

研究要旨：本研究では同種造血幹細胞移植後の再発した成人T細胞白血病リンパ腫（ATLL）の治療として、ATLLに高発現するNY-ESO-1抗原特異的なT細胞レセプター（TCR）遺伝子を導入したドナーリンパ球輸注療法(DLI)の医師主導治験実施を目指した実用化研究を行うことを目的とする。独自開発の内因性TCR発現を抑制するレトウイルスベクターを用いてTCR遺伝子導入し、腫瘍特異的反応性(GVL)を強めGVHDを低減し、有効かつ安全性の高いドナーリンパ球輸注療法を開発する。

A. 研究目的

成人T細胞白血病リンパ腫（ATLL）に対し同種造血幹細胞移植は有効だが3年非再発生存は30%前後である。再発例にドナーリンパ球輸注療法が試みられるが、深刻な合併症としてのGVHD克服と有効性の向上が課題である。

本研究では同種造血幹細胞移植後の再発ATLLの治療として、ATLLに高発現するNY-ESO-1抗原特異的なT細胞レセプター（TCR）遺伝子を導入したドナーリンパ球輸注療法の医師主導治験実施を目指し実用化研究を行う。独自開発の内因性TCR発現を抑制するレトウイルスベクターを用いてTCR遺伝子導入し、腫瘍特異的反応性(GVL)を強めGVHDを低減し、有効かつ安全性の高いドナーリンパ球輸注療法を開発する。本業務項目ではin vitroにおける薬理薬効試験、毒性試験とin vivo評価系の樹立を行い、治験申請に必要とされる、薬理薬効、毒性、安全性に関する非臨床試験を実施する。

B. 研究方法

In vitro におけるヒト ATLL 細胞への特異的反応性、正常細胞への低反応性を確認する。免疫不全マウスを用い ATLL の造血幹細胞移植後ドナーリンパ球輸注療法の in vivo 評価系樹立する。近交系マウスを用い白血病の造血幹細胞移植後ドナーリンパ球輸注療法の in vivo 評価系樹立する。これらの in vivo 評価系を用いて薬効薬理、薬物動態、安全性薬理、毒性データ獲得する。

（倫理面への配慮）

本研究に用いるヒト末梢血等の検体の採集、解析はヘルシンキ宣言にのっとり行なわれ、全て三重大学医学部研究倫理委員会にて承認されたプロトコールに従い、被験者本人の書面による同意書を得て実施される。採取した検体は本人特定不可能な暗号化がなされ盗難防止処置を施した冷蔵庫、液体窒素タンクに保存する。被験者個人情報に関

しては匿名化され、個人のプライバシー、遺伝子解析の結果が外部に漏洩されないよう厳重な注意、処置が施行される。

レトロウイルスを用いたヒト末梢血単核球への腫瘍抗原特異的TCRの導入実験は三重大学の組換えDNA実験審査委員会及び三重大学医学部研究倫理委員会において承認されている。これらの実験は三重大学において承認を受けたP2レベルの研究室にて行なわれる。

実験動物を用いたT細胞輸注療法、遺伝子免疫療法の研究は三重大学の組換えDNA実験審査委員会、三重大学医学部研究倫理委員会、動物実験審査委員会においてすでに承認を受けており、三重大学において承認を受けた実験室、飼育室において実施される。

C. 研究結果

1. NY-ESO-1 陽性腫瘍細胞に対する *in vitro* の細胞傷害性試験を実施した。TCR 遺伝子を導入したヒト T 細胞は NY-ESO-1 抗原と HLA-A*24:02 を発現する腫瘍細胞を抗原特異的に傷害することを確認した。2. 免疫不全マウスを用いた、TCR 遺伝子改変ヒト T 細胞によるドナーリンパ球輸注療法の評価系を作製した。本評価系を用いて、ドナーリンパ球中の CD4、CD8 陽性両 T 細胞サブセットが GVHD と抗腫瘍効果に果たす役割を検討した。その結果、GVHD 発症には CD4、CD8 陽性両 T 細胞が関わるが、siTCR ベクターを用いて TCR 遺伝子改変することで CD4、CD8 陽性 T 細胞は共に GVHD を起こさなくなることが示された。一方、抗腫瘍効果は主に TCR 改変された CD8 陽性

T 細胞が担うことが示された。また、本評価系における GVHD 病態の解析を行い、GVHD により顕著な骨髄破壊が起こるが、siTCR ベクターを用いて TCR 遺伝子改変することで骨髄破壊を起こさなくなることが示された。3. 近交系マウスを用いた、白血病の造血幹細胞移植後ドナーリンパ球輸注療法の *in vivo* 評価系の作製を行った。4. TCR の認識する抗原ペプチドについてアラニン置換による交差反応性を検討し、正常タンパク質由来のペプチドに対する予期せぬ交差反応性の可能性が極めて低い事を確認した。

