌は生存率が大幅に改善されてきたにも関わらず、膵癌の生存率は1960年代以降ほとんど変化がなく(国立がん研究センター,2022)、膵癌全体の5年生存率は12.5%程度と極めて予後不良である。また、膵癌の多くは進行癌で発見され、本邦の膵癌登録によると約50%がStage IVであり、膵癌症例の約20%が切除不能例となっているのが現状である(国立がん研究センター,2022)。2011年にFOLFIRINOX(5-FU/leucovorin/irinotecan/oxaliplatin)療法が、また2013年にGEM+nab-paclitaxel併用療法が開発され、転移性膵癌におけるGEM単剤療法の全生存率6.7-6.8ヶ月に対しそれぞれ11.1ヶ月[ハザード比0.57(P<0.001)]、8.7ヶ月[ハザード比0.72(P<0.001)]と有意な効果が報告された(Conroy et al, 2011; Hoff et al, 2013)。FOLFIRINOX療法の方で少し全生存期間の延長効果が優っている印象があるが、その一方で発熱性好中球減少症、下痢、末梢神経障害など様々な副作用の頻度が高く(Conroy et al, 2011)、また、いずれの治療法においても決して良好な治療成績とは言えない。そのため、膵癌はアンメットメディカルニーズのある代表的疾患の1つであり、抗腫瘍効果が高く副作用が少ない新規治療法の開発が急務である。

近年の医学研究及び医療技術の進歩によって、癌に対して多くの先進医療が実施されるようになり、手術、化学療法、放射線療法のいわゆる三大療法に続く画期的な癌治療法が開発が強く求められている。免疫療法は癌に対する第4の治療法として長らく期待されてきたが、近年までは臨床評価に耐えうるだけの有効な治療効果を示せていなかった。しかし、この約20年間で免疫療法は大きなパラダイムシフトを迎えている。1996年のCTLA-4(Pierre et al, 1996)の研究を皮切りに免疫チェックポイント阻害剤の開発研究が進んでおり、2014年には本邦でNivolumabが世界で初めて臨床承認されるなど急速に臨床応用が進められている(Berger et al, 2008; Brahmer et al, 2010)。近年では、遺伝子改変T細胞輸注療法のひとつとして、キメラ抗原受容体T細胞(chimeric antigen receptor engineered T cells: CAR-T)療法が白血病やリンパ腫などの血液腫瘍の患者に顕著な治療効果が証明されて以来、注目を浴びている。2017年には、CD19陽性B細胞性急性リンパ芽球性白血病とCD19陽性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫に対してCD19標的CAR-T(CTL019: Kymriah, Novartis, Emeryville, CA, USA)が米国Food and Drug Administration(FDA)によって承認された。このようにCAR-T療法は血液腫瘍で効果がある一方で、固形腫瘍においては有効な治療効果の報告がない(Wang et al, 2015; O'Hara et al, 2015; Beatty et al, 2019; Heyman and Yang, 2019)。しかし近年、転移性去勢抵抗性前立腺癌に対する抗PSMA-CAR-Tによる第I相臨床試験が施行され、治験患者13人中5人で治療効果を認めたという報告(Vivek et al, 2022)があり、固形腫瘍に対するCAR-T

療法の利用への期待が更に高まっている。

CAR-Tは、任意の抗原に対する特異的モノクローナル抗体由来の single-chain variable fragment (scFv) 抗体、副刺激分子、細胞内シグナル伝達ドメインを、膜貫通ドメインを介してT細胞に結合した構造を有する(図1)。今回導入したCARは、scFv抗体、CD8ヒンジ膜貫通ドメイン、副共刺激ドメインのCD28及びCD3 ζ 鎖由来の細胞内シグナル伝達ドメインに加え、そのシグナルが制御性T細胞による免疫抑制を阻害するGITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) 分子で構成されている(図2)。scFv抗体が抗原と反応する事によりT細胞にシグナルが伝達され、標的細胞の障害・サイトカイン放出・刺激後のT細胞分裂増殖が起こる。

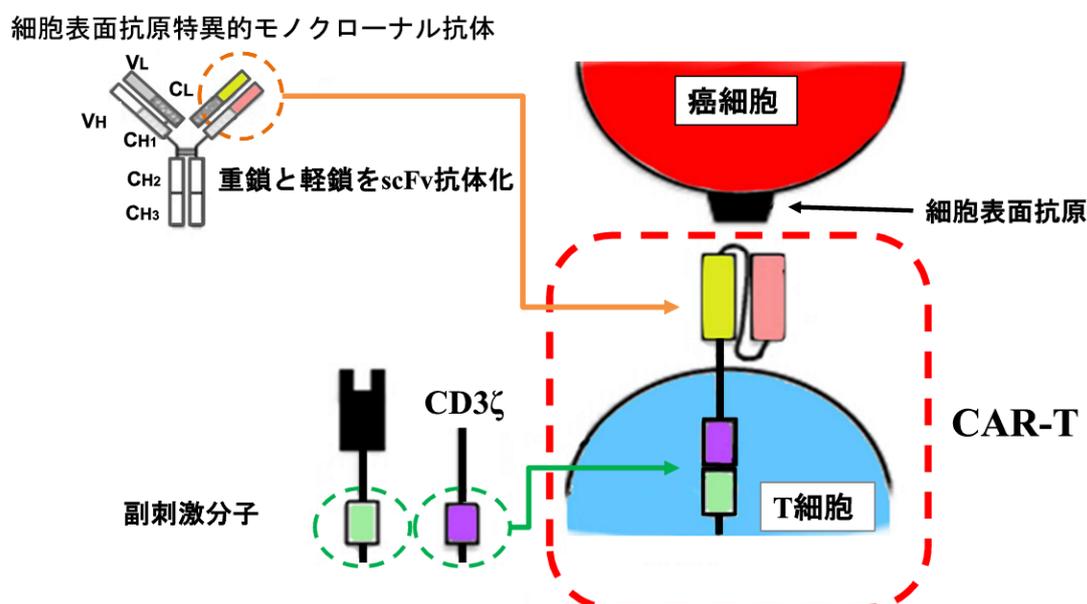


図1 CAR-Tの構造

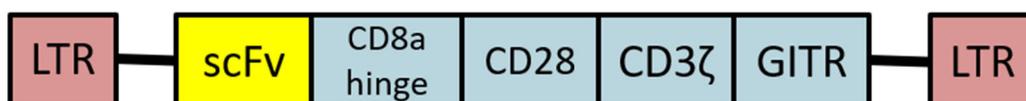


図2 本研究で用いた抗CEA-CAR遺伝子ベクターのコンストラクト

本実験では、固形腫瘍におけるCAR-T療法の可能性として、最も致命的な悪性腫瘍のひとつである膵癌に注目した。標的抗原としては、CAR-T療法の重大な課題のひとつであるオフターゲット効果(Morgan et al, 2010)を回避するために、腫瘍特異性が高かつ正常細胞に影響を与えないような抗原の選択が重要である。そこで、本実験では carcinoembryonic antigen (CEA) に注目した。CEAは分子量約 180 kDaの糖蛋白質で、

白血病やリンパ腫、肉腫を除くほとんどの臓器の癌組織で検出され、膵癌においても高率に発現している (Gansauge S, et al, 1996)。大腸や気管支などの正常腺細胞では主に管腔側の細胞膜表面に存在している (Denk et al, 1972) ため、scFv 抗体が直接 CEA を認識する抗 CEA-CAR-T では正常細胞は障害されず、CEA は標的抗原として有用であると考えた。これまで、膵癌に対する CAR-T 療法の先行研究としては mesothelin、CEA、MUC1 など様々な標的抗原に焦点を当てて行われている (Yunzhen et al, 2020) が、CEA を標的とした膵癌特異的 CAR-T 療法の臨床試験結果は未だ報告されていない。また、膵癌を含む固形腫瘍におけるいくつかの研究 (O'Hara et al, 2015; Feng et al, 2018) では、治療実験を行う際の抗原発現の評価として病理組織学的染色陽性率でカットオフ値を設定して治療実験がされているが、抗腫瘍効果と抗原発現強度の相関関係についての報告はない。そこで、本実験では膵癌に対する抗 CEA-CAR-T 療法の有効性を標的 CEA の発現強度と関連して解析し、さらに、膵癌特有の微小環境下での抗 CEA-CAR-T 療法の抗腫瘍効果を解析するために、ヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを製作して治療実験を行った。また、CAR-T 療法の重大な副作用としてサイトカイン放出症候群 (cytokine release syndrome: CRS) がよく知られており (Neelapu et al, 2018)、本研究でも CRS の代表的なバイオマーカーである血清 IFN- γ 、IL6、TNF- α を測定した。

実験方法

1) ベクター構築およびウイルス溶液

CD8a 膜貫通ドメイン、CD28 副刺激分子、CD3 ζ 細胞内シグナル伝達ドメインおよび GITR 細胞内ドメインと共に、CEA(F11-39)に対する抗 CEA モノクローナル抗体の VH と VL 領域遺伝子を linker で結合して scFv 抗体を作成し、pMS3 レトロウイルスベクターにクローニングした。293T 細胞 (ATCC, Rockville, MD, USA) と Retrovirus Packaging Kit Eco (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いてエコトロピック偽型レトロウイルスを一過性に取得した。このウイルスを用いて PG13 細胞 (ATCC) を形質転換し、GaLV-偽型レトロウイルスを作製した。このベクター作製、ウイルス溶液の作製は国立三重大学とタカラバイオ株式会社による共同開発で行われ、本研究はその提供を受けた。

2) 細胞株

本研究に使用した細胞株は、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 種類を使用した。MIA PaCa-2、PANC-1、AsPC-1、PK-9、BxPC-3 は American Type Culture Collection (ATCC) から、SUIT-2、KP1N は the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB, Osaka, Japan) から購入した。また、PCI-66 は所属研究室で過去に確立した膵癌細胞株 (Sugiura et al, 1994) である。luciferase 遺伝子導入細胞の BxPC-3-Luc は JCRB から購入し、対照群として CEA を強発現が証明されているヒト胃癌細胞株 MKN45 を JCRB から購入した。予備実験としてヒト胆道癌細胞株 RBE、SSP-25、TFK-1、HuH28、HuCC-T1 を使用した。RBE、SSP-25、TFK-1 は RIKEN BRC (Ibaraki, Japan) から購入し、HuH28、HuCC-T1 は JCRB から購入した。治療実験の際に BxPC-3、PK-9、PANC-1 の Luciferase 遺伝子導入細胞を使用する方針となり、BxPC-3-Luc は JCRB から購入した。PANC-1 および PK-9 への luciferase 遺伝子導入は、FuGENE6 試薬 (Promega, Wisconsin, USA) を使用して pGL4.45 [luc2P/ISRE/Hygro] ベクター (Promega) を細胞に導入し、単一クローンの細胞をハイグロマイシンによる限界希釈法によって PANC-1-Luc、PK-9-Luc を作製した。全ての細胞株は RPMI 1640 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用し、いずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan) と Penicillin/ Streptomycin (Life Technologies, Tokyo, Japan) を添加し、それぞれ終濃度 10%、1% とした。いずれの細胞株も 5% CO₂ 下で 37 度の温度のもとインキュベーター内で培養を行った。

3) 細胞膜表面の CEA 発現の解析

3-1) 免疫蛍光染色

すべての細胞膜表面のCEA発現を評価するために、特異的マウス抗ヒトIgG一次抗体: 抗CEA (ab105364; 1: 100, abcam plc., Cambridge, UK) およびAlexaFluor®488ヤギ抗マウスIgG二次抗体 (ab150113; 1: 1000, abcam plc.) を使用して免疫蛍光染色を行った。アイソタイプコントロールとしてマウスIgG抗体(ab37355; 1: 100, abcam plc.) を使用した。免疫蛍光染色は、まず細胞をスライドガラス上で37°C、24時間インキュベートし、4%パラホルムアルデヒドで固定した。次に、1%BSAを加えて60分室内で静置し、ブロッキングした。続いて、抗CEA一次抗体を加えて4°C、一晚インキュベートしたのち、二次抗体を4°C暗所で60分インキュベートした。スライドはDAPI含有封入剤(#0100-20; SouthernBiotech, Birmingham, AL) で封入し、蛍光顕微鏡 (Keyence, Tokyo, Japan) で観察した。後に本実験ではスライドガラス上での染色ではなく、より培養細胞の活性化を期待してコラーゲンコートされたスライドチャンバー (SCS-N38; MATSUNAMI, Osaka, Japan) を使用した。

3-2) Western blot analysis

目的とする細胞の Cell lysate を Protease Inhibitor Cocktail (G6521; Promega, Wisconsin, USA) を補充した RIPA 緩衝液中で 4°C、20 分で溶解したのちスクレーパーで掻き取り、4°C、12 分超音波処理で破碎した。続いて 12000rpm、4°C、20 分の遠心分離を行い、上清を回収する事で全タンパク質を細胞から抽出した。計 20 μ g のタンパク質を 15% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) をした後、ニトロセルロース膜に転写した。膜を 1% 脱脂乳でブロッキングした後、マウス抗ヒト IgG 一次抗体: 抗 CEA (ab105364; 1: 100, abcam plc.)、およびローディングコントロールとして抗 β -アクチン (ab8227; 1: 5000, abcam plc.) を室温で、60 分インキュベートした。すべてのサンプルをトリス緩衝食塩水で洗浄し、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 (#115-035-003; 1: 10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) を室温で、60 分インキュベートした。結果は化学発光検出システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて可視化した。

3-3) Flowcytometry

すべての細胞株の細胞膜表面 CEA 発現の評価、T 細胞への CAR 導入率、細胞毒性アッセイの解析を Flowcytometry (FCM) で行った。

細胞膜表面の解析には間接的染色を行い、抗体は免疫蛍光染色で使用したものと同一のものを使用した [一次抗体: 抗 CEA (ab105364; 1: 200, abcam plc.)、AlexaFluor®488 ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (ab150113; 1: 2000, abcam plc.)、アイソタイプコントロール IgG 抗体(ab37355; 1: 200, abcam plc.)]。使用した細胞株はいずれも接着細胞であるため、0.2% EDTA を含む PBS を培養細胞に添加し、37°C で 5 分間インキュベートして細胞を

分離し、培養液で EDTA を中和して単一細胞懸濁液を調整した。マイクロテストチューブに 1×10^6 / ml の細胞液を調整し、それぞれを上記抗体で染色した。一次、二次抗体はそれぞれ 4°C 、暗所で 30 分インキュベートした。

CD4+/CD8+ T 細胞への CAR 導入率の FCM 解析は二重染色で行った。作製した T 細胞を 0.5% BSA を含む PBS で洗浄し、ビオチン化 CEA を $0.1 \mu\text{g} / 2 \times 10^5$ cells で加えて室温、30 分間インキュベートした。0.5% BSA / PBS で洗浄し、APC-conjugated anti-CD4 (#300552; 1: 50; BioLegend, San Diego, CA, USA), PE-Cy5 conjugated anti-CD8 (#555636; 1: 50; Biosciences, San Jose, CA, USA), PE-conjugated streptavidin (#130-106-790; 1: 300; Miltenyi Biotec) を加えて 4°C 、暗所で 30 分インキュベートした。なお、ビオチン化 CEA は recombinant CEA (ab158095; abcam plc.) をビオチン化 Kit (Dojindo, Kumamoto, Japan) を使用し作製した。

