HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CEA特異的キメラ抗原受容体発現T細胞を用いた膵臓癌に対する免疫細胞療法に関する研究
Author(s)	武内, 優太
Description	配架番号：2882
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16201号
Issue Date	2024-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16201
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94081
Type	doctoral thesis
File Information	TAKEUCHI_Yuta.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

CEA 特異的キメラ抗原受容体発現 T 細胞を用いた膵臓癌に対する免疫細胞療法に関する研究

(Studies on the CEA specific chimeric antigen receptor T cell therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma)

2024 年 12 月

北　海　道　大　学

武内　優太

学　位　論　文

CEA 特異的キメラ抗原受容体発現 T 細胞を用いた膵臓癌に対する免疫細胞療法に関する研究

(Studies on the CEA specific chimeric antigen receptor T cell therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma)

2024 年 12 月

北　海　道　大　学

武内　優太

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　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　10 頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　18 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　29 頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　32 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　33 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　35 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。

Yuta Takeuchi, Yizheng Wang , Katsunori Sasaki, Osamu Sato, Takahiro Tsuchikawa, Linan Wang, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Yoshifumi Hirokawa, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Hiroshi Shiku and Satoshi Hirano
Exhaustion, rather than lack of infiltration and persistence, of CAR-T cells hampers the efficacy of CAR-T therapy in an orthotopic PDAC xenograft model
Biomedicine & Pharmacotherapy 170 ・116052, (2024)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

武内優太，土川貴裕，天石泰典，岡本幸子，峰野純一 , 畑中　豊 , 王　立楠,
加藤琢磨，珠玖　洋，平野　聡
GITR シグナル伝達ドメインを有する CEA 特異的キメラ抗原受容体発現 T 細胞を用いたヒト膵癌同所移植マウスモデルの抗腫瘍効果の検討
第 24 回日本がん免疫学会総会，2020 年 10 月 7-9 日・北海道札幌市

要旨

【背景と目的】

膵臓癌（以下、膵癌）は、消化器癌の中でも悪性度の高い癌腫の 1 つである。膵癌に対して唯一根治が望めるのは外科切除であるが、膵癌初診時の切除可能症例は 20%に過ぎず、また根治切除ができても術後 5 年生存率は 10- 25% と不良である。膵癌に対して化学療法を行っても全 5 年生存率は 12% 程度と極めて予後不良な疾患である。したがって、膵癌における治療成績の向上が急務である。

近年、癌治療に対して新たな治療法である免疫療法が、その有効性と安全性から注目されている。その中でも、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) 療法が血液腫瘍の患者に顕著な治療効果を示して以来、注目を集めている。一方、固形腫瘍に対しての CAR-T 療法では有効な治療効果の報告は少ないものの、臨床応用に向けて研究が続けられている。固形腫瘍への CAR-T 療法の課題として CAR-T 細胞の持続性の低下、腫瘍への遊走・浸潤能、免疫抑制に働く腫瘍微小環境、疲弊化等があげられる。

本研究ではヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを作製して、膵癌特有の腫瘍微小環境下で carcinoembryonic antigen (CEA)特異的 CAR-T 療法の治療抵抗性を示し、その機序を検討した。さらに、担癌患者における T 細胞が機能不全を呈しているとの報告もあり、膵癌患者から採取・作製した CAR-T 細胞を用いた治療の妥当性を検証した。

【材料と方法】

ヒト膵癌細胞株として MIAPaCa-2、Panc-1、Capan-1、BxPC-3 を使用した。各種細胞株において flowcytometry (FCM) を試行して細胞膜表面の CEA 発現の評価を行った。続いて、各細胞株に対して CEA 特異的 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を確認するため、まず *in vitro* で機能アッセイを行った。CEA 特異的 CAR-T 細胞と各細胞株の共培養液中の Interferon-γ (IFN-γ)分泌を FCM で評価した。さらに、細胞毒性アッセイとして共培養後の各細胞株の生細胞／死細胞率を FCM で解析した。次に、*in vitro* で抗腫瘍効果を認めた CEA 高発現の BxPC-3 株に Luciferase 遺伝子を導入した細胞株を用いて膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを作製し、治療実験を行った。さらに、治療を行ったマウスから腫瘍を摘出し病理学的検討を行った。また、CEA 特異的 CAR-T 細胞の *in vivo* での機能評価を行うため、治療実験の過程で BxPC-3 の皮下腫瘍を埋め込み、治療効果を評価する re-challenge テストや tumor infiltrating lymphocytes (TILs)、脾臓、末梢血中の CEA 特異的 CAR-T 細胞を抽出し共培養による *ex vivo* での機能評価も行った。さらに、2019 年 5 月から同年 9 月の間で、北海道大学病院消化

器外科Ⅱで手術を受けた膵癌患者症例 8 名より末梢血を採取し、CEA 特異的 CAR-T 細胞を作製して機能評価を行った。

【結果】

ヒト膵癌細胞株の CEA 発現評価の結果から BxPC-3、Capan-1 を CEA 発現陽性株、MIA PaCa-2、Panc-1 を CEA 発現陰性株として定義した。各細胞株との共培養による機能アッセイでは、CEA 発現陽性細胞株に対して IFN-γ 分泌を認めた。細胞毒性アッセイでも腫瘍抗原特異的に用量依存性の抗腫瘍効果も認めた 。

次に、膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを用いた *in vivo* 治療実験では Day14、21、28 で経時的に抗腫瘍効果を認めたが、徐々に抗腫瘍効果は失われていった。*in vivo* 治療実験における免疫組織学的検討では CEA 特異的 CAR-T 細胞は膵腫瘍への浸潤を認め、腫瘍の CEA 発現が低下した。

また、re-challenge テストでは CAR-T 細胞の皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果は認めなかったが、皮下腫瘍への浸潤像を認めた 。次に、*ex vivo* 実験では IFN-γ 陽性細胞の割合に有意差は認めず、ポジティブコントロールにおける PMA+ ionomycin では IFN-γ の産生を示した。

膵癌患者由来、及び健常者由来の CEA 特異的 CAR-T 細胞の拡大培養増殖率を比較すると膵癌患者由来 CAR-T 細胞の増殖率が有意に低かった。しかし、抗腫瘍効果に有意差は認めなかった。

【考察】

CEA 特異的 CAR-T 細胞は容量依存性・抗原特異的に抗腫瘍効果を示したが、*in vivo* の結果では抗腫瘍効果は一時的であった。治療実験で用いたヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルは腫瘍の発育等が臨床例に近似しており、臨床でも同様の事象が起こると推察される。抗腫瘍効果が失われた原因究明のための病理組織学的検討では、治療開始から Day28 まで CAR-T 細胞の腫瘍への浸潤能は保たれていた。さらに、CEA 特異的 CAR-T 細胞に対する tumor microenvironment (TME)の影響を検証するために行った re-challenge テストでは、抗腫瘍効果の喪失は TME による影響ではなく、CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能不全が示唆された。CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能不全を検証するために行った *ex vivo* 実験では、膵癌細胞株との共培養で IFN-γ 産生を示さなかったため、CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能不全を示唆した。これは、CAR-T 細胞の PD-1 などの疲弊化マーカーを検証することで、さらに機能不全の原因を明確にできる可能性がある。実際に、PD-1 阻害薬と CAR-T 細胞を併用することで CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の再活性化することが報告されている。

次に、実際の膵癌患者から採取・作製した CAR-T 細胞の機能評価では健常者由来の CAR-T 細胞と比較して膵癌患者由来の CAR-T 細胞の増殖率が著明に低く、これは実際の臨床の場では CAR-T 療法の導入までに一定の期間を要することを意味し、

速やかな治療導入を妨げる。したがって、患者由来の CAR-T 細胞を用いた場合には増殖率の低さに対応していかなければならないが、それと同時に将来的には健常者由来の CAR-T 細胞を用いた CAR-T 療法を確立できれば、速やかに治療導入を行うことができ、更なる臨床応用が期待される。

【結 論】

CEA 特異的 CAR-T 細胞は、膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示したが、経時的に抗腫瘍効果は消失した。抗腫瘍効果の消失が見られても膵原発巣への浸潤を認めており、抗腫瘍効果の喪失は CEA 特異的 CAR-T 細胞の疲弊化や細胞障害活性の低下が要因であることが示唆された。膵癌患者由来の CAR-T 細胞は健常者由来の CAR-T 細胞と比較して作製時の増殖率は低かったが、抗腫瘍効果は同等であった。

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。

ATCC	American Type Culture Collection
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
CAR	chimeric antigen receptor
CAR-T	chimeric antigen receptor engineered T cells
CEA	carcinoembryonic antigen
CFSE	carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
CK	cytokeration
E:T ratio	Effector:Target ratio
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
HDs	healthy donors
HE	Hematoxylin Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICC	immunocytochemistry
IFN-γ	interferon-γ
IHC	immunohistochemistry
IL-2	Interleukin-2
Ionomycin	Ca2+ ionophore
NOG	NOD/ Shi-scid, IL-2RγKO
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed death receptor-1
PD-L1	Programmed cell Death ligand 1
PDs	patient donors
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
scFv	single-chain variable fragment
SEM	standard error of the mean
TILs	tumor infiltrating lymphocytes
TME	tumor microenvironment
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D

緒言

膵臓癌（以下、膵癌）は、消化器癌の中でも悪性度の高い難治癌の一つである。他の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 5 年生存率は約 7%と極めて予後不良である (Siegel et al, 2018)。さらに、膵癌に対して唯一根治が望めるのは外科切除であるが、膵癌の多くは進行期で発見され切除可能症例は 20%に過ぎない(Versteijne et al, 2020)。また、手術を受けたとしても術後 5 年生存率は 10-25%と高くはない(Mizrahi et al, 2020)。

膵癌に対しての化学療法では FOLFIRINOX (5-FU/ leucovorin/ irinotecan/ oxaliplatin) 療法や 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が (Conroy et al, 2011; Von Hoff et al, 2013)、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ず、膵癌における治療成績の向上が急務である。

近年の医療技術の進歩によって、手術、化学療法、放射線療法のいわゆる三大療法に次ぐ新たな治療法である免疫療法が、その有効性と安全性から注目されている。中でも、2014 年に本邦で Nivolumab が世界で初めて悪性黒色腫に対して臨床承認され、多くの癌腫に対し目ざましい成果をあげている (Brahmer et al, 2010)。他にも、養子免疫療法の一つである遺伝子改変 T 細胞輸注療法として、キメラ抗原受容体 T 細胞 (chimeric antigen receptor engineered T cells: CAR-T) 細胞を用いた CAR-T 療法が血液腫瘍の患者に顕著な治療効果が証明されて以来、注目を集めている (Porter et al, 2011)。CAR-T 細胞は、腫瘍細胞表面の特定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、膜貫通ドメインを有する chimeric antigen receptor (CAR)を T 細胞へ導入・発現させた構造を有している (図 1)。これにより、CAR-T 細胞は腫瘍細胞上の主要組織適合抗原クラス I の発現とは無関係に腫瘍細胞表面抗原を scFv 領域で直接認識し、その認識シグナルをζ鎖により T 細胞内へ伝達する。加えて、CD28 などの副刺激分子を通じて CAR-T 細胞を活性化し増強することで腫瘍細胞を効率的に殺傷することが可能である。その CAR を採取した自己の T 細胞に遺伝子導入した CAR-T 細胞を再度輸注する養子免疫療法が CAR-T 療法である。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 療法が米国で、2019 年には日本でも臨床承認された。一方、固形腫瘍に対しての CAR-T 療法では第 I 相臨床試験で転移性去勢抵抗性前立腺癌に対して抗 PSMA-CAR-T 療法の治療効果を認めた報告 (Narayan et al, 2022)、びまん性正中部グリオーマに対して GD-2 を標的抗原とした CAR-T 療法 (Lin et al, 2024)、悪性

胸膜中皮腫に対して Mesothelin を標的抗原とした CAR-T 療法が報告されている (Adusumilli et al, 2021)。しかし、血液腫瘍に対する CAR-T 療法と比較すると固形腫瘍に対する CAR-T 療法が顕著な治療効果を認めたとする報告は乏しい。加えて、膵癌でも同様に CAR-T 療法の研究が行われているがいずれも第 1 相試験までにとどまっているのが現状であり、CAR-T 療法の改善が望まれる(Czaplicka et al, 2024)。

本実験で用いた CAR は、scFv 抗体、CD8 hinge 膜貫通ドメイン、副刺激分子ドメインとして T 細胞の活性化や制御性 T 細胞による免疫抑制を制御する働きをもつ glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR)分子、CD3ζ 鎖由来の細胞内シグナル伝達ドメインまでを持った CAR (zG 型)及び副刺激分子として T 細胞の活性化を促す CD28 で構成された CAR (28z 型)を用いた (図 2)。

