

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）

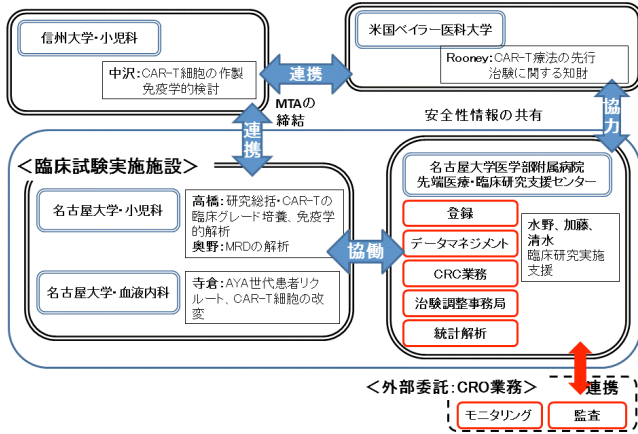
研究要旨： 急性リンパ性白血病（ALL）は小児において悪性腫瘍による死亡者数第一位の疾患である。最近、化学療法抵抗性 ALL 患者に対して、細胞表面に発現する CD19 抗原に対するキメラ抗原受容体（CAR）を、患者から採取した末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、大量培養して輸注する CD19.CAR-T 療法の臨床試験が欧米で行われ良好な成績が報告されている。しかし、細胞株や牛胎児血清を培養に用い、遺伝子導入にウイルスベクターを使用しているため白血病を惹起する危険性があり、特に小児においては長期安全性に懸念がある。我々は、細胞株や牛胎児血清を使わずに大量培養したウイルス特異的 T 細胞療法の第 I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

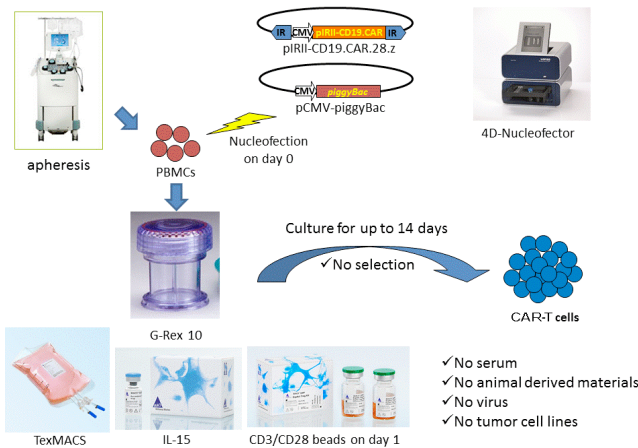
「小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体T細胞 (CAR-T)療法の開発」研究組織



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、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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし