

201438063A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを
用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高橋 義行

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の革新的がん医療実用化研究事業による委託業務として、国立大学法人名古屋大学が実施した平成26年度「小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを
用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高橋 義行

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いた キメラ抗原受容体T細胞療法の開発	1
名古屋大学大学院医学系研究科 成長発達医学	高橋 義行
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
GMP グレード CD19.CAR-T 細胞培養法の確立、 骨髄中微小残存白血病細胞の検出法の確立	5
名古屋大学大学院医学系研究科 成長発達医学	高橋 義行
名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター	奥野 友介
新規 CAR-T 細胞療法の開発	8
信州大学医学部附属病院 小児科	中沢 洋三
CD19CAR 以外のキメラ遺伝子導入 T 細胞療法の開発および キメラ遺伝子導入 T 細胞の技術開発	9
名古屋大学医学部附属病院 血液内科	寺倉 精太郎
III. 学会等発表実績	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	15

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託業務（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（総括）

小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

業務主任者 高橋 義行（名古屋大学大学院医学系研究科 成長発達医学 准教授）

研究要旨

本研究班では平成 26 年度より治療抵抗性の小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発を目的に発足した。急性リンパ性白血病（ALL）は小児において悪性腫瘍による死亡者数第一位の疾患である。最近、化学療法抵抗性 ALL 患者に対して、細胞表面に発現する CD19 抗原に対するキメラ抗原受容体（CAR）を、患者から採取した末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、大量培養して輸注する CD19.CAR-T 療法の臨床試験が欧米で行われ良好な成績が報告されている。しかし、細胞株や牛胎児血清を培養に用い、遺伝子導入にウイルスベクターを使用しているため白血病を惹起する危険性があり、特に小児においては長期安全性に懸念がある。本研究班では、細胞株や牛胎児血清を使わずに大量培養したウイルス特異的 T 細胞療法の第 I 相臨床試験を終了し、米国ベイラー医科大学で、非ウイルスベクターによる遺伝子導入法である PiggyBac トランスポゾン法での CAR-T 療法を開発し、日本での臨床開発についてベイラー大学から承諾を得ている。トランスポゾン法はより安全性が高く、ウイルスベクター法と比較してコストが 10 分の 1 以下で First in Human 臨床第 I 相試験を行うことが可能である。次世代シーケンス法を利用した骨髄中微小残存白血病細胞（MRD）の検出方法を確立でき、新規がん特異的分子を標的とした CAR を開発し、ウイルス特異的 CAR-T 細胞製造の樹立にも成功できた。非ウイルスベクター法による CD19/CAR-T 細胞による First in Human 臨床第 I 相試験を行う基盤が整備できた。

業務項目担当責任者

水野 正明	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	病院教授
加藤 勝義	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	講師
清水 忍	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	病院講師
中沢 洋三	信州大学医学部附属病院小児科	講師
奥野 友介	名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センター	特任講師
寺倉 精太郎	名古屋大学医学部附属病院血液内科	病院助教

A. 研究目的

本研究班は、本研究班では平成 26 年度より治療抵抗性の小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法（以下 CD19.CAR-T 細胞療法）の臨床応用開発を目的に発足した。

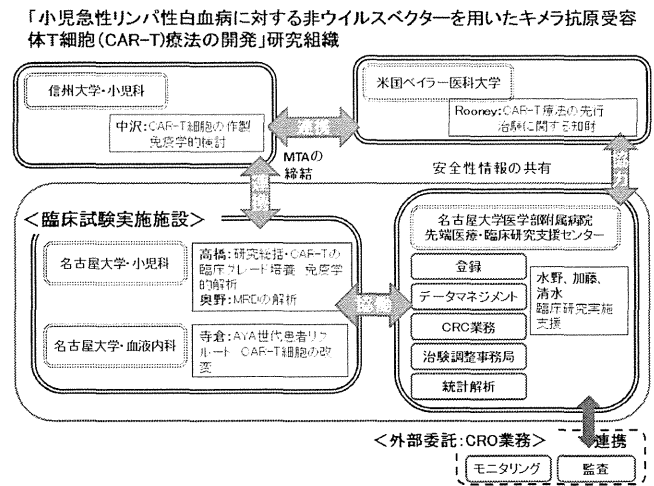
1) GMP 基準に準拠した臨床スケールの

CD19.CAR-T 細胞の培養法確定、2) 次世代シーケンス法を用いた骨髄中微小残存白血病細胞（MRD）の検出方法の確立、3) 新規がん特異的分子を標的とした CAR の開発と CAR-T 細胞デザインの改善を業務課題としている。

急性リンパ性白血病（ALL）は小児において悪

性腫瘍による死亡者数第一位の疾患である。最近、化学療法抵抗性 ALL 患者に対して、細胞表面に発現する CD19 抗原に対するキメラ抗原受容体 (CAR) を、患者から採取した末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、大量培養して輸注する CD19.CAR-T 療法の臨床試験が欧米で行われ良好な成績が報告されている。しかし、細胞株や牛胎児血清を培養に用い、遺伝子導入にウイルスベクターを使用しているため白血病を惹起する危険性があり、長期安全性に懸念がある。

