

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) T細胞エクソソームによるがん転移阻害剤

(英語) Development of the Inhibitor against Tumor Metastasis by T Cell-Derived Exosomes

研究開発実施期間: 2017年10月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 珠玖 洋

(英語) Hiroshi Shiku

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科・遺伝子・免疫細胞治療学・特定教授

(英語) Mie University Graduate School of Medicine, Department of Immuno-Gene Therapy, Program-Specific Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

三重大学では、細胞傷害性T細胞 (CD8⁺T細胞) が活性化する時に放出するエクソソームのがん進行における機能を追求してきて、マウスを用いた研究を重ね以下のことを明らかにした (Nature Communications 9:435, 2018)。A) CD8⁺T細胞エクソソームは、腫瘍内の間葉系間質細胞である間葉系幹細胞 (MSC) やがん関連線維芽細胞 (CAF)に取り込まれて、それらががん間質細胞を傷害する。B) CD8⁺T細胞エクソソームによりがん間質を失った腫瘍は、浸潤や転移する能力を失う。C) A) とB) の機能発現には、CD8⁺T細胞エクソソームが腫瘍内投与で5 μg、全身投与で100 μgが必要である。これらのマウスPOCを基に、本ACT-M事業では、ヒトにおけるPOCの取得と、それらの結果を基に、ヒトT細胞エクソソームをがん転移阻害剤とする創薬を達成するためのトランスレーショナルな研究開発を行った。

研究開発分担者は、マウスPOC取得者の三重大学大学院医学系研究科 (瀬尾講師)、ナノ微粒子のエキスパートの京都大学大学院工学研究科 (秋吉教授)、iPS-T細胞のエキスパートの京都大学ウイルス再生研 (河本教授)、ウイルス調製のノウハウに長けたタカラバイオ (株)、薬事とグローバル戦略に長けたファイザーR&D 合同会社で組織し、微粒子測定技術を持つ (株) 堀場製作所を研究開発協力者とした。また、北海道大学臨床開発センター (荒戸教授)、金沢大学大学院医学系研究科 (寺島講師)、三重大学大学院医学系研究科 (奥村助教) を中心とし薬事検討委員会を組織した。

目標達成の副目標として、(1) エクソソーム生産用 CD8⁺ T 細胞の選抜、(2) エクソソームの精製技術及び製剤化技術開発、(3) T 細胞エクソソームの品質試験法の開発、(4) T 細胞エクソソームの治験薬製造法の確立、(5) T 細胞エクソソームのがん転移阻害の作用機序と生物活性評価法、(6) T 細胞エクソソームの活性補強技術、(7) 非臨床試験プロトコルコンセプト、(8) エクソソーム創薬に関する薬事相談、(9) FIH 第 1 相治験のプロトコルコンセプト、(10) 非臨床試験、(11) 製造販売承認申請を踏まえた開発戦略、(12) FIH 治験の開始を設定し、(1) - (9) までの達成を本事業期間内の目標に掲げた。

(1) は京都大学工学部 (秋吉教授)、京都大学ウイルス再生研 (河本教授)、タカラバイオ (株) を研究開発分担施設とし実施し、PBMC より得られる T 細胞が、マウスと同様の作用を持つエクソソームの放出細胞になることを証明した。効力を持つエクソソームは、PBMC の刺激培養から 7-10 日目でピークとなることを証明した。off-the-shelf を目指した、ヒト iPS-T 細胞や T リンパ腫から得られるエクソソームには、マウスと同様の強い作用がないこともわかった。

(2) は京都大学工学部 (秋吉教授)、タカラバイオ (株) を研究開発分担施設とし実施し、750 kDa MWC0 限外濾過で濃縮と除タンパク質をした PBMC の培養上清を、DEAE イオン交換カラムにかけることにより、生物活性を保持したエクソソームが超高純度で得られる方法を開発した。