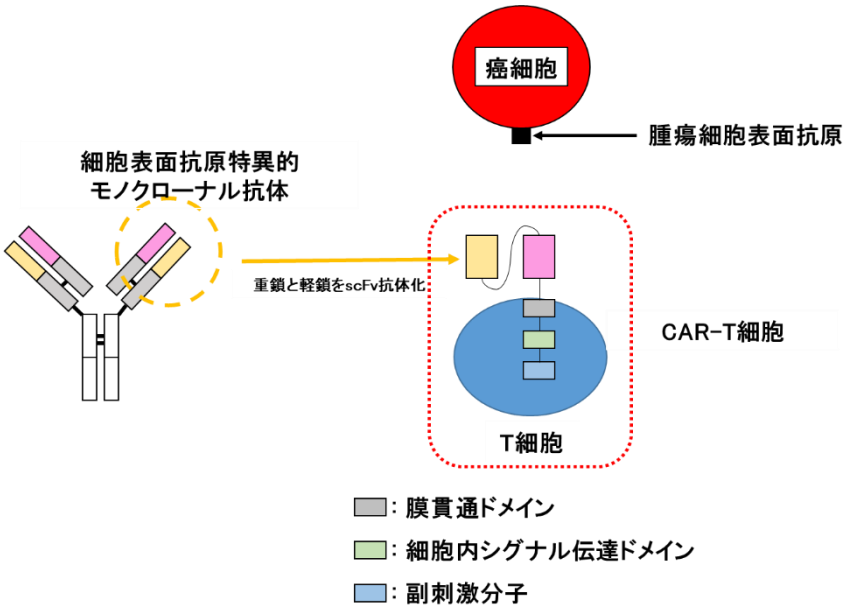


図 1　CAR-T 細胞の構造

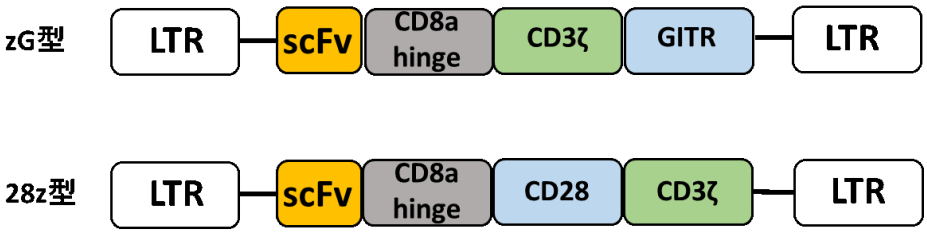


図 2　本研究で用いた CAR 遺伝子のコンストラクト

CAR-T 細胞における標的抗原は腫瘍特異性が高く、正常細胞に影響の少ない抗原を選択することが肝要であることから、本研究では癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen: CEA)に着目した。CEA は結腸癌と胎児腸管粘膜に共通して存在する抗原と

して発見された分子量約 18 万 Da の糖蛋白質である。膵癌において CEA は幅広く発現を認めており (Yamaguchi et al, 1991)、CEA 特異的抗原認識部位を有する CEA 特異的 CAR-T 細胞を作製することで、CEA 抗原を発現する膵癌細胞に対して抗腫瘍効果が得られると考えられる。さらに、CEA は大腸や気管支などの管腔臓器で主に発現を認めているが、正常組織では管腔側の細胞膜表面を中心に CEA は発現しているため (Nap et al, 1988; Wang et al, 2016)、CEA 特異的 CAR-T 細胞により正常細胞を傷害することなく膵癌細胞を選択的に傷害することが可能である。本研究の先行研究である Sato ら (Sato et al, 2023)の報告でも *in vitro* と *in vivo* において CEA を標的抗原とした CAR-T 細胞の膵癌に対する抗腫瘍効果を認めており、CEA 特異的 CAR-T 細胞の有用性が示されている。加えて、この先行研究で用いられた膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルは、腫瘍の局所増殖、血管・リンパ管侵襲、腫瘍微小環境形成を臨床例と同様に表現していることが報告されており (Saluja and Dudeja, 2013)、膵癌特有の腫瘍微小環境下を想定した CEA 特異的 CAR-T 療法の検証を行っている。他にも、膵癌切除検体における CEA 染色強度が CEA 特異的 CAR-T 療法の治療対象のバイオマーカーとなることを示し、臨床応用の可能性を示唆した(Sato et al, 2023)。

しかし、膵癌含め固形腫瘍における CAR-T 療法には、CAR-T 細胞の持続性の低下、腫瘍への遊走・浸潤能、免疫抑制に働く腫瘍微小環境、疲弊化等、固形腫瘍特有の課題が存在する。持続性低下に関しては、輸注した CAR-T 細胞が治療経過とともに増殖・活性を失い、体内での CAR-T 細胞が減少する現象であり、これは CAR-T 細胞が標的抗原に感作する機会が少ないことが原因とされている (Fan et al, 2020)。また、CAR–T 細胞の腫瘍への遊走・浸潤能に関しても、血液腫瘍における CAR-T 療法では腫瘍細胞が血管内に存在するため標的抗原への CAR-T 細胞の感作は容易であるが、固形腫瘍の場合は目的臓器に達し、さらに腫瘍に浸潤する必要があることから、効果発現に関して血液腫瘍に比べ不利である (Foeng et al, 2022)。

さらに、腫瘍微小環境では、免疫抑制的に作用する間質細胞が多く存在している(Rodriguez-Garcia et al, 2020)が、それらが浸潤した CAR-T 細胞に対し疲弊化マーカーとよばれる Programmed death receptor-1 (PD-1)などの免疫チェックポイント分子の発現を促し、Interferon-γ (IFN-γ)や Interleukin-2 (IL-2)などのサイトカイン産生能や、増殖能、細胞障害活性などが低下せしめ、いわゆる「疲弊化」と呼ばれる機能不全状態にすることで CAR-T 細胞からの免疫応答を回避している(Ye et al, 2018; Kankeu Fonkoua et al, 2022)。

加えて、近年の報告では担癌患者の腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞は腫瘍抗原に曝露され続けることで T 細胞受容体への刺激が持続し、T 細胞が疲弊化することが示されている (Schietinger et al, 2016)。すなわち、CAR-T 細胞療法を行う場合には患者から採取した T 細胞が CAR-T 細胞を作製する前段階で既に疲弊化しており、十分に治療効

果を発揮していない可能性が考えられる。

これらの課題が、膵癌に対する CEA 特異的 CAR-T 細胞を用いた治療ではあげられるが、いずれの課題が治療効果の主たる妨げとなっているかを検討した報告はなく、また、膵癌患者での CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価に関する報告はない。そこで本研究では、膵癌に対する CEA 特異的 CAR-T 細胞を用いた CAR-T 療法の治療抵抗性に着目し、CEA 特異的 CAR-T 細胞の定量的および機能的な細胞動態を解析することで治療抵抗性の機序を検討した。また、膵癌患者 (PTs; Patients)および健常者 (HDs; Healthy donors)から作製した CEA 特異的 CAR-T 細胞を比較し、その機能や PD-1 発現状況を検討することによって、患者由来 CEA 特異的 CAR-T 細胞を用いた治療の妥当性を検討した。

実験方法

１）ベクター構築およびウイルス溶液

zG 型の CAR は CD8a 膜貫通ドメイン、CD28 副刺激分子、CD3ζ 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 抗体を作製し、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。28z 型は GITR 細胞内ドメインを含まない構成であり、同様の方法で作製した。これらのベクター作製、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 MIAPaCa-2、Panc-1、Capan-1、BxPC-3 の 4 種類を使用した。MIA PaCa-2、Panc-1、BxPC-3 は American Type Culture Collection (ATCC) から、luciferase 遺伝子導入細胞の BxPC-3-Luc は the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB, Osaka, Japan)から購入した。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% CO_2 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) CEA 特異的 CAR-T 細胞の作製

ヒト末梢血 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: PBMCs) 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。Condeitioned 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 にそれぞれのウイルス

ベクター (zG 型と 28z 型)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 に CAR 遺伝子の発現効率を flow cytometry (FCM)で確認し、CEA 特異的 CAR-T 細胞のソーティングを行い (図 3)、実験に使用した。また本研究では CAR 遺伝子を導入せず、同じ条件で培養した PBMCs を Mock-T 細胞として用いた。

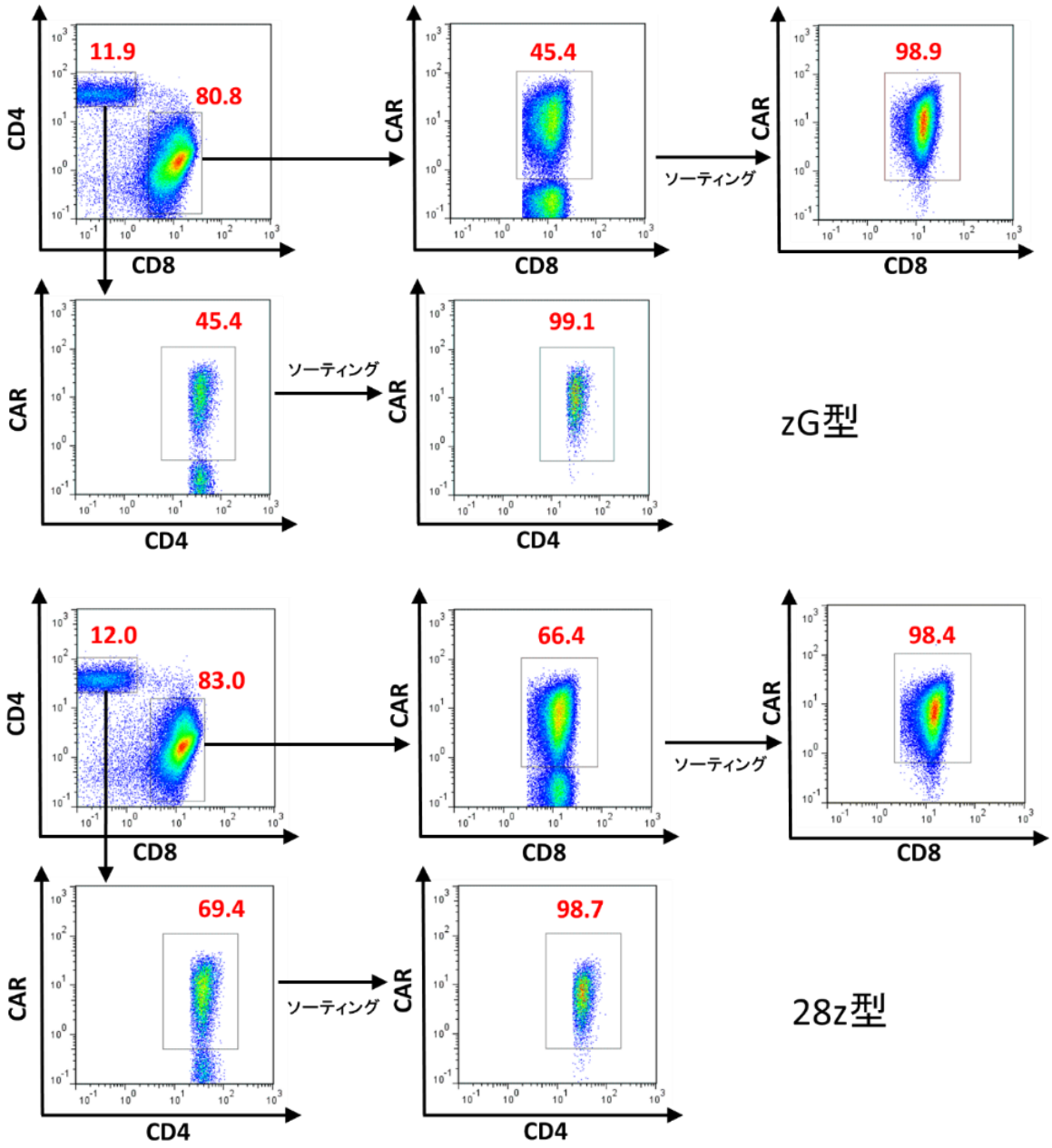


図 3　CEA 特異的 CAR-T 遺伝子の発現効率とソーティング

上段は zG 型、下段は 28z 型の CAR 発現率とソーティング結果を示す。

４) CEA 特異的 CAR-T 細胞のソーティング

CEA 特異的 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, Bergisch Gladbach, Germany) 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、各 CEA 特異的 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 3) 。

$CD4^+$ / $CD8^+$ T 細胞への CAR 導入率の FCM 解析は二重染色で行った。作製した細胞を 0.5% BSA を含む PBS で洗浄し、ビオチン化 CEA を 0.1μg/ 2×10^5 cells で加えて 4°C、30 分間インキュベートした。0.5% BSA/ PBS で洗浄し、anti-CD4-APC/Fire^{TM}750 (#116019; 1: 50; BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD8-PerCP (#980916; 1: 50; BioLegend), 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)を用い、FlowJo 7.6.5 (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA)で解析を行った。

５）Flowcytometry を用いたヒト膵癌細胞株細胞膜表面の CEA 発現の解析

細胞膜表面の解析には間接的染色を行い、抗体は一次抗体: 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.) を使用した。使用した細胞株はいずれも接着細胞であるため、0.2%ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を含む phosphate-buffered saline (PBS)を培養細胞に添加し、37°Cで 10 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。

６）CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能アッセイ

６-１）細胞機能アッセイ

ヒト膵癌細胞に対して分泌した CEA 特異的 CAR-T 細胞の Interferon-γ (IFN-γ)を Immunocytochemistry (ICC)を用いて FCM で評価した。各 CEA 特異的 CAR-T 細胞 ($1x10^5$/0.1 mL)をヒト膵癌細胞株と 1：1 の割合で 96 well dish で 6 時間共培養し、最後の 5 時間に monensin (GolgiStop Protein Transport Inhibitor; BD Biosciences, Franklin

Lakes, NJ)を添加した。Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences)を用いて、共培養した細胞を固定・透過処理した後、FITC-mouse anti-Human IFN-γ (#554551; 50:1; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)、anti-CD4-APC/FireTM750 (#100568; BioLegend)、anti-CD8-PerCP (#344710; BioLegend) で染色し、FCM で解析した。アイソタイプコントロールは FITC Mouse IgG1, k Isostype Control (#550616; 50:1; BD Pharmingen)、ポジティブコントロールとして CEA 特異的 CAR-T 細胞に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; #162-23591; 50 ng/mL; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) と Ca2+ ionophore (Ionomycin; #095-05831; 250 ng/mL; FUJIFILM Wako)を添加して同様のアッセイを行った。

６-２）細胞毒性アッセイ

ヒト膵癌細胞に対する各 CEA 特異的 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 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) / Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) 細胞毒性アッセイを用いて行った。アッセイには 7-AAD/ CFSE Cell-Mediated Cytotoxicity Assay Kit (#600120; Cayman Chemical, Michigan, USA) を用いた。まず、すべてのヒト膵癌細胞株を CFSE で 37℃, 10 分間インキュベートしヒト膵癌細胞株の生細胞を CFSE で標識した。染色した細胞を PBS で 2 回洗浄し、それぞれ $1x10^5$ ずつ 96 well dish で 37℃、30 分インキュベートした。それぞれに標識していない CEA 特異的 CAR-T 細胞を E: T ratio= 1: 1、3:1、10 : 1、30:1 で混合し 37℃で、6 時間の共培養を行った。PBS で洗浄した後、細胞混合物に 7-AAD 染料を加えて 4℃、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 Cytotoxicity (%)= [(ET-T_0) / (100-T_0)] × 100 (ET: 共培養後の $CFSE^+$ & $7\text{-}AAD^+$ (%)、T_0: Target 細胞のみ培養した $CFSE^+$ & $7\text{-}AAD^+$ (%))で求めた。またこのアッセイでは、後述する HDs 群と PDs 群を比較する際には標的細胞を $1x10^4$ で行った。対照群として Mock-T 細胞群で同様のアッセイを行った。

７) ヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルの作製

6 週齢のメスの NOD/ Shi-scid, IL-2RγKO (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 週齢で使用した。全ての動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に従って行った (承認番号: 18-0134) 。

BxPC-3-Luc をそれぞれ 1×10^6 ずつ 30μl の Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco: ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)を 100μl 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 秒間圧迫したのち閉腹した。腫瘍の観察は、全身麻酔下に D-luciferin (RS101-010; 2.25 mg/mouse; GORYO Chemical, Inc, Hokkaido, Japan) を腹腔内投与し、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マウス全体を覆うように統一した。Total flux (photons/ sec) 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。

８）マウスモデル治療実験プロトコール(図 4)

上記の方法で作製した膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを各 CEA 特異的 CAR-T 細胞治療群と Mock-T 細胞治療群に無作為に分けて治療実験を行った。膵癌 orthotopic xenograft 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 CEA 特異的 CAR-T 細胞を、非治療群は Mock-T 細胞を同数、尾静脈内注射した。腫瘍の発育は 1 週ごとに IVIS イメージングにて評価した。各アッセイを行う為に腫瘍検体を摘出する際には頸椎脱臼法で安楽死させた上で腫瘍を摘出した。

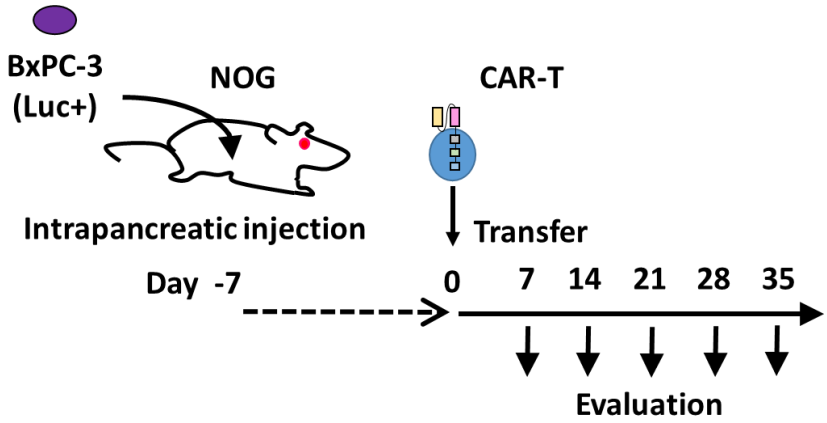


図 4　膵癌 orthotopic xenograft マウスモデル治療プロトコール

NOG マウスの膵被膜下に BxPC-3-Luc を投与し、その 1 週間後に CEA 特異的 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各アッセイに用いた。

９）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5μmに薄切した。パラフィン包埋切片はアビジン-ビオチン複合体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Cytokeration (CK; 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Hematoxylin Eosin (HE)染色も行った。

１０）膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを用いたヒト膵癌細胞株の re-challenge テスト (図 5)

上記の方法で行った膵癌 orthotopic xenograft マウスモデル治療実験の Day21 に皮下腫瘍を作製し CEA 特異的 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を評価した。まず、Luciferase が導入されていない BxPC-3 (5×10^6)を 100µl の HBSS に 100µl シリンジに入れて準備した。各膵癌 orthotopic xenograft マウスを十分な全身麻酔下におき、背部に 27 ゲージ針で皮下に上記細胞調整液を慎重に注入し皮下腫瘍を作製した。皮下腫瘍の観察は全身麻酔下にノギスを用いて腫瘍径を計り、腫瘍体積を長径×短径 $^2/2$ で求めた。さらに皮下腫瘍の組織学的特徴も検討するために、皮下腫瘍埋め込みから Day7、14、21 で皮下腫瘍を採取し、上記の方法で免疫組織学染色を行った。腫瘍検体を摘出する際には頸椎脱臼法で安楽死させた上で腫瘍を摘出した。

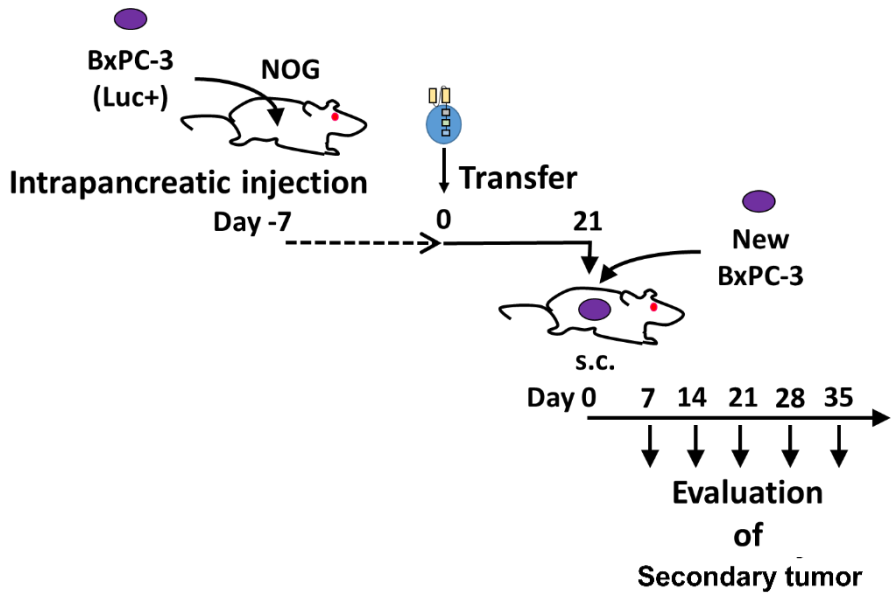


図 5　Re-challenge テストのプロトコール

CAR-T 細胞による治療開始後 21 日目のマウス背部に皮下腫瘍を作製し、腫瘍体積を計測した。

１１）*Ex vivo* における CEA 特異的 CAR-T 細胞の細胞機能アッセイ

１１-１）各マウス組織からの単細胞懸濁液の作製

上記の方法で治療実験を行った膵癌 orthotopic xenograft マウスから膵腫瘍、脾臓、末梢血を採取した。膵腫瘍は PBS で洗浄し、～5mm の小切片にした。小切片を Tumor Dissociation Kit, human (130-095-929, Miltenyi Biotec)で処理し、gentleMACS™ Octo Dissociator (Miltenyi Biotec)を用いて単細胞懸濁液を作製した。単細胞懸濁液を 70μm と 30μm のフィルターに順に通すことで、さらに不要な組織を除去した。本実験では Tumor infiltrate lymphocytes (TILs)として用いた。脾臓は PBS で洗浄し、細かく分割した。300μm、100μm、 40μm のフィルターで順にフィルター上で細かくした脾臓をすりつぶした。得られた単細胞懸濁液を IOTest® 3 Solution (BECKMAN COULTER, Fullerton, CA, USA)で 4℃、15 分で処理し赤血球を除去した。末梢血は IOTest® 3 Solution で 4℃、15 分で処理し赤血球を除去し、PBMCs として実験に用いた。

１１-２）単細胞懸濁液を用いた細胞機能アッセイ

治療実験を行った膵癌 orthotopic xenograft マウスから上記方法で得られた TILs、脾臓、PBMCs の単細胞懸濁液を等分し、BxPC-3 か MIAPaca-2 (各 2.5×10^5 /mL)と混合し 96well dish を用いて 37℃、4 時間の共培養を行った。共培養後は上記細胞機能アッセイと同様の方法で ICC を行い、FCM にて IFN-γ の発現を評価した。CD8 陽性細胞の抗腫瘍効果は IFN-γ 陽性 CD8 陽性細胞の割合を BxPC-3 共培養群-MIAPaCa-2 共培養群で求め、CD8 陽性細胞のヒト膵癌細胞株の腫瘍反応性とした。ポジティブコントロールとして各単細胞懸濁液に PMA と Ionomycin を添加して、同様に培養を行った。ネガティブコントロールとしては各単細胞懸濁液と RPMI1640 のみで培養を行った。

１２）膵癌患者症例ならびに CEA 特異的 CAR-T 細胞の作製

2019 年 5 月から同年 9 月の間で、北海道大学病院消化器外科Ⅱで手術を受けた膵癌患者症例 8 名より採血を行い、末梢血を約 12ml 採取、CEA 特異的 CAR-T 細胞を上記 CEA 特異的 CAR-T 細胞の作製・ソーティングと同様の方法で作製・ソーティングを行った。使用したウイルスベクターは zG 型を用いた。健常人ボランティアからも末梢血を約 12ml 採取し、膵癌患者症例と同条件で CEA 特異的 CAR-T 細胞の作製・ソーティングを行い、CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能性を比較・検討した。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. 018-0077) 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書面による同意を得て行った。

１３）膵癌患者および健常者由来 PBMC および CEA 特異的 CAR-T 細胞増殖率の評価

採取した各 PBMCs 及び CEA 特異的 CAR-T 細胞を、それぞれの CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞を FCM にて同様に評価した。PBMCs 拡大培養時 (day0-4)の PBMCs 増殖率と CEA 特異的 CAR 導入後 (day4-10)の CEA 特異的 CAR-T 細胞増殖率を比較した。

１４）膵癌患者および健常者由来 CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能アッセイ

PTs 群および HDs 群から作製した CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能を比較するため、上記方法により、ヒト膵癌細胞に対して CEA 特異的 CAR-T 細胞が分泌した IFN-γ を定量した。また、ヒト膵癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果を比較するために上記方法による 7-AAD/ CFSE 細胞毒性アッセイを用いて定量し、比較した。

１５）膵癌患者および健常者由来 CEA 特異的 CAR-T 細胞 PD-1 発現比較

PTs 群および HDs 群由来の PBMCs を PBS で洗浄し anti-CD3-PacificBlue (#300329; 1:50; BioLegend), anti-CD4-APC/Fire^{TM}750, anti-CD8-PerCP, anti-PD-1-FITC (#329904; 1:50; BioLegend) を加えて 4℃、暗所で 30 分インキュベートした。各材料を FCM により比較・検証した。同様に両群から作製した CEA 特異的 CAR-T 細胞を染色し、FCM にて評価した。