我々は、細胞株や牛胎児血清を使わずに大量培養したウイルス特異的 T 細胞療法の第 I 相臨床試験を終了している。分担研究者の中沢は、米国ベイラー医科大学で、非ウイルスベクターによる遺伝子導入法である PiggyBac トランスポゾン法での CAR-T 療法を開発し、日本での臨床開発についてベイラー大学から承諾を得ている。トランスポゾン法と申請者が開発した大量 T 細胞培養法と組みあわせることで、より安全性が高く、ウイルスベクター法と比較してコストが 10 分の 1 で First in Human 臨床第 I 相試験を行うことが可能である (組織図)。



CD19.CAR-T 細胞療法の適応や効果判定に従来の骨髄検査法以上に鋭敏な骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出方法を確立が必要となる。MRD の検出にあたっては、次世代シーケンスを用いることで高い検出感度 ($\sim 10^{-6}$) が得られる。

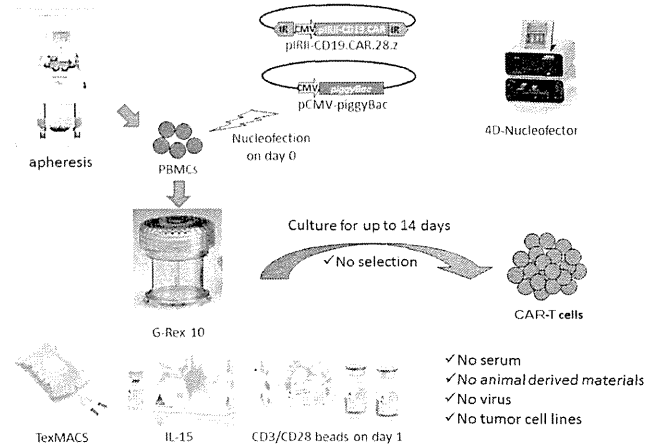
さらに海外の動向を見ても CAR-T 療法について

では発展途上の治療法であり、新規がん特異的分子を標的とした CAR の開発や、ウイルス特異的 T 細胞と CAR-T 細胞を組み合わせることで副作用の軽減、効果の増強が期待できる。

B. 研究方法

1) CD19.CAR-T 細胞培養を、GMP 基準に準拠した臨床スケールで培養法を確定する (図 1)。

図 1: CD19-CAR-T 細胞の作成、培養方法



2) 骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出方法を確立する。MRD の検出にあたっては、高い検出感度 ($\sim 10^{-6}$) を得るため、次世代シーケンスを用いる。ゲノム DNA を鋳型として、免疫グロブリン重鎖の各 V 領域に特異的なプライマーと、J 領域のコンセンサスプライマーを用いて複数の PCR を行う。PCR 産物をまとめて次世代シーケンス用に調製し、デスクトップ型シーケンサー (イルミナ社 MiSeq) で 200 万リードの配列を読み取る。診断時サンプルより腫瘍細胞のクローンタイプの塩基配列を決定し、寛解期サンプルから同じ配列が 2 リード以上検出されれば MRD 陽性と判断する。

3) 新規がん特異的抗原 X に対する抗体のアミノ酸配列情報を得て、これをもとに X を特異的に認識する抗 X 抗体の単鎖抗体で置き換えた CAR 遺伝子を作成する。患者体内で CAR 遺伝子発現の調整を目的とした tet-responsive element と CAR 遺伝子を同時に遺伝子導入するためのベクターを構築する。これを T 細胞に遺伝子導入し、CAR の発現を薬剤によってコントロールできる

かどうか検討する。

4) **CAR-T** 細胞の持つ **T** 細胞受容体が同時にウイルス抗原を認識するものであれば、アロ反応などの副作用となりうる非特異的な**T**細胞反応を減弱できるため、**CAR-T** 細胞作製後早期にウイルス抗原ペプチドにより刺激し、ウイルス抗原により刺激された **CAR-T** 細胞を培養しその特異性を検討した。

(倫理面への配慮)

わが国において臨床研究倫理指針に準拠した臨床研究として、名古屋大学倫理審査委員会で審議し、承認後に研究を開始する。医師主導臨床治験としての申請について **PMDA** に事前相談を行い、戦略相談を行う予定で、厚生労働省に提出する。個人情報を守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。検体の採取にあたっては患者および家族から事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得る。遺伝子解析についてはヒトゲノム、遺伝子解析研究指針にしたがい、患者および家族に事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。

C. 研究結果

1) **GMP 基準に準拠した臨床スケールの CD19-CAR-T 細胞培養** : **GMP** 準拠の試薬を用いた培養系において、末梢血 30ml より分離した単核球 2×10^7 個の細胞より 14 日間培養後平均 1.5×10^8 個の **CD19-CAR-T** 細胞が得られた。14 日目の **CD19-CAR** 遺伝子導入効率はいずれも基準値 5%以上が得られた。米国 **Waisman** 社と **GMP** 規格プラスミドの委託契約を結んだ。

