

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24-25年度 総合研究報告書

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年(2014)年 3月

《目 次》

総合研究報告書	1
研究代表者 寺倉 精太郎		
研究成果の刊行に関する一覧表	7
研究成果の刊行物・別刷	9

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。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。

CD20CAR 遺伝子導入 T 細胞の調製にあたり、実験で行うよりも大きな規模の培養が必要になる。そのため、病院の細胞調製施設を使って試験培養を行う予定としていた。病院の細胞調製施設の規則によって、試験培養は行うことが出来なかったが、その代替として実験室での拡大培養を行った。これによって培養が可能であることが分かった。

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

直江知樹・名古屋大学大学院医学系研究科 教授
(当時)

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 vitro 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

新規ヒト化抗 CD20 抗体の可変領域を細胞外ドメインとする CAR を分子生物学的手法を用いて作成した。作成した CD20-CAR をレトロウイルス作成用のプラスミド・ベクターに組み込み、レトロウイルス・ベクターを作成した。作成したレトロウイルス・ベクターを用いてドナー末梢血 T 細胞に CD20-CAR を遺伝子導入し、CD20-CAR+ T 細胞を作成した。さらに CD8 陽性細胞あるいは CD4 陽性細胞に純化して実験に用いた。種々のレベルの CD20 を発現する CD20-CEM 細胞を標的としてクロム放出試験を行った。また、本学にて富田らが樹立・報告している CD20 低発現細胞株および CD20 低発現臨床分離細胞を標的としてクロム放出試験や細胞内インターフェロン染色にて、CD20-CAR+ T 細胞が標的を CD20 特異的に認識・傷害するかどうかについて検討した。細胞上清に含まれるインターフェロンや IL-2 は ELISA を用いて測定した。

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 および SUPT1 細胞株に reporter vector を組み込んだものを作成している。これにより、より定量的にシグナル伝達を評価することにした。

(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。CD20-CAR+ T 細胞は極めて低い CD20 発現を示す CD20+ CEM 細胞に対しても高い細胞傷害活性を示した。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患者から樹立された細胞株・臨床分離検体に対しても比較的高い認識・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。Reporter vector を遺伝子導入した Jurkat および SUPT1 細胞にこれらの CD20-CAR を遺伝子導入し、CD20 刺激後に蛍光を評価する系を樹立すべく、実

験を進めた。Reporter vector を遺伝子導入した細胞株は樹立できたが、刺激後の活性化が見られなかった。作成した Affinity の異なる 5 種類の CAR を比較するため、ドナー由来 T 細胞に遺伝子導入し、比較検討した。Affinity が高まるにつれて、一定以上の Affinity があれば CD20 特異的に CAR を通した細胞の活性化は見られた。しかしながら、一定以上に Affinity を高めても、同程度のシグナルが伝わっていることが分かった。CAR として有効性が出るための抗体の Affinity の閾値が存在するものと考えられた。

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、本学の細胞調製施設の規則により、患者に投与するための細胞以外の細胞の調製は細胞調製施設では行えなかった。そのため、代替として実験室での Large scale 培養の検討を行った。これにより、CD20CAR-T 細胞は臨床スケールで培養可能であることが分かった。

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 は抗体の認識する範囲よりも低発現の標的でも十分認識することが示され、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。

抗体を CAR に加工した場合に必要な条件については詳細には分かっていない。今回我々は 5 種類の Affinity の異なる CD20CAR を作成し、比較検討した。Affinity は一定以上の強さが必要であったが、Affinity と活性化の程度との相関は閾値のある反応曲線を描いた。今後さらに何種類かの細胞内ドメインにおいて、細胞内ドメインと Affinity との組み合わせにおいて、最適なものを検討していく。

CD20CAR 遺伝子導入 T 細胞の臨床スケールの培養を病院の細胞調製室で行う予定であったが、病院規則から出来なかった。その代替として実験室での拡大培養を行った。その結果として細胞調製は技術的には可能であることが確認できた。今後、CD20CAR の最適構造が決定し、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。新規 CD20CAR は CD20 低発現標的に対して有効であることが示唆された。

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.* 17(6): e385-390, 2013.
- 4) Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y; Donor/Source Working Group and HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia.* 27(2): 286-294, 2013.
- 5) Kuwatsuka Y, Kohno A, Terakura S, Saito S, Shimada K, Yasuda T, Inamoto Y, Miyamura K, Sawa M, Murata M, Karasuno T, Taniguchi S, Nagafuji K, Atsuta Y, Suzuki R, Fukumoto M, Naoe T, Morishita Y; Nagoya Blood and

Marrow Transplantation Group. Phase II study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy. *Cancer Sci.* 103(9):1688-1694, 2012.

- 6) Kato T, Terakura S, Murata M, Sugimoto K, Murase M, Iriyama C, Tomita A, Abe A, Suzuki M, Nishida T, Naoe T. Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. *Cell Immunol.* 276(1-2): 75-82, 2012.
- 7) Terakura S, Yamamoto TN, Gardner RA, Turtle CJ, Jensen MC, Riddell SR. Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells. *Blood.* 119(1): 72-82, 2012.

< 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
- 8) 寺倉精太郎, Yamamoto TN, Turtle CJ, Jensen MC, Riddell SR. セントラル・メモリー T 細胞由来、ウイルス特異的/CD19 特異的キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞の作成、第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会、金

沢、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
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

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
<u>Terakura S</u> , Nishida T, Inamoto Y, Ohashi H, <u>Naoe T</u> , <u>Murata M</u> .	Successful unrelated cord blood transplantation for adult acquired aplastic anemia using reduced intensity conditioning without ATG.	Immunol Lett.	In press	In press	2014
Imahashi N, <u>Terakura S</u> , <u>Murata M</u> , <u>Naoe T</u> , 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
Yasuda T, Suzuki R, Ishikawa Y, <u>Terakura S</u> , <u>Naoe T</u> , 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
Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, <u>Terakura S</u> , et al.	Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction.	Leukemia	27(2)	286-294	2013
Kuwatsuka Y, Kohno A, <u>Terakura S</u> , <u>Murata M</u> , <u>Naoe T</u> , et al.	Phase II study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy.	Cancer Sci.	103(9)	1688-1694	2012

Kato T, <u>Terakura S</u> , <u>Murata M</u> , <u>Naoe T</u> , et al.	Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation.	Cell Immunol.	276(1-2)	75-82	2012
<u>Terakura S</u> , et al.	Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells.	Blood	119(1)	72-82	2012