厚生労働科学研究費補助金

第３次対がん総合戦略研究事業

ヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとした新規キメラ抗原レセプター（CAR）遺伝子導入 T 細胞の作成と評価

平成25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　寺　倉　精　太　郎

（名古屋大学医学部附属病院）

平成26（2014）年3月

目　　次

Ⅰ．研究組織 ---------- 1

Ⅱ．総括研究報告

ヒト化抗CD20抗体を細胞外ドメインとした新規キメラ抗原レセプター（CAR）遺伝子導入T細胞の作成と評価　研究代表者　寺倉　精太郎---- 3

Ⅲ．分担研究報告

1．Cell processing centerにおける実際の遺伝子導入および細胞調製試験　村田　誠---------- 7

Ⅳ．研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 9

Ⅴ．研究成果の刊行物・別刷 ---------- 11

厚生労働省科学研究費補助金（第 3 次対がん総合戦略事業）

総括研究報告書

ヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとした新規キメラ抗原レセプター（CAR）遺伝子導入 T 細胞の作成と評価

研究代表者：寺倉　精太郎　名古屋大学医学部附属病院　血液内科医員

研究要旨：

ヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとした新規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 細胞を用いてその評価を行った。CD20 を特異的に認識する CAR 遺伝子を開発し得た。現在臨床で用いられる抗 CD20 抗体は、連用することで腫瘍細胞表面上の CD20 発現が低下し、抗 CD20 抗体療法が不応になることが知られているが、CD20-CAR+ T 細胞はこうした CD20 低発現細胞株も有効に認識・傷害した。また、腫瘍細胞表面上の CD20 が低発現となった患者からの臨床分離株においても有効な認識・傷害を示した。

これまで用いてきた CD28 細胞内ドメインに加え、4-1BB および CD27 細胞内ドメインをもつ CAR を作成した。細胞内シグナルを詳細に検討するため、T 細胞が活性化すると蛍光を発するよう vector を遺伝子導入したが、刺激後にうまく発現しなかった。さらに抗体部分の affinity の異なる CAR を複数種類作成し、affinity と細胞内ドメインの最適な組み合わせについて検討した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における所属

村田誠・名古屋大学医学部附属病院　講師

A.研究目的

本研究ではヒト化 CD20 抗体を細胞外ドメインとして用いた CAR を作成･評価し前臨床試験までを行うことを目的とした。既に抗体の Affinity が報告されているヒト化 CD20 抗体の遺伝子情報を用いて開発に着手できる。ヒト化抗体を用いた CAR の開発はまだ報告が少ないが、導入した遺伝子産物に対する免疫反応が起こりにくいと考えられるヒト化抗体を用いて免疫反応を避ける必要性は高い。本研究で用いる CD20 抗体は Affinity が既知であるために、標的細胞側の抗原発現量がリガンド結合後の T 細胞機能に及ぼす影響を、異なる Affinity の CAR を用いて検討可能である。CD20 低発現細胞株や臨床分離細胞を用いて CD20 低発現の標的に対する CD20-CAR の作用について検討する。さらに Affinity/avidity を変化させたときに CD28/CD27/4-1BB の細胞内ドメインの違いが及ぼす影響について、とくに抗原刺激後の T 細胞の増殖・メモリー化に及ぼす影響について in vivo で検討する。

CD20 刺激後のサイトカイン分泌や細胞分裂能から最適な CAR の構造を決定し、これを用いた臨床試験の準備を行う。分担研究者において既に稼働している Cell processing center を用いて実際の患者から分離した T 細胞を用いた細胞調整の試験を数例程度行い、GMP 基

準に則った細胞調整が可能であることを確認する。

開発したCD20-CARを用いて臨床試験を行い、実際に臨床的有用性が示されれば、現在臨床で使用されている維持抗体療法・化学療法の代替としてより副作用が少なく、維持療法よりもむしろ安価な治療として認知されることが期待される。

B. 研究方法

これまで用いてきた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・ベクターを作成した。上記同様にレトロウイルス・ベクターを作成した。CARがCD20に結合した後、伝達されるシグナルを比較検討するため、Jurkat細胞株にreporter vectorを組み込んだものを作成した。これにより、より定量的にシグナル伝達を評価できるものと考えた。