2) **次世代シーケンス法を用いた骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出方法の確立** : 名古屋大学医学部附属病院小児科において同種造血幹細胞移植を施行した 15 歳以下の小児 **CD19** 陽性急性リンパ性白血病患者 (9 例) において、診断時検体を用いた腫瘍特異的 **CDR3** 配列の決定を行った。以下の 2 時点において **MRD** を

検討した(A) 初回化学療法終了時 (5 例) (B) 移植直前 (7 例)。初回化学療法終了時に **MRD** 陽性の 3 例はいずれも治療終了後 5 か月以内の早期に再発していた。さらに移植直前 **MRD** 陽性の 2 例はともに移植後再発していたが、陰性 5 例は全例無再発生存していた ($p=0.0082$)。

3) **新規がん特異的分子を標的とした CAR の開発と CAR-T 細胞デザインの改善** : 新規がん特異的抗原に対する **X-CAR** をデザインし、**overlap PCR** を行い作成した。**T** 細胞に遺伝子導入を行うため、レトロウイルス・ベクターを準備した。**X** は活性化 **T** 細胞には発現しておらず、限定された腫瘍細胞上に発現が見られた。**CAR** の発現を薬剤投与によってコントロールすることが可能となるように、**Inducible vector system** を組みこんだ **CAR-T** 細胞用ベクターを作成できた。

CAR-T 細胞療法の安全性の向上を目的に、同種反応や非特異的反応の減弱したウイルス特異的 **CAR-T** 細胞が樹立でき、**ALL** 細胞株との共培養で優れた抗白血病効果を示した。

D. 考察

非ウイルスベクター法であるトランスポゾン法を用いた **GMP** 準拠 **CD19-CAR-T** 細胞培養法を確定でき、骨髄中微小残存白血病細胞 (**MRD**) の検出方法を確立した。新規がん抗原に対する **CAR** の開発や副作用を軽減し、効果の増強を目的としたウイルス特異的 **CAR-T** 細胞療法の作成が可能であった。

E. 結論

GMP 準拠 **CD19-CAR-T** 細胞培養法を確定でき、骨髄中微小残存白血病細胞 (**MRD**) の検出を行うことで、非ウイルスベクター法による **CD19-CAR-T** 細胞による **First in Human** 臨床第 I 相治験を行う基盤が整備できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol.* 2014 Feb;99(2):169-174.

2. 学会発表

海外

- 1) Takahashi Y. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. 40th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 9, 2014. Milano, Italia.
- 2) Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. The 19th congress of APBMT. Oct.16, 2014. Hangzhou, China.

国内

- 1) 高橋 義行、関屋 由子、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、奥野 友介、入江 正寛、村松 秀城、濱 麻人、小島 勢二. Unmanipulated HLA haploidentical bone marrow transplantation combined with PBSC using high dose ATG. 第 76 回日本血液学会学術集会. 2014 年 10 月 31 日. 大阪.
- 2) Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Nishikawa E, Wang X, Xu Y, Kamei M,

Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Next-generation sequencing-based detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia.

次世代シーケンサーを用いた小児急性リンパ性白血病における微小残存病変の検出. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 11 月 28 日. 岡山.

- 3) 奥野 友介、西尾 信博、川島 希、鈴木 哲、関屋 由子、村松 秀城、濱 麻人、中沢 洋三、高橋 義行、小島 勢二. 難治性小児急性リンパ性白血病に対する臨床応用を目的としたトランスポゾン法による抗 CD19 キメラ抗原受容体導入 T 細胞の培養法の確立. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 6 日. 神戸.
- 4) 西尾 信博、鈴木 哲、鍛塚 八千代、西田 徹也、村田 誠、清井 仁、高橋 義行、小島 勢二. 長期保存されたウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞の安定性に関する検討. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 6 日. 神戸.
- 5) 関屋 由子、奥野 友介、村松 秀城、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、亀井 美智、入江 正寛、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二. 小児 ALL に対する次世代シーケンスを用いた微小残存病変 (MRD) による造血幹細胞移植時期の検討. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 7 日. 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託業務（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体 T 細胞療法の開発

