

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18459

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫に対するCD269抗原特異的遺伝子改変T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of CD269-CAR T cells for the adoptive immunotherapy of multiple myeloma.

研究代表者

内堀 亮介(Uchibori, Ryosuke)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20458285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は新規治療薬の臨床開発が進み治療成績も向上しつつあるが、満足できるとは言い難い。本研究では、多発性骨髄腫の克服に向けた中核となる新規治療法の開発を目指し、ヒトCD269特異的キメラ抗原受容体(CAR)発現T細胞を作製して担がんマウスの治療実験を行い、その治療有効性を検証した。ヒトCD269特異的抗体を産生するハイブリドーマの樹立に成功し、その抗体を元にCARを作製した。このCARは骨髄腫を含むCD269陽性の細胞に対して特異的にT細胞の活性化と細胞傷害活性を示した。骨髄腫モデルマウスの治療実験では、CAR-T細胞の投与によって腫瘍細胞が速やかに消失した。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) remains in most cases an incurable disease, and new therapeutic strategies are urgently required for radical cure or continued disease control. Our purpose of this study is to verify whether treatment with CD269-specific CAR-expressing T cells can eradicate myeloma cells from bone marrow of tumor-bearing NOG mice. Firstly, we uniquely developed monoclonal antibodies against human CD269. Next, we designed and verified novel CD269-specific CAR. CD269-CAR T cells showed redirected cytolysis toward CD269-positive U266 human MM-derived cells, but not CD269-negative K562 cells. Six weeks after tumor inoculation, we injected saline, non-CAR gene-modified T cells, or CAR gene-modified T cells (GMCs) into the cardiac chamber of tumor-bearing mice. In the group of GMC injection, U266 cells were dramatically eradicated from bone marrow. We conclude that adoptive transfer of CD269-CAR T cells could be a promising option for patients with MM.

研究分野：遺伝子細胞治療

キーワード：キメラ抗原受容体 CAR CD269 BCMA 多発性骨髄腫 養子免疫遺伝子細胞治療 細胞療法 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会の進展とともにがんの罹患率ならびに死亡率は益々増加傾向にある。多発性骨髄腫 (multiple myeloma) も高齢化社会の到来とともに増加傾向が認められてきており、新規治療薬の臨床開発が進み治療成績も向上しつつあるが、満足できるとは言い難い。造血幹細胞移植と大量化学療法の併用による治療においても一定の効果が認められているが、治療の適応が65歳以下に限られるといった制限がある。そこで、従来の治療法とはコンセプトが全く異なり、かつ全患者に施行可能な新しい治療法の開発が期待されている。

近年、遺伝子改変 T 細胞を用いた養子免疫遺伝子療法、特に腫瘍などの標的細胞を特異的に認識する抗体と T 細胞受容体 (T-cell receptor; TCR) のシグナルドメインを遺伝子工学的に結合したキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor; CAR) に注目が集まっている。特にヒト CD19 特異的 CAR を用いた臨床研究が盛んに行われており、高い治療有効性が認められている。したがって、骨髄腫細胞を標的とした CAR を用いることで、従来の治療には反応が乏しいような症例でも有効な治療法であると考えられ、再発・難治性の多発性骨髄腫の治療にも期待が持てる。しかし、ヒト骨髄腫細胞は一般的に CD19 陰性の細胞集団であるため、新たな標的抗原として骨髄腫細胞で特に強く発現しているが B 細胞系以外の細胞 (造血幹細胞も含む) には発現が認められていない CD269 (B 細胞成熟抗原 BCMA、TNFRSF17 としても知られる) に着目した。

本研究では、多発性骨髄腫の克服に向けた中核となる新規治療法の開発を目指し、ヒト CD269 特異的 CAR 発現 T リンパ球を作製して担がんマウスの治療実験を行い、その治療有効性を検証する。

2. 研究の目的

多発性骨髄腫は特に高齢者に発生する造血器腫瘍である。新規薬剤の登場により治療成績は向上しつつあるが、依然として治療困難な疾患である。したがって、化学療法等の従来の治療法とはコンセプトの異なる新しい治療法の開発が望まれている。本研究では、骨髄腫細胞を標的とするキメラ抗原受容体を発現するリンパ球を作製し、その治療有効性を担がんモデルマウスを用いて検証した。この治療方法は従来の治療とは腫瘍細胞の殺傷機序が異なるため、再発・難治性の多発性骨髄腫の克服を担う新規治療法の中核的存在になると期待される。

3. 研究の方法

1) CD269-CAR の機能解析:

ヒト CD269 特異的 CAR を搭載した一過

性のレトロウイルスベクター (VSV-G でシールドタイプ化) を作製した。これを PG13 細胞に遺伝子導入してシングルクローン化し、レトロウイルスベクターの安定産生株を樹立する。この PG13 細胞培養上清を用いて、健常人由来リンパ球に人 CD269 特異的 CAR を遺伝子導入した。CAR 発現リンパ球の作製には、より実用化を意識して、現在 CD19-CAR の臨床研究で使用されている OKT-3/Retronectin 法を採用し、これまでの臨床研究で得られている知見と整合性を図れるようにした。作製した CAR 発現リンパ球を、カルセインで蛍光標識した標的細胞 (U266、RPMI8226、K562-CD269、K562 を想定) と、*in vitro* において異なる E/T 比で共培養して細胞傷害活性を測定した。また、CAR を導入したリンパ球のサブセットを FACS で解析し、さらに活性化時の IFN- γ 、TNF- α などの産生を ELISA で確認した。