全てのアッセイは MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) で解析を行った。細胞膜表面の CEA 解析は当初 BD FACSCanto2 (Becton, Dickinson and Company, USA) で行っていたが、途中で所属研究室に新たに MACSQuant Analyzer 10 が導入されたため、すべての細胞株に対して MACSQuant で各解析を再試行した。ヒストグラム解析は FlowJo 7.6.5 (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA) で行った。

3-4) 細胞膜表面 CEA 分子数の定量化

細胞膜表面の CEA 発現を更に定量化して評価比較するために、FCM で解析した CEA 発現の mean fluorescence intensity (MFI) から細胞あたりの CEA 分子数 (sites/ cell) を導いた。QIFIKIT (K0078; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を使用し、製品プロトコールに沿ってキャリブレーションカーブ (MFI vs sites/ cell) を作製 (図 3) し、それぞれの MFI から細胞膜表面 CEA 分子数 (sites/ cell) を計算した。

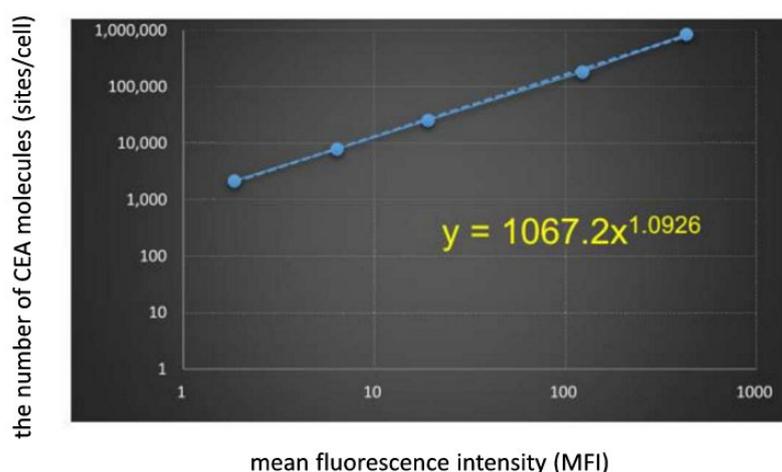


図 3 MFI と細胞膜表面 CEA 分子数のキャリブレーションカーブ

4) 抗 CEA-CAR-T 細胞の作製

健常者ドナー末梢血 10ml を遠心分離 (700×g, 20min, 25°C) で赤血球層と Plasma 層に分離した。赤血球層を Ficoll 密度勾配遠心法 (700×g, 20min, 25°C) で末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) を回収し、GT-T511 (WK551; Takara Bio) で洗浄した。Plasma 層は 56°C、30min で静置し非働化し、T 細胞の Conditioned Medium として GT-T511 に加えて使用した。Conditioned Medium は GT-T551 200ml に 25% HAS 1200µl, plasma 1200µl、IL-2 (Novartis) を 600IU/ml で添加して作製した。予め抗 CD3 抗体 (#16-0037-85; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) とレトロネクチン (#T202; Takara Bio) を pre-coat した 12 well plate を用意しておき、 5×10^5 /well で PBMC を培養開始した (Day 0)。Day 3 に遺伝子導入用の plate をレトロネクチンで pre-coat しておき、Day 4 と 5 に同 plate 上で T 細胞 1×10^5 /ml にウイルスベクターを形質導入した。拡大培養のために、以降は 50ml フラスコに細胞を移し培養した。培地は GT-T551+Conditioned Medium を使用した。Day 10-14 に CAR 遺伝子の感染効率を FCM で確認し、抗 CEA-CAR-T のソーティングを行い実験に使用した。抗 CEA-CAR-T 細胞の作製に際して、申請者は三重大学遺伝子・免疫細胞治療学講座へ短期留学し作製方法を習得した。

5) 抗 CEA-CAR-T 細胞のソーティング

抗 CEA-CAR-T 細胞を含有するリンパ球溶液をビオチン化 CEA (10^7 細胞に対して 1µg) とともに室温で 30 分インキュベートした。細胞を緩衝液で洗浄し、抗ビオチンマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を 10^7 細胞に対して 20µg 加え 4°C で、15 分間インキュベートした。細胞を緩衝液で洗浄した後、抗 CEA-CAR-T 細胞を専用のカラムと磁気分離機 (Miltenyi Biotec) によって単離した。FCM により分離効率の評価を行い、単離が十分であることを確認した (図 4)。

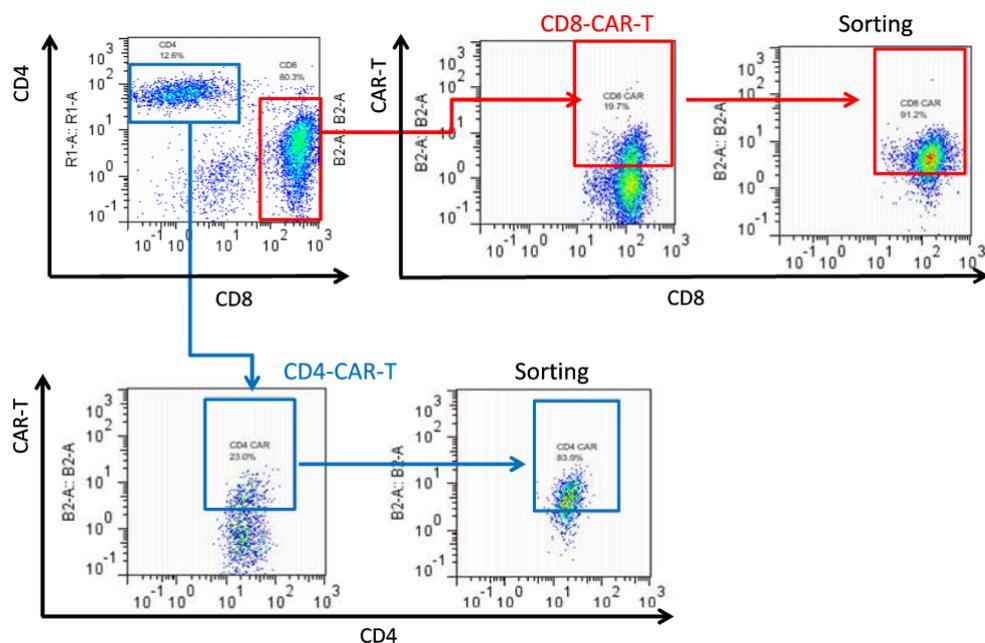


図4 CARの導入効率および Sorting 効率の確認

6) 抗CEA-CAR-Tの機能アッセイ

6-1) ELISA 法によるサイトカイン測定

ELISA キット (ab174443; abcam plc.) を細胞共培養上清中の IFN- γ の定量的測定に使用した。各膀胱癌細胞株と抗 CEA-CAR-T 細胞、対照として non-gene modified cells (NGMC) を 1×10^4 ずつ Effector (E): Target (T)= 1: 1 で一晩共培養した。細胞共培養上清中を回収し、プロトコールに従って IFN- γ の分泌を測定した。また、可溶性 CEA (sCEA) を 0ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml の濃度条件下での競合アッセイも行った。一方、各膀胱癌細胞株の培養上清中 (1×10^6 Seeding して 72 時間後の培養上清) の sCEA、および後述の抗 CEA-CAR-T 治療前後 (Day 0, 21) のマウス血清 CEA の定量測定を ELISA キット (ab183365; abcam plc.) で行った。結果はいずれも吸光度 450nm のプレートリーダーで測定した。

6-2) 細胞毒性アッセイ

膀胱癌細胞に対する CEA-CAR-T 細胞の直接的な抗腫瘍効果を検証するために細胞毒性アッセイを行った。アッセイはまずクロムリリースアッセイを三重大学留学中に予備実験として試行した (図 5) が、本実験では FCM により安定した細胞毒性評価を行い得る方法として 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)/ Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) 細胞毒性アッセイを採用した。アッセイには 7-AAD/CFSE Cell-Mediated Cytotoxicity Assay Kit (#600120; Cayman Chemical, Michigan, USA) を使用した。まず、すべて

の膵癌細胞株と MKN45 を CFSE で 37°C、10 分間インキュベートし生細胞を CFSE で標識した。染色した細胞を PBS で 2 回洗浄し、それぞれ 1×10^4 ずつ 96 well dish で 37°C、30 分インキュベートした。抗 CEA-CAR-T 細胞の用量依存性による検証も行うために、それぞれに抗 CEA-CAR-T 細胞を E:T=1:1 および 10:1 で混合し 37°C で、6 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、細胞混合物に 7-AAD 染料を加えて 4°C、暗所にて 15 分間インキュベートした。7-AAD は死細胞の DNA 鎖にインターカレートされ赤色蛍光を発するため、FCM を用いて CFSE+/7-AAD+ (=生細胞/死細胞) の比率を解析 (図 6) し、Cytotoxicity (%) を計算した。またこのアッセイでは、sCEA の存在が抗 CEA-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を妨げる可能性について検証するために sCEA (ab158095; abcam plc.) 1000ng/ml の濃度下での競合アッセイも施行した。対照群として NGMC 群で同様のアッセイを行った。

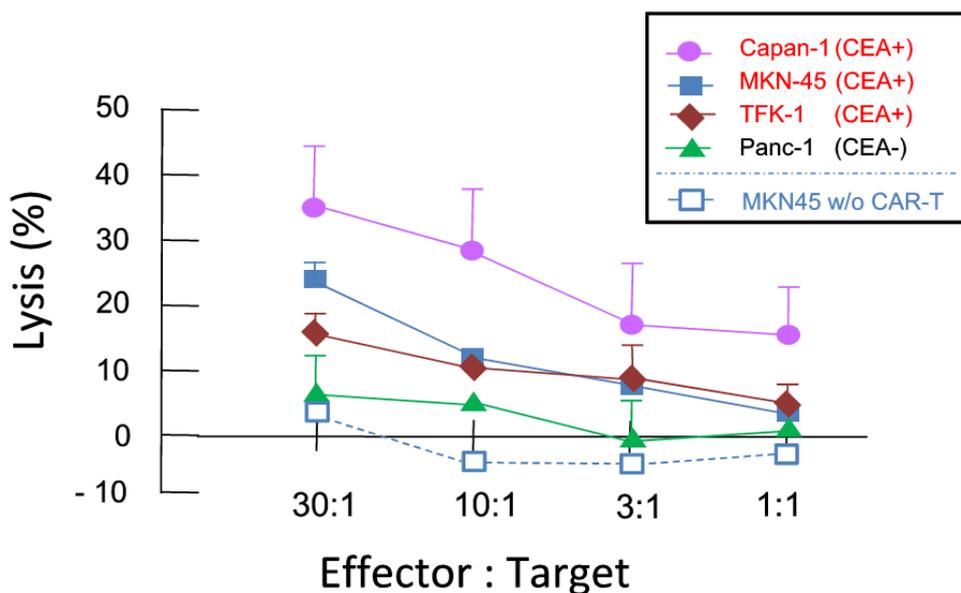


図 5 予備実験 : クロムリリースアッセイ

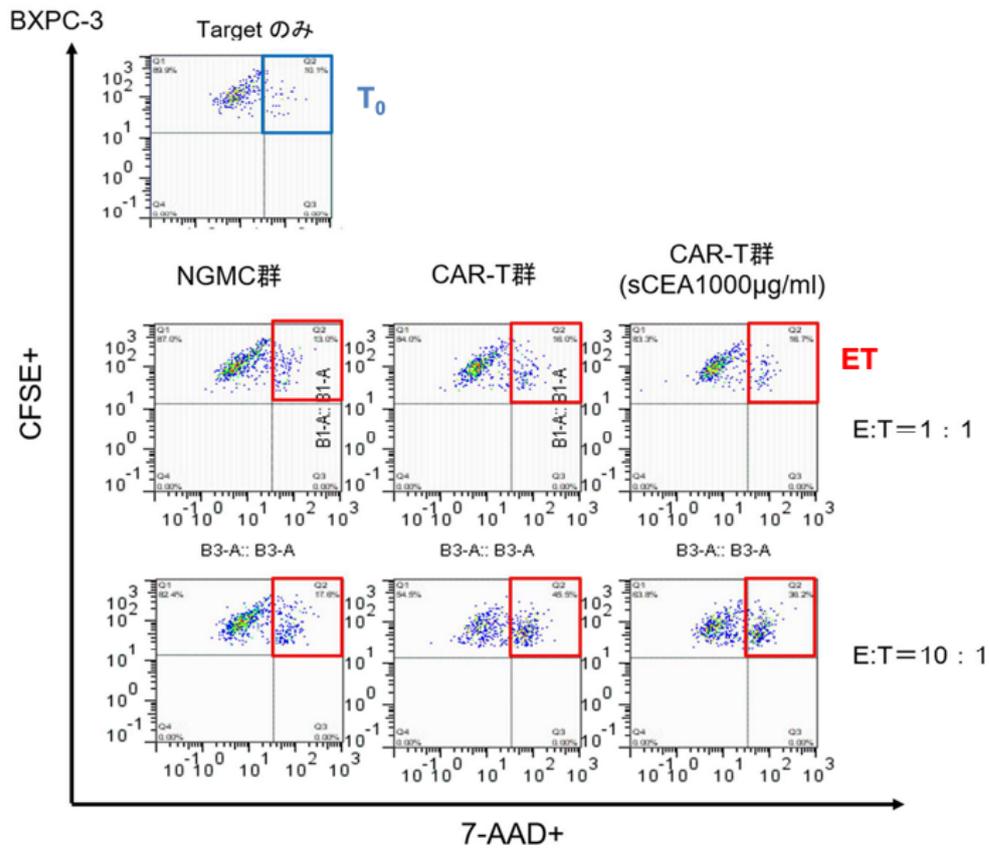


図6 本実験:7-AAD/CFSEアッセイ

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{[(ET - T_0) / (100 - T_0)] \times 100}{1}$$

T₀: Target細胞のみ培養した CFSE+ & 7-AAD+

ET: 共培養後の CFSE+ & 7-AAD+

7) 膵癌 orthotopic xenograft mouse model の作成

6週令のメスのNOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG)マウスを In-Vivo Science 社(Tokyo, Japan)より購入し、標準的な食事、特定の病原体がない状態で飼育し、8~10週齢で使用した。全ての動物実験は北海道大学遺伝子病制御研究所の動物管理委員会によって承認されたプロトコール(P-2019-034)の下で行われた。

BxPC-3-Luc、PK-9-Luc、PANC-1-Luc をそれぞれ 1×10^6 ずつ $10 \mu\text{l}$ の Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies, Tokyo, Japan) と $30 \mu\text{l}$ の Matrigel (Coming, NY, USA) に溶解したものを $100 \mu\text{l}$ シリンジに入れて準備した。NOG マウスを十分な全身麻酔下におき、左側腹部を切開し膵臓を脾臓ごと引き出した。その後 27 ゲージ針で膵被膜下に上記細胞調整液を慎重に注入した。刺入部を綿棒で 30 秒間圧迫したのちマウス用サージカルクリップで閉腹した。腫瘍の観察は、全身麻酔下に D-luciferin (#LK10000; Funakoshi, Tokyo, Japan) を 3 mg/匹で腹腔内投与し、IVIS イメージング (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) で可視化して行った。関心領域のゲーティングは腹部全体を覆うように統一した。Photon emission intensity (photons/sec/cm 2 /sr) はそれぞれの関心領域から抽出したデータを元に Living Image software (PerkinElmer Inc., Boston, MA, USA) を用いて算出した。予備実験で腫瘍移植 1 週後に IVIS イメージングと解剖にて腫瘍の樹立を確認できた(図 7)。