業務課題：GMP グレード CD19.CAR-T 細胞培養法の確立、骨髄中微小残存白血病細胞の検出法の確立

担当責任者 高橋 義行（名古屋大学大学院医学系研究科 成長発達医学 准教授）

奥野 友介（名古屋大学医学部附属病院

先端医療・臨床研究支援センター 特任講師）

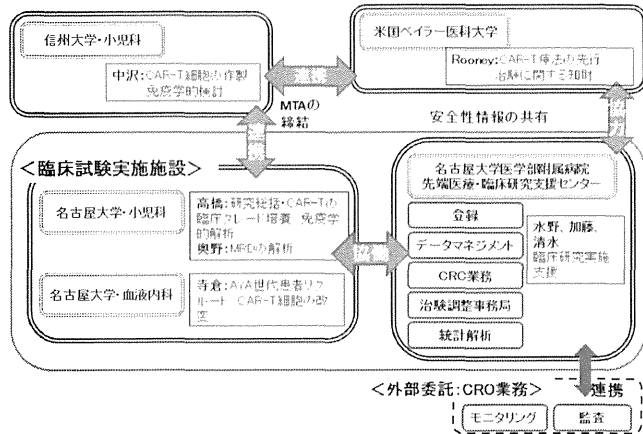
研究要旨：急性リンパ性白血病（ALL）は小児において悪性腫瘍による死亡者数第一位の疾患である。最近、化学療法抵抗性 ALL 患者に対して、細胞表面に発現する CD19 抗原に対するキメラ抗原受容体（CAR）を、患者から採取した末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、大量培養して輸注する CD19.CAR-T 療法の臨床試験が欧米で行われ良好な成績が報告されている。しかし、細胞株や牛胎児血清を培養に用い、遺伝子導入にウイルスベクターを使用しているため白血病を惹起する危険性があり、特に小児においては長期安全性に懸念がある。我々は、細胞株や牛胎児血清を使わずに大量培養したウイルス特異的 T 細胞療法の第 I 相臨床試験を終了し、米国ベイラー医科大学で、非ウイルスベクターによる遺伝子導入法である PiggyBac トランスポゾン法での CAR-T 療法を開発し、日本での臨床開発についてベイラー大学から承諾を得ている。トランスポゾン法はより安全性が高く、ウイルスベクター法と比較してコストが 10 分の 1 以下で First in Human 臨床第 I 相試験を行うことが可能である。次世代シーケンス法を利用した骨髄中微小残存白血病細胞（MRD）の検出方法を確立でき、非ウイルスベクター法による CD19/CAR-T 細胞による First in Human 臨床第 I 相試験を行う基盤が整備できた。

A. 研究目的

急性リンパ性白血病（ALL）は小児において悪性腫瘍による死亡者数第一位の疾患である。最近、化学療法抵抗性 ALL 患者に対して、細胞表面に発現する CD19 抗原に対するキメラ抗原受容体（CAR）を、患者から採取した末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、大量培養して輸注する CD19.CAR-T 療法の臨床試験が欧米で行われ良好な成績が報告されている。しかし、細胞株や牛胎児血清を培養に用い、遺伝子導入にウイルスベクターを使用しているため白血病を惹起する危険性があり、長期安全性に懸念がある。

我々は、細胞株や牛胎児血清を使わずに大量培養したウイルス特異的 T 細胞療法の第 I 相臨床試験を終了している。分担研究者の中沢は、米国ベイラー医科大学で、非ウイルスベクターによる遺伝子導入法である PiggyBac トランスポゾン法での CAR-T 療法を開発し、日本での臨床開発についてベイラー大学から承諾を得ている。トランスポゾン法と申請者が開発した大量 T 細胞培養法と組みあわせることで、より安全性が高く、ウイルスベクター法と比較してコストが 10 分の 1 で First in Human 臨床第 I 相試験を行うことが可能である。

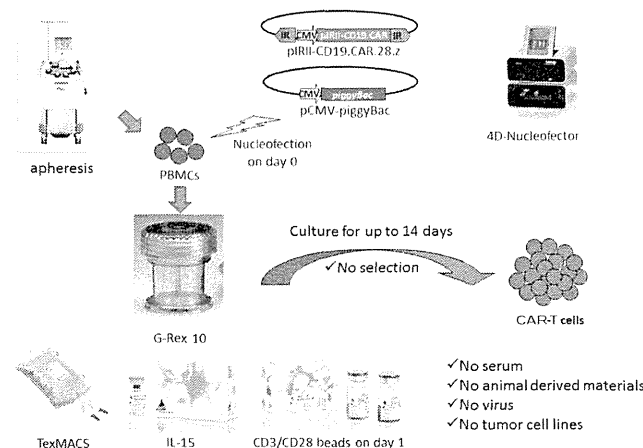
「小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法の開発」研究組織



B. 研究方法

CD19.CAR-T 細胞培養を、GMP 基準に準拠した臨床スケールで培養法を確定する (図1)。

図1: CD19・CAR-T細胞の作成、培養方法



骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出方法を確立する。MRD の検出にあたっては、高い検出感度 ($\sim 10^{-6}$) を得るため、次世代シーケンスを用いる。ゲノム DNA を鋳型として、免疫グロブリン重鎖の各 V 領域に特異的なプライマーと、J 領域のコンセンサスプライマーを用いて複数の PCR を行う。PCR 産物をまとめて次世代シーケンス用に調製し、デスクトップ型シーケンサー (イルミナ社 MiSeq) で 200 万リードの配列を読み取る。診断時サンプルより腫瘍細胞のクロノタイプ塩基配列を決定し、寛解期サンプルから同じ配列が 2 リード以上検出されれば MRD 陽性と判断する。