両群の CEA 特異的 CAR-T 細胞 (5×10^5)を BxPC-3 か Panc-1 (5×10^5)と混合し計 1ml で 24 well dish を用いて 37℃、24 時間の共培養を行った。共培養後は上記方法で染色し FCM で検証した。コントロールとして各 CEA 特異的 CAR-T 細胞と RPMI1640 のみで培養を行った。

１６）統計学的解析

データは平均値±standard error of the mean (SEM)で表し、エラーバーを示した。すべての統計学的検討は Graph Pad Prism 8 (MDF co., Tokyo, Japan) 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。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た。

実験結果

１）各ヒト膵癌細胞株細胞膜表面 CEA 発現の評価 (図 6)

ヒト膵癌細胞株の MIA PaCa-2、Panc-1、Capan-1、BxPC-3 の 4 種類における細胞膜表面 CEA の発現を FCM により評価した (図 6)。BxPC-3 を CEA 高発現細胞株、MIA PaCa-2 を CEA 低発現細胞株として以降の実験に用いることにした。

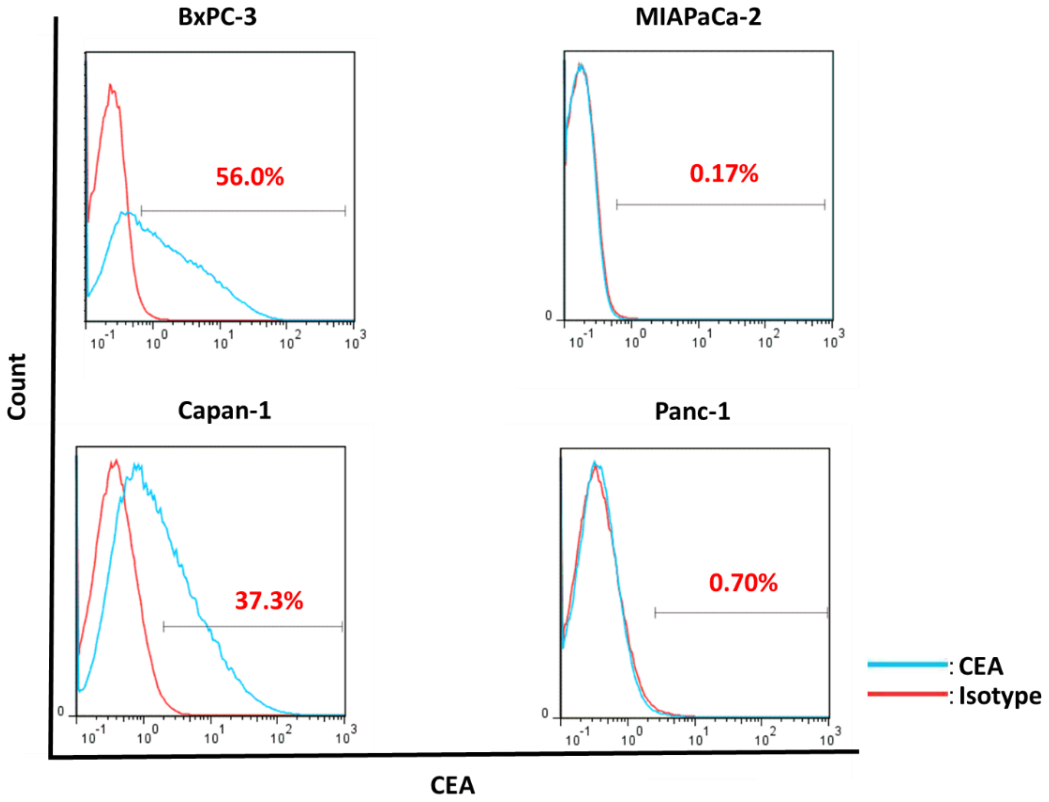


図 6　ヒト膵癌細胞株の CEA 発現評価

２）*In vitro* における CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価 (図 7)。

CEA 陽性細胞株に対する CEA 特異的 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を検証するため、CEA 特異的 CAR-T 細胞をヒト膵癌細胞株と共培養して *in vitro* 解析を行った。対照群として Mock-T 細胞を使用した。ICC を用いて CEA 特異的 CAR-T 細胞内の IFN-γ を染色し、測量した (図 7A)。各 CEA 特異的 CAR-T 細胞 (zG 型と 28z 型)は腫瘍抗原特異的に IFN-γ 分泌を認めた。7-AAD/ CFSE を用いた細胞毒性アッセイでも腫瘍抗原特異的に有意な細胞障害活性を示し、用量依存性の抗腫瘍効果も認めた (図 7B)。zG 型と 28z 型の間には有意な差は認めなかった。

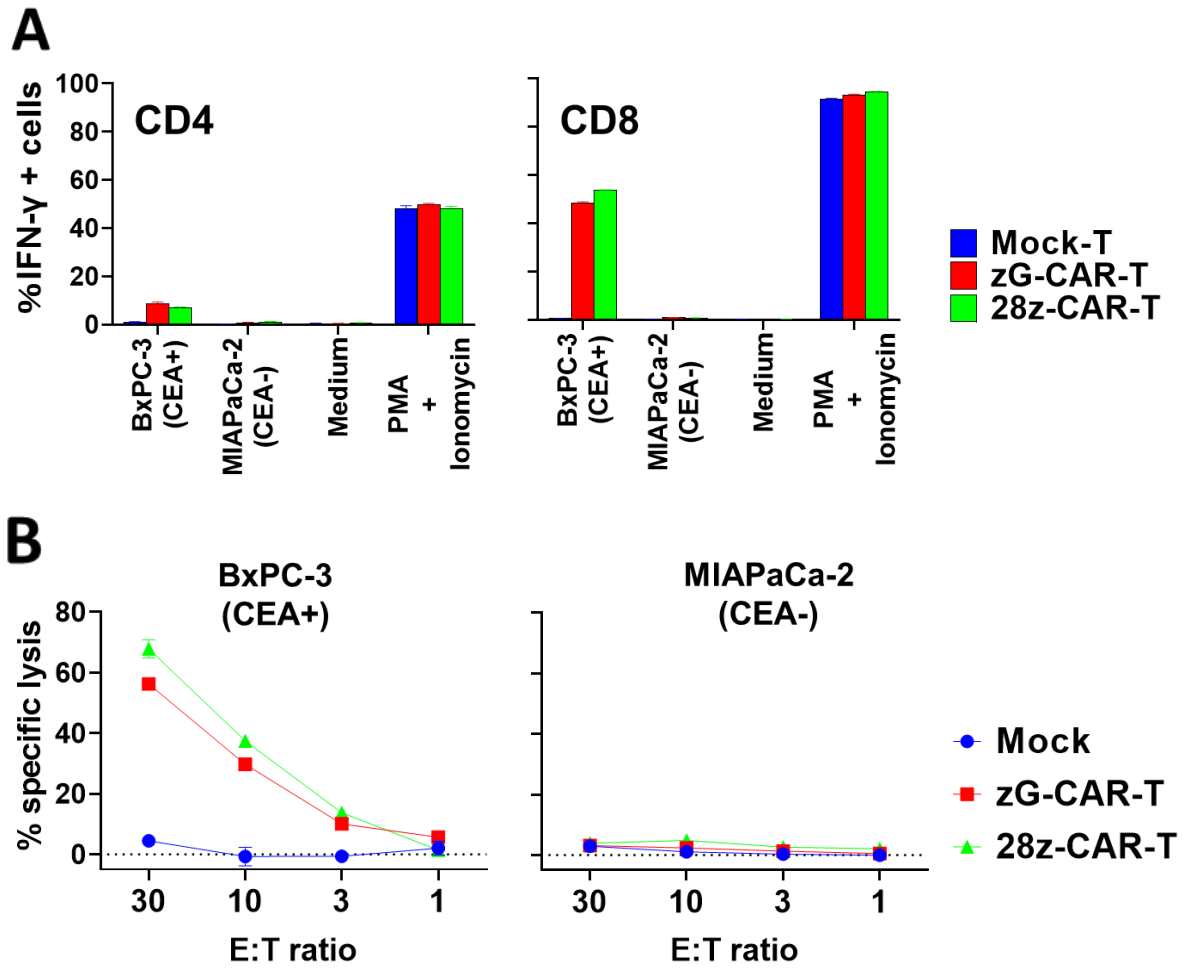


図 7　ヒト膵癌細胞株に対する CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価

A: 共培養における CEA 特異的 CAR-T 細胞の IFN-γ 分泌測定

B: ヒト膵癌細胞株に対する CEA 特異的 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果

３）CEA 特異的 CAR-T 細胞による膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを用いた抗腫瘍効果の評価 (図 8)

In vitro で抗腫瘍効果を認めた BxPC-3 に Luciferase 遺伝子が導入された細胞株を用いて膵癌 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。Day 0 に IVIS イメージングで腫瘍が確立した事を確認し、各 CEA 特異的 CAR-T 細胞 (zG 型と 28z 型：1×10^7 個/匹)を尾静脈内注射した。対照群は Mock-T 細胞 (1×10^7 個/匹)の注射とした。

また、治療効果の評価は 1 週ごとの IVIS イメージングで行った (図 8A)。各 CEA 特異的 CAR-T 細胞治療群 (zG 型と 28z 型)において Day14、21、28 で経時的に抗腫瘍効果を認めたが、Day35 では抗腫瘍効果の有意差は認めず、CEA 特異的 CAR-T 細胞による抗腫瘍効果は失われていた (図 8B)。zG 型と 28z 型の両群間においても抗腫

瘍効果に有意差は認めなかった。In vitro と In vivo の実験結果を踏まえ、zG 型と 28z 型の両群間に抗腫瘍効果の差は認めないため、以降の実験は zG 型を用いて実験を行った。また、以降の CEA 特異的 CAR-T 細胞という表記は zG 型を指す。

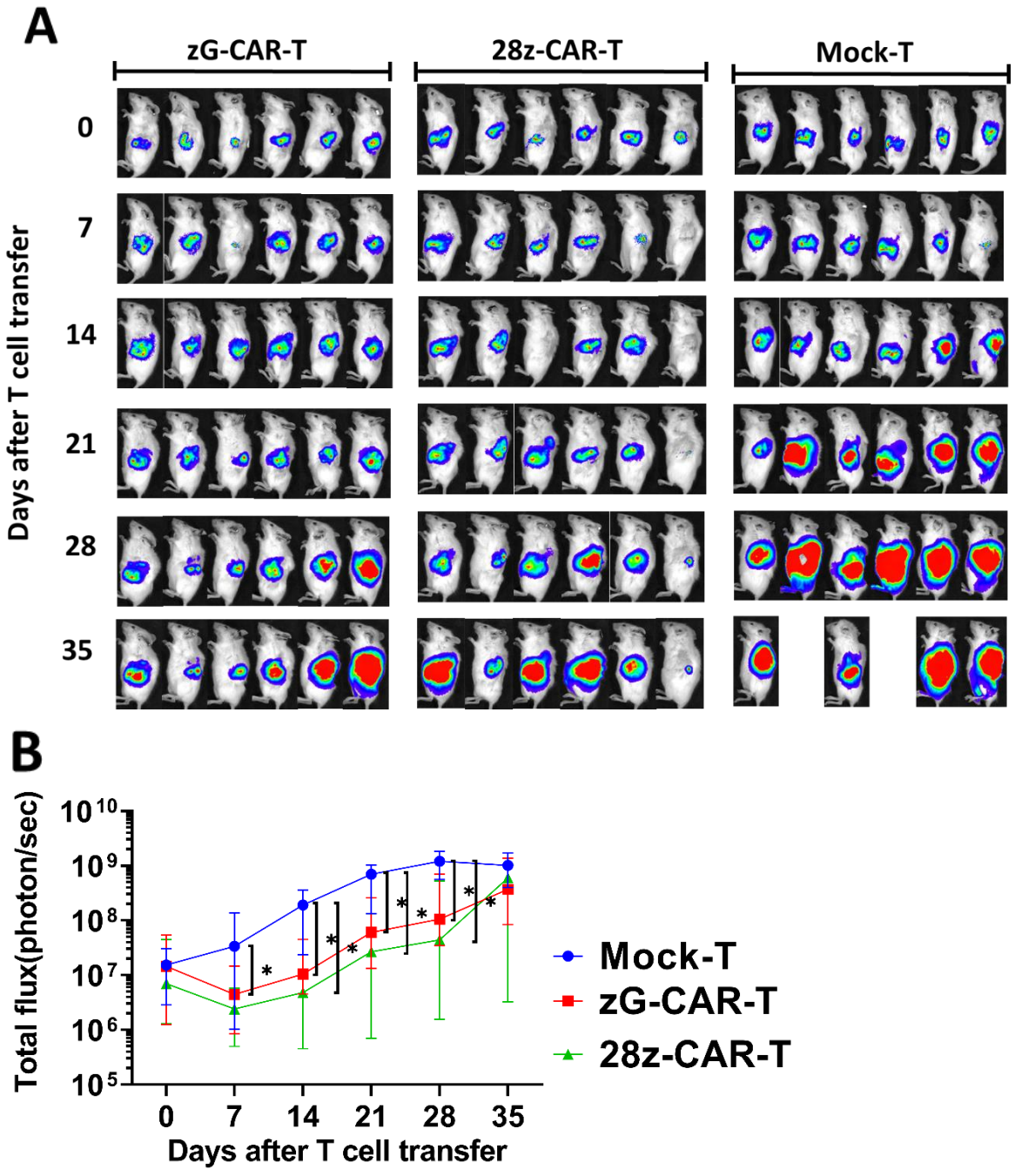


図 8　膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルにおける抗腫瘍効果の検討

A: IVIS イメージングによる評価

B: IVIS イメージング画像からの Total flux による定量化

*: P<0.05

４）CEA 特異的 CAR-T 細胞による治療介入後の膵腫瘍における免疫組織学的検討 (図 9)