図 7 膵癌 orthotopic xenograft model 作成予備実験

NOG マウスの膵被膜下に調整した膵癌細胞を注入し、1週間後に腫瘍の発育を確認した。

8) マウスモデル治療実験プロトコール

上記の方法で作成した膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを BxPC-3、PANC-1、PK-9 マウスでそれぞれ治療群と非治療群に 5~7 匹ずつに分けて無作為に治療実験を行った。オルソトピックマウスを作製した日を Day -7 とし、治療介入を Day 0 に行った。それぞれのマウスに対し、治療群では抗 CEA-CAR-T を 2.5×10^6 cells/匹、非治療群は NGMC 細胞を同数、尾静脈内注射した。腫瘍の発育は Day 0、7、14、21 に IVIS イメージングにて評価した。観察期間は、膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルの作製 14-21 日目までが体調と死亡率の観点から最適な治療観察期間だとする報告 (Erstad et al, 2018) があり、本実験では人道的エンドポイントを Day 21 と設定し、頸椎脱臼法で安楽死させた。安楽死の後、腫瘍を摘出しホルマリン固定の後、免疫染色用プレパラートを作成し、腫瘍の組織学的特徴について検討を行った(図 8)。

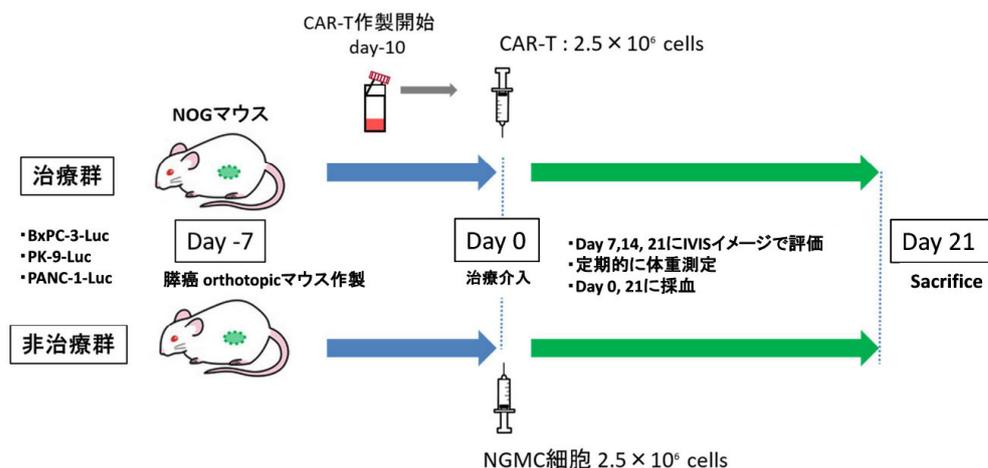


図 8 膵癌 orthotopic xenograft マウスモデル治療プロトコール

NOG マウスの膵被膜下に BxPC-3-Luc、PK-9-Luc、PANC-1-Luc を投与し、その 1 週間後に抗 CEA-CAR-T 細胞を尾静脈投与した。IVIS イメージング、体重測定を行いながら 3 週間後に安楽死させ、腫瘍を摘出し病理学的検討を行った。

9) 抗 CEA-CAR-T 投与による副作用の評価

抗 CEA-CAR-T 治療の副作用の検証として、経時的な体重変化とサイトカインを測定した。体重測定は治療開始から 2、3 日間隔で行った。Day 21 にはマウスから末梢血サンプルを採取し、血清と血漿の 2 つに分けた。血漿はサイトカインビーズアレイ (Bio-Plex, Multiplex Immunoas, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) へ委託し、CRS の代表的なバイオマーカーとして知られている IFN- γ 、IL-6、TNF- α の測定を行った。血清は先述の血清 CEA の測定のために ELISA 法へ使用した。

1 0) 症例ならびに組織マイクロアレイ (TMA)

2009 年 1 月から 2016 年 12 月の 8 年間で、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 人を対象にレトロスペクティブな検討を行った。患者背景では男女比、年齢、術前血清 CEA 値を集計した。病理組織的検討は、当教室でランダムに作成された 22 例の Tissue microarray (TMA) 標本を使用した。術前 1 か月以内の血清 CEA は施設内で正常上限とされている 5ng/ml を Cut-off 値とした。また、予備解析として 2010 年 1 月から 2016 年 12 月の 7 年間で同科にて切除された胆道癌症例 180 人、TMA 標本 28 例でも同様の検討を行った。なお、本研究で使用したデータは「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従い、北海道大学病院自主臨床試験 (No. 016-0318) として北海道大学病院倫理審査委員会の承認を得ており、全ての対象患者より同意を得て行った。

1 1) 免疫組織化学染色

摘出したマウス膵癌を 10% 緩衝ホルマリンで固定し 5 μ m に薄切した。パラフィン包埋切片はアビジン-ビオチン複合法にて免疫組織化学染色を実施した (EnVision FLEX system, Dako, Santa Clara, CA, USA)。マウスモノクローナル抗 CEA 抗体 (M7072; 1: 50; Dako)、マウスモノクローナル抗 CD8 抗体 (IR623; RTU; Dako)、マウスモノクローナル抗 CD4 抗体 (IR649; RTU; Dako)、マウスモノクローナル抗 サイトケラチン (AE1/AE3) 抗体 (IR053; RTU; Dako) を一次抗体として使用し、一次抗体反応時間は 60 分、室温条件で行った。二次抗体はポリマー試薬 EnVision™ FLEX HRP (Dako) を利用し、反応時間は 30 分、室温条件で行った。その後、DAB 色素原基質 EnVision™ FLEX SUBSTRATE BUFFER (Dako) を用い反応時間 5 分、室温条件で標識した。さらに切片に H&E 染色を行った。また、患者の膵癌 TMA 標本にても同様に CEA の組織免疫染色を行った。

1 2) 疫組織化学染色評価法

膵癌患者のTMA標本におけるCEA発現の評価は、膵癌細胞の細胞膜のみの染色強度に焦点を当て、最も大きな面積を占めている染色強度でCEA-、CEA+、CEA++の3群に分けた(図9)。また、膵癌CEA発現のheterogeneityの評価として、TMAの1サンプル中における全腫瘍に対するCEA染色膵癌細胞の面積割合を評価し、0%、0-25%、25-50%、50-75%、75-100%に分類した(図10)。面積の評価は顕微鏡の解析アプリケーション(KEYENCE, Osaka, Japan)を使用して行った。

オルソトピック膵癌マウスモデルから抽出した膵癌組織において、抗CEA-CAR-Tの治療効果と病理所見の関連を調べるために、腫瘍の内部(Center)と周囲(Peritumor)の領域から1視野0.25mm²の範囲で無作為の5視野からそれぞれCD8+リンパ球をカウントし、その中央値を用いた(図11)。

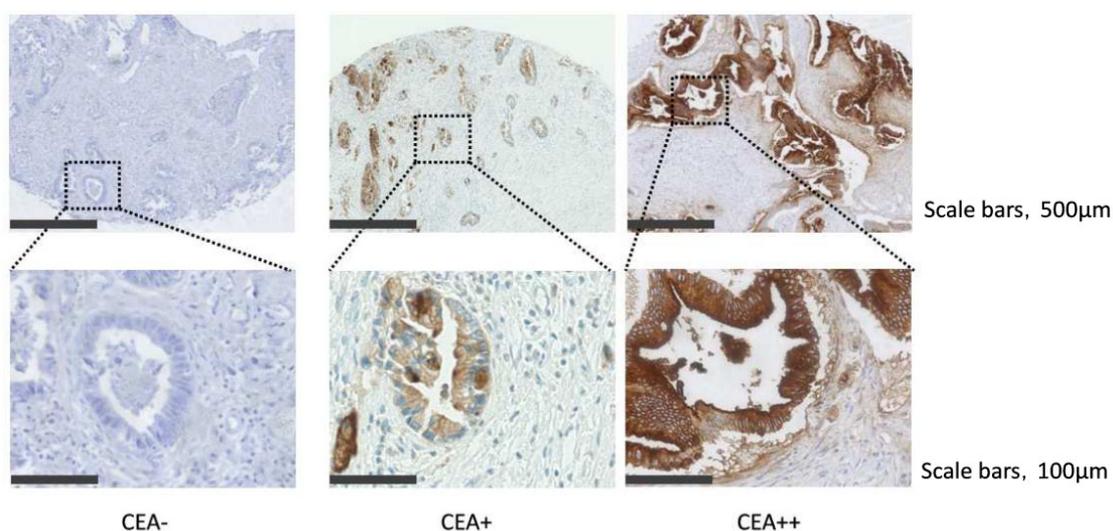


図9 膵癌細胞のCEA染色強度の分類

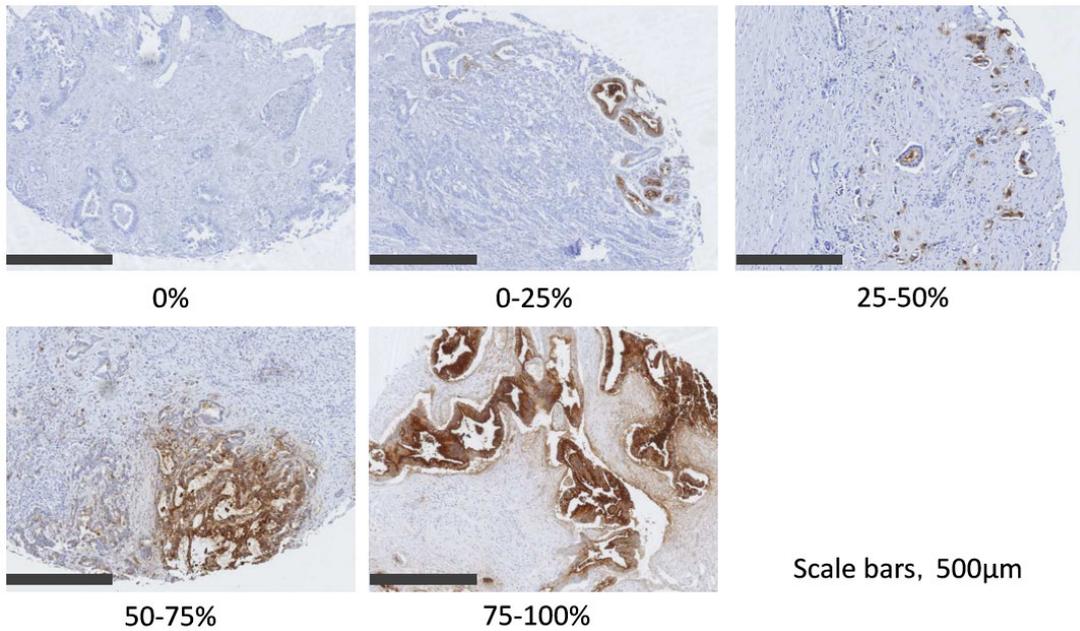


図 10 膵癌細胞の CEA 染色面積による heterogeneity の評価

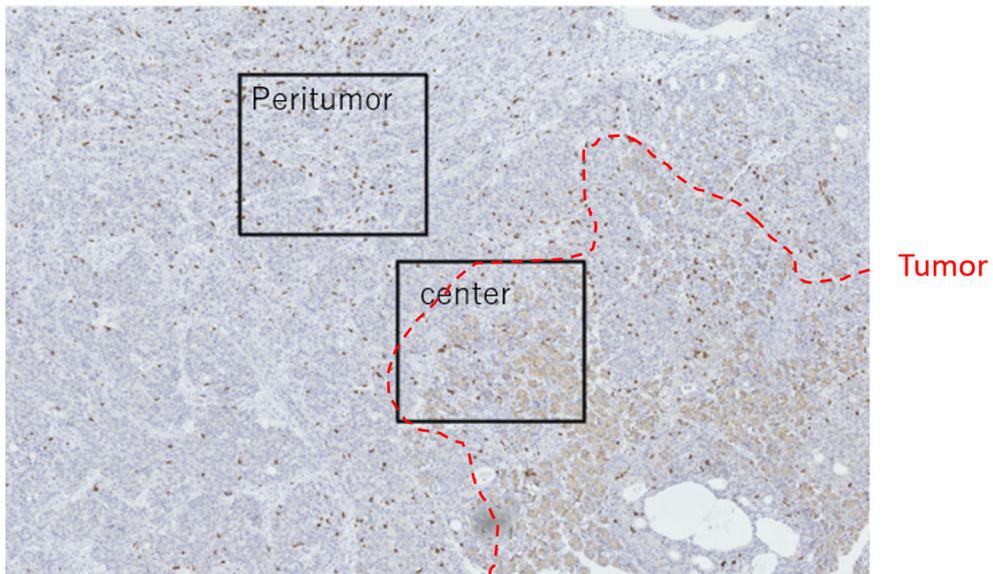


図 11 CD8+リンパ球のカウント

膵癌の内部(Center)と周囲(Peritumor)における1視野/ 0.25mm^2 のCD8+リンパ球をそれぞれ無作為に5視野でカウントした。

1.4) 統計学的解析

データは平均値±SEMで表し、エラーバーを示した。すべての統計学的検討は JMP pro13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて計算した。各アッセイの有意差は対応のないスチューデント t 検定を用いた。相関分析はピアソンの相関係数 (R) を用いた。3 つ以上の対応のないグループ間の差を比較するために Kruskal-Wallis 検定を使用した。クロス分割表における変数間の統計意はフィッシャーの直接確率検定を使用した。すべての検定において $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと定義し、 $0.4 \leq R < 0.7$ を相関あり、 $0.7 \leq R$ を強い相関ありとして定義した。

実験結果

1) 各膵癌細胞株および胃癌細胞株の細胞膜表面 CEA 発現の評価(図 12)

ヒト膵癌細胞株の MIA PaCa-2、PANC-1、Capan-1、AsPC-1、PK-9、BxPC-3、SUIT-2、KP1N、PCI-66 の 9 種類、対照群としてヒト胃癌細胞株 MKN45 における細胞膜表面 CEA の発現を免疫組織染色、Western blotting (W-B)、FCM により定量した(図 12)。FCM では CEA 抗体とアイトタイプコントロール抗体との MFI の差(Δ MFI)を用いて CEA 発現を評価し、QIFIKIT を用いて CEA 分子数を算出した。また予備実験としてヒト胆道癌細胞株の RBE、HuCC-T1、HuH28、TFK-1、SSP-25 の 5 種類でも同様の解析(FCM は positivity のみの解析)を行った(図 13)。W-B による細胞 CEA の評価では、Capan-1 で FCM の結果よりも高い CEA タンパク質が検出された。MFI から算出した CEA 分子数から、BxPC-3 と MKN45 を CEA 高発現細胞株、Capan-1、AsPC-1、PK-9 を CEA 中発現細胞株、MIA PaCa-2、PANC-1、SUIT-2、KP1N、PCI-66 を CEA 低発現細胞株として定義した。

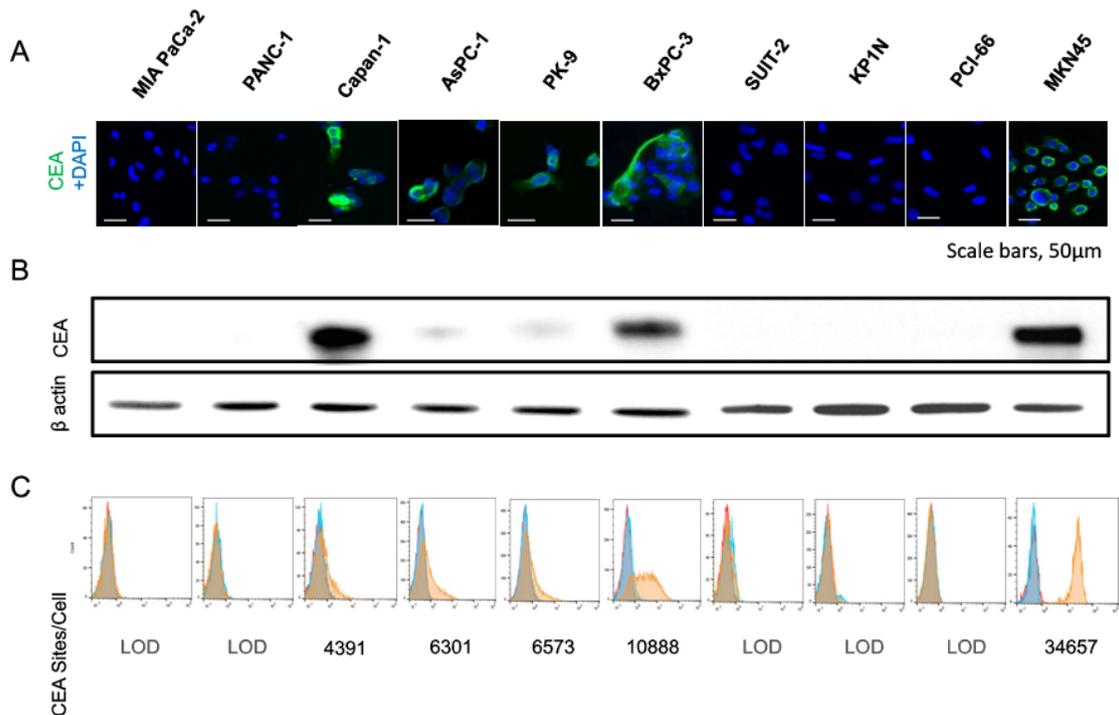


図 12 膵癌細胞株と胃癌細胞株の CEA 発現評価

A: 免疫組織染色。B: Western blot。C: Flowcytometry、CEA 分子数。ヒストグラム橙-Positive、青-Negative、赤- Isotype control。

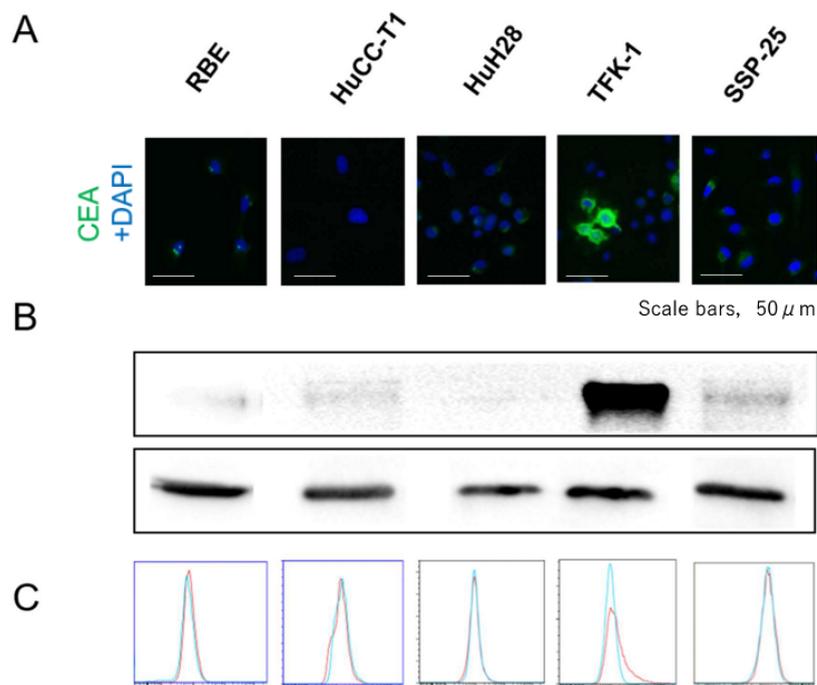


図 13 胆道癌細胞株の CEA 発現評価

A: 免疫組織染色。B: Western blot。C: Flowcytometry。ヒストグラム赤-Positive、青-Negative。

2) 膵癌細胞株による sCEA の分泌は CEA 発現と相関する (図 14)

CEA は glycosylphosphatidylinositol (GPI) 部分によって細胞膜に固定されており、特異的ホスホリパーゼ C で切断され、sCEA となり分泌される。腫瘍の進行と転移における sCEA の機能的役割はまだ確立されていないが、sCEA つまり血清 CEA の存在が抗 CEA-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果と競合する可能性が考えられるため、培養液中に分泌される sCEA を ELISA で測定した。また細胞膜表面 CEA 分子数と sCEA 分泌の関係性を解析した (図 14)。各培養細胞を 10cm ディッシュに 1×10^6 個撒いて 72 時間インキュベートした培養液を解析した結果、sCEA 分泌は細胞膜表面 CEA 分子数と相関を認めた (相関係数 $R=0.668$)。

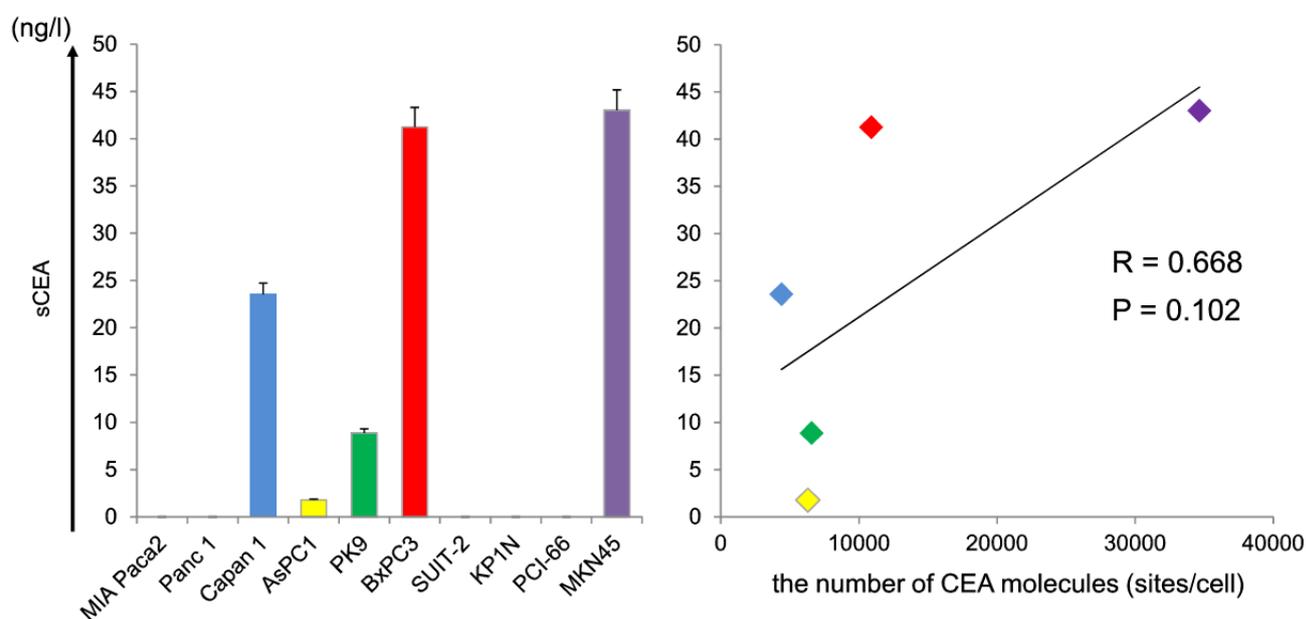
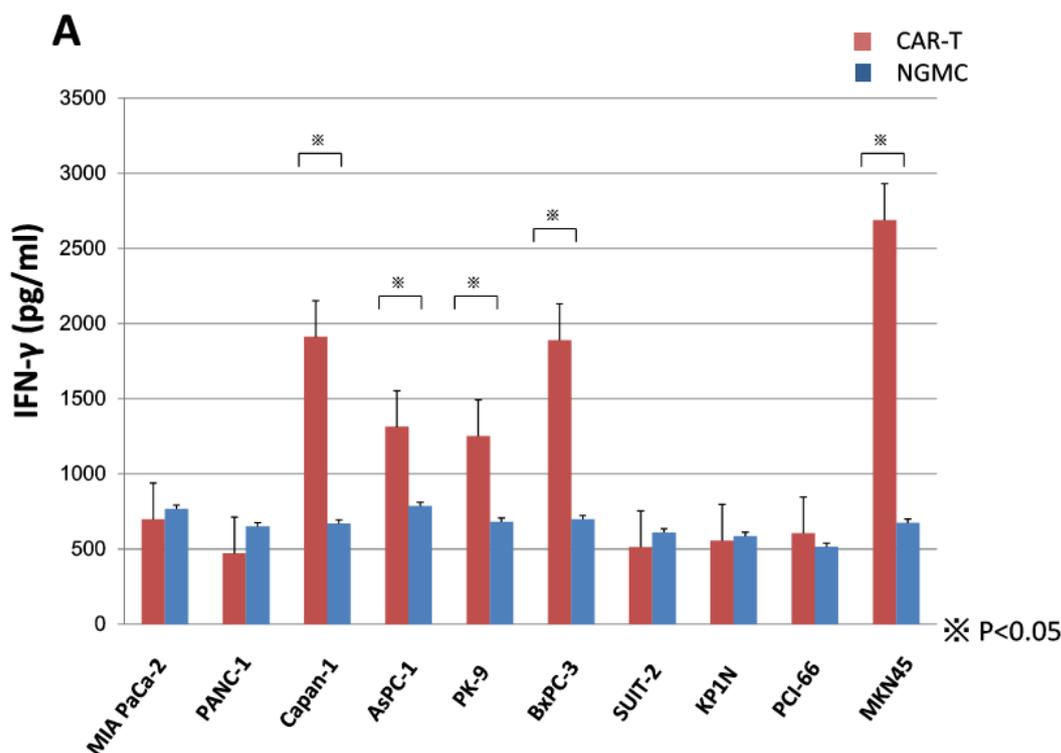


図 14 sCEA 分泌と細胞膜 CEA 発現数の相関

3) ELISAによりCEA陽性細胞に対する抗CEA-CAR-Tの抗腫瘍効果が確認された(図15)

CEA陽性細胞株に対する抗CEA-CAR-Tの抗腫瘍効果を検証するため、抗CEA-CAR-T細胞を膵臓癌細胞株、胃癌細胞株と共にインキュベートして*in vitro*解析を行った。対照群としてNGMCを使用した。ELISA法にてIFN- γ の放出を測定すると、CEA高・中発現細胞株であるCAPAN-1、AsPC-1、BxPC-3、PK-9、MKN45においてIFN- γ の分泌増加に統計学的有意差を認め、他のCEA低発現細胞株では有意差は認めなかった(図15A)。また、このIFN- γ の分泌程度はCEA分子数と強い相関を認めた($R=0.701$)(図15B)。更に、抗CEA-CAR-Tとの共培養の際にリコンビナントCEAを10ng/ml、100ng/ml、1000ng/mlの濃度で加えてsCEAによる競合アッセイを行ったところ、IFN- γ の分泌はsCEAの濃度が10ng/ml、100ng/ml、1000ng/mlのいずれの条件下においても有意な影響を認めなかった(図15C)。



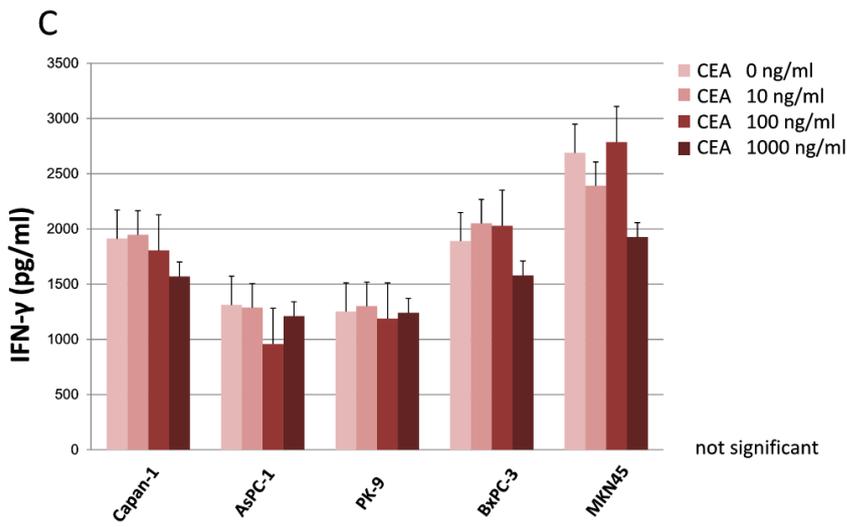
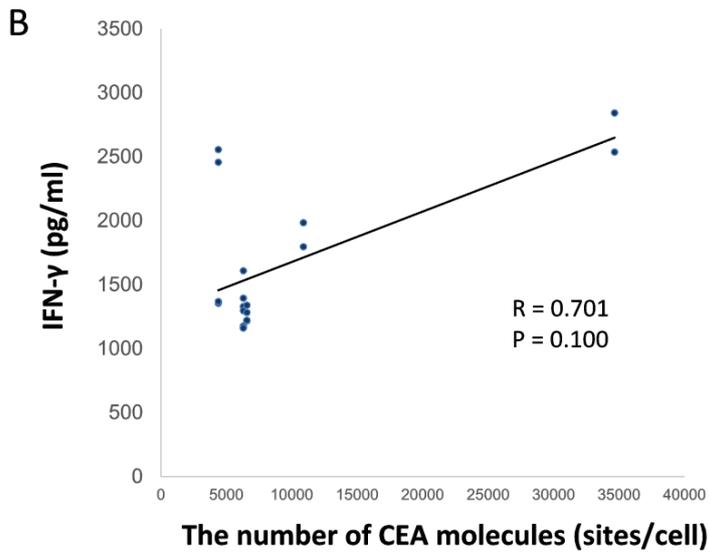


図 15 膵癌細胞株に対する抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍効果の検討; ELISA

※ Control; NGMC 群

4) 細胞毒性アッセイで抗 CEA-CAR-T は CEA 陽性細胞に対して用量依存的に抗腫瘍効果を認めた (図 16)

7-AAD/CFSE を用いた細胞毒性アッセイでは、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示した。CEA 高発現細胞株の BxPC-3 と MKN45 においては用量依存的に有意な細胞障害活性を示したが、中発現細胞株である AsPC-1 と PK-9 では有意差を示さなかった。また、CEA 陰性細胞株では抗 CEA-CAR-T 群で細胞障害活性の差を認めなかった。更に、sCEA 1000ng/ml と高濃度存在下での競合アッセイでは、BxPC-3 と MKN45 で細胞障害活性の有意な減退を認めた (図 16)。

