

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 久保 裕

### 論文題目

Development of non-viral ligand-dependent EPHB4-specific chimeric antigen receptor T cells for treatment of rhabdomyosarcoma

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

キメラ抗原受容体 T 細胞(CAR-T 細胞)療法は、従来の医療では治癒しえなかった再発・難治性腫瘍に対しても有効な新規治療法として期待されている。造血器腫瘍と比較すると固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の効果は未だ限局的であるが、最適な標的抗原の選択や腫瘍微小環境が持つ免疫逃避機構の克服など、さまざまな工夫が重ねられ、奏効例が報告されるようになってきている。受容型チロシンキナーゼである EPHB4 は受容体型チロシンキナーゼの Eph ファミリーの 1 つである。一部の臓器を除いては成熟組織にほとんど発現が見られないが、横紋筋肉腫(RMS)を含む多くの腫瘍で高発現し、悪性度に関わることが報告されていることから、理想的ながん抗原として治療標的となっている。著者は PiggyBac transposon(PB)法を用いて、EPHB4 を特異的に認識する CAR-T 細胞を作成し、その細胞特性、抗腫瘍効果、安全性を評価することを目的とした。

#### 【方法】

ヒト末梢血単核球に、EPHB4 を特異的に認識する第 2 世代 CAR 遺伝子を PB 法で導入し、EPHB4-CAR-T 細胞を作成した。Flow cytometry(FCM)により CAR 発現率、フェノタイプ、免疫逃避マーカーを解析した。また、RMS 細胞株 Rh30、RD、Rh41 と共培養を行い FCM で抗腫瘍効果を評価した。また、Rh30 と連続共培養試験を行い、EPHB4-CAR-T 細胞の細胞増殖能と抗腫瘍効果の持続性を real-time cell analyzer(RCTA)、FCM で評価した。さらに RMS の悪性度や免疫逃避機構との関連が報告されている PAX3-FOXO1(P3F)融合遺伝子発現が EPHB4-CAR-T 細胞の抗腫瘍効果に与える影響について、リポフェクション法で siRNA を導入し P3F をノックダウンし、FCM、RCTA で、抗腫瘍効果、免疫逃避マーカー、サイトカイン分泌を評価した。また Rh30 を免疫不全マウスに接種後、EPHB4-CAR-T 細胞を尾静脈投与し、腫瘍サイズを生体イメージングシステムで評価した。EPHB4 リガンドのヒト EPHRIN B2-Fc と、マウス EPHB4 もしくはヒト EPHB4 を発現させた HEK293 と共培養し、結合率を FCM で評価した。EPHB4-CAR-T 細胞を投与したマウスの全身状態、体重など EPHB4-CAR-T 細胞の毒性がないか観察した。

#### 【結果】

EPHB4-CAR-T 細胞は良好な細胞増加と CAR 発現率(CD3+/CAR+;78.5%±5.9%)、Stem cell memory 分画優位で (CAR+/CD45RA+/CCR7+;59.4 ± 7.2%、CD28+/CAR+/CD45RA+/CCR7;86.1±11.8%、CD95+/CAR+/CD45RA+/CCR7;99.7±0.44%)、PD-

1 発現も僅かであった(CAR+/PD-1+;0.60±0.21%)。Rh30 との共培養試験で EPHB4-CAR-T 細胞の高い抗腫瘍効果を示した。また、Rh30 と連続共培養でも持続する高い抗腫瘍効果と EPHB4-CAR-T 細胞の細胞増殖を示した。P3F の発現抑制では、EPHB4-CAR-T 細胞との共培養で抗腫瘍効果の増強や免疫逃避の抑制は確認できなかった。担がんマウスを用いた検討でも、EPHB4-CAR-T 細胞は腫瘍増殖を抑制した。ヒト EPHB4 とマウス EPHB4 は 90%以上の相同性を有し、ヒト EPHB4-CAR-T 細胞はマウス EPHB4 発現細胞にも結合することを証明した。さらに、EPHB4-CAR-T 細胞が投与された免疫不全担がんマウスでは、一般状態の悪化や体重減少などが認められなかった。

#### 【考察】

PB 法で作成した EPHB4-CAR-T 細胞は良好な CAR 発現率と良好なフェノタイプを示し、免疫疲弊による治療効果の減弱を起こすことなく、強く持続的な抗腫瘍効果を示し、機能的に優れていることを示した。また RMS の細胞株 Rh30、RD、Rh41 の他にも骨肉腫細胞株、乳がん細胞株に対しても強力な抗腫瘍効果を認めた。RMS の悪性度に関わる P3F は CAR-T 細胞を介した免疫逃避への関与は乏しいと考えられた。また EPHB4-CAR-T 細胞がマウス EPHB4 にも結合することと、EPHB4-CAR-T 細胞を投与したマウスを用いた安全性試験の結果から、EPHB4-CAR-T 細胞が重篤な Off tumor 毒性を示さないことが示唆された。