Day14、21、28 に CEA 特異的 CAR-T 細胞ないし Mock-T 細胞 (0.8×10^7 個/匹)で治療したマウスをそれぞれ安楽死させ、腫瘍を摘出し免疫組織学的染色を行った (n=2；day28 CAR-T 群は n=1)。CK 発現は腫瘍に一致して認め、更に、CEA 特異的 CAR-T 細胞治療群では抗腫瘍効果に伴い CEA 発現の低下を認めた (図 9A)。本研究では CD8 リンパ球を CEA 特異的 CAR-T 細胞のサロゲートマーカーとして評価した。CEA 特異的 CAR-T 細胞は膵腫瘍への浸潤を認めた (図 9B)。また、Mock-T 細胞群と比較するために腫瘍を 1 視野 $0.14mm^2$ の範囲内において CD8 陽性細胞を 3-10 視野 (day21 CAR-T 群のみ 3 視野)でカウントすると、CEA 特異的 CAR-T 細胞が Mock-T 細胞と比較して有意に膵腫瘍への浸潤を認めた (図 9C)。

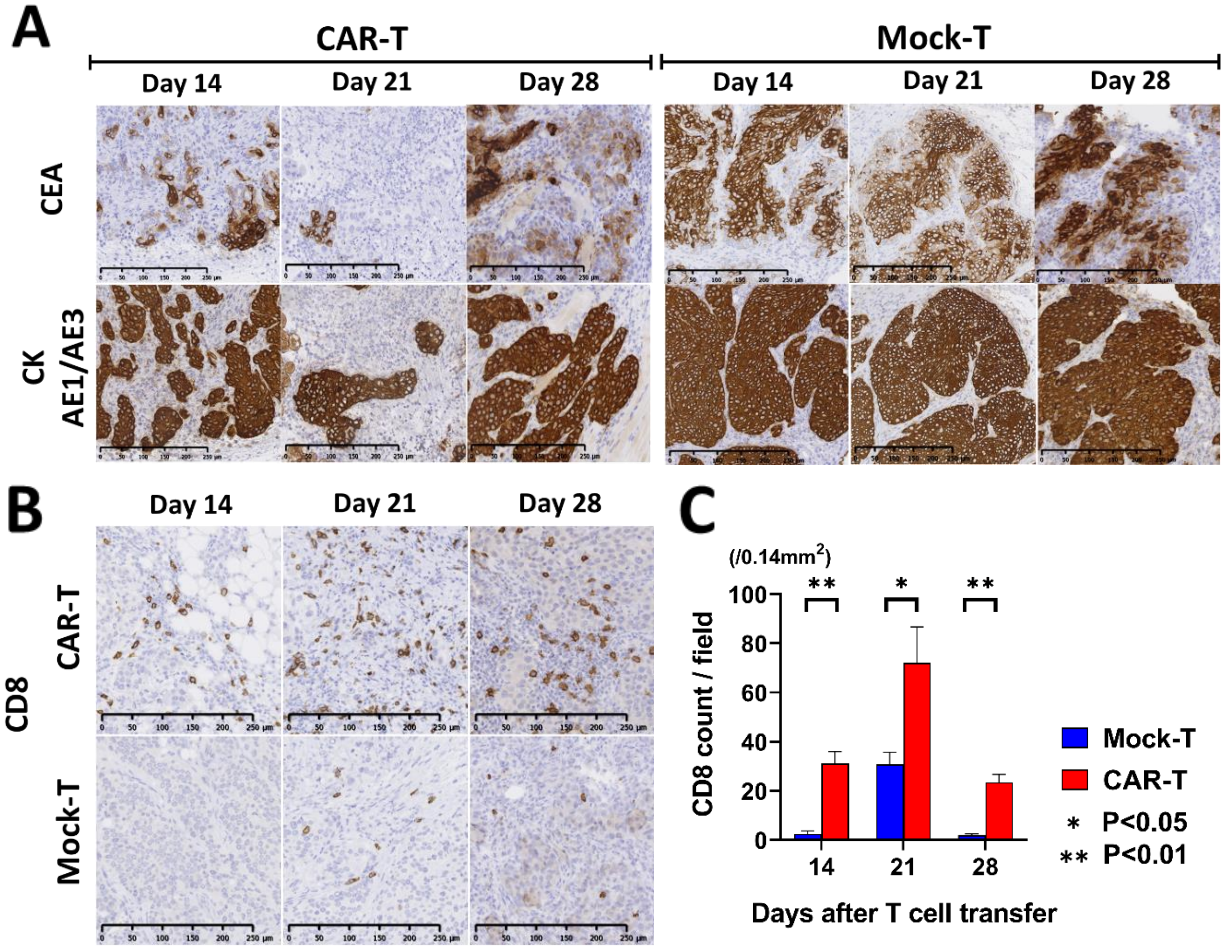


図 9　治療介入後マウスの摘出標本における免疫組織学的染色結果

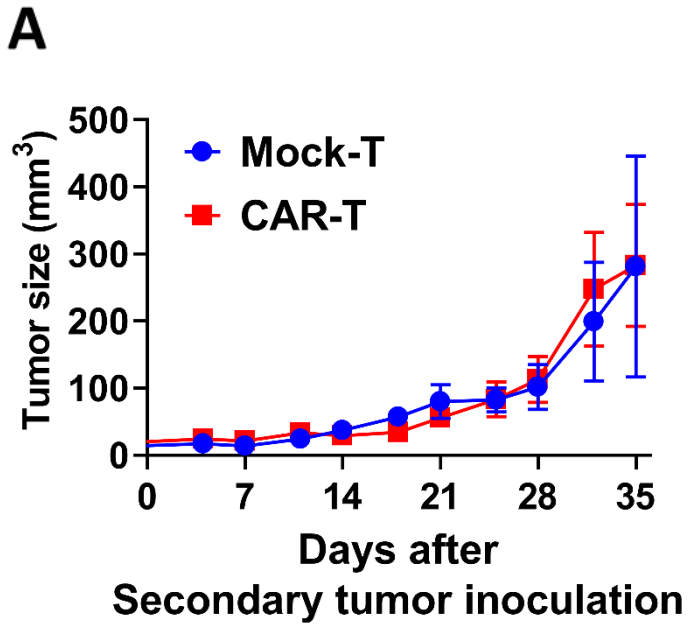
A: 代表的な免疫組織化学染色像 (CEA、CK AE1/AE3)

B: 膵腫瘍への CD8 陽性細胞の浸潤

C: 膵腫瘍内の CD8 陽性細胞数 (1 視野 $0.14mm^2$)

５）**Re-challenge** テストによる抗腫瘍効果評価及び免疫組織学的検討**(**図 **10)**

治療開始後より、徐々に膵原発に TME が形成されている可能性があるため、長期的な CEA 特異的 CAR-T 細胞の持続性や抗腫瘍効果に関して評価を行う為に Re-challenge テストを行った。上記の方法と同様に膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを作製し、治療介入を先述のプロトコール通り施行した Day21 に Luciferase 遺伝子を導入されていない BxPC-3 をマウス背部に皮下注射を行い、皮下腫瘍を作製した。治療効果の評価として皮下腫瘍の作製日 (膵腫瘍作製から Day21)を Day0 とし、週 2 回のサイズ測定で行った。CEA 特異的 CAR-T 細胞治療群は Mock-T 細胞群と比較して皮下腫瘍サイズの縮小を認めず、皮下腫瘍への抗腫瘍効果を認めることが出来なかった (図 10A)。次に Day7、14、21 に CEA 特異的 CAR-T 細胞ないし Mock-T 細胞で治療したマウスをそれぞれ安楽死させ、皮下腫瘍を摘出し免疫組織学的染色を行った (n=2 匹；day21 Mock-T 群は n=1)。両群において、皮下腫瘍の CEA 発現の低下は認めなかった (図 10B)。また、CEA 特異的 CAR-T 細胞は皮下腫瘍への抗腫瘍効果は認めなかったが、皮下腫瘍へ浸潤する像を認めた (図 10C)。また、上記の同様の測定法において CD8 陽性細胞を 10 視野でカウントすると、CEA 特異的 CAR-T 細胞が Mock-T 細胞と比較して早期に皮下腫瘍への浸潤を認めた (図 10D)。



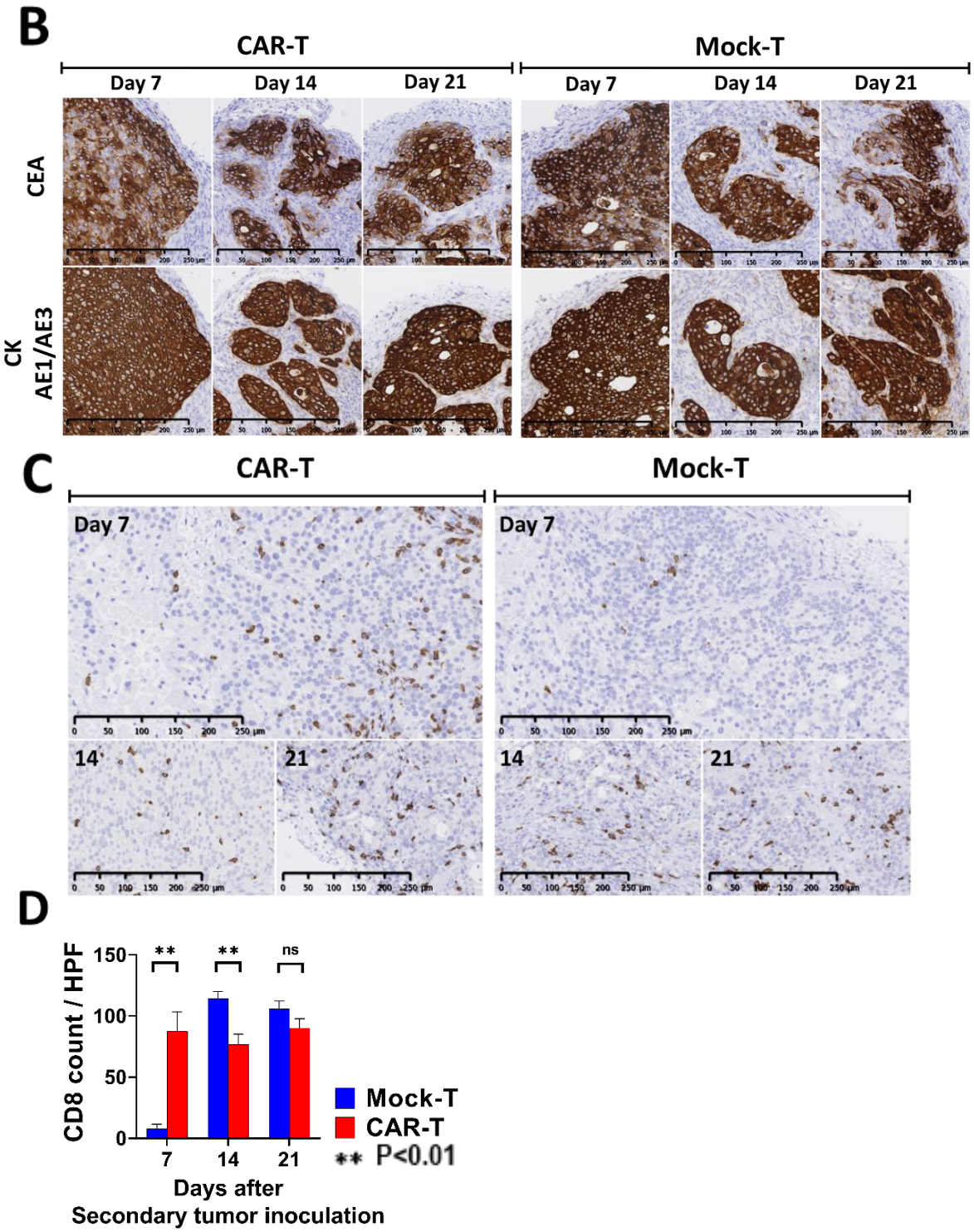


図 10　Re-challenge テストにおける皮下腫瘍に対する評価

A: 皮下腫瘍体積の経時的変化

B: 代表的な免疫組織化学染色像 (CEA、CK AE1/AE3)