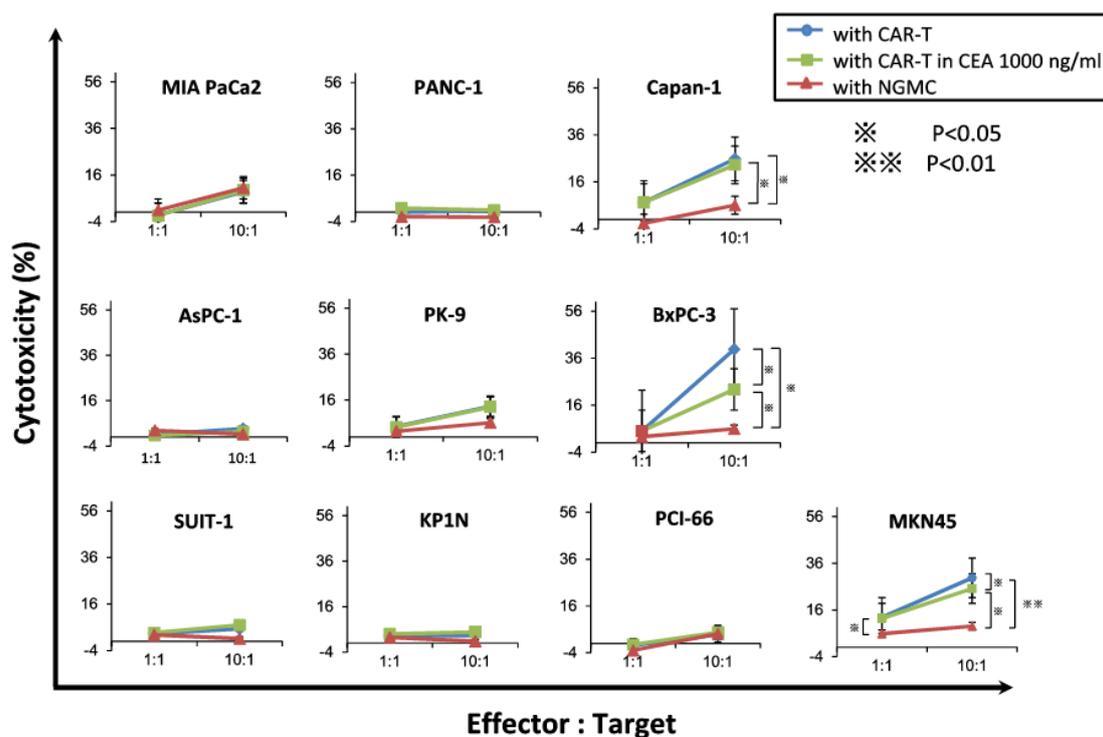


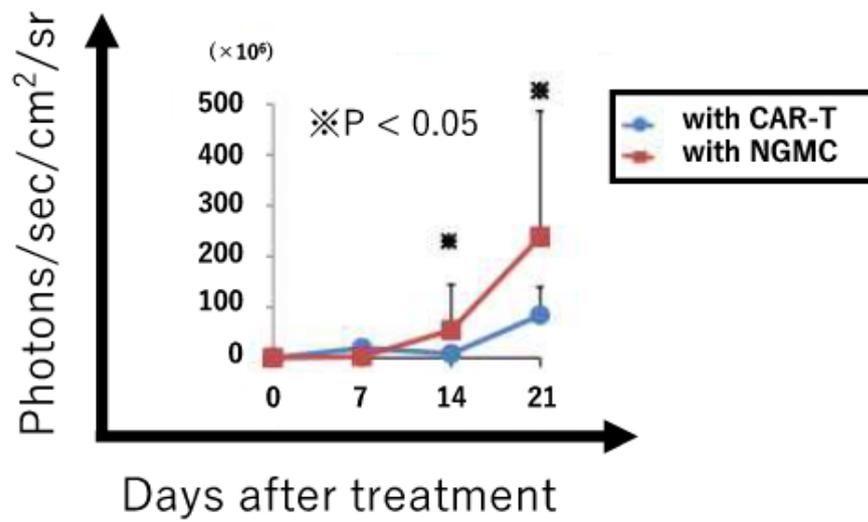
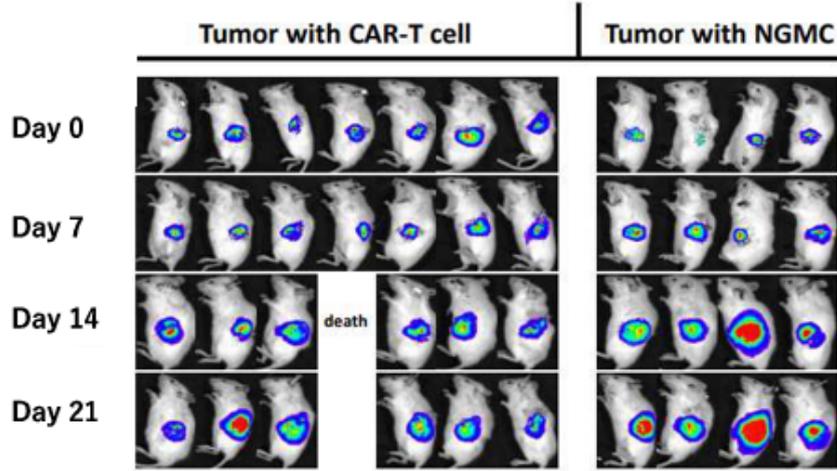
図 16 膵癌細胞株に対する抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍効果の検討; 7-AAD/CFSE assay

5) 抗 CEA-CAR-T 療法は orthotopic xenograft マウスモデルにおいて抗腫瘍効果を認めた (図 17)

In vitro で抗腫瘍効果を認めた膵癌細胞株から CEA 強陽性細胞の BxPC-3、中陽性細胞の PK-9、陰性細胞の PANC-1 を選択し Luciferase 遺伝子を導入して orthotopic xenograft マウスモデルを作製した。治療介入は先述のプロトコール通り施行した。移植後 7 日目 (Day 0) に IVIS イメージングで腫瘍が確立した事を確認し、抗 CEA-CAR-T を尾静脈内注射によって養子移入した。対照群は NGMC の注入をした。抗 CEA-CAR-T 投与の後、腫瘍の Luciferase シグナルの増強は CEA 強陽性細胞である BxPC-3 モデルにおいて Day 14、21 で経時的に有意な抑制傾向を示した。PK-9 モデルでは Day 21 で抗 CEA-CAR-T 投与群の腫瘍シグナル増強が抑制されたが、有意差は無かった (図 17A)。Orthotopic xenograft マウスモデル作製の手術直後、もしくは経過観察中に死亡した個体を数例認めた。また、副次項目として治療介入の前後 (Day 0、21) の血清 CEA の測定を行った。CEA の発現有無に関わらずいずれの細胞株マウスモデルにおいても介入前の血清 CEA はカットオフ値未満であった (図 17B)。これは *in vitro* の競合アッセイの結果を鑑みると、今回のマウス治療実験において血清 CEA が抗 CEA-CAR-T の効果へ影響を及ぼす事はなかったと考えた。治療介入後は BxPC3 マウスの治療群でのみ血清 CEA 値が有意に上昇しており、非治療群で変化はなかった。

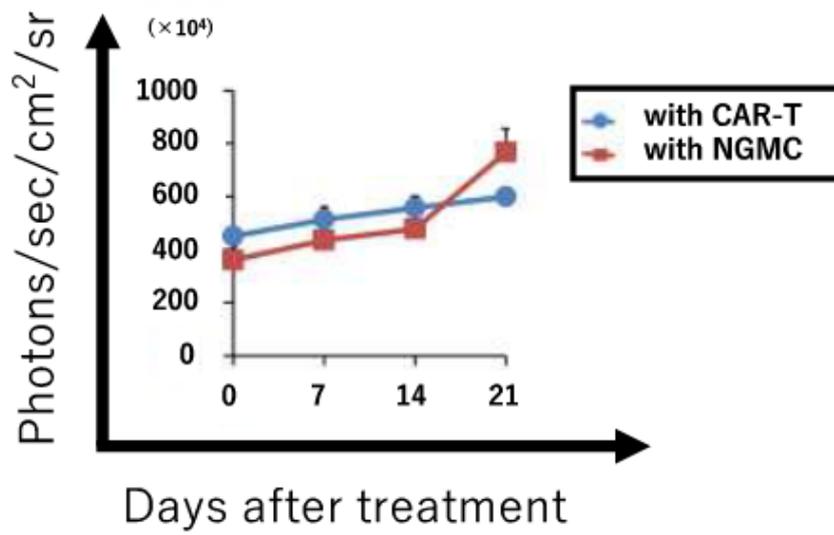
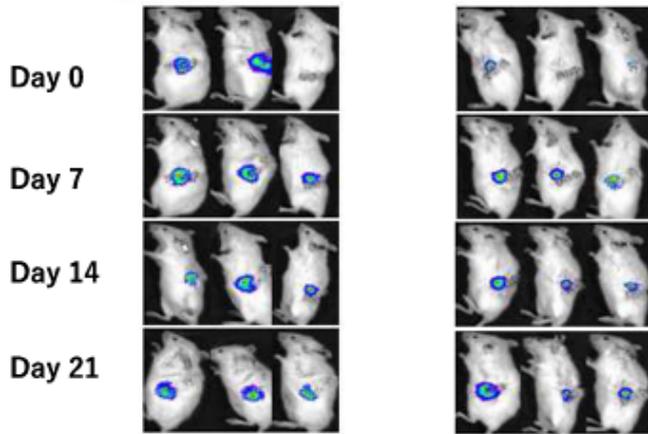
A

BxPC-3 [CEA++]

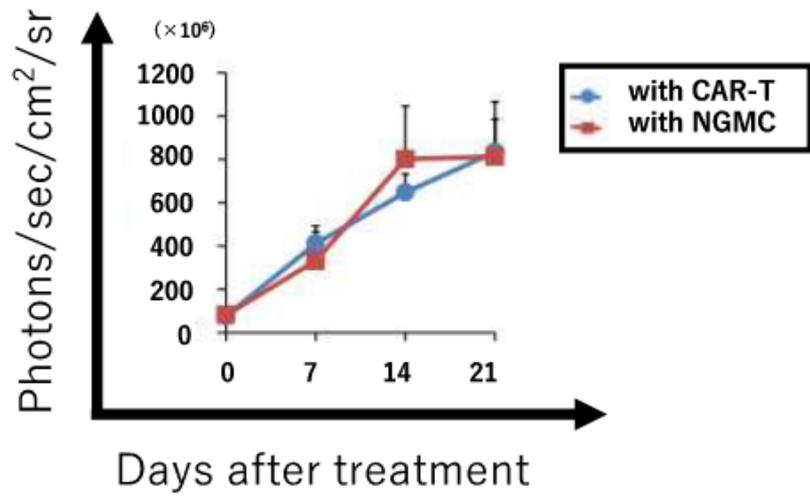
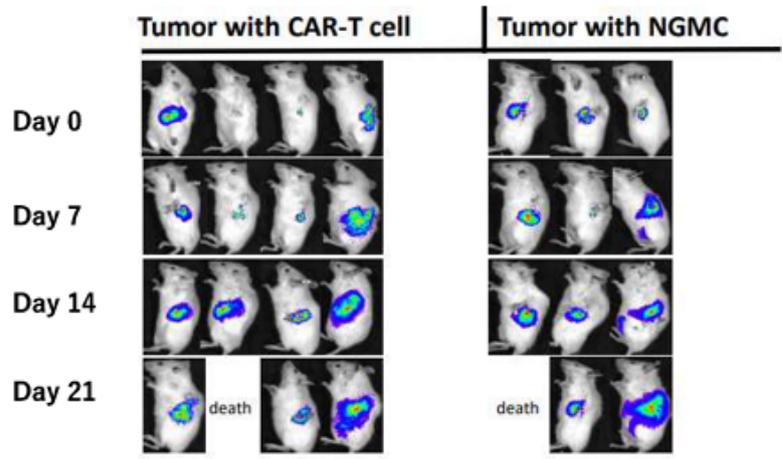


PK-9 [CEA+]

Tumor with CAR-T cell | Tumor with NGMC



PANC-1 [CEA-]



B

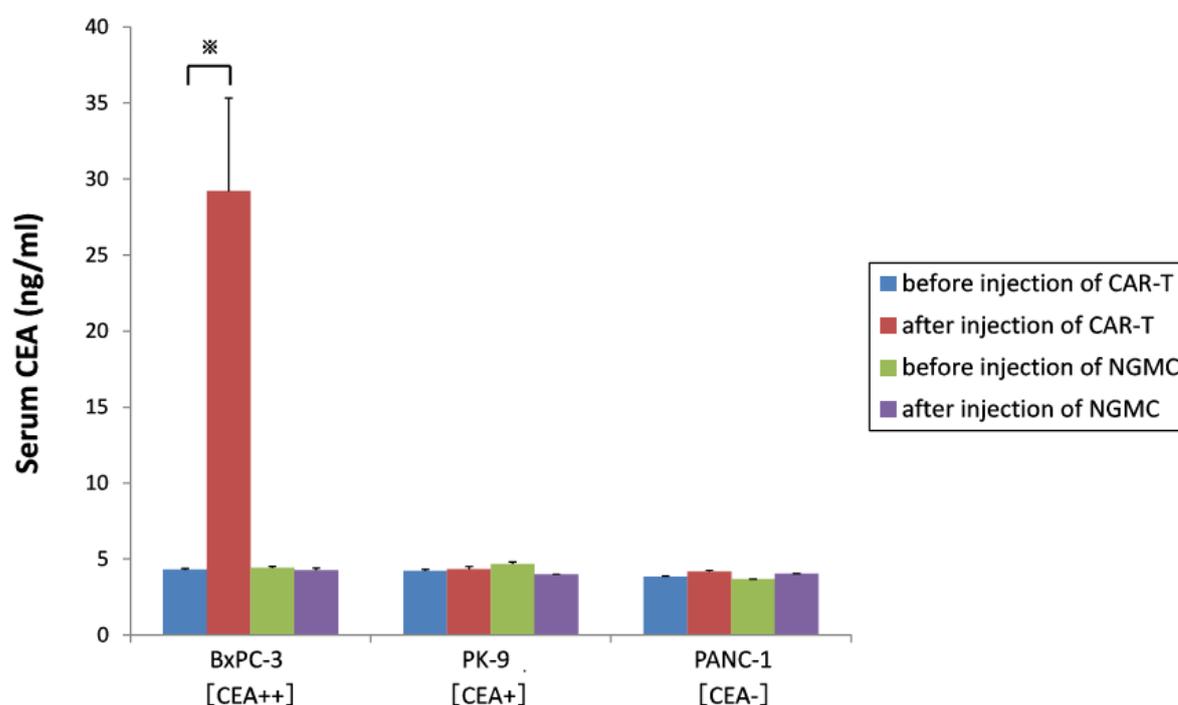


図 17 Orthotopic xenograft マウスモデルへの抗 CEA-CAR-T 治療実験結果

A: BxPC-3-Luc、PK-9-Luc、PANC-1-Luc の orthotopic xenograft マウスモデルに対して抗 CEA-CAR-T 投与を行った。