(倫理面への配慮)

わが国において臨床研究倫理指針に準拠した臨床研究として、名古屋大学倫理審査委員会で審議し、承認後に研究を開始する。医師主導臨床治験としての申請について PMDA に事前相談を行い、戦略相談を行う予定で、厚生労働省に提出する。個人情報情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。検体の採取にあたっては患者および家族から事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得る。遺伝子解析についてはヒトゲノム、遺伝子解析研究指針にしたがい、患者および家族に事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。

C. 研究結果

GMP 準拠の試薬を用いた培養系において、末梢血 30ml より分離した単核球 2×10^7 個の細胞より 14 日間培養後平均 1.5×10^8 個の CD19/CAR-T 細胞が得られた。14 日目の CD19・CAR 遺伝子導入効率はいずれも基準値 5% 以上が得られた。米国 Waisman 社と GMP 規格プラスミドの委託契約を結んだ。

名古屋大学医学部附属病院小児科において同種造血幹細胞移植を施行した 15 歳以下の小児 CD19 陽性急性リンパ性白血病患者 (9 例) において、診断時検体を用いた腫瘍特異的 CDR3 配列の決定を行った。以下の 2 時点において MRD を検討した (A) 初回化学療法終了時 (5 例) (B) 移植直前 (7 例)。初回化学療法終了時に MRD 陽性の 3 例はいずれも治療終了後 5 か月以内の早期に再発していた。さらに移植直前 MRD 陽性の 2 例はともに移植後再発していたが、陰性 5 例は全例無再発生存していた ($p=0.0082$)。

D. 考察

非ウイルスベクター法であるトランスポゾン法を用いた GMP 準拠 CD19/CAR-T 細胞培養法を確定でき、骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出方法を確立した。

E. 結論

骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出を行うことで、非ウイルスベクター法による CD19/CAR-T 細胞による First in Human 臨床第 I 相治験を行う基盤が整備できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol.* 2014 Feb;99(2):169-174.

2. 学会発表

海外

- 1) Takahashi Y. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. 40th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 9, 2014. Milano, Italia.
- 2) Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. The 19th congress of APBMT. Oct.16, 2014. Hangzhou, China.

国内

- 1) 高橋 義行、関屋 由子、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、奥野 友介、入江 正寛、村松 秀城、濱 麻人、小島 勢二. Unmanipulated HLA haploidentical bone marrow

transplantation combined with PBSC using high dose ATG.第 76 回日本血液学会学術集会. 2014 年 10 月 31 日. 大阪.

- 2) Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Nishikawa E, Wang X, Xu Y, Kamei M, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Next-generation sequencing-based detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. 次世代シーケンサーを用いた小児急性リンパ性白血病における微小残存病変の検出. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 11 月 28 日. 岡山.
- 3) 奥野 友介、西尾 信博、川島 希、鈴木 哲、関屋 由子、村松 秀城、濱 麻人、中沢 洋三、高橋 義行、小島 勢二. 難治性小児急性リンパ性白血病に対する臨床応用を目的としたトランスポン法による抗 CD19 キメラ抗原受容体導入 T 細胞の培養法の確立. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 6 日. 神戸.
- 4) 西尾 信博、鈴木 哲、鋤塚 八千代、西田 徹也、村田 誠、清井 仁、高橋 義行、小島 勢二. 長期保存されたウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞の安定性に関する検討. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 6 日. 神戸.
- 5) 関屋 由子、奥野 友介、村松 秀城、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、亀井 美智、入江 正寛、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二. 小児 ALL に対する次世代シーケンスを用いた微小残存病変 (MRD) による造血幹細胞移植時期の検討. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 7 日. 神戸.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

業務課題：新規 CAR-T 細胞療法の開発

担当責任者 中沢 洋三（信州大学医学部附属病院 講師）

研究要旨： HLA 不一致同種造血幹細胞移植を受けた急性リンパ性白血病患者に対する CD19.CAR-T 細胞療法においては、ドナー由来 CAR-T 細胞による重症 GVHD の発症が懸念される。本研究では、CAR-T 細胞療法の安全性の向上を目的に、同種反応の減弱したウイルス特異的 CAR-T 細胞の樹立を試みた。その結果、サイトメガロウイルス特異性と抗白血病効果の両者を有する非ウイルス遺伝子改変 CAR-T 細胞の樹立に成功した。

A. 研究目的

HLA 不一致同種造血幹細胞移植を受けた患者に対する CAR-T 細胞療法においては、ドナー由来 CAR-T 細胞による重症 GVHD の発症が懸念される。本研究では、CAR-T 細胞療法の安全性の向上を目的に、同種反応の減弱したウイルス特異的 CAR-T 細胞の樹立を試みた。