(3) は京都大学工学部 (秋吉教授) を研究開発分担施設とし実施し、活性を持ったエクソソームの基本的な物性の検討 (タンパク濃度、粒子数、粒子径、粒子内 RNA、表面分子、ゼータ電位、タンパク質糖鎖、形状)、生物活性を評価するための *in vitro* がん細胞と間葉系細胞との混合細胞の傷害試験法と、*in vivo* がん細胞と間葉系細胞の混合細胞のヌードマウス皮下移植腫瘍の増殖抑制試験法を開発した。

(4) はタカラバイオ (株) を研究開発分担施設とし、エクソソームの GMP 調製のための CliniMACS Prodigy を用いた PBMC 培養上清分取のための有効なプログラミングについて検討を重ねた。また、CliniMACS Prodigy を安定的に稼働させるための簡易 CPC を作製した。本副目標は、現在も進行中である。

(5) は三重大学単独の副目標として、(3) で開発した *in vitro* がん細胞と間葉系細胞の混合細胞の傷害試験と *in vivo* 皮下移植腫瘍増殖抑制試験なども利用し、腫瘍内投与および全身投与における有効な PBMC エクソソーム量の算出、全身投与におけるがん転移阻害効果機序の解明、グランザイム B やパーフォリンをはじめとした PBMC エクソソームの傷害物質の同定などを行った。傷害物質の同定については現在も進行中である。

(6) は京都大学工学部 (秋吉教授)、タカラバイオ (株) を研究開発分担施設とし実施し、PBMC エクソソームに存在するマイクロ (miRNA) の、エクソソームへの大量包埋技術の確立を目指し、レトロウイルスベクターを用いた検討を重ねたが、miRNA 配列の困難さから、この技術については開発を停止している。グランザイム B およびパーフォリンの PBMC エクソソーム包埋については、現在進行中となっている。キメラ抗原リセプター (CAR) を導入した PBMC から得られるエクソソームが、がんの間葉系細胞傷害と共に CAR に特異的がん細胞傷害もすることが本研究開発事業の伏線事業として判明しており、今後の主要な活性補強技術として研究開発が進行中である。

(7) はファイザー R&D 合同会社を研究開発分担施設とし、薬事検討委員のメンバーとして北海道大学 (荒戸教授) と金沢大学 (寺島講師) の参加のもと、主に安全性試験のプロトコルについて検討を重ねた。非臨床試験は、一般毒性試験 (安全性薬理試験) を必須とし、器官への影響 (心臓、肺、神経、免疫) を担がんヌードマウスを用いた単回もしくは複数回投与試験 (5 μ g/tumor もしくは 100 μ g/マウス) で行うこととした。

(8) はファイザー R&D 合同会社を研究開発分担施設とし、薬事検討委員のメンバーとして北海道大学 (荒戸教授) と金沢大学 (寺島講師) の参加のもと 3 回薬事検討会議を行い、非臨床安全性試験項目や FIH 治験プロトコル原案について、PMDA との相談事項の抽出を行ってきた。既に、事前面談を重ね、現在対面助言の準備を進め

ている。

(9) はファイザーR&D 合同会社を研究開発分担施設とし、薬事検討委員のメンバーとして北海道大学（荒戸教授）と金沢大学（寺島講師）の参加のもと3回薬事検討会議を行い、FIH 第I相治験プロトコルの立案を行ってきた。対象とするがん種は、去勢抵抗性の前立腺がんとし、6-9名の実施を目指す。経直腸的、超音波ガイド下で腫瘍内投与を行う。投与量は100 μ g/回両薬の単回を基本とし、併用する場合にはCpGの皮下投与(0.8 mg/回)とする。エンドポイントとしては、安全性、病理組織解析、臨床所見(PSA)とすることなどを決定した。

細胞外小胞には、後期エンドソームを起源とするエクソソームの他に、細胞膜を起源とするマイクロベシクル、アポトーシス小体、エクソメアが知られているが、これら全てを明確に区別し、エクソソームだけを大量に調製する方法はなく、このことがエクソソーム創薬の進展を著しく阻んでいる。本ACT-M事業は、現段階で非臨床安全性試験やPMDAとの薬事相談など、FIH治験を実施するための重要な過程を残している。しかしながら、本事業でエクソソームを他の細胞外小胞と見分ける大量調製法と有効性を評価するための試験法を確立できたことは、我々の今後の研究開発の進展を含め、世界のエクソソーム創薬に大きく貢献できる意義は大変大きいと考えている。