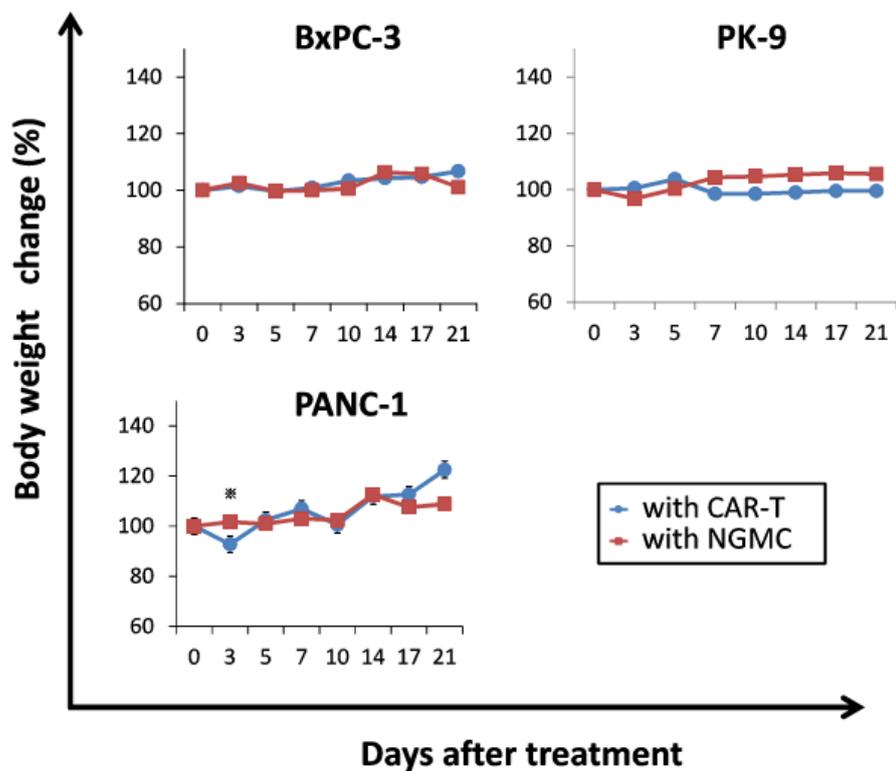
B: 治療前後 (Day 0、21) での血清 CEA を測定した。

※P<0.05

6) 抗 CEA-CAR-T 投与による有意な体重減少や血中サイトカイン上昇は認めなかった (図 18)

抗 CEA-CAR-T 投与による副作用の評価として体重の継続的な変化と血中の炎症性サイトカインを解析した。どのマウスモデルでも治療による体重変化に差異は認めなかった (図 18A)。また、血清サイトカインの評価は代表的な炎症性サイトカインである IFN- γ 、IL6、TNF- α の測定を Day 21 に行った。いずれの群も抗 CEA-CAR-T 治療群の方でサイトカイン放出が高い傾向にあったが、CEA 発現や治療効果の有無による有意な差異は認めなかった (図 18B)。

A



B

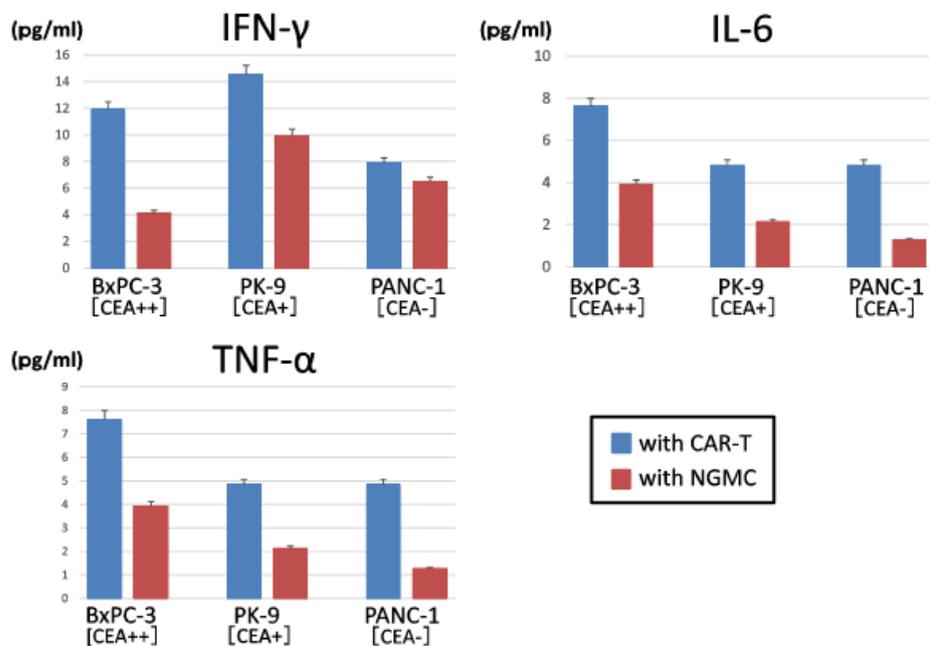


図18 マウスへの抗CEA-CAR-T投与による副作用評価

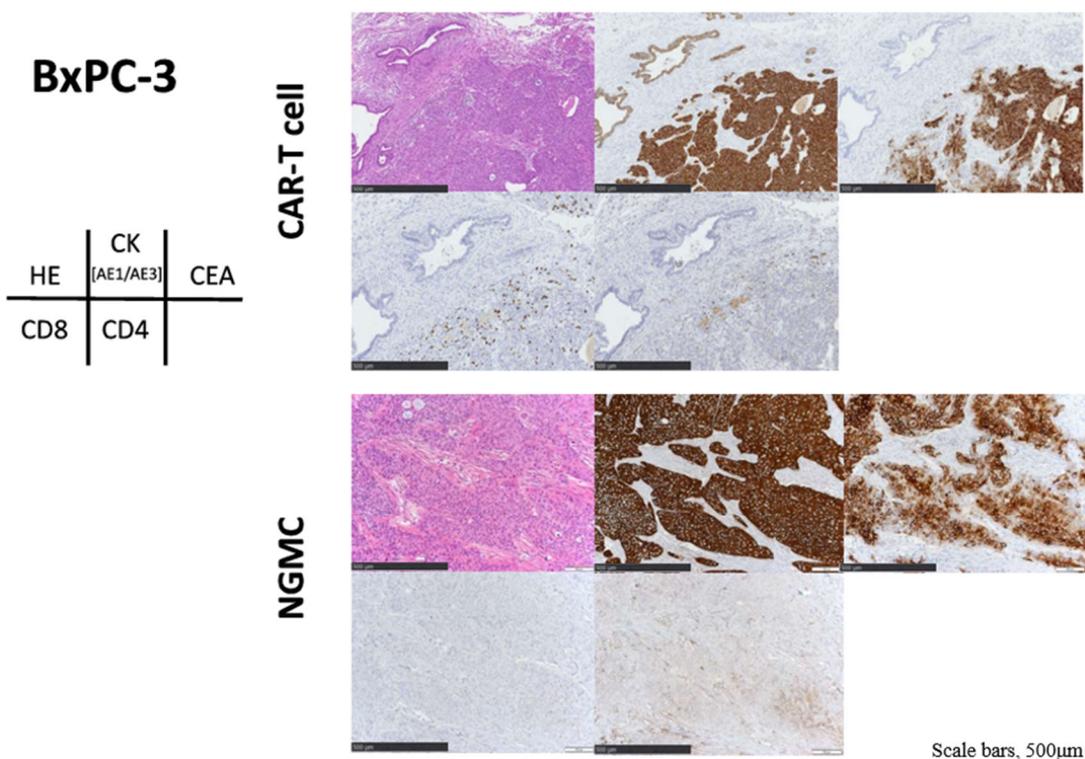
A: 経時的な体重変化。

B: 治療後 (Day 21) の血清サイトカイン測定。

7) 抗 CEA-CAR-T 治療後に移植腫瘍内部への CD8 リンパ球の浸潤を認めた(図 19)

Day 21 にマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出し免疫組織学的染色を行った。腫瘍の局在評価のためサイトケラチン(AE1/AE3)、CEA 発現の評価、CD4 と CD8 リンパ球の染色を行った (図 19A)。BxPC-3 腫瘍の CEA 発現はほぼ腫瘍に一致して認められたが、PK-9 と PANC-1 腫瘍では殆ど認めなかった。CD8 リンパ球は BxPC-3 と PK-9 マウスモデルでの抗 CEA-CAR-T 治療群において腫瘍への浸潤傾向を認めた。PANC-1 腫瘍では NGMC 群において腫瘍への CD8 の浸潤を認める個体があった。NOG マウスを使用しており自家リンパ球は存在しないため、浸潤したリンパ球はいずれも投与したリンパ球である。リンパ球の浸潤と抗腫瘍効果の関連を調べるために、腫瘍の Center と Peritumor の領域に分けて 1 視野 0.25mm^2 の範囲内の CD8 をカウントすると、抗腫瘍効果を認めた BxPC-3 と PK-9 では抗 CEA-CAR-T 群において CD8 浸潤は腫瘍周囲よりも内部で多く認められた。しかし、BxPC-3 においては NGMC 群でも腫瘍周辺・内部に CD8 浸潤を認めた。PANC-1 の抗 CEA-CAR-T 群では殆ど CD8 浸潤を認めなかったが、一方、NGMC 群でのみ浸潤を認めた (図 19B)。

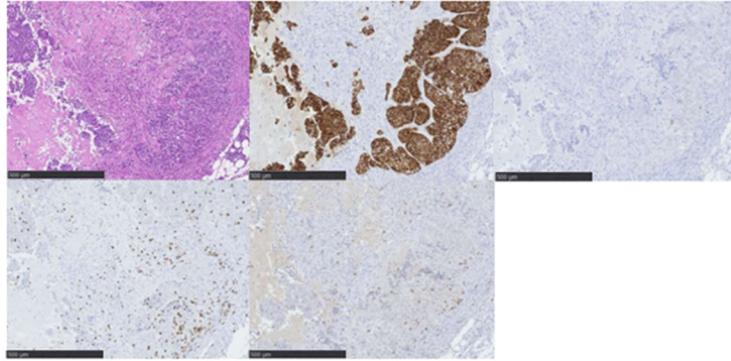
A



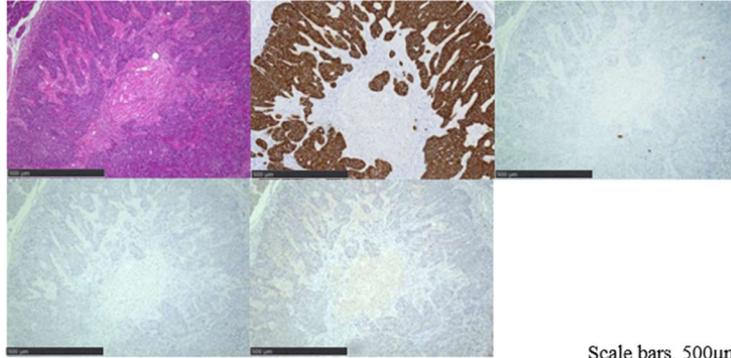
PK-9

HE	CK [AE1/AE3]	CEA
CD8	CD4	

CAR-T cell



NGMC

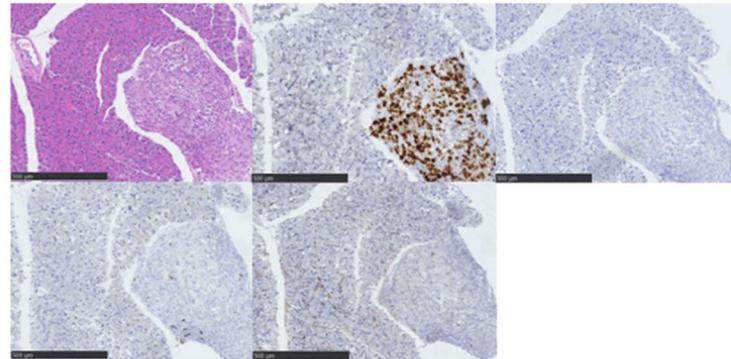


Scale bars, 500µm

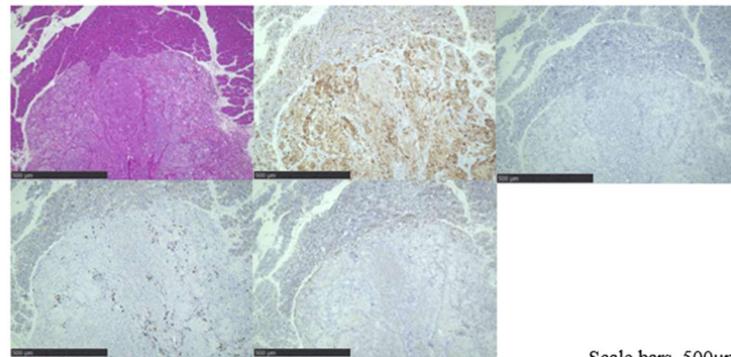
PANC-1

HE	CK [AE1/AE3]	CEA
CD8	CD4	

CAR-T cell



NGMC



Scale bars, 500µm

B

(/ 0.25mm²)

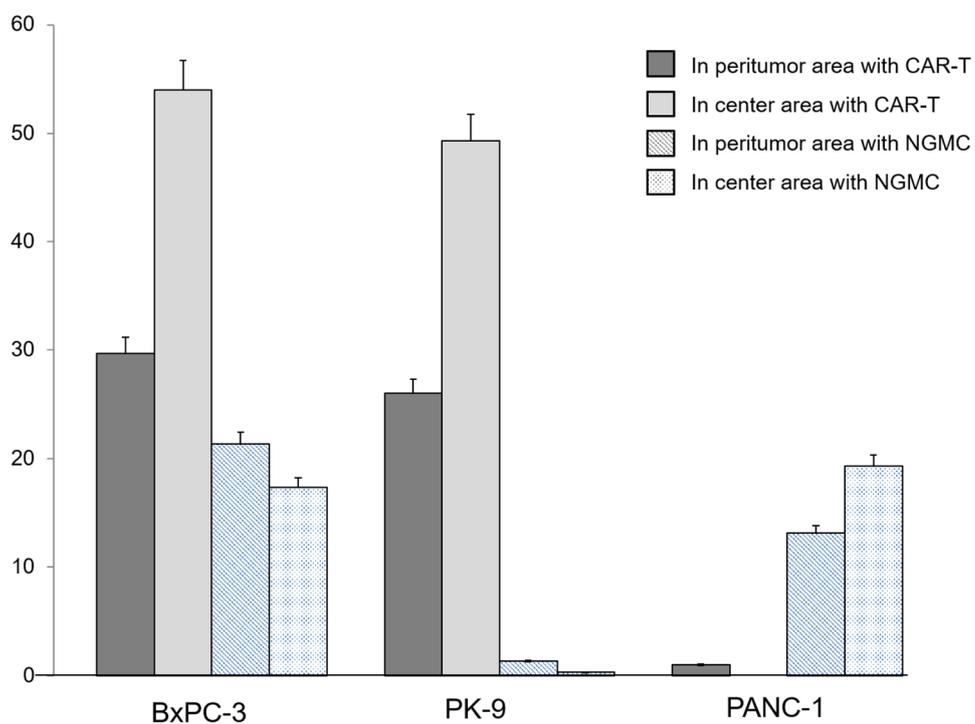


図 19 治療介入後マウスの摘出標本における免疫染色結果

A: 代表的な免疫染色像 (HE、CK、CEA、CD4、CD8)。

B: 各群での center と peritumor の CD8+リンパ球数(1 視野 0.25mm²) の中央値。

8) 膵癌切除症例の患者背景(表 1)

膵癌切除患者 151 名の臨床データと病理 CEA 染色所見をレトロスペクティブに解析した。表 1 に患者背景を示す。男性は 89 名 (58.9%)、女性は 62 名 (41.1%)、年齢中央値は 68 歳、術前血清 CEA は中央値 4.2 ng/ml で陽性率は 55 人 (36.4%) であった。この中からランダムに選択された 22 例の TMA 標本の内訳は男性 12 名 (54.5%)、女性 10 名 (45.5%)、年齢中央値 68.5 歳、血清 CEA 値は中央値 3.95 ng/ml で陽性率は 8 名 (36.4%) であった。TMA 標本における患者選別に偏りはなかった。予備解析で胆道癌 180 名、TMA 標本 28 例の臨床データもまとめた(表 2)。男性は 125 名 (69.4%)、女性は 55 名 (30.6%)、年齢中央値は 69 歳、術前血清 CEA は中央値 3.0 ng/ml で陽性例は 73 名 (40.5%) であった。この中からランダムに選択された 22 例の TMA 標本の内訳は男性 24 名 (85.7%)、女性 4 名 (14.3%)、年齢中央値 72.0 歳、血清 CEA 値は中央値 3.15 ng/ml で陽性例は 7 名 (25%) であった。

表 1 膵癌切除患者の患者背景

n= 151	
Gender	
Male	89 (58.9)
Female	62 (41.1)
Age (years old)	68 (42 - 83)
Serum CEA (ng/ml)	4.2 (0.6 - 212)
< 5	96 (63.6)
≥ 5	55 (36.4)
n= 22	
Gender	
Male	12 (54.5)
Female	10 (45.5)
Age (years old)	68.5 (55 - 82)
Serum CEA (ng/ml)	3.95 (1.5 - 26.4)
< 5	14 (63.6)
≥ 5	8 (36.4)

Data were presented values as n (%) or median (range).

上：全患者

下：Tissue Microarray 患者

表2 胆道癌切除患者の患者背景

n= 180	
Gender	
Male	125 (69.4)
Female	55 (30.6)
Age (years old)	69 (30 - 86)
Serum CEA (ng/ml)	3.0 (0.6 - 442.8)
< 5	107 (50.5)
≥ 5	73 (40.5)
n= 28	
Gender	
Male	24 (85.7)
Female	4 (14.3)
Age (years old)	72 (45 - 83)
Serum CEA (ng/ml)	3.15 (1.3 - 126.2)
< 5	21 (75)
≥ 5	7 (25)

Data were presented values as n (%) or median (range).

上: 全患者

下: Tissue Microarray 患者

9) 膵癌 TMA 標本で CEA 発現強度と heterogeneity との間に有意な相関関係を認め
た(図 20、表 3)

TMA 標本の CEA 染色で染色強度を先述の 3 段階、heterogeneity を 5 段階に評価して
それぞれに割り当てた。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(図 20)。一方、術前血清 CEA または CEA 染色強度と heterogeneity の相関につ
いて解析すると、heterogeneity は血清 CEA 陽性との間には相関関係を認めなかったが、
CEA 染色強度との間に有意な相関関係を認めた(表 3)。また、予備解析で胆道癌
TMA 標本でも同様の解析を行ったところ、術前値と CEA 染色強度に有意な相関関係
は認めず(図 21)、heterogeneity は血清 CEA 陽性と CEA 染色強度との間に有意な相関関
係を認めた(表 4)。

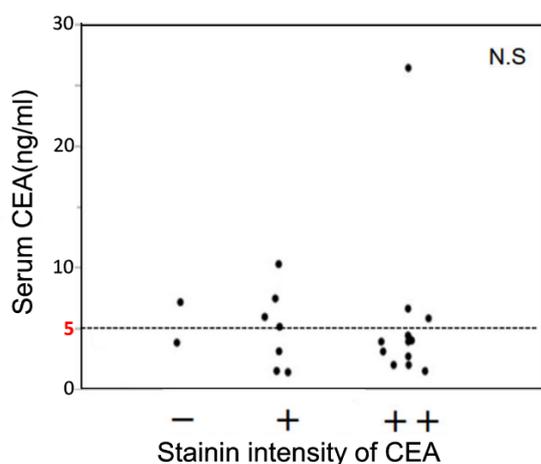


図 20 術前血清 CEA 値と標本の CEA 染色強度の相関

表3 Heterogeneity と血清 CEA、CEA 染色強度

	Heterogeneity (%)					p Value
	0	0<,≤25	25<,≤50	50<,≤75	75<,≤100	
Serum CEA (ng/ml)						0.731
<5	1	1	1	2	10	
≥5	1	0	1	0	5	
Intensity						<0.001*
CEA-	2	0	0	0	0	
CEA+	0	1	2	2	2	
CEA++	0	0	0	0	13	

Values are n.

* Significantly different.

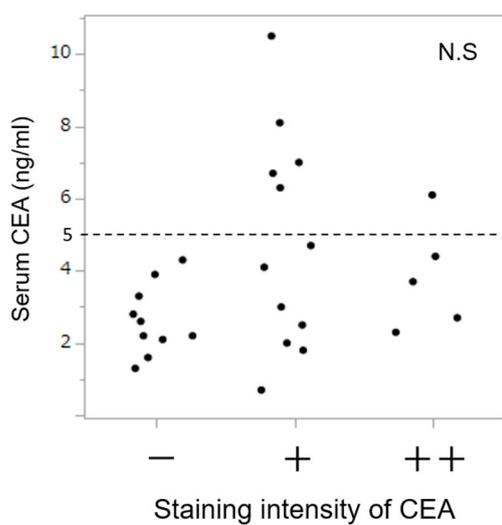


図21 胆道癌患者における術前血清 CEA 値と標本の CEA 染色強度の相関

表 4 胆道癌患者における heterogeneity と血清 CEA、CEA 染色強度

	Heterogeneity (%)					p Value
	0	0<,≤25	25<,≤50	50<,≤75	75<,≤100	
Serum CEA (ng/ml)						<0.05*
<5	10	4	0	1	6	
≥5	0	0	2	1	4	
Intensity						<0.001*
CEA-	10	0	0	0	0	
CEA+	0	4	2	1	5	
CEA++	0	0	0	1	5	

Values are n.

* Significantly different.

考察

CAR-T療法は、白血病やリンパ腫などの血液腫瘍の患者に顕著な治療効果が証明され、抗CD19-CAR-T製剤であるKymriah (Novartis)が2017年にアメリカ食品医薬品局FDAによって承認された。CAR-T療法は血液腫瘍で効果がある一方で、固形腫瘍においては未だ臨床応用へは至っていない。この理由としては、固形腫瘍特有の微小環境による免疫抑制機構の存在や、CAR-Tが腫瘍へ遊走しづらい事、腫瘍の標的抗原の不均一性 (heterogeneity) などが挙げられている(Newick et al, 2016; Wendell A. Lim, 2017; (Jindal et al, 2018a; Jindal et al, 2018b; Majzner and Mackall, 2018; Martinez and Moon, 2019; De Vito et al, 2020; Tian et al, 2020)。固形腫瘍におけるこうした課題を克服するために、複数の抗原を認識するCAR (Zhang et al., 2018) や抗PD-1-scFvを産生する能力を備えたCAR (Nakajima et al, 2019) などの新規開発、IL-7やPD-1阻害剤の併用投与など (Markley and Sadelain, 2010; Moon et al, 2014) 様々な検証が行われている。近年の報告では、転移性去勢抵抗性前立腺癌に対する抗PSMA-CAR-Tによる第I相臨床試験が施行され、治験患者13人中5人で治療効果を認めたという報告 (Vivek et al, 2022) があり、固形腫瘍に対するCAR-T療法の利用への期待が更に高まっている。

今回、本研究では最も致命的な悪性腫瘍の1つである膵癌に注目し、CAR-T療法の標的抗原として、膵癌に高率で発現しているCEA (Gansauge S, et al, 1996) に注目した。ここで、遺伝子改変T細胞輸注としてはもうひとつ癌抗原特異的T細胞受容体 (T cell receptor therapy: TCR) を用いたTCR-T療法が開発されており、2011年に抗CEA-TCR-T療法による大腸癌肝転移の治療実験 (Parkhurst et al, 2011) が行われている。治験患者3人中1人で治療効果を認めたが、全症例で一過性の重篤な大腸炎を発症しており、安全性に重大な課題を残した。これは、正常大腸組織が内因しているCEAタンパクから相同性を持つエピトープが産生され、major histocompatibility complex (MHC) による抗原提示された正常細胞に抗CEA-TCR-Tが反応したためと考えられる。一方で、CAR-Tは抗原認識にscFvを利用しているためMHCによる抗原提示を必要とせず、また、正常細胞ではCEAは主に管腔側の膜表面に存在しているため抗CEA-CAR-T輸注では正常細胞は障害されないと考えられる。このように、遺伝子改変T細胞輸注の副作用のひとつであるオフターゲット効果 (Morgan et al, 2010) を回避するために、CAR-T療法においてCEAを標的抗原とする事は非常に有用であると考えた。

初めに、標的細胞株の抗原CEAの発現レベルと抗CEA-CAR-Tの抗腫瘍効果の関係について解析を行った。各々の膵癌細胞株のCEA発現を免疫蛍光染色、W-B、FCMで評価し、それらに対する抗CEA-CAR-Tの直接的または間接的な機能アッセイを *in vitro* で行った。細胞膜表面CEA発現は、Capan-1においてFCMよりもW-Bの結果で発現が多いという結果となったが、この不一致は、W-Bでは細胞内因性CEAタンパ

ク質も検出され、標的抗原としての細胞膜表面 CEA よりも過大評価になったためと推測される。このような事から、細胞膜表面 CEA 発現の評価を標準化するためには FCM の結果が適していると考えた。FCM による細胞膜表面 CEA 分子数の解析結果から各細胞株を CEA 高発現・中発現・低発現群に分け、それぞれに抗 CEA-CAR-T を共培養させると、標的 CEA 抗原が高発現な細胞において有意に抗腫瘍効果を示した。続いてそれぞれの群から代表の細胞株を選択し、Nog マウスへ同所移植にて *orthotopic xenograft* マウスモデルを作成し *in vivo* で治療実験を行った。このモデルは腫瘍の局所増殖、血管・リンパ管侵襲、転移臓器での血管外遊出、播種・増殖からなる転移の全過程などを臨床例と同様に表現しているとされており (Erstad et al, 2018)、このモデルを使用する事によって臨床に類似した病態の条件下での検証が行えたと考える。抗 CEA-CAR-T の単回静脈内投与をしたこれらのマウスは、CEA 高発現の BxPC-3 を用いたモデルにおいて Day 14、21 で腫瘍増大の有意な抑制を示した。中発現細胞株の PK-9 モデルでは、Day 21 で抗 CEA-CAR-T 投与群で腫瘍シグナル増強が軽度抑制されていたが有意差は無かった。これらは抗 CEA-CAR-T による膵癌の実質的な退縮を示していると考えられ、抗 CEA-CAR-T 輸注は標的 CEA 抗原発現量が高い細胞ほど抗腫瘍効果を示す事が示唆された。これまで、固形腫瘍における CAR-T 療法、例えば HER2 や *mesothelin* を標的抗原とした研究 (O'Hara et al, 2015; Feng et al, 2018) では、治療実験を行う際の抗原発現の評価として病理組織学的な染色陽性率でカットオフ値を設定して治療実験がされているが、抗腫瘍効果と抗原発現程度の相関関係についての報告はなかった。他の抗 CEA-CAR-T 研究 (Kenanova et al, 2011; Katz et al, 2015; Wang et al, 2016) においても抗原発現量と抗腫瘍効果の関係については言及されておらず、本実験の結果は、CAR-T 療法の抗腫瘍効果を予測するための新たなカットオフを定める一助になる可能性がある。PK-9 モデルにおいては、摘出標本の CEA 染色では殆ど陽性細胞を認めず、それ故に抗腫瘍効果が乏しかった可能性を考えるが、このようにシャーレでの培養 (二次元培養) と生体内では細胞の極性変化や遺伝子発現パターンの変化により細胞株の形態や増殖率などが変化する可能性が知られており (Meng, 2010; Lee et al, 2013; Luca et al, 2013)、臨床応用への課題の 1 つである。 *In vivo* での用量依存性の検証については今後の課題であり、CAR-T 投与量に伴った有害事象についての観察も今後必要と考える。病理学的所見では、摘出標本の病理学的染色で認めた浸潤リンパ球は、Nog マウスを使用している事から輸注した CAR-T または NGMC に由来するが、腫瘍への CD8+T 細胞浸潤の数は抗腫瘍効果の結果と有意な相関はなかった。パーフォリンやグランザイムなどの細胞傷害性物質で各浸潤リンパ球を染色する事で、腫瘍環境内の抗原発現レベルに応じてクラスター化した CD8+T 細胞の機能変化をより適切に評価できる可能性があり、今後の課題である。

また、血清 CEA が CAR 受容体を遮断する可能性 (Gross G, 1995; Eshhar Z, et al, 1996) に

ついて、実際に sCEA の存在が抗 CEA-CAR-T の細胞毒性活性を妨げるかどうかを検証した。 *In vitro* 実験において、1000 ng/mL の CEA 濃度下では BxPC-3 と MKN45 において細胞毒性活性に有意に抑制を認めたが、100 ng/mL までの CEA 濃度下では活性に有意な影響を与えなかった。細胞膜表面の CEA は GPI アンカーと膜マイクロドメインで膜結合しており、今回使用した CAR は GPI アンカーの一部である F11-39 に対する抗体であるため、細胞膜結合が切断された状態の sCEA に対しては反応性が低い事が理由として考えられる。 *In vivo* 実験において、血清 CEA は治療介入時にいずれの orthotopic xenograft マウスモデルでも差はなく、CEA100 ng/ml 未満であったため抗 CEA-CAR-T の抗腫瘍応答には影響を及ぼさなかったと考える。なお、治療介入により抗腫瘍効果を認めた CEA 強陽性 BxPC-3 マウスにおいてのみ、治療成功後に血清 CEA 値が有意に増加した。この現象は CEA 陽性細胞が抗 CEA-CAR-T による障害を受け、細胞崩壊によって腫瘍内在性の CEA が放出された事を反映したと考える。ここで、実臨床における膵癌患者の血清 CEA は中央値±SD が 3.51±2.34 ng/ml であったという報告 (Terai et al, 2016) があるが、今回のレトロスペクティブな膵癌患者データの検討においても術前血清 CEA 中央値は 4.2 ng/ml であり、既報と同程度であった。ゆえに、実臨床において膵癌患者の血清 CEA の存在が抗 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される。

抗 CEA-CAR-T 療法の安全性についての検討では、CAR-T 療法の課題の一つとして CRS が着目されている (Neelapu et al, 2018)。本研究では CRS の代表的なバイオマーカーとして治療介入前後のマウス血清 IFN- γ 、IL6、TNF- α の測定を行ったが、抗腫瘍効果の有無でいずれの分泌量に有意差は認めなかった。いずれの群も抗 CEA-CAR-T 投与群でサイトカイン放出が高い傾向にあったが、これはわずかな CEA 陽性細胞に対する抗 CEA-CAR-T の反応や、抗原陰性細胞へもリンパ球が非特異的に反応した事と推測している。また、BxPC-3 と PK-9 で IFN- γ の分泌量と抗腫瘍効果に乖離が生じているが、これは近年報告された、腫瘍細胞側の IFN- γ 受容体の変異が CAR-T の効果を阻害する (Rebecca et al, 2022) という事を反映した可能性も考えられた。副作用の評価として、今回これらのサイトカイン放出がマウスに対し有害事象を引き起こしたか否かは定かではないが、少なくとも報告 (Wang et al, 2016) に見られた有意な体重減少は認めなかった。BxPC-3 の治療群で 1 匹、PANC-1 の治療群と NGMC 群で 1 匹ずつの死亡を認めたが、死因は移植手技の侵襲によるものと考えている。実際にマウス作製の予備実験においても手術直後や数日後に死亡した個体を認めた。しかし死亡後の全身的な病理学的分析は行っていないため、抗 CEA-CAR-T 療法による副作用の可能性を完全に排除することはできない。

