

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：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  $1 \times 10^7$  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  $2.9 \times 10^7$  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