CARの細胞外ドメインとなる抗体のaffinityとCARの有効性との関連は詳細には検討されていない。5種類のaffinityの異なるCD20抗体を用いてCARを作成した。これをT細胞に遺伝子導入し、CAR-Tの細胞傷害活性などのT細胞活性に及ぼす影響を検討する。また、細胞内ドメインのaffinityの組み合わせの違いによってT細胞機能にどのような影響が出るのか検討する。

（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・コンセントのもと行う。研究遂行にあたって必要な倫理指針などを遵守して行う。

C. 研究結果

新規にヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとして用いた CAR を作成し、細胞表面上に発現する CD20 の抗原量と CD20-CAR+ T 細胞の反応しうる限界について検討した。新たに作成した CD20-CAR を遺伝子導入した CD20-CAR+ T 細胞はCD20 特異的に標的細胞を認識・傷害した。この細胞を用いて様々な程度の CD20 を発現する CEM 細胞株群に対する細胞傷害活性を検討した。今回作成した CD20CAR-T 細胞は標的細胞あたり約 200 分子の CD20 を認識して傷害することが分かった。同様にして CD20CAR-T 細胞を活性化するために必要な CD20 分子密度を検討した。CD20CAR-T を活性化するために必要な CD20 抗原は標的細胞あたり約 2000 分子程度であることが分かった。さらに、CD20 低発現となり臨床的に抗 CD20 抗体療法に対して不応となった慢性リンパ性白血病患者から樹立された細胞株・臨床分離検体に対しても十分高い認識・細胞傷害活性を示した。

CD27 細胞内ドメインを用いた CAR を CD28 あるいは 4-1BB の細胞内ドメインを用いた CAR と比較して有用性を検討することを目的として、これまで用いてきた CD28 細胞内ドメインに替えて、4-1BB/CD27 細胞内ドメインに入れ替えたものを作成した。これらのプラスミド・ベクターを用いてレトロウイルス・ベクターを作成した。細胞内シグナルを詳細に検討するため、Reporter vector を遺伝子導入した Jurkat 細胞にこれらの CD20-CAR を遺伝子導入し、CD20 刺激後に比較検討する系を樹立した。しかしながら、刺激後に蛍光は定量的に検討できなかった。これは Jurkat および SUPT1 などの今回用いた T 細胞腫瘍細胞株では、文献的には刺激後の活性化は見られることになっているが、実際に手持ちの細胞株では刺激後の再活性化が見られなかったためと考えている。ATCC から購入した SUPT1 細胞を用いてみたが同様の結果であった。

最適と考えられる CD20-CAR の構造が決定した後、これを用いた臨床試験の準備として GMP 基準に則った細胞調製が可能かどうかについて検討することにしていたが、cell processing center (CPC) での細胞調製は臨床試験開始後にしか認められておらず、断念し

た。そのため、Large scale 培養の検討は実験室にて行った。

D. 考察

CAR の標的抗原が腫瘍組織以外に発現していると、CAR がその抗原を標的として正常組織をも攻撃することが懸念される。そのため CAR の標的抗原は腫瘍組織以外に発現がないことが極めて厳密に求められてきた。そのためになかなか新しい CAR の標的抗原の同定はこれまで困難であった。一方で、これまで抗体療法の標的としての腫瘍特異抗原の探索は広く行われてきたが、その場合には腫瘍特異性と同時にその抗原が腫瘍において高発現していることが求められてきた。こちらも同様になかなか新規に良い標的抗原は出てこなかった。

本研究の結果から、CAR は標的抗原が細胞あたり 200 分子程度発現していれば、傷害活性を示すことが出来、また 2000 分子程度発現していれば抗原刺激によって分裂・増殖などの活性化を示すことが分かった。すなわち、抗体の認識しうる範囲よりも低発現の標的でも十分認識しうることが示され、腫瘍抗原の探索範囲をこれまでよりも低発現の範囲に広げることによって新たな腫瘍抗原が得られる可能性が考えられた。そのような新しい戦略によって比較的発現の低い腫瘍抗原を CAR の標的抗原として同定出来れば、CAR の臨床応用の可能性も高まることが期待される。