B. 研究方法

骨髄移植後患者から採取した 1×10^7 個の末梢血単核球に、piggyBac トランスポゾン法を用いて CD19.CAR を遺伝子導入した。遺伝子導入単核球を、CMV 抗原ペプチドをパルスした患者由来細胞と混合し、サイトカイン添加無血清培地を用いて培養した。7 日後に 2 回目の CMV 抗原刺激を行い、さらに 10 日間培養した。

（倫理面への配慮）

患者末梢血の採取について、信州大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

培養開始 17 日目に 2.9×10^7 個の生細胞が得られ（CAR-T 細胞）、そのうち 89% が CD3 陽性を示した。CD3 陽性細胞の 39% は CD19.CAR を発

現していた。CAR-T 細胞は CMV 抗原に特異性を示し、さらに ALL 細胞株との共培養で優れた抗白血病効果を発揮した。

D. 考察

遺伝子導入と細胞培養の両過程から完全にウイルスを除いた方法を用いて、CMV 特異的 CD19.CAR-T 細胞の拡大培養に成功した。今後、従来の非特異的刺激法で培養した CAR-T 細胞と比較して同種反応の減弱を確認する。

E. 結論

非ウイルス法によるウイルス特異的 CD19.CAR-T 細胞の樹立は十分可能であり、将来的な HLA 不一致同種造血幹細胞移植への応用が期待される。

F. 研究発表

論文発表、学会発表

未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

平成27年度特許出願予定

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告書（業務項目）

小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

業務課題

CD19CAR 以外のキメラ遺伝子導入 T 細胞療法の開発およびキメラ遺伝子導入 T 細胞の技術開発

担当責任者 寺倉 精太郎（名古屋大学医学部附属病院血液内科 病院助教）

研究要旨： 新規がん特異的分子を標的としたキメラ抗原レセプター（CAR）を開発し、これを遺伝子導入したT細胞の作成を目的とする。新規癌特異的抗原Xに対する抗体のアミノ酸配列情報を得て、これをもとにXを特異的に認識するCAR遺伝子を開発している。今後CARをT細胞に遺伝子導入し、その特異性を検討する。特異的反応が確認できれば、実際の腫瘍細胞表面上のXにおいても有効な認識・傷害を示すかどうか検討する。

これまで用いてきたCD19CARでは、T細胞を患者体内に投与するとCARに反応するCD19抗原がなくなるまで非常に強い反応が起こり続け、それによる致命的合併症も報告されている。今回我々は薬剤を投与したときだけCD19CARが発現するようにする新たなシステムの検討を行っている。

A. 研究目的

目的 1：新規がん特異的分子を標的としたキメラ抗原レセプター（CAR）を作成し、これを遺伝子導入した T 細胞を樹立する。新規癌特異的抗原 X に対する抗体のアミノ酸配列情報を得て、これをもとに X を特異的に認識する CAR 遺伝子を開発する。今後 X-CAR を T 細胞に遺伝子導入し、その特異性を検討する。特異的反応が確認されれば、実際の腫瘍細胞表面上の X においても有効な認識・傷害を示すかどうか検討する。

目的 2：これまで用いてきた CD19CAR では、CD19CAR-T 細胞を患者体内に投与すると、これに反応する CD19 抗原陽性細胞がなくなるまで非常に強い反応が起こり続け、それによる致命的合併症も報告されている。今回我々は薬剤を投与したときだけ CD19CAR が発現するようにする新たなシステムの検討を行う。

B. 研究方法

これまで用いてきたCD19CARの細胞外ドメインを抗X抗体の単鎖抗体で置き換えるため、X抗体

のアミノ酸配列を用いて、CAR遺伝子をデザインし、**overlap PCR**で結合させ作成する。細胞内ドメインとしてはCD28細胞内ドメインに替えて**4-1BB/CD27**の細胞内ドメインを組み込んだプラスミド・ベクターも作成することにした。共同研究者から供与された抗X抗体を用いて活性化T細胞上および腫瘍細胞上のXの発現を検討する。

Tet inducible expression vectorを用いてモデルとなるCARの発現をコントロールできるかどうか検討する。レトロウイルスを用いて**tet-responsible element**とCAR遺伝子を同時に遺伝子導入するためのベクターを構築する。これをT細胞に遺伝子導入し、CARの発現を薬剤によってコントロールできるかどうか検討する。

（倫理面への配慮）

患者あるいはドナーから細胞その他の材料を採取する場合には、当院 IRB で審査を受け、適切なインフォームド・コンセントのもと行っている。研究遂行にあたって必要な倫理指針などを遵守して行っている。

C. 研究結果

新規に抗 X 抗体の単鎖抗体の遺伝子を構築した。これまで用いていた CAR vector の単鎖抗体部分と置き換えることで、抗 X-CAR を作成した。現在これを T 細胞に遺伝子導入し、抗 X-CAR としての特異性を検討している。併せて様々な腫瘍細胞株における X の発現を検討した。