C: 膵腫瘍への CD8 陽性細胞の浸潤

D: 膵腫瘍内の CD8 陽性細胞数 (1 視野 0.14mm^2)

6）*Ex vivo* における CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価 (図 11)

上記の方法と同様に治療介入を行った膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルから day28、day35 で各組織を採取し単細胞懸濁液を作製した (n=2；day28 CAR-T 群は n=1)。CEA 特異的 CAR-T 細胞群で治療したマウスの TILs および脾臓、PBMCs では、BxPC-3 との共培養により IFN-γ 陽性細胞の割合には変化がない傾向にあった (図 11A)。ポジティブコントロールにおける PMA+ ionomycin では IFN-γ の産生を示した (図 11B)。

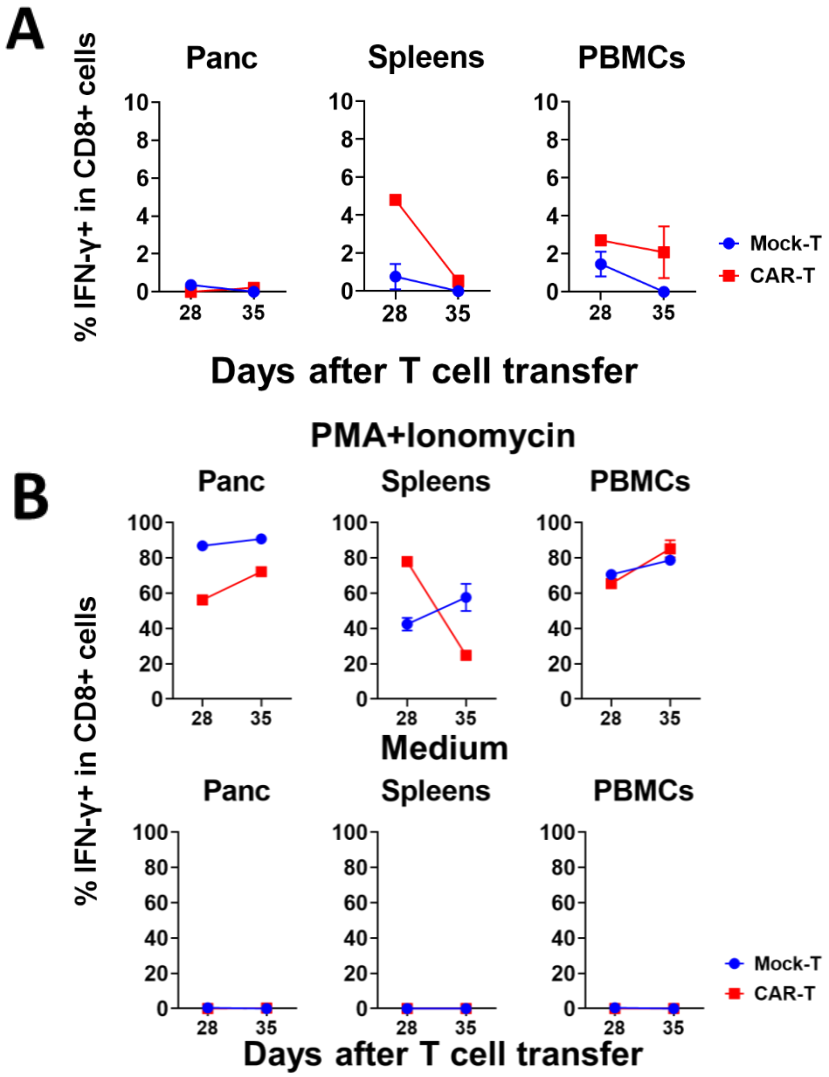


図 11　*Ex vivo* における CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価

A: 各組織由来の単細胞懸濁液と共培養における CEA 特異的 CAR-T 細胞の IFN-γ 分泌測定

B: Ex vivo におけるポジティブコントロール群 (PMA+Ionomycin)とネガティブコントロール群 (Medium)

7）膵癌切除症例の患者背景 (表 1)

膵癌患者 8 名の患者背景を表 1 に示す。男性は 6 名 、女性は 2 名 、年齢中央値は 70 歳、術前血清 CEA は中央値 4.8 ng/ ml であった。

表 1　膵癌患者背景

	n=8
Gender	
Male	6 (75.0)
Female	2 (25.0)
Age (years old)	70 (52-77)
Serum CEA(ng/ml)	4.8(1.3-10.3)
<5	3.2(50.0)
≧5	5.6(50.0)

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

8）PTs 由来と HDs 由来 PBMCs 及び CEA 特異的 CAR-T 細胞の表現型と proliferation (図 12)

PTs 群と HDs 群からそれぞれ採取した PBMCs の CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の構成に有意差は認めなかった (図 12A)。しかし、PTs 群と HDs 群からそれぞれ作製した CEA 特異的 CAR-T 細胞の CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の構成に違いを認め、HDs 群では CD8 陽性細胞の割合が多かった (図 12A)。CEA 特異的 CAR-T 細胞作製における PBMCs 拡大培養時 (Day0-4)および CAR 遺伝子導入後拡大培養時の(Day5-10)増殖率が PTs 群において HDs 群と比較して増殖率が低かった (図 12B)。

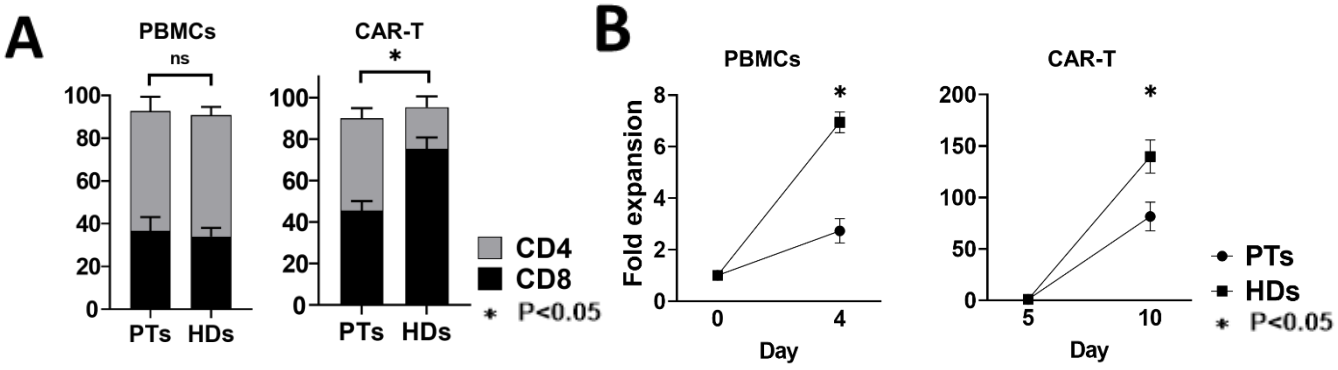


図 12　*In vitro* における PTs 群と HDs 群の PBMCs 及び CEA 特異的 CAR-T 細胞の比較検討

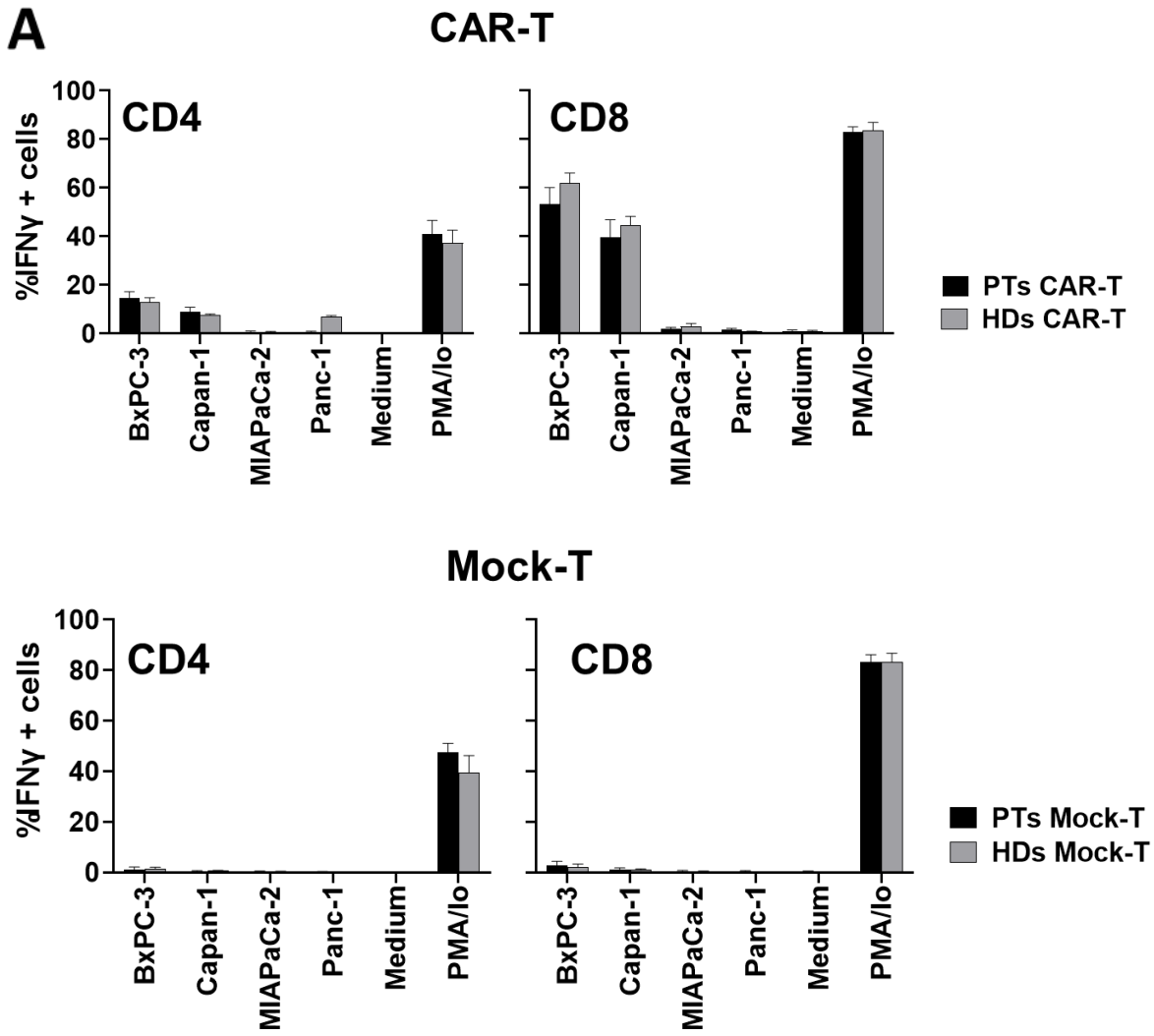
A：PTs 由来と HDs 由来 PBMCs 及び CAR-T 細胞の CD4/CD8 比(各 n=8)

B：PTs 由来と HDs 由来 PBMCs 及び CAR-T 細胞の拡大培養増殖率 (n=8)

９）*In vitro* における PTs 群と HDs 群由来 CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価(図 13)

PTs 群と HDs 群由来の CEA 特異的 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を比較検討するために、CEA 特異的 CAR-T 細胞とヒト膵癌細胞株を共培養して *in vitro* 解析を行った。対照群として両群の Mock-T 細胞を使用した。ICC にて IFN-γ の分泌量を測量すると、両群ともに CEA 発現株である BxPC-3 と Capan-1 において IFN-γ の分泌増加を認めたが、PTs 群と HDs 群に統計学的有意差は認めなかった (図 13A)。

7-AAD/ CFSE を用いた細胞毒性アッセイでも同様に BxPC-3 と Capan-1 に対して容量依存的に細胞障害活性を示したが、PTs 群と HDs 群に統計学的有意差は認めなかった (図 13B)。



