

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 富田 晃正

### 論文題目

Inhibition of MEK pathway enhances the antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against neuroblastoma.

### 論文内容の要旨

難治性がんに対するキメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変 T (chimeric antigen receptor T cells : CAR-T) 細胞療法が注目されているが、造血器腫瘍に比べ固形腫瘍での効果は限定的であり、さらなる工夫が必要である。近年、免疫チェックポイント阻害剤や細胞免疫療法と分子標的薬の併用療法の有効性が報告され、種々の臨床試験が行われている。著者らは、小児難治性がんの1つである神経芽腫の新規治療戦略の開発を目的とし、神経芽腫細胞に対する GD2 特異的 CAR-T (GD2-CAR-T) 細胞療法と Raf/MEK 経路の阻害剤である Trametinib (以下、Tram) の併用効果について検討した。

GD2-CAR-T 細胞は *piggyBac transposon* (PB) 法を用いて作成した。Tram と GD2-CAR-T 細胞併用による *in vitro* での抗腫瘍効果について、GD2 高発現神経芽腫細胞株 (SK-N-AS, SH-SY5Y, IMR32) との共培養試験を行い、生細胞数や CAR-T 細胞のフェノタイプについて real-time cell analyzer (RTCA) や flow cytometry (FCM) を用いて評価した。また、担癌マウスモデルで Tram と GD2-CAR-T 細胞による併用療法の効果を検証した。

PB 法により作成した GD2-CAR-T 細胞は約 2 週間の培養期間で良好な細胞増加と CAR 発現率 (44.1 ± 6.8%) を示し、フェノタイプも Stem cell memory 分画が優位 (45.6 ± 5.6%) で、免疫疲弊マーカーとされる PD-1 発現も低値 (3.5 ± 1.1%) だった。*in vitro* では神経芽腫細胞株に対して GD2-CAR-T 細胞による抗腫瘍効果を認めたが、Tram 併用下では GD2-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果が抑制され、培養上清中の IFN- $\gamma$  や TNF といったサイトカイン分泌も低下していた。また、抗原刺激後の免疫疲弊も抑制されていた。一方で、Tram 併用は GD2-CAR-T 細胞の増殖には影響を与えなかった。また、*in vivo* では Tram 投与開始時に GD2-CAR-T 細胞を投与する同時投与群、あるいは Tram を先行投与した後に GD2-CAR-T 細胞を投与する先行投与群を比較したが、いずれの群においても GD2-CAR-T 細胞による相乗的な抗腫瘍効果を認め、担癌マウスの生存期間を延長させた。この併用効果は、Tram 非感受性の神経芽腫細胞株でも認められたことから、この併用効果は Tram による直接の抗腫瘍効果ではなく、Tram による GD2-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果の増強である可能性が考えられた。

近年、Tram と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法は、さまざまながん種でその効果が検証されているが、Tram は T 細胞の活性化に関与する Raf/MEK 経路も阻害しうるとされている。著者らの検討でも、*in vitro* では Tram によって GD2-CAR-T 細胞の活性化が抑制されたが、*in vivo* では GD2-CAR-T 細胞の機能を抑制せず、Tram 非感受性腫瘍においても併用効果を認めるという結果であった。

担癌マウスモデルや患者検体を用いた検討において、Raf/MEK 阻害剤は腫瘍細胞への T 細胞集積や T 細胞の免疫疲弊の抑制にも影響すると報告されている。また、最近では CAR-T 細胞においても、Dasatinib など T 細胞受容体下流シグナルを抑制する分子標的薬の併用により CAR-T 細胞の活性化を調整し免疫疲弊を抑制することで抗腫瘍効果が高まると報告された。このように、Raf/MEK 阻害剤と T 細胞機能については、現時点 (2021 年) においても未だ一定の見解は得られていないが、著者らの検討は、Raf/MEK 阻害剤は腫瘍に対する直接の抗腫瘍効果だけではなく、腫瘍微小環境の調整や *in vivo* における CAR-T 細胞の免疫疲弊の抑制にも関わることを強く示唆する結果であった。

以上の結果より、Tram と GD2-CAR-T 細胞の併用療法は難治性神経芽腫に対する新たな治療戦略として有望である。