CAR 発現をコントロールするため inducible element と CAR を同時に遺伝子導入できるレトロウイルスを作成した。これを用いて腫瘍細胞株である SUPT1 に遺伝子導入を行った。この細胞株を用いて、薬剤投与後の CAR 発現の kinetics を検討した。また、ドナーから採取した primary T 細胞に同様に遺伝子導入を行い、薬剤投与後に CAR の発現が上昇するかどうか検討した。

D. 考察

今回我々は新規がん特異的標的分子として X に対する CAR の開発を進めている。X はがん特異的であると同時にがんの生存に必要な分子であると考えられている。その特異性がどの程度厳密に担保されているかは今後の検討課題であるが、どのような腫瘍組織に発現が見られるのかと同時に健全組織における発現についても今後検討していく予定にしている。

CAR の発現を薬剤で自由にコントロールすることが出来れば、これまで自殺遺伝子の導入などを行っていたところを、薬剤でコントロールし、遺伝子導入免疫細胞は生かしたまま治療を一旦中断するなど柔軟な対応が可能となり、期待される。今後薬剤投与後の CAR の発現・消失のスピードや必要な薬剤濃度などについて検討を加えていく。

E. 結論

新規 X-CAR をデザインし、overlap PCR を行い作成した。T 細胞に遺伝子導入を行うため、レトロウイルス・ベクターを準備した。今後作成した X-CAR T 細胞が X を特異的に認識・傷害することが期待される。X は活性化 T 細胞には発現しておらず、限定された腫瘍細胞上に発現が見られた。

Inducible vector system を用いて、CAR の発現をコントロールすることを目指して開発を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imahashi N, Nishida T, Goto T, Terakura S, Watanabe K, Hanajiri R, Sakemura R, Imai M, Kiyoi H, Naoe T, Murata M. Simple and Efficient Generation of Virus-specific T Cells for Adoptive Therapy Using Anti-4-1BB Antibody. *J Immunother.* 2015 Feb-Mar;38(2):62-70.
- 2) Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3 ζ Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8+ T Cells. *J Immunol.* 2015 Feb 1;194(3):911-20.
- 3) Tanaka M, Miyamura K, Terakura S, Imai K, Uchida N, Ago H, Sakura T, Eto T, Ohashi K, Fukuda T, Taniguchi S, Mori S, Nagamura-Inoue T, Atsuta Y, Okamoto S. Comparison of Cord Blood Transplantation with Unrelated Bone Marrow Transplantation in Patients Older than Fifty Years. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Dec 8. pii: S1083-8791(14)01394-9.
- 4) Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Terakura S, Saito S, Kato T, Mizuno H, Imahashi N, Seto A, Ozawa Y, Miyamura K, Ito M, Takeshita K, Kato H, Toyokuni S, Nagao K, Ueda R, Naoe T. Dexamethasone palmitate ameliorates macrophage-rich graft-versus-host disease by inhibiting macrophage functions. *PLoS One.* 2014 May 7;9(5):e96252.

- 5) Terakura S, Nishida T, Inamoto Y, Ohashi H, Naoe T, Murata M. Successful unrelated cord blood transplantation for adult acquired aplastic anemia using reduced intensity conditioning without ATG. Immunol Lett. 2014 Jul;160(1):99-101.

2. 学会発表

- 1) 渡邊慶介、寺倉精太郎、内山進、今井美沙、小山大輔、酒村玲央奈、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、直江知樹、村田誠、清井仁. キメラ抗原受容体単鎖抗体部分の強すぎる親和性は抗原刺激後の T 細胞増殖を阻害する 第 6 回造血器腫瘍免疫療法研究会, 京都, 2014
- 2) 寺倉精太郎. キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞を用いた細胞治療の今後 第 63 回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会, 名古屋, 2014
- 3) 渡邊慶介、寺倉精太郎、内山進、今井美沙、小山大輔、酒村玲央奈、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、直江知樹、村田誠、清井仁. ヒト化抗 CD20 キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞は非常に低発現の標的抗原を認識し得る 第 76 回日本血液学会総会, 大阪, 2014
- 4) Keisuke Watanabe, Seitaro Terakura, Susumu Uchiyama, Anton C. Martens, Tom van Meerten, Hitoshi Kiyoi, Tetsuya Nishida, Tomoki Naoe, Makoto Murata. Excessively High-Affinity Single-Chain Fragment Variable Region in a Chimeric Antigen Receptor Can Counteract T-Cell Proliferation. 第 56 回米国血液学会総会, San Francisco, USA, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 学会等発表実績