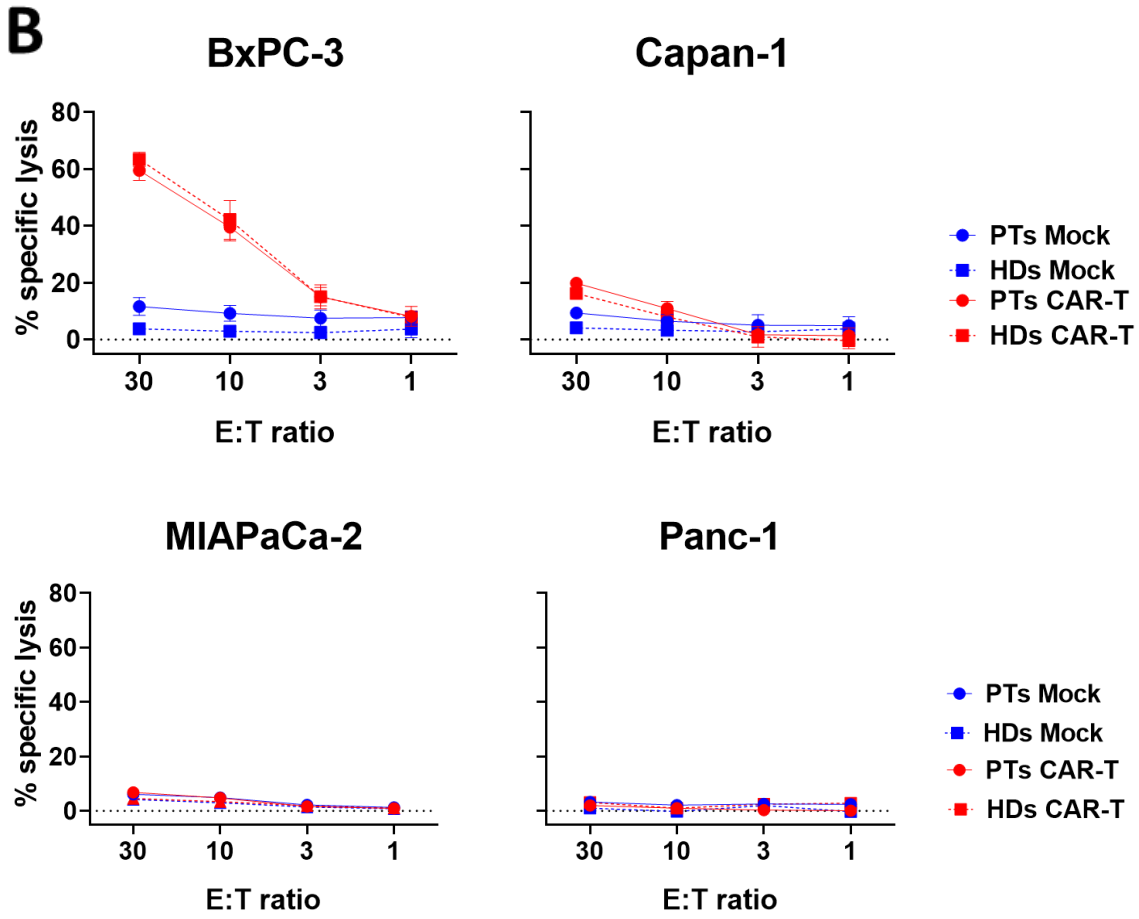


図 13　ヒト膵癌細胞株に対する PTs 群と HDs 群における CEA 特異的 CAR-T 細胞の機能評価

A: 共培養における両群 CEA 特異的 CAR-T 細胞の IFN-γ 分泌比較 (n=5)

B: 両群 CEA 特異的 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果比較 (n=5)

１０）*In vitro* における PTs 群と HDs 群由来 PBMCs 及び CEA 特異的 CAR-T 細胞の PD-1 発現検討 (図 14)

PTs 群と HDs 群から採取した PBMCs 及び作製した CEA 特異的 CAR-T 細胞の PD-1 発現には有意差を認めなかった (図 14A)。膵癌細胞株との共培養後の PD-1 発現の評価では、CEA 陰性である Panc-1 との共培養では両群共に PD-1 発現の増加は認めず、CEA 陽性である BxPC-3 との共培養では PD-1 の発現の増加を認めた。しかし、BxPC-3 との共培養後の両群の PD-1 の発現率に有意差は認めなかった (図 14B)。

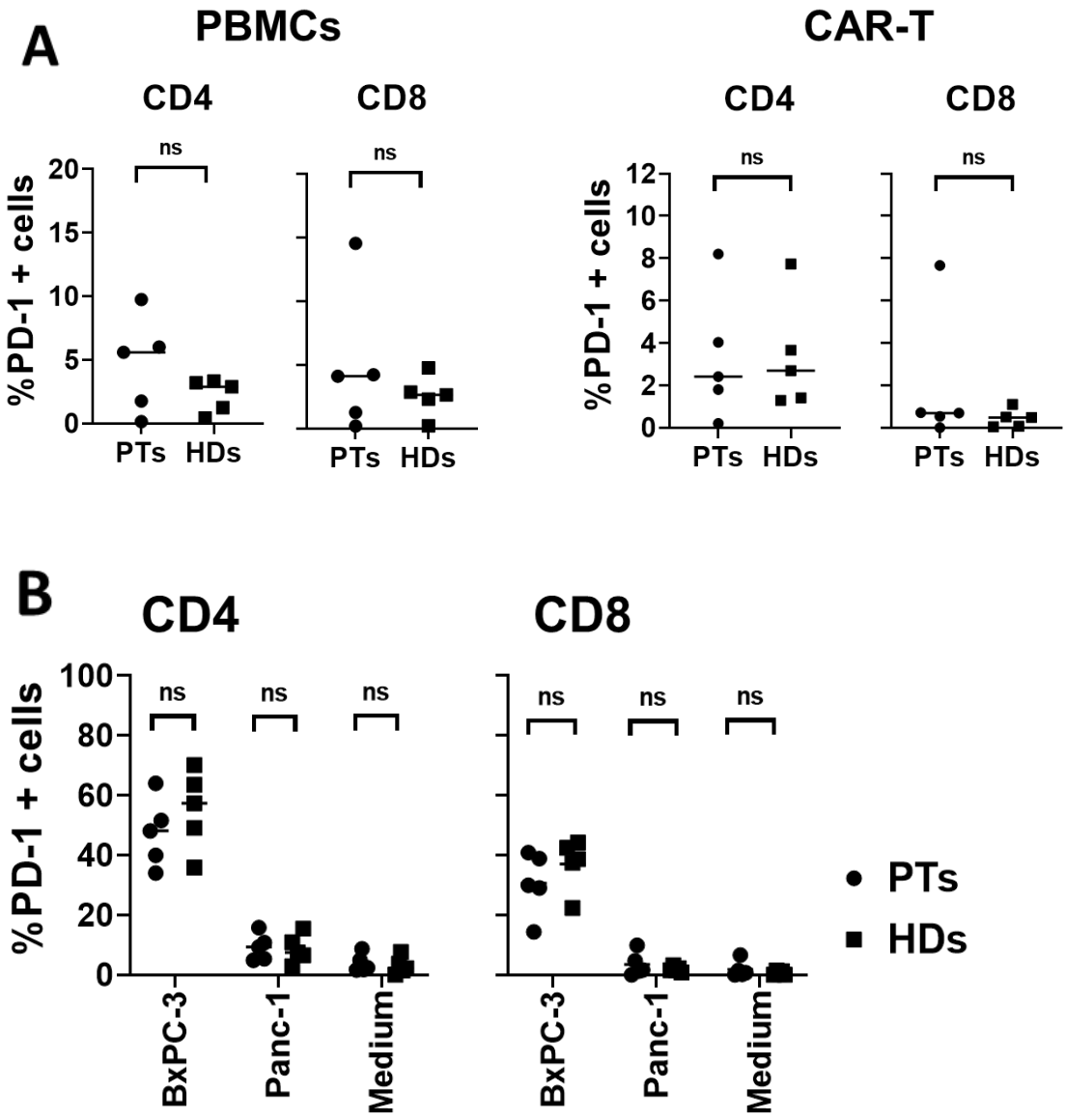


図 14　PTs 由来と HDs 由来 PBMCs 及び CEA 特異的 CAR-T 細胞の PD-1 発現率

A：PTs 由来と HDs 由来 PBMCs 及び CAR-T 細胞の CD4・CD8 における PD-1 発現率 (n=5)

B：PTs 由来及び HDs 由来 CAR-T 細胞と膵癌細胞株共培養後の PD-1 発現率 (n=5)

考察

CAR-T 療法は、血液悪性腫瘍に対しては飛躍的な進歩を遂げ、顕著な治療効果が証明されており、臨床にも用いられている(Porter et al, 2011; Maude et al, 2018)。しかし、固形腫瘍の治療における CAR-T 療法の有効性は依然として不十分のままである(Zhang et al, 2016)。したがって、固形腫瘍の治療において現在の CAR-T 療法が直面している課題を理解し、克服することが固形腫瘍患者に有効な CAR-T 療法を確立するために必要である。固形腫瘍に対する CAR-T 療法の課題は CAR-T 細胞の持続性の低下、腫瘍への遊走・浸潤能、免疫抑制に働く腫瘍微小環境、疲弊化があげられる(Craddock et al, 2010; Caruana et al, 2015; Renner et al, 2017; Kumar et al, 2021)。本研究では、ヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルを用いて、膵癌に対する CAR-T 細胞療法の治療効果を発揮していくために、上記いずれの課題で CAR-T 細胞療法の治療効果が最も阻害されているのかをより究明するために取り組んだ。

また、CAR-T 療法は主に自家細胞療法で行われており、固形癌の担癌患者から作製された CAR-T 細胞が自家細胞療法に適しているかどうかは不透明である(Louis et al, 2011; Katz et al, 2015; Guo et al, 2018)。担癌状態では腫瘍特異的 T 細胞が腫瘍形成の初期段階から長期的に腫瘍抗原に暴露され続けているため疲弊化マーカーを発現しやすく、それにより不可逆的な T 細胞の機能障害が惹起されやすい (Schietinger et al, 2016; Graham et al, 2018)。 したがって、担癌患者から採取・作製した CAR-T 細胞そのものにも機能障害を認める可能性がある。そこで本研究では、CAR-T 治療の膵癌患者への臨床応用への一助として膵癌患者から作製した CAR-T 細胞の機能プロファイルを調べ、健常者から作製した CAR-T 細胞と比較した。

初めに本研究で主に用いた zG 型の CAR-T 細胞に関して抗腫瘍効果を評価した。CAR-T 細胞は、もともと scFv と CD3ζ 鎖を組み合わせたものを第 1 世代と呼称し、その第 1 世代に T 細胞活性化のために重要な副刺激分子も組み込んだ CAR-T 細胞を第 2 世代と呼び、副刺激分子として CD28 や 4-1BB が一般的に用いられている(Czaplicka et al, 2024)。本研究では副刺激分子に GITR 分子を用いた zG 型を用いたが、zG 型は 28z 型と同等の抗腫瘍効果を *In vitro* と *In vivo* において示すことが出来た。*In vitro* と *In vivo* の結果では CAR-T 細胞は容量依存性・抗原特異的に抗腫瘍効果を示したが、*In vivo* の結果では抗腫瘍効果は一時的であり、経時的に CAR-T 細胞の腫瘍コントロールは失われた結果となった。*In vivo* 治療実験で用いたヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルは腫瘍の増殖、血管・リンパ管浸潤、転移・播種の過程を臨床例と同様に表すことができるとされており(Erstad et al, 2018)、臨床でも同様の事象が起こると推察される。これまで、CAR-T 細胞が抗腫瘍効果を失われる原因の一つとしては CAR-T 細胞の生存が関わっていることが示唆されていた(Haas et al,

2019; Wang et al, 2021)。抗腫瘍効果喪失の原因を検証するために治療マウスモデルの腫瘍を取り出し、immunohistochemistry (IHC)で評価した結果では Day28 まで腫瘍への浸潤能は保たれていた。したがって、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果が減弱していくことを考慮すると、CAR-T 細胞の機能不全が原因であると示唆された。しかし、腫瘍は腫瘍形成の過程で腫瘍血管やリンパ系を介して、免疫応答を阻害する Programmed cell Death ligand 1 (PD-L1)などの膜タンパク発現や制御性 T 細胞、腫瘍随伴マクロファージや骨髄由来免疫抑制細胞などの免疫系細胞やがん関連繊維芽細胞などのさまざまな細胞を取り込みながら TME を形成していく (Arneth, 2019)。これらの免疫応答を抑制する因子が CAR-T 細胞に影響を与えることで CAR-T 細胞の機能不全が惹起された可能性が考えられた。そこで、CAR-T 細胞に対する腫瘍の TME の影響を受けないよう検証するために、re-challenge テストを行った。CAR-T 細胞ないし Mock-T 細胞を輸注したヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルにおいて Day21 に naiive な BxPC-3 を用いて皮下腫瘍を作製することで、TME が形成されていない腫瘍環境を新たに想定した。皮下腫瘍を IHC で評価行うと、CAR-T 細胞の皮下腫瘍への浸潤を認めていたが、しかし、皮下腫瘍の縮小は認めなかった。したがって、CEA 特異的 CAR-T 細胞は長期でも腫瘍への浸潤、持続性は保たれているが、抗腫瘍効果は失われている結果となった。また、Day14、21 には Mock-T 細胞群も CD8 陽性細胞が皮膚腫瘍内へ浸潤を認めているが、これはヒト T 細胞が腫瘍に特異的な T 細胞レセプターを発現したことによって皮下腫瘍への非特異的な集積を認めた可能性がある。この結果からも、CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の喪失は TME による影響ではなく、CAR-T 細胞の機能不全が示唆された。しかし、膵腫瘍の IHC では標的抗原である CEA の発現低下も認めているため、標的抗原が喪失したことによる抗腫瘍効果減弱の可能性も考えられるため、その検証は今後の課題である。