現在、CAR の affinity と細胞内ドメインの最適な組み合わせについて検討を行っており、今後 CD20-CAR の最適構造が決定されれば CPC における細胞調製試験を経て臨床試験の開始を目指していく。

E. 結論

新規 CD20-CAR を作成し、T 細胞に遺伝子導入を行った。これらの CD20-CAR+ T 細胞は CD20 を特異的に認識・傷害した。これらの細胞を用いて CD20 低発現細胞株・臨床分離検体に対する反応を検討した。極めて低発現の細胞株や臨床分離検体でも認識・傷害しうることがわかった。CAR のこういった特性を生かして、低発現であるが腫瘍特異性の極めて高い標的抗原の探索という新しい戦略が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

＜英文＞

1) 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 Jan 29. pii: S0165-2478(14)00017-0. doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.013. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24487060.
2) Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+ T-cell epitope for adoptive immunotherapy. Mol Immunol. 2013 Dec; 56(4):399-405.
3) Yasuda T, Suzuki R, Ishikawa Y, Terakura S, Inamoto Y, Yanada M, Nagai H, Ozawa Y, Ozeki K, Atsuta Y, Emi N, Naoe T. Randomized controlled trial comparing ciprofloxacin and cefepime in febrile neutropenic patients with hematological malignancies. Int J Infect Dis. 2013 Jun; 17(6): e385-390.

＜和文＞

1) 血液疾患最新の治療 2014-2016．寺倉精太郎、編者：直江知樹、小澤敬也、中尾眞二．総頁 380．うち 42-46

2. 学会発表

1) 渡邊慶介、寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹. 新規 CD20 キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞の樹立と CD20 低発現標的に対する効果の検討 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会, 名古屋, 2013
2) Ryo Hanajiri, Makoto Murata, Kyoko Sugimoto, Miho Murase, Haruhiko Ohashi, Tatsunori Goto, Keisuke Watanabe, Nobuhiko Imahashi, Seitaro Terakura, Tetsuya Nishida, Tomoki Naoe. Cord blood allograft rejection mediated by coordination of cellular and humoral immunity. 第 75 回日本血液学会, 札幌, 2013
3) Keisuke Watanabe, Seitaro Terakura, Tatsunori Goto, Ryo Hanajiri, Nobuhiko Imahashi, Kazuyuki Shimada, Tetsuya Nishida, Akihiro Tomita, Makoto Murata, Tomoki Naoe. Anti-CD20 chimeric antigen receptor transduced T cells can recognize very low antigen expression: Determination of the lower threshold required to activate the CAR-Tcells. 第 55 回米国血液学会総会、New Orleans, USA, 2013
4) Ryo Hanajiri, Makoto Murata, Kyoko Sugimoto, Miho Murase, Haruhiko Ohashi, Tatsunori Goto, Keisuke Watanabe, Nobuhiko Imahashi, Seitaro Terakura, Tetsuya Nishida, Tomoki Naoe. Cord blood allograft rejection mediated by coordinated donor-specific cellular and humoral immune processes. 第 55 回米国血液学会総会、New Orleans, USA, 2013
5) 寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、渡邊慶介、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹. 同種臍帯血移植を行い良好な生着・生存を得た成人再生不良性貧血の 3 例 第 36 回日本造血細胞移植学会, 那覇, 2013
6) 渡邊慶介、寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹. 新規 CD20 キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞の樹立と CD20 低発現標的に対する効果の検討 第 36 回日本造血細胞移植学会, 那覇, 2013
7) 葉名尻良、村田誠、杉本恭子、村瀬未帆、大橋春彦、後藤辰徳、渡邊慶介、今橋伸彦、寺倉精太郎、西田徹也、直江知樹. 臍帯血移植片拒絶症例によるドナーHLA 特異的抗体とドナーHLA 特異的細胞傷害性 T 細胞の協働作用 第 36 回日本造血細胞移植学会, 那覇, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）

