



Title	Claspinを標的とした膀胱癌に対する遺伝子改変T細胞療法の樹立 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	堀, 寛太
Description	配架番号 : 2923
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16431号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95566
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HORI_Kanta_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 堀 寛太

学 位 論 文 題 名

Claspin を標的とした膀胱癌に対する遺伝子改変 T 細胞療法の樹立(Establishment of potent TCR-T cells specific for cisplatin-resistance related tumor-associated antigen, CLSPN)

【背景と目的】膀胱癌は 10 番目に頻度の高いがんであり、全世界で年間 55 万人が新たに罹患し、20 万人以上が死亡している。膀胱癌の新規症例の 25%は筋層浸潤癌であり、その約半数は遠隔転移を来す。遠隔転移を伴う症例では予後不良であり 5 年生存率は 7-15%程度に留まる。すなわち、遠隔転移を伴う膀胱癌の生命予後改善が問題となる。長年にわたり局所浸潤や遠隔転移を伴う膀胱癌に対する治療の主軸は cisplatin(CDDP)を中心とした化学療法であった。しかしながら、多くの症例において、最終的には治療抵抗性を示すようになり、新たな治療戦略が必要となる。近年になり膀胱癌に対して免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の使用が承認され本邦でも広く臨床使用されるようになった。しかしながら、その奏効率は 20%程度と幅広く有効であるとは言い難い。さらに新規の治療法として、Nectin-4 を標的とした抗体薬物複合体(ADC)であるエンホルツマブベドチンが 2021 年より本邦でも保険収載された。化学療法および ICI 抵抗性の進行性膀胱癌において、エンホルツマブベドチンは奏効率 40%と有効性を示しており、ICI と ADC の併用療法も臨床応用され始めている。しかしながら、ICI と ADC の併用療法および CDDP 治療後の治療選択は極めて限られている。新たな免疫療法の観点から、T 細胞移入療法の開発が進んでいる。具体的に Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) や Folate Receptor alpha (FR α) などの膜蛋白を標的とした膀胱癌に対するキメラ抗原受容体-T 細胞療法(CAR-T)の臨床開発が行われている。しかしながら PSMA や FR α は膀胱癌では予後の良い非筋層浸潤癌で発現が高いことが知られており、筋層浸潤膀胱癌に対する有効な治療として適正であるか、疑問が残る。PSMA や FR α 以外の治療標的となり得る癌抗原は過去に複数報告されているが、浸潤癌や、治療抵抗性膀胱癌に発現する治療標的の報告は無かった。

本研究では、化学療法における問題点となる CDDP 耐性膀胱癌を有効に治療できる治療標的として、我々は Claspin(CLSPN)という分子に着目した。CLSPN は DNA 損傷や DNA 複製ストレスに関与する核内タンパク質であり、尿路上皮癌では浸潤癌で発現が高く、CLSPN 高発現は予後不良と相関する。先行研究において、我々はヒト筋層浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC3 の CDDP 耐性株(CR)は野生株(WT)に比べて高い CLSPN 発現レベルを示すことを明らかにした。さらに、CLSPN 特異的な細胞障害性 T 細胞(CTL)を樹立し、CLSPN ペプチド特異的 CTL が CR に高い反応性を示す事を見出した。これらの結果から、CLSPN 標的免疫療法は、CDDP 耐性浸潤膀胱癌に対する有効な治療戦略と考えられた。しかしながら、CDDP は T 細胞増殖を抑制する副作用もあり、併用療法として工夫が必要と考えられた。本研究においては、患者生体外で T 細胞を増殖し、養子免疫療法を行う基礎研究として、CLSPN 特異的 T 細胞受容体 (TCR)改変 T 細胞 (TCR-T 細胞)を開発し、CDDP 耐性膀胱癌症例における養子免疫療法開発を基盤とする事を目的とした

【材料と方法】既報で報告している CLSPN 特異的な細胞障害性 T 細胞(yc3)の TCR 遺伝子のクローニングを 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) PCR を用いて行った。オリジナルの yc3TCR 遺伝子(Ori TCR)および、GeneArt GeneOptimizer によりコドン最適化を行った Codon-optimized yc3 TCR 人工遺伝子(Opt TCR)の TCR コンストラクトを作製し、pMXs レトロウイルスベクターに導入した。pMXs レトロウ

イルストランスフェクションにより、健常人 PBMC より TCR コンストラクトを導入した 2 種類の TCR-T (Ori, Opt) を作成し、フローサイトメトリーで TCR 遺伝子発現の確認を行った。TCR-T 細胞の反応性について interferon (IFN)- γ ELISPOT assay を、細胞障害性について LDH cytotoxicity assay を用いて検証した。Target にはペプチドを負荷された T2、K562、UM-UC3 WT、CR 細胞を用い、Effector の Negative control として遺伝子導入を行っていない T 細胞(untransduced)を用いた。Student's t-test (両側検定) を用い群間に差を認めるか検討し $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】フローサイトメトリーで Ori TCR-T と Opt TCR-T は untransduced と比較して高い TCR 発現を認めた。特に Opt TCR-T で有意差を持って高い TCR タンパク発現を認めた。2 種類の TCR-T 細胞は、IFN- γ ELISPOT assay にて CLSPN ペプチド添加 T2 細胞に対して反応を示し、HIV ペプチド添加 T2 細胞に対しては反応を示さなかった。次に、添加する CLSPN ペプチドの濃度を 10^{-12} から 10^{-5} M に調整しオリジナルの CTL である yc3 と比較しての反応閾値の検証を行った。Ori TCR-T 細胞は 10^{-7} M 以上のペプチド濃度において yc3 よりも反応性が有意に低かった。Opt TCR-T 細胞はペプチド濃度 10^{-7} M および 10^{-8} M において yc3 と比較して有意に高い反応性を認めた。細胞傷害性試験においては 2 種類の TCR-T 細胞は Negative control である K562 細胞や HIV ペプチド添加 T2 細胞と比較して CLSPN ペプチド添加 T2 細胞に対して高い細胞傷害性を示した。また、Opt TCR-T 細胞は Ori TCR-T 細胞と比較して有意に高い細胞障害性を認めた。さらに、Opt TCR-T 細胞は WT と比して CR に対して有意に高い細胞傷害性を認めた。

【考察】本研究では、CLSPN 特異的な CTL クローンより TCR 遺伝子を単離し、CLSPN 特異的 TCR-T 細胞を樹立した。Opt TCR-T がオリジナルの CTL と同等以上の反応性を認めることを確認した。また、Opt TCR-T 細胞は CLSPN 特異的な細胞傷害性を示し、CDDP 耐性の膀胱がん細胞株に対する細胞傷害性を示すことを明らかにした。Opt TCR-T 細胞は、yc3 と同じ TCR を保持するため、その特異性は同じであると考えられる。一方では、フローサイトメトリーによる TCR 発現効率の結果からコドン最適化された TCR 遺伝子は翻訳効率が良い事が示唆された。これらの結果から、CDDP と CLSPN を標的とする T 細胞療法を含む併用免疫療法は、化学療法と並行して T 細胞補充を可能にするため合理的であると考えられる。本研究で得られた知見は、CDDP 耐性がんを標的とした免疫療法や、CDDP と免疫療法の併用療法の手がかりとなるものである。