D. 考察

TCR 遺伝子導入 T 細胞の薬理活性と安全性に関する非臨床試験を行い、TCR 遺伝子を導入したヒト T 細胞は NY-ESO-1 抗原と HLA-A*24:02 を発現する腫瘍細胞を抗原特異的に傷害することを確認した。また、免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞を輸注する *in vivo* 評価系を樹立した。また、用いる TCR が正常タンパク質由来のペプチドに対する予期せぬ交差反応性の可能性が極めて低い事が確認できた。

E. 結論

平成 26 年度は TCR 遺伝子を導入したヒト T 細胞は NY-ESO-1 抗原と HLA-A*24:02 を発現する腫瘍細胞を抗原特異的に傷害することを確認した。また、免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞を輸注する *in vivo* 評価系を樹立した。また、用いる TCR が正常タンパク質由来のペプチドに対する予期せぬ交差反応性の可能性が極めて

低い事が確認され、治験開始に向けて順調に準備が進んだ。平成27年度にさらに近交系マウスの評価系を用いた検討を含む追加非臨床試験の実施し、平成28年度の治験開始を目指す。

F. 健康危険情報
該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sung Won Choi, Erin Gatza, Guoqing Hou, Yaping Sun, Joel Whitfield, Yeohan Song, Katherine Oravec-Wilson, Isao Tawara, Charles A. Dinarello, Pavan Reddy. Histone deacetylase inhibition regulates inflammation and enhances Tregs after allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans. *Blood* 125(5), 815-819, 2015.
- 2) Kenichiro Nishikawa, Naohiro Seo, Mie Torii, Nei Ma, Daisuke Muraoka, Isao Tawara, Masahiro Masuya, Kyosuke Tanaka, Yoshiyuki Takei, Hiroshi Shiku, Naoyuki Katayama, Takuma Kato. Interleukin-17 Induces an Atypical M2-Like Macrophage Subpopulation That Regulates Intestinal Inflammation. *PLoS One*, 9(9) e108494, 2014.
- 3) Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T,

Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H. Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2015 in press.

- 4) Ishihara M, Seo N, Mitsui J, Muraoka D, Tanaka M, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. Systemic CD8+ T Cell-Mediated Tumorcidal Effects by Intratumoral Treatment of Oncolytic Herpes Simplex Virus with the Agonistic Monoclonal Antibody for Murine Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor. *PLoS One*, 9(8):e104669. 2014.
- 5) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7:3, 2014.
- 6) O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Gross E, Tran M, Mayfield SP, Ikeda H, Bui JD. Interleukin-17D mediates tumor rejection through recruitment of natural killer cells. *Cell Rep.*, 7(4):989-998, 2014.
- 7) Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaike C, Wang L, Orito Y, Yamane M, Ueno H,

Ideno M, Nukaya I, Enoki T, Mineno J, Takesako K, Hirano S, Shiku H. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8⁺ T cells. Eur J. Immunol., 44:1727-1758, 2014.

2.学会発表

- 1) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Isao Tawara, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Naoyuki Katayama, Hiroshi Shiku. Tumor-specific TCR-engineered donor lymphocyte infusion therapy with reduced GVHD induction utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. American Society of Hematology 56th annual meeting, SF, USA, 2014.
- 2) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Tumor-specific donor Lymphocyte infusion therapy with allogeneic T cells utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. Society for immunotherapy of Cancer 29th Annual Meeting. National Harbor, MD, USA, 2014.
- 3) 池田裕明 TCR遺伝子改変T細胞輸注による新しいがん免疫療法の臨床開発 2014第63回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会 名古屋 2014.

- 4) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京 2014.
- 5) Yasushi Akahori, Motohiro Yoneyama, Hiroaki Ikeda, Yuki Orito, Yoshihiro Miyahara, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of chimeric antigen receptor immunotherapy targeting intracellular WT1 gene product. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京 2014.
- 6) Hiroaki Ueno, Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第18回日本がん免疫学会総会 松山 2014.
- 7) 赤堀泰 米山元裕 池田裕明 宮原慶裕 織戸由貴 天石泰典 岡本幸子 峰野純一 竹迫一任 珠玖洋 WT1ペプチド-HLA-A24複合体を認識するヒト抗体の単離とそれを用いたCAR治療法の開発 第18回日本がん免疫学会総会 松山 2014.

H.知的所有権の出願・取得状況

- 1.特許取得
該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し