

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。次世代シーケンズ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

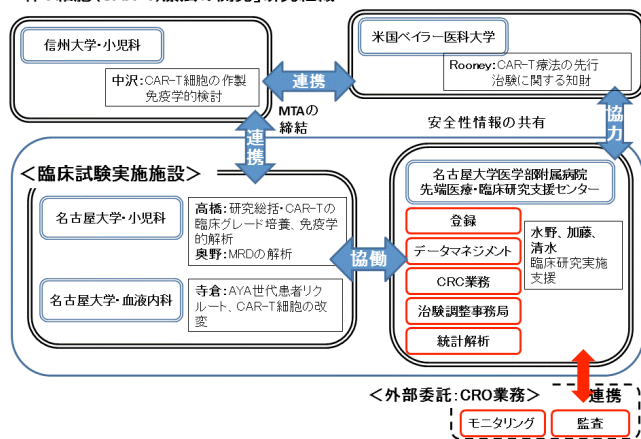
CD19.CAR-T 細胞の培養法確定、2) 次世代シーケンズ法を用いた骨髄中微小残存白血病細胞（MRD）の検出方法の確立、3) 新規がん特異的分子を標的とした CAR の開発と CAR-T 細胞デザインの改善を業務課題としている。

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 細胞培養法と組み合わせることで、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 相治験を行うことが可能である (組織図)。

「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



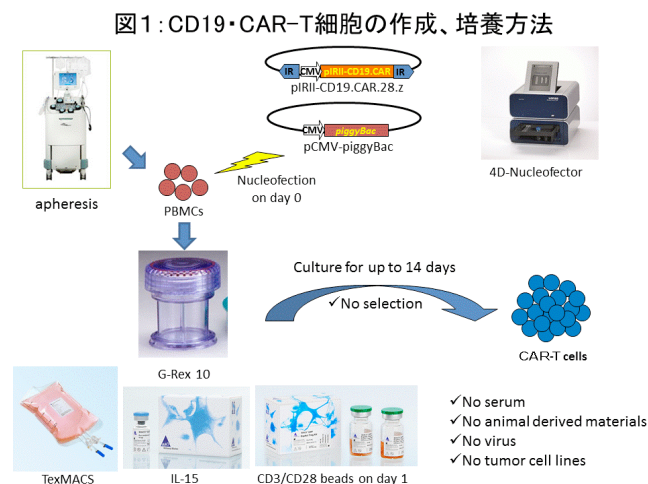
CD19.CAR-T 細胞療法の適応や効果判定に従来の骨髄検査法以上に鋭敏な骨髄中微小残存白血病細胞 (MRD) の検出方法を確立が必要となる。MRD の検出にあたっては、次世代シーケンスを用いることで高い検出感度 ( $\sim 10^{-6}$ ) が得られる。

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)。



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-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。

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  $2 \times 10^7$  個の細胞より 14 日間培養後平均  $1.5 \times 10^8$  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、鉾塚 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