We have investigated the function of exosomes that are released during activation of murine cytotoxic T cells (CD8⁺ T cells) in cancer progression, and demonstrated that (A) CD8⁺ T cell exosomes kill mesenchymal tumor stromal cells regardless of the specificity against tumor cells, B) Tumors depleted mesenchymal stroma by CD8⁺ T cell exosomes lose invasive and metastatic properties, and C) 5 μ g (local) and 100 μ g (systemic) of CD8⁺ T cell exosomes are required for (A) and (B). On the basis of these mouse POCs, in this ACT-M project, we started the acquisition of human POCs and the translational study for FIH clinical trial.

The following studies were conducted according to the set sub-aims. (1) (Contributors: Kyoto Univ., Prof. Akiyoshi and Prof. Kawamoto; Takara Bio Co., Ltd.) Selection of cells as exosome source: 7-10d cultured human T cells from PBMCs were selected as a source of exosome production, (2) (Contributors: Kyoto Univ., Prof. Akiyoshi; Takara Bio Co., Ltd.) Development of exosome purification technology: The method for ion exchange fractionation after ultrafiltration concentration was established, (3) (Contributor: Kyoto Univ., Prof. Akiyoshi) Development of T cell exosome quality test: In addition to the nano tracking analysis, bicinchoninic acid analysis, western blot analysis, flow cytometric analysis, and measurement of zeta potential, *in vitro* tumor cytolysis test and *in vivo* tumor growth inhibition test were developed, (4) (Contributor: Takara Bio Co., Ltd.) GMP manufacturing: Drug production method of exosomes for clinical trial was tested by using CliniMACS Prodigy, (5) (Contributor: Takara Bio Co., Ltd.) Enhancement technology of T cell exosome activity: Forced expressions of granzyme B, perforin, and tumor-specific chimeric antigen receptor were tested, (6) (Contributor: Pfizer R&D Japan) Protocol concept for non-clinical safety test: General toxicity test required, (7) (Contributor: Pfizer R&D Japan) Protocol concept for FIH phase 1 clinical trial: Single or multiple local administration into pancreatic cancer was decided.

In addition to exosomes originating from late endosomes, plasma membrane-derived microvesicles, apoptotic bodies, and exosomes are known as extracellular vesicles. There is no method to prepare exosome alone. Although this ACT-M project still remains important processes for FIH clinical trials such as non-clinical safety tests and pharmaceutical consultation with PMDA, we think that the establishment of the large-scale preparation method for distinguishing exosomes from other

extracellular vesicles and the method for efficacy in this project can contribute significantly to the world's exosome drug discovery including our project.

III 事後評価総合所見

がんの浸潤・転移の抑制作用を有するエクソソームを生産できる T 細胞 (PBMC 由来) を同定し、その細胞を用いた対象エクソソームの GMP 製造対応の生産・精製技術及び製剤化技術の基本的な部分を確立、その品質評価法と生物活性試験法を確定し、実装化に向かって研究は着実に進展しています。調製されたエクソソームの標的細胞を同定し、インビトロ、インビボ活性評価法も確立しました。さらに、得られた T 細胞エクソソーム薬の FIH 第 1 相試験の実施に向けて、準備が進められています。

しかし、エクソソームの Heterogeneity が明らかにされたことで、非臨床 POC 検証に用いるエクソソーム製剤の仕様が、新たな課題として浮上しています。また、エクソソーム医療の汎用性を高めるために Off-the-shelf への展開が計画されていましたが、あまり進展が見られていません。さらに、活性補強分子の T 細胞エクソソーム内搭載技術の開発が検討されたものの、達成には至らず、別プログラムで実施されている CAR-T からエクソソームを取得し、新たな検討が始まるなど、開発戦略が定まっていないように見受けられます。

企業が主導するシナリオが描けず、機能的な連携が図れていない印象を受けますが、今後より一層の産学連携を進め、世界初のエクソソーム医療の進展に期待します。