発表実績

委託業務題目：「小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞療法の開発」

機関名：国立大学法人名古屋大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor.	Takahashi Y.	40th Annual Meeting of the EBMT. (Milano, Italia)	2014. 4. 9	国外
CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease.	Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S.	The 19th congress of APBMT. (Hangzhou, China.)	2014. 10. 16	国外
Excessively High-Affinity Single-Chain Fragment Variable Region in a Chimeric Antigen Receptor Can Counteract T-Cell Proliferation	Keisuke Watanabe, Seitaro Terakura, Susumu Uchiyama, Anton C. Martens, Tom van Meerten, Hitoshi Kiyoi, Tetsuya Nishida, Tomoki Naoe, Makoto Murata	56th American Society of Hematology Annual Meeting	2014. 12. 7	国外
キメラ抗原受容体単鎖抗体部分の強すぎる親和性は抗原刺激後のT細胞増殖を阻害する（口頭）	渡邊 慶介、寺倉 精太郎、内山 進、今井 美沙、小山 大輔、酒村 玲央奈、後藤 辰徳、葉名尻 良、今橋 伸彦、西田 徹也、直江 知樹、村田 誠、清井 仁.	第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会	2014. 9. 6	国内
キメラ抗原レセプター遺伝子導入T細胞を用いた細胞治療の今後	寺倉 精太郎	第63回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会	2014. 9. 20	国内
Unmanipulated HLA haploidentical bone marrow transplantation combined with PBSC using high dose ATG. (口頭)	高橋 義行、関屋 由子、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、奥野 友介、入江 正寛、村松 秀城、濱 麻人、小島 勢二.	第76回日本血液学会総会（大阪）	2014. 10. 31	国内
ヒト化抗CD20キメラ抗原レセプター遺伝子導入T細胞は非常に低発現の標的抗原を認識し得る	渡邊 慶介、寺倉 精太郎、内山 進、今井 美沙、小山 大輔、酒村 玲央奈、後藤 辰徳、葉名尻 良、今橋 伸彦、西田 徹也、直江 知樹、村田 誠、清井 仁	第76回日本血液学会総会（大阪）	2014. 11. 2	国内
Next-generation Sequencing-based Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia	Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Nishikawa E, Wang X, Xu Y, Kamei M, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会（岡山）	2014. 11. 28	国内
難治性小児急性リンパ性白血病に対する臨床応用を目的としたトランスポンゾン法による抗CD19キメラ抗原受容体導入T細胞の培養法の確立（口頭）	奥野 友介、西尾 信博、川島 希、鈴木 哲、関屋 由子、村松 秀城、濱 麻人、中沢 洋三、高橋 義行、小島 勢二.	第37回日本造血細胞移植学会総会（神戸）	2014. 3. 6	国内
長期保存されたウイルス特異的細胞傷害性T細胞の安定性に関する検討（口頭）	西尾 信博、鈴木 哲、鎌塚 八千代、西田 徹也、村田 誠、清井 仁、高橋 義行、小島 勢二.	第37回日本造血細胞移植学会総会（神戸）	2014. 3. 6	国内
小児ALLに対する次世代シーケンスを用いた微小残存病変（MRD）による造血幹細胞移植時期の検討（口頭）	関屋 由子、奥野 友介、村松 秀城、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、亀井 美智、入江 正寛、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二.	第37回日本造血細胞移植学会総会（神戸）	2014. 3. 7	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
1 Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant.	Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S.	Biol Blood Marrow Transplant.	2015	国外
2 Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. Br J Haematol.	Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E.	Br J Haematol.	2015	国外
3 Simple and Efficient Generation of Virus-specific T Cells for Adoptive Therapy Using Anti-4-1BB Antibody.	Imahashi N, Nishida T, Goto T, Terakura S, Watanabe K, Hanajiri R, Sakemura R, Imai M, Kiyoi H, Naoe T, Murata M.	J Immunother.	2015	国外
4 Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3 ζ Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8 ⁺ T Cells.	Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M.	J Immunol.	2015	国外
5 Oncolytic virus expressing RANTES and IL-15 enhances function of CAR-modified T cells in solid tumors.	Nishio N, Dotti G.	OncoImmunology	2015	国外
6 Comparison of Cord Blood Transplantation with Unrelated Bone Marrow Transplantation in Patients Older than Fifty Years.	Tanaka M, Miyamura K, Terakura S, Imai K, Uchida N, Ago H, Sakura T, Eto T, Ohashi K, Fukuda T, Taniguchi S, Mori S, Nagamura-Inoue T, Atsuta Y, Okamoto S.	Biol Blood Marrow Transplant.	2014	国内
7 Dexamethasone palmitate ameliorates macrophage-rich graft-versus-host disease by inhibiting macrophage functions.	Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Terakura S, Saito S, Kato T, Mizuno H, Imahashi N, Seto A, Ozawa Y, Miyamura K, Ito M, Takeshita K, Kato H, Toyokuni S, Nagao K, Ueda R, Naoe T.	Plos One.	2014	国内
8 Successful unrelated cord blood transplantation for adult acquired aplastic anemia using reduced intensity conditioning without ATG.	Terakura S, Nishida T, Inamoto Y, Ohashi H, Naoe T, Murata M.	Immunol Lett.	2014	国内
9 RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22).	Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S.	Int J Hematol.	2014	国内