

2019年 6月 18日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設					
	渡辺 紀子 ④ (講師)	施設名	東京医科大学 分子病理学分野	所在地	東京都新宿区 新宿 6-1-1	電話	03-3351-6141 (内393)
研究課題	ユーイング肉腫に対するCAR-T療法の開発ならびに 立体細胞培養法による評価系の研究						
研究目的	<p>本研究は、小児に好発するユーイング肉腫に対する抗CD99 CAR-T療法の開発を目的とした。CAR-T療法は、腫瘍を認識する人工的なキメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor : CAR) をTリンパ球に発現させ腫瘍を攻撃させる免疫細胞療法である。ここ数年間で血液腫瘍に対する抗CD19 CARをはじめとして様々なCARが開発されているが、CD99を標的としたCARは未だない。</p> <p>当教室では、第3世代型の抗CD99 CARの設計に成功したが、リンパ球やNK細胞への導入が困難であった。そこで、本研究にて、ドナー血由来のinduced pluripotent stem (iPS) 細胞へ抗CD99 CARを導入し、Tリンパ球へ分化させることとした。また、作成細胞の評価系として腫瘍細胞の立体培養の研究を並行して行うこととした。</p>						
研究方法	<ol style="list-style-type: none"> ドナー血T細胞からinduced pluripotent stem (iPS) 細胞を樹立する 抗CD99CARをレンチウイルスで導入する T細胞へ分化誘導する ユーイング肉腫細胞株と共培養を行い、抗腫瘍効果について解析を行う スフェロイド培養したユーイング肉腫細胞株でも同様に解析を行う 						
研究成果	<ol style="list-style-type: none"> ドナー血T細胞からのiPS細胞樹立 健常ドナー2名の末梢血5mLからリンパ球分離溶液でPBMCを抽出し、更に Microbeads法にてCD3陽性細胞のみとし、CD3/CD28とIL-2で刺激しつつ数日間培養した。山中因子搭載センダイウイルスと反応させ (MOI=3、2時間)、Matrigel コーティングプレートとReproTeSRメディウムにて約2週間培養後、形成された細胞コロニーを採取し、安定するまで継代を繰り返し、増殖させた。 作成した株は、OCT4、Sox2、SSEA4の蛍光抗体、OCT4、SSEA4のFlowcytometryにて、ほぼ全ての細胞に陽性であった。また、STEMdiff Trilineage Differentiation Kitにて3胚葉への分化誘導が確認され、iPS細胞に特徴的な未分化能が確認できた。また、継代4代目には、抗NP蛋白の蛍光抗体は陰性であり、センダイウイルスの残存がないことを確認した。 						

<p>研 究 成 果</p>	<p>2. 抗CD99CARの導入 2-1) 作成したiPS細胞株において、Flowcytometryにて約3割にCD99の発現を認めため、抗CD99CAR導入に先立ち、これら内因性CD99をノックダウンすることとした。CD99 shRNAをレンチウイルスにて導入しpuromycinにて約3週間の選択培養後、FlowcytometryにてCD99発現の消失を確認した。 2-2) わずかに構造の異なる2種類の抗CD99CARをレンチウイルスにてCD99ノックダウンiPS細胞へ導入した。GFPを発現マーカーとしたFlowcytometryで約12%の細胞に導入されていると考えられた。</p> <p>3. T細胞への分化誘導 3-1) 京都大学iPS細胞研究所 (CiRA) の金子らの方法 (2016) に従い、最初の2週間でHematopoietic stem cells への分化、次の3週間でT細胞への分化を行った。しかし、Hematopoietic stem cellsへの分化は成功したように思えたものの、T細胞への分化への移行時の手技が難しく、細胞の大半が失われ、解析がほぼ不能であった。また、分化中、導入した抗CD99CARの発現の維持をGFP蛋白で追っていたが、Tag蛋白で検出するとGFPの発現と食い違うことが分かった。そのため、①T細胞への分化法または手技の見直しと②抗CD99CARの検出法の見直しを行う必要が生じた。</p> <p>4. ①について、CiRAの金子新准教授と共同研究契約を結び、CiRAを訪問し、技術提供を仰いだ。②について、抗CD99CARのコンストラクトのデザインを再度行い、現在クローニング中である。また、作成した抗CD99CARのCD99への親和性確認のためNFAT reporter assayを構築中である。</p> <p>5. 本プロジェクトに関する発表を、第6回東京医科大学記念会館ポスター発表懇談会 (2019年2月22日) と第108回日本病理学会 (2019年5月10日) にて行った。</p>
<p>今 後 の 予 定</p>	<p>1. CiRAで実際に行われているT細胞分化方法を参考に安定したT細胞分化方法を確立する。手技的な問題は技術提供により解決するものと考えられるが、iPS細胞株によりT細胞への分化効率がかなり異なるという助言から、現在、20~30株のiPS細胞株を改めて作成しているところである。これらをT細胞へ分化誘導して、分化しやすい株を選択し、拡大培養する。</p> <p>2. 選択したiPS細胞株にCD99ノックダウンを行い、T細胞分化効率に影響を及ぼさないか確認する。</p> <p>3. 新たに作成中の抗CD99CARを上記1. 2で選択したiPS細胞株へ導入し、T細胞分化を行ったところで、抗CD99CARの発現維持の確認とCD99発現細胞に対する親和性の確認を行う。</p> <p>4. ユーイング肉腫細胞株と共培養を行い、抗腫瘍効果について解析を行う。</p> <p>(当初、スフェロイド培養したユーイング肉腫細胞株を作成し、iPS細胞より誘導した抗CD99 CAR T細胞同様に解析を行うことを予定していたが、予定期間を超過することが予想されるため、まずは上記した実験までを目標と設定する)</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

2019年 6月 18日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名 東京医科大学 分子病理学分野

氏 名 渡辺 紀子 ⑩

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額					
金 円					
	費 目	明 細	単 価 及 金 額	計 額	
支 出 内 訳	設備、備品費		0	0	
	消 耗 品 費	細胞培養関連		1,374,368	1,374,368
		抗体類		248,724	1,623,092
		ノートパソコン		183,384	1,806,476
		学会参加費		81,256	1,887,732
		打ち合わせ		74,900	1,962,632
		書籍		35,497	1,998,129
		文房具		1,506	1,999,635
		切手		365	2,000,000
	計				2,000,000
過 △ 不足額				0	
備 考					

支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費		
消 耗 品 費		
	細胞培養関連 1,374,368	iPS細胞、T細胞分化培養に使用した
	抗体類 248,724	iPS細胞や分化細胞の同定に必要とした
	ノートパソコン 183,384	作成細胞の解析や結果のまとめに必要であった
	学会参加費 81,256	同分野の研究の動向や新しい情報を得るために学会に参加した
	打ち合わせ 74,900	T細胞分化法改良のためCiRAの金子新准教授と共同研究締結を行うことになり、打ち合わせを必要とした
	書籍 35,497	小児腫瘍に関する全般的な知識を得るため購入
	文房具 1,506	実験ノート等の購入
	切手 365	打ち合わせ等の通信費