

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-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。

（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・コンセントのもとに行っている。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 macrophages-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