続いて CAR-T 細胞の機能不全を検証するために *ex vivo* の実験を行った。ヒト膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルから各組織を取り出し、BxPC-3 との共培養を行った。治療後期である Day28、Day35 における CAR-T 細胞は共培養にて IFN-γ の産生は認めなかった。ポジティブコントロールである PMA/Io を添加した群では IFN-γ の産生を認め、ネガティブコントロールである Medium のみの群では IFN-γ の産生を認めない為、CAR-T 細胞の品質は保たれていると考える。したがって、BxPC-3 との共培養で CAR-T 細胞が IFN-γ 産生の反応を示さなかった原因は、CAR-T 細胞の細胞障害活性の機能低下であることが示唆された。これは、CAR-T 細胞の PD-1 などの疲弊化マーカーを検証することで、さらに適切に評価される可能性がある。実際に、PD-1 阻害薬と CAR-T 細胞を併用することで CAR-T 細胞の抗腫瘍効果が再活性化することが報告されている(Cherkassky et al, 2016; Ba et al, 2023)。

今回、CEA 特異的 CAR-T 細胞を用いた膵癌患者への臨床応用に向けて、実際の膵

癌患者から採取・作製したCAR-T細胞が十分な抗腫瘍効果を発揮するかを検証した。これは、担癌患者におけるT細胞が機能不全を惹起されていることが示唆されることから(Schietinger et al, 2016)、それをもとに作製するCAR-T細胞にも影響があることが考えられるためである。今回の実験で、健常者群と膵癌患者群において膵癌細胞に対して抗腫瘍効果は同等だが、両群間のCD4/CD8比に有意差を認めていた。これは、CD4/CD8比により抗腫瘍効果に差があることが示されており(Sommermeyer et al, 2016)、CD4/CD8比を規定した検証も必要と考える。さらに、両群のCAR-T細胞PD-1発現率に有意差は認めず、ヒト膵癌細胞株との共培養後でのCAR-T細胞PD-1発現率にも有意差は認めなかった。しかし、体系的に評価するために他の疲弊化マーカーも検索が必要である。

また、膵癌患者由来のCAR-T細胞の増殖率は健常者由来のCAR-T細胞と比較して著明に低かった。この結果は血液悪性腫瘍担癌患者からのT細胞における報告とも一致している(Singh et al, 2016; Das et al, 2019)。CAR-T細胞の増殖率が低いことは、CAR-T療法を導入するまでの時間を要することに直結し、速やかな治療導入を妨げる要因となる(Graham et al, 2018)。したがって、患者由来のCAR-T細胞を用いた場合には増殖率の低下に対応していかなければならないが、それと同時に将来的には健常者由来のCAR-T細胞を用いたCAR-T療法を確立できれば、速やかに治療導入が行うことができ、広く臨床応用される可能性がある。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

・CEA 特異的 CAR-T 細胞は、膵癌 orthotopic xenograft マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示したが、その効果は一時的であった。
・CEA 特異的 CAR-T 細胞は膵原発巣への浸潤が抗腫瘍効果を消失した後期でも認めていた。CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の喪失は CAR-T 細胞における細胞障害活性の機能低下が主因であることが示唆された。
・膵癌患者由来の CAR-T 細胞は健常者由来の CAR-T 細胞と比較して、*in vitro* 実験において抗腫瘍効果は同等であったが、増殖率が有意に低値を認めた。

② 新知見の意義・今後の展望

CEA を標的抗原とした膵癌に対しての CAR-T 療法は効果に時間的制約があるが有用であることが示唆された。さらに、固形腫瘍に対する CAR-T 療法には様々な課題があるが、本研究の結果から CAR-T 細胞における細胞障害活性の機能低下が治療抵抗性の主因として示され、機能不全に対して CAR 遺伝子を改良することにより膵癌治療においてさらなる画期的な治療法として発展することが期待される。

③ 今後の課題

CEA 特異的 CAR-T 細胞による膵癌症例に対する有用な治療法の確立が最終的な目標である。そのためには、CAR-T 細胞の疲弊化・機能不全についてさらなる検証が必要である。この課題を克服するためには、CAR-T 細胞と免疫チェックポイント阻害薬の併用や CAR-T 細胞そのものにゲノム編集技術を用いて疲弊化を防ぐ方法が考えられる。

また、現状では担癌患者から作製する自家細胞の CAR-T 療法が主流になるが、CAR-T 細胞の増殖不良による作製不成功や供給不安定による治療逸脱も報告される。他にも、病勢の進行した患者に対して治療導入までの時間がかかり、安定した素早い供給が望まれる。ひとつには健常者由来の CAR-T 細胞を作製・保存しておき、速やかに用いることが出来る off-the-shelf 化が想定される。これには健常者由来の T 細胞をゲノム編集技術により HLA 遺伝子や内因性の T 細胞受容体を編集することで急性期拒絶反応や移植片対宿主病を予防する方法や、HLA 非依存性で細胞障害活性をもつ γδ-T 細胞による CAR-T 細胞を用いることで、問題を克服することが期待されている。

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 先生、学位論文作製にあたり、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、CEA特異的CAR-T細胞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

Adusumilli PS, Zauderer MG, Rivière I, Solomon SB, Rusch VW, O'cearbhaill RE, Zhu A, Cheema W, Chintala NK, Halton E, et al (2021) A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T-cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. Cancer Discov, 11, 2748-2763.

Arneth B (2019) Tumor Microenvironment. Medicina (Kaunas), 56.

Ba H, Dai Z, Zhang Z, Zhang P, Yin B, Wang J, Li Z and Zhou X (2023) Antitumor effect of CAR-T cells targeting transmembrane tumor necrosis factor alpha combined with PD-1 mAb on breast cancers. J Immunother Cancer, 11.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, Mcmiller TL, 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.

Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, Ittmann MM, Marchetti D and Dotti G (2015) Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. Nat Med, 21, 524-529.

Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, Sadelain M and Adusumilli PS (2016) Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. J Clin Invest, 126, 3130-3144.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, De La Fouchardière C, et al (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med, 364, 1817-1825.

Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM and Foster AE (2010) Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. J Immunother, 33, 780-788.

Czaplicka A, Lachota M, Pączek L, Zagożdżon R and Kaleta B (2024) Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Pancreatic Cancer: A Review of Current Evidence. Cells, 13.

Das RK, Vernau L, Grupp SA and Barrett DM (2019) Naïve T-cell Deficits at Diagnosis and after Chemotherapy Impair Cell Therapy Potential in Pediatric Cancers. Cancer Discov, 9, 492-499.

Erstad DJ, Sojoodi M, Taylor MS, Ghoshal S, Razavi AA, Graham-O'regan KA, Bardeesy N, Ferrone CR, 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.

Fan J, Das JK, Xiong X, Chen H and Song J (2020) Development of CAR-T Cell Persistence in Adoptive Immunotherapy of Solid Tumors. Front Oncol, 10, 574860.

Foeng J, Comerford I and Mccoll SR (2022) Harnessing the chemokine system to home CAR-T cells into solid tumors. Cell Rep Med, 3, 100543.

Graham C, Jozwik A, Pepper A and Benjamin R (2018) Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? Cells, 7.

Guo Y, Feng K, Liu Y, Wu Z, Dai H, Yang Q, Wang Y, Jia H and Han W (2018) Phase I Study of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Patients with EGFR-Positive Advanced Biliary Tract Cancers. Clin Cancer Res, 24, 1277-1286.

Haas AR, Tanyi JL, O'hara MH, Gladney WL, Lacey SF, Torigian DA, Soulen MC, Tian L, Mcgarvey M, Nelson AM, et al (2019) Phase I Study of Lentiviral-Transduced Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Recognizing Mesothelin in Advanced Solid Cancers. Mol Ther, 27, 1919-1929.

Kankeu Fonkoua LA, Sirpilla O, Sakemura R, Siegler EL and Kenderian SS (2022) CAR T cell therapy and the tumor microenvironment: Current challenges and opportunities. Mol Ther Oncolytics, 25, 69-77.

Katz SC, Burga RA, Mccormack E, Wang LJ, Mooring W, Point GR, Khare PD, Thorn M, Ma Q, Stainken BF, 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 Cancer Res, 21, 3149-3159.

Kumar J, Kumar R, Kumar Singh A, Tsakem EL, Kathania M, Riese MJ, Theiss AL, Davila ML and Venuprasad K (2021) Deletion of Cbl-b inhibits CD8(+) T-cell exhaustion and promotes CAR T-cell function. J Immunother Cancer, 9.

Lin FY, Stuckert A, Tat C, White M, Ruggieri L, Zhang H, Mehta B, Lapteva N, Mei Z, Major A, et al (2024) Phase I Trial of GD2.CART Cells Augmented With Constitutive Interleukin-7 Receptor for Treatment of High-Grade Pediatric CNS Tumors. J Clin Oncol, 42, 2769-2779.

Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, et al (2011) Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. Blood, 118, 6050-6056.

Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, et al (2018) Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med, 378, 439-448.

Mizrahi JD, Surana R, Valle JW and Shroff RT (2020) Pancreatic cancer. Lancet, 395, 2008-2020.

Nap M, Mollgard K, Burtin P and Fleuren GJ (1988) Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. Tumour Biol, 9, 145-153.

Narayan V, Barber-Rotenberg JS, Jung IY, Lacey SF, Rech AJ, Davis MM, Hwang WT, Lal P, Carpenter EL, Maude SL, et al (2022) PSMA-targeting TGFβ-insensitive armored CAR T cells in metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 trial. Nat Med, 28, 724-734.

Porter DL, Kalos M, Zheng Z, Levine B and June C (2011) Chimeric Antigen Receptor Therapy for B-cell Malignancies. J Cancer, 2, 331-332.

Renner K, Singer K, Koehl GE, Geissler EK, Peter K, Siska PJ and Kreutz M (2017) Metabolic Hallmarks of Tumor and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. Front Immunol, 8, 248.

Rodriguez-Garcia A, Palazon A, Noguera-Ortega E, Powell DJ, Jr. and Guedan S (2020) CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. Front Immunol, 11, 1109.

Saluja AK and Dudeja V (2013) Relevance of animal models of pancreatic cancer and pancreatitis to human disease. Gastroenterology, 144, 1194-1198.

Sato O, Tsuchikawa T, Kato T, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Takeuchi Y, Sasaki K, Nakamura T, Umemoto K, et al (2023) Tumor Growth Suppression of Pancreatic Cancer Orthotopic Xenograft Model by CEA-Targeting CAR-T Cells. Cancers (Basel), 15.

Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, Lauer P, Brockstedt DG, Knoblaugh SE, Hammerling GJ, et al (2016) Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity, 45, 389-401.

Siegel RL, Miller KD and Jemal A (2018) Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin, 68, 7-30.

Singh N, Perazzelli J, Grupp SA and Barrett DM (2016) Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies. Sci Transl Med, 8, 320ra323.

Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ and Riddell SR (2016) Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. Leukemia, 30, 492-500.

Versteijne E, Suker M, Groothuis K, Akkermans-Vogelaar JM, Besselink MG, Bonsing BA, Buijsen J, Busch OR, Creemers GM, Van Dam RM, et al (2020) Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. J Clin Oncol, 38, 1763-1773.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA,

Ma WW, Saleh MN, et al (2013) Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. N Engl J Med, 369, 1691-1703.

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.

Wang Y, Tong C, Dai H, Wu Z, Han X, Guo Y, Chen D, Wei J, Ti D, Liu Z, et al (2021) Low-dose decitabine priming endows CAR T cells with enhanced and persistent antitumour potential via epigenetic reprogramming. Nat Commun, 12, 409.

Yamaguchi K, Enjoji M and Tsuneyoshi M (1991) Pancreatoduodenal carcinoma: A clinicopathologic study of 304 patients and immunohistochemical observation for CEA and CA19-9. Journal of Surgical Oncology, 47, 148-154.

Ye B, Stary CM, Li X, Gao Q, Kang C and Xiong X (2018) Engineering chimeric antigen receptor-T cells for cancer treatment. Molecular Cancer, 17, 32.

Zhang H, Ye ZL, Yuan ZG, Luo ZQ, Jin HJ and Qian QJ (2016) New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells. Int J Biol Sci, 12, 718-729.