最後に、将来的な抗 CEA-CAR-T 療法の臨床応用に向けて、治療対象となる膵癌患者を選択するために使用できるバイオマーカーを検索した。結果に示したように、血

清 CEA 濃度は膵癌患者の病理検体の CEA 染色強度との相関を示さなかったためマーカーと見なすことはできなかった。対照的に、膵癌患者の病理標本の CEA 染色強度と CEA 陽性細胞の heterogeneity の評価は相関していた。実際に、膵癌は腫瘍内で分子レベル、ゲノムレベルの heterogeneity の存在が知られており (Behr et al, 1996; Cros et al, 2018)、膵癌が難治性疾患と言われている要因の 1 つである (Yao et al, 2020)。しかし、免疫組織学的な染色性の不均一性については体系的な報告がされていない。今回の検討から、CEA 染色強度が強い症例は CEA 陽性細胞の heterogeneity も低いと考えられるため、外科的または生検標本の CEA 染色強度を使用して抗 CEA-CAR-T 療法の適応膵癌症例を選択することができる可能性がある。染色強度についての評価を更に標準化するにはコンパニオン診断の開発が有用な可能性があり、さらに、近年ではリキッドバイオプシーにより腫瘍内の heterogeneity によって引き起こされるサンプリングバイアスを排除できる事が考えられている (Vorstman et al, 2015; Oxnard et al, 2016)。これらを組み合わせる事は、膵癌患者の抗 CEA-CAR-T 療法の治療管理において重要な新しいアプローチとなる可能性がある。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

- ・抗 CEA-CAR-T は、*in vitro* の実験において細胞膜 CEA が高発現の膵癌細胞株に対して有意な抗腫瘍効果を認めた。また抗 CEA-CAR-T の用量依存性も示唆された。
- ・膵癌 *orthotopic xenograft* マウスモデルにおける *in vivo* の実験で、抗 CEA-CAR-T 輸注は CEA 強陽性膵癌に対して有意な腫瘍増殖の抑制を示し、有意な体重減少や血中サイトカインの上昇は認めなかった。
- ・膵癌患者 TMA 標本の解析から、検体の CEA 染色強度と *heterogeneity* の程度に相関を認めた。

② 新知見の意義・今後の展望

本研究の結果から、CEA を標的抗原とする CAR-T 療法は、膵癌に対して有用で安全な治療である可能性が示唆された。さらに、標本の病理学的 CEA 染色の程度の評価は、抗 CEA-CAR-T 療法の膵癌症例への将来的な臨床応用における患者選択の指標となり得る。今後、臨床応用に向けた研究を進めることで、抗 CEA-CAR-T 療法が膵癌治療においてこれまでにない画期的な治療法となることが期待される。

③ 今後の課題

抗 CEA-CAR-T 療法の膵癌症例への臨床応用が最終的な目標である。そのためには、患者から得た初代培養細胞を用いた *ex vivo* での治療実験や、*in vivo* における抗 CEA-CAR-T の用量依存性と安全性について検証する必要がある。また、固形腫瘍において挙げられている CAR-T 療法の様々な課題を克服するために更なる検証も引き続き必要である。たとえば、CEA と *mesothelin* など複数の抗原を標的とする CAR-T や、サイトカインやケモカイン産生能を有する CAR-T など、CAR 遺伝子自体の改良である。他には、免疫チェックポイント阻害剤や腫瘍溶解性ウイルスなどの併用投与による治療効果の検証、動脈注射や腫瘍内注射など CAR-T の投与経路による治療効果の *validation* などが考えられる。

また、臨床応用へ向けた患者選択のバイオマーカーの更なる探索も課題である。ひとつには、本研究より得られた CEA 染色強度の評価を更に標準化するためにはコンパニオン診断の開発が有用な可能性がある。さらには、近年ではリキッドバイオプシーにより腫瘍内の *heterogeneity* の問題を克服できる事が期待されており、これらを組み合わせたアプローチの検証も課題である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室 II 平野 聡 教授に深く感謝致します。

本研究において、多大なご指導をいただいた北海道大学病院 消化器外科 II 土川 貴裕 診療准教授、学位論文作成にあたりご助言を頂きました北海道大学病院 消化器外科 II 武内 慎太郎 先生、病理学解析において御協力をいただきました北海道大学病理部ゲノム・コンパニオン診断研究部 畑中 豊 特任准教授に深く感謝いたします。さらに CAR 遺伝子の開発・提供、抗 CEA-CAR-T 作製手法等について多大なご支援ご指導をいただいた三重大学大学院医学系研究科 故 珠玖 洋 特定教授、加藤 琢磨 准教授、王 立楠 助教に深く感謝いたします。

最後に、本研究を支えてくださった北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室 II の全ての皆様に心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Ahmed, N., Brawley, V.S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C., Liu, E., Dakhova, O., Ashoori, A., Corder, A., et al. (2015) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)–Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 33, 1688-1696.

Beatty, G.L., O'Hara, M.H., Lacey, S.F., Torigian, D.A., Nazimuddin, F., Chen, F., Kulikovskaya, I.M., Slulen, M.C., McGarvey, M., Nelson, A.M., et al. (2019) Activity of Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor T cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology* 155, 29-32.

Behr, T.M., Sharkey, R.M., Juweid, M.I., Dunn, R.M., Ying, Z., Zhang, C.H., Siegel, J.A., Gold, D.V. and Goldenberg, D.M. (1996) Factors influencing the pharmacokinetics, dosimetry, and diagnostic accuracy of radioimmunodetection and radioimmunotherapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors. *Cancer Res* 56, 1805-1816.

Berger, R., Yehudar, R.R., Slama, G., Landes, S., Kneller, A., Leiba, M., Michowitz, M.K., Shimoni, A. and Nagler, A. (2008) Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* 14, 3044-3051.

Brahmer, J.R., Drake, C.G., Wollner, I., Powderly, J.D., Picus, J., Sharfman, W.H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T.M., McMiller, T.L., et al. (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28, 3167-3175.

Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarasoff, P., et al. (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 15, 2403-2413.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouam, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Bourgade, S., Fouchardière, C., et al. (2011) FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 364, 1817-1825.

Cros, J., Raffenne, J., Couvelard, A. and Poté, N. (2018) Tumor geneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology* 85, 64-71.

Denk, H., Tappeiner, G., Eckerstorfer, R., Holzner, J. H. (1972) Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation. *Int J cancer* 10, 262-273.

Erstad, D.J., Sojoodi, M., Taylor, M.S., Ghoshal, S., Razavi, A.A., O'Regan, K.A., Bardeesy, N., Ferrone, C.R., Lanuti, M., Caravan, P., et al. (2018) Orthotopic and heterotopic murine models of pancreatic cancer and their different responses to FOLFIRINOX chemotherapy. *Dis Model Mech* 11, dmm034793.

Eshhar, Z., Bach, N., Fitzer-Attas, C.J., Gross, G., Lustgarten, J., Waks, T. and Schindler, D.G. (1996) The T-body approach : potential for cancer immunotherapy. *Springer Semin Immunopathol* 18, 199-209.

Feng, K., Liu, Y., Guo, Y., Qiu, J., Wu, Z., Dai, H., Yang, Q., Wang, Y. and Han W. (2018) Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell* 9, 838-847.

Girgis, M.D., Olafsen, T., Kenanova, V., McCabe, K.E., Wu, A.M. and Tomlinson, J.S. (2011) Targeting CEA in Pancreas Cancer Xenografts with a Mutated scFv-Fc Antibody Fragment. *EJNMMI Res* 1, 24.

Gross, G. (1995) Chimeric T cell receptors specific to a B-lymphoma idiotype : a model Search results. *Biochem Soc Trans* 23, 1079-1083.

Gansauge, S., Gansauge, F. and Beger, H.G. (1996) Molecular oncology in pancreatic cancer. *J Mol Med* 74, 313-320.

Heyman, B. and Yang, Y. (2019) Chimeric antigen receptor T cell therapy for solid tumors: Current status, obstacles and future strategies. *Cancers* 11, 1-21.

Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., et al. (2013) Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *NEJM* 369, 1691-1703.

- Jindal, V., Arora, E., Masab, M. and Gupta, S. (2018a) Chimeric antigen receptor T cell therapy in pancreatic cancer: from research to practice. *Med Oncol* 35, 84.
- Jindal, V., Arora, E. and Gupta, S. (2018b) Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T cell therapy in solid tumors. *Med Oncol* 35, 87.
- Katz, S.C., Burga, R.A., McCormack, E., Wang, L.J., Mooring, W., Point, G.R., Khare, P.D., Thorn, M., Ma, Q., Stainken, B.F., et al. (2015) Phase I hepatic immunotherapy for metastases study of intra-arterial chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for CEA+ liver metastases. *Clin Can Res* 21, 3149-3159.
- Lee, J.M., Fauceglia, P., Lee, N., Parsanian, L.C., Lin, Y.G., Gayther, S.A. and Lawrenson, K. (2013) A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest* 93, 528-542.
- Lim, W.A. and June, C.H. (2017) The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* 168, 724-740.
- Luca, A.C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.W., Baldus, S.E., Huckenbeck, W., Piekorz, R.P., Knoefel, R.F., et al. (2013) Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS ONE* 8, e59689.
- Majzner, R.G. and Mackall, C.L. (2018) Tumor antigen escape from car t-cell therapy. *Cancer Discov* 8, 1219-26.
- Markley, J.C. and Sadelain, M. (2010) IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood* 115, 3508-3519.
- Martinez, M. and Moon, E.K. (2019) CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol* 10, 128.
- Meng, Q. (2010) Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6, 733-746.
- Moon, E.K., Wang, L.C., Douglas, V., Dolfi, C.B., Wilson, Ranganathan, R., Sun, J., Scholler, K.J., Puré,

E., Milone, M.C., et al. (2014) Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 20, 4262-4273.

Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M. and Rosenberg, S.A. (2010) Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 18, 843-851.

Nakajima, M., Sakoda, Y., Adachi, K., Nagano, H. and Tamada, K. (2019) Improved survival of chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) and tumor-specific T cells caused by anti-programmed cell death protein 1 single-chain variable fragment-producing CAR-T cells. *Cancer Sci* 110, 3079-3088.

Neelapu, S.S., Tummala, S., Kebriaei, P., Wierda, W., Gutierrez, C., Locke, F.L., Komanduri, K.V., Lin, Y., Jain, N., Daver, N., et al. (2018) Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 47-62.

Newick, K., O'Brien, S., Moon, E., Albelda, S.M. (2016) CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med* 68, 139-152.

Oxnard, G.R., Thress, K.S., Alden, R.S., Lawrance, R., Paweletz, C.P., Cantarini, M., Yang, J.C.H., Barrett, J.C. and Jänne, P.A. (2016) Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 34, 3375-3382.

Parkhurst, M.R., Yang, J.C., Langan, R.C., Dudley, M.E., Nathan, D.A.N., Feldman, S.A., Davis, J.L., Morgan, R.A., Merino, M.J., Sherry, R.M., et al. (2011) T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 19, 620-626.

Pierre, B., Catia, T., Patrick, C., Christophe, L., Etienne, D.P., Benoît, J.V.E., Alexander, K. and Thierry, B. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.

Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M. and Matrisian, L.M. (2014) Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913-2921.

Rebecca, C.L., Michael, C.K., Stefanie, R.B., Nicholas, J.H., Paula, M.L., Amanda, A.B., Irene, S., Mark, B.L., Korneel, G., Trisha, R.B., et al. (2022) CAR T cell killing requires the IFN γ R pathway in solid but not liquid tumours. *Nature* 604, 563-570.

Sugiura, H., Ishikura, H., Omi, M., Kaji, M., Iwai, K., Kishimoto, T., Takahashi, T., Kimura, C., Kato, H. and Yoshiki, T. (1994) Lymphokine-activated killer cytotoxicity against pancreas adenocarcinoma cell lines and vascular endothelial cells. *Pathol Int* 44, 688-696.

Tanyi, J.L., Haas, A.R., Beatty, G.L., Morgan, M.A., Stashwick, C.J., O'Hara, M.H., Porter, D.L., Maus, M.V., Levine, B.L., Lacey, S.F., et al. (2015) Abstract CT105: Safety and feasibility of chimeric antigen receptor modified T cells directed against mesothelin (CART-meso) in patients with mesothelin expressing cancers. *Cancer Res* 75, CT105.

Terai, K., Jiang, M., Tokuyama, W., Murano, T., Takada, N., Fujimura, K., Ebinuma, H., Kishimoto, T., Hiruta, N., Schneider, W.J., et al. (2016) Levels of soluble LR11/SorLA are highly increased in the bile of patients with biliary tract and pancreatic cancers. *Clin Chim Acta* 457, 130-136.

Tian, Y., Li, Y., Shao, Y. and Zhang, Y. (2020) Gene modification strategies for next-generation CAR T cells against solid cancers. *J. Hematol. Oncol* 13, 54.

Vito, A.D., Orecchia, P., Balza, E., Reverberi, D., Scaldaferrri, D., Taramelli, R., Noonan, D.M., Acquati F and Mortara L. (2020) Overexpression of murine mase2 in a colon syngeneic mouse carcinoma model leads to rebalance of intra-tumor m1/m2 macrophage ratio, activation of t cells, delayed tumor growth, and rejection. *Cancers* 12, 717.

Vivek, N., Julie, S.B.B, In-Young, J., Simon, F.L., Andrew, J.R., Megan, M.D., Wei-Ting, H., Priti, L., Erica, L.C., Shannon, L.M., et al. (2022) PSMA-targeting TGF β -insensitive armored CAR T cells in metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 trial. *Nat Med* 28, 724-734.

Wang, L.L., Gray, T., Liu, E., Corder, A., Mei, Z., Robertson, C., et al. (2015) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 33, 1688-1696.

Wang, L., Ma, N., Okamoto, S., Amaishi, Y., Sato, E., Seo, N., Mineno, J., Takesako, K., Kato, T. and Shiku, H. (2016) Efficient tumor regression by adoptively transferred CEA-specific CAR-T cells

associated with symptoms of mild cytokine release syndrome. *OncoImmunology* 5, e1211218.

Yao, W., Maitra, A. and Ying, H. (2020) Recent insights into the biology of pancreatic cancer. *EBioMedicine* 53, 102655.

Yunzhen, Q., Yitao, G., Zhiyao, F., Guopei, L., Qiuyi, H., Shengming, D., He, C., Kaizhou, J., Quanxing, N., Xianjun, Y., et al. (2020) Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 13, 130.

Zhang, E., Yang, P., Gu, J., Wu, H., Chi, X., Liu, C., Wang, Y., Xue, J., Qi, W., Sun, Q., et al. (2018) Recombination of a dual-CAR-modified T lymphocyte to accurately eliminate pancreatic malignancy. *J Hematol Oncol* 11, 102.

Zhang, J., Fujimoto, J., Zhang, J., Wedge, D.C., Song, X., Zhang, J., Seth, S., Chow, C.W., Cao, Y. and Gumbs, C. (2015) Intra-tumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas Delineated by Multi-region Sequencing. *Science* 72, 377-385.

国立研究開発法人国立がん研究センター (2022) がんの統計 2022. In がん情報サービス, <https://ganjoho.jp/public/index.html> (2023年3月1日参照)