1. 特許取得出願

ヒト化抗 CD20 キメラ抗原レセプター 発明者：寺倉精太郎、渡邊慶介 権利者：名古屋大学 産業財産権の種類、番号：特願 2013-234784、出願年月日：2013 年 11 月 13 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第３次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

Cell processing centerにおける実際の遺伝子導入および細胞調製試験

研究分担者　村田　誠　　名古屋大学医学部附属病院　血液内科　講師

研究要旨
細胞免疫療法を臨床応用するためには、信頼性の高い細胞調製法の確立が必須である。そのため、３−６例程度の患者から分離されたＴ細胞に対して、実際に作成したCD20-CARを遺伝子導入し、SOP を作成するとともに、遺伝子導入効率などを検討する。実際に細胞を調製することで問題点の洗い出しを目的とした。
患者に投与する細胞しかCPCでは調製が許されておらず、患者細胞を用いた細胞調製は行わなかった。ドナー細胞を用いた細胞調製を実験室で行った。これまでの方法を踏襲し、かなり再現性よく細胞調製が行われた。今後患者細胞を用いた細胞調製を行い、さらに問題点の洗い出しを行っていくことにしている。

A.　研究目的

信頼性の高い細胞調製法の確立を目指して、CD20-CAR遺伝子導入Ｔ細胞作成のtest-runを実際のcell processing center (CPC)で行い、問題点を洗い出すことを目的とした。

B.　研究方法

治療抵抗性の悪性リンパ腫患者からインフォームドコンセントの上で末梢血を採取し、CPC において CD20-CAR 遺伝子導入細胞を作成する。手順の詳細を記録し、Standard Operation Procedure (SOP)として作成する。問題点があればこれらは別途記録し、対応策を講じる。

（倫理面への配慮）

厚生労働省研究の遂行にあたっては、厚生労働省臨床研究の倫理指針に従い、患者の利益を最優先し、研究実施計画書・同意説明書・同意書等を策定し、倫理審査委員会の承認を得る。

C.　研究結果

院内CPCの内規から、CPCでは実際に患者に投与する予定の細胞しか調製できないことが分かったため、通常用いている実験室でLarge scaleの細胞調製を行った。CD20-CAR遺伝子およびウイルスベクターの作成・遺伝子導入は、24 穴プレートを用いるこれまで通りの方法を用いた。その後、バッグに移して培養を行った。今回は患者細胞でなく、ドナー細胞を用いたこともあり、概ね予定通りの遺伝子導入効率および培養増幅効率が得られた。今後、患者由来細胞を用いた細胞調製の実施に向けて、仮のSOPの作成を作成し、さらに研究計画作成・施設IRBへの申請を準備している。

D.　考察

今回ドナー由来の細胞を用いた細胞調製を行い、多くの問題点を知ることが出来た。細胞療法の実施に向けたCPCにおける細胞調製のtest-runは、臨床試験の実施に向けて重要な段階である。今後患者由来細胞を用いたTest-run によってさらに多くの問題点が明らかになるものと期待される。

E.　結論

CD20-CAR遺伝子導入Ｔ細胞のCPCにおける作成を目指して、CPCにおけるSOP/protocolを準備中である。

F.　研究発表

1.　論文発表

1)　本研究に関する今年度の論文は未発表

2.　学会発表

未発表

G.　知的財産権の出願・登録状況

1.　特許取得　なし

2.　実用新案登録　　なし

3.　その他　なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ
寺倉精太郎	巻頭トピックス8 新しい細胞免疫療法の進展	直江知樹、小澤敬也、中尾眞二	血液疾患　最新の治療 2014-2016	南江堂	日本	2014	380、(42-46)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuda T, Suzuki R, Ishikawa Y, Terakura S, Naoe T, et al.	Randomized controlled trial comparing ciprofloxacin and cefepime in febrile neutropenic patients with hematological malignancies.	Int J Infect Dis.	17(6)	e385-390	2013
Imahashi N, Terakura S, Murata M, Naoe T, et al.	Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+ T-cell epitope for adoptive immunotherapy.	Mol Immunol.	56(4)	399-405	2013
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.	In press	In press	2014