The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of glioblastoma-specific antigens expressed in patient-derived tumor cells as candidate targets for chimeric antigen receptor T cell therapy
Author(s)	中川, 智義
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91816
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	中川　智義
論文題名 Title	Identification of glioblastoma-specific antigens expressed in patient-derived tumor cells as candidate targets for chimeric antigen receptor T cell therapy （CAR-T細胞療法の治療標的となりうる膠芽腫特異的抗原の患者由来腫瘍細胞を用いた検索）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

膠芽腫(glioblastoma, GBM)は、脳実質のグリア細胞を由来とする悪性脳腫瘍である。脳実質内腫瘍の中で最も悪性度が高く、標準治療を行っても期待される生命予後は約1年半と非常に短く、新規の治療法が求められている。一方、近年、キメラ抗原受容体T細胞療法(CAR-T細胞療法)が血液腫瘍に対して高い抗腫瘍効果を示し注目されており、膠芽腫やその他の固形腫瘍の治療への応用も期待される。新規CAR-T細胞療法の開発には腫瘍細胞に特異的な抗原を必要とするが、トランスクリプトーム解析等の遺伝子解析による膠芽腫特異的抗原の同定は未だ限定的である。

本研究では、手術検体から樹立した患者由来の膠芽腫細胞株(GBM-PDTCs)および非腫瘍性脳細胞とマウス体内での免疫反応を利用した独自の方法によってCAR-T細胞療法の治療標的となりうる膠芽腫特異的抗原を同定する手法の確立を試みた。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず、膠芽腫手術検体から得られた腫瘍細胞を無血清培地で培養し、GBM-PDTCsを複数樹立した。樹立したGBM-PDTCsは、既存の膠芽腫セルラインとは異なり、がん幹細胞を含んだヘテロな細胞集団とされ、実際の膠芽腫の腫瘍プロファイルに近い細胞と考えられている。このうち1つのGBM-PDTCsでBALB/cマウスを免疫し、マウスのリンパ節からB細胞を抽出、マウスミエローマ細胞と融合させることによって、膠芽腫細胞に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを507株樹立した。続いてフローサイトメトリーを用いて、これらの抗体の中から、他患者由来の別のGBM-PDTCsとも結合する抗体を21株選択した。さらに、これらの抗体の中で、てんかん等の非腫瘍性病変に対する脳外科手術で得られた非腫瘍性脳細胞には結合しない抗体を選択した。非腫瘍性脳細胞は、シングルセルに解離した正常脳組織のうちCD31陰性/CD45陰性の細胞集団とし、最終的に、GBM-PDTCs2株と結合する一方、2患者の非腫瘍性脳細胞と結合しない抗体を2株選択した。

次に、これらの抗体の認識抗原についてcDNA発現クローニング法によって同定を試みた。具体的には、マウスの免疫に用いたGBM-PDTCsのcDNAライブラリをマウス由来のBa/F3細胞に導入し、抗体と結合するBa/F3細胞を選択、濃縮して、そのcDNA配列を解析した。その結果、2つの抗体のうち1つが認識する抗原は腫瘍抗原B7-H3と同定された。もう1つの抗体はcDNAライブラリ発現Ba/F3での陽性細胞濃縮が得られず、抗原同定に至らなかった。

続いて、我々の同定したB7-H3に対する抗体(E61)の抗原認識配列(scFv)を解析し、この配列にCD28/CD3ζを連結させたE61-CAR導入遺伝子を作成して、CD3/CD28共刺激末梢血単核細胞に導入することで、E61-CAR-T細胞を作成した。このE61-CAR-T細胞を用いて、in vitroでのGBM-PDTCsに対する抗腫瘍細胞効果を検証した。E61陽性GBM-PDTCs 2株をE61-CAR-T細胞と共培養してサイトカインリリースアッセイ(IL-2、IFN-γ)および^{51}Crリリースアッセイを行い、コントロールT細胞に対して有意な細胞傷害性を確認した。

〔総　括(Conclusion)〕

我々は、樹立したGBM-PDTCsを用いて膠芽腫細胞に対する抗体ライブラリを作成し、さらに複数のGBM-PDTCsや非腫瘍性脳組織を利用して候補抗体を絞り込むという独自の手法によって、膠芽腫特異的と考えられる候補抗体を2つ得た。そのうち1つが認識しているのは近年CAR-T細胞療法の標的としても注目されている腫瘍抗原B7-H3であることを同定した。さらにこの抗体配列に基づくCAR-T細胞を作成し、in vitroで抗腫瘍細胞効果のあることを確認した。これらの結果から、我々の実験手法が妥当であることが示唆された。

今回の我々の手法は、細胞表面における糖鎖修飾の変化や立体構造の変化といった、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析等の網羅的遺伝子解析手法では検出できていない可能性のある、タンパク翻訳後の変化によって生じる抗原性をも検出可能である。今後さらに規模を拡大することにより、本法を用いた新規の膠芽腫特異的抗原の同定や、それを標的としたCAR-T細胞療法への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　　中川　智義

		（職）	氏　　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	骨島 晴彦	署　名
	副　査	大阪大学教授	新谷 康	署　名
	副　査	大阪大学教授	石井 優	署　名

論文審査の結果の要旨

本研究は、悪性脳腫瘍である膠芽腫に対するキメラ抗原受容体T細胞療法（CAR-T細胞療法）の治療標的となりうる膠芽腫特異的抗原を同定する手法の確立を試みたものである。

具体的には、手術検体から樹立した患者由来の膠芽腫細胞株でマウスを免疫して膠芽腫細胞に対する抗体ライブラリを作成し、さらに複数の膠芽腫細胞株や非腫瘍性脳組織を利用しハイスループットフローサイトメトリーを用いて候補抗体を絞り込む独自の手法によって、膠芽腫特異的と考えられる候補抗体を2つ得た。発現クローニング法によりそのうち1つの抗体が認識している抗原は、近年CAR-T細胞療法の標的としても注目されている腫瘍抗原B7-H3であることを同定した。さらにこの抗体配列に基づくCAR-T細胞を作成し、in vitroで抗腫瘍細胞効果のあることを確認した。これらの結果から、本研究における実験手法が妥当であることが示唆された。

本研究の手法では、従来型の細胞株ではなく患者由来の膠芽腫細胞株を用いるため、実際の腫瘍細胞の抗原性をより反映した結果が得られやすいものと考えられる。また本法では、既存の網羅的遺伝子解析手法では検出できていない可能性のあるタンパク翻訳後の変化によって生じる抗原性をも検出可能と考えられる。以上の点から本研究には新規性が認められ、さらに今後、新規の膠芽腫特異的抗原の同定やCAR-T細胞療法への応用につながる可能性も期待されることから、高い学術的価値を有し学位論文に値するものと考えられる。