2) 骨髄腫モデルマウスの作製と病態の解析:

超免疫不全マウス (NOG マウス) にルシフェラーゼ遺伝子 (ELuc) で標識した 2×10^6 個骨髄腫細胞 (U266) を左心室に投与し、骨髄腫モデルマウスの作製方法を確立した。骨髄腫細胞移植後数週間で腫瘍の増殖に伴うさまざまな症状が観察されることが想定される。適切な時期 (骨髄腫細胞接種後 4~8 週) において組織学的検査を行い、骨髄 (胸骨を想定) を含めた各種臓器 (肝臓、脾臓、肺を想定) への浸潤の有無を確認した。また、骨吸収についても、大腿骨を用いて MMA 樹脂ブロック包埋非脱灰標本作製して V.Goldne 染色を行い、類骨量、骨梁、骨芽細胞数、破骨細胞数等の静的パラメータを測定する。さらに、左大腿骨を用いて三次元 μ CT 撮影による骨の構造解析を行った。

3) 骨髄腫モデルマウスの治療実験:

骨髄腫モデルマウスに CD269-CAR を発現するリンパ球を投与し、生体イメージング装置を用いて腫瘍の縮小を確認した。そして、適当なタイミングで主要な臓器 (現時点では採取が容易な胸骨を想定) を採取して、免疫染色や、ゲノム DNA を抽出してヒトゲノムの混入率の測定なども行った。腫瘍の残存は一般的に免疫染色等で確認されることが多いが、本研究ではマウス由来ゲノム DNA とヒト由来ゲノム DNA を区別して検出できる定量的 PCR を行うことで、より微小な残存腫瘍をも検出した (当研究室では既に、Prostaglandin E2 receptor を標的としたプライマーを用いて、マウスゲノムとヒトゲノム由来の増幅を高い特異性と感度で区別することができる検出系を構築している)。また、U266 細胞を移植した骨髄腫モデルマウスでは、腫瘍の増殖に伴って血中にヒト Ig λ が検出されるとの報告もあるため、血中ヒト Ig λ 量を評価した。さ

らに、治療介入のタイミングは手順□)において決定するが、原則として骨吸収や造血障害が観察された時点で開始するため、CD269-CAR 投与によって骨吸収や造血障害が改善されるか、骨の構造解析や血球数計測を行って確認した。さらに、治療マウスにおいては長期飼育を行って再発の有無について確認を行い、治療効果の持続性についても評価する。

4) CD269-CAR の実用化に向けた基礎検討：

本研究では、実用化に向けて今後必要となる課題を洗い出すために、骨髄腫患者から末梢血リンパ球と骨髄液を提供してもらい、健常者由来のリンパ球と比較して CAR 遺伝子の導入効率や増殖能、あるいは細胞傷害活性にどの程度違いがあるのかを *in vitro* および *in vivo* にて評価した。

4. 研究成果

1) CD269-CAR の機能解析：

ヒト CD269 リコンビナントタンパク質で免疫したマウスから、ヒト CD269 特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを 6 クローン樹立した。それぞれのハイブリドーマの抗体遺伝子情報を解析し、軽鎖-リンカー-重鎖、または重鎖-リンカー-軽鎖の順に連結した単鎖抗体遺伝子を作製した。リンカーには 15、18、20 アミノ酸配列を使用した。それぞれの単鎖抗体遺伝子にヒト CD28 の膜貫通領域と細胞内ドメイン、さらにヒト CD3 ζ の細胞内ドメインを連結した第二世代型 CAR を作製した。ハイブリドーマ 6 クローンから作製した計 36 個のコンストラクトのうち、標的細胞との反応性および T 細胞での発現効率が優れていた、軽鎖-18 アミノ酸リンカー-重鎖の順に連結した 3.3E クローンを CD269 特異的 CAR として以降の実験に使用した。

この CAR を遺伝子導入した健常者由来の T 細胞(CAR-T 細胞)は、骨髄腫細胞と CD269 を強制発現させた K562 細胞に対してのみ細胞傷害活性と IFN- γ の産生を認め、抗原特異的に反応を示した。

2) 骨髄腫モデルマウスの作製と病態の解析：

超免疫不全マウス(NOG マウス)に、ルシフェラーゼ遺伝子(ELuc)で標識した骨髄腫細胞(U266 または RPMI8226)を 2×10^6 個を左心室に投与した。腫瘍の生着および増殖を *in vivo* イメージング装置(IVIS)で経時的に観察すると、腫瘍細胞を移植してから 6 週間後には全身性の骨髄内で骨髄腫細胞が増殖し、安定的に骨髄腫モデルマウスを作製することができた。腫瘍細胞を移植してから 6 週間後の大腿骨の構造を解析すると、骨髄腫モデルマウスでは大腿骨内部は骨梁が破壊されるなど骨破壊が進行していた。しかし、大腿骨表面は正常なマウスと同様の構造を保っていた。また、血中の

Ig λ 量を測定すると、正常マウスでは未検出であったが、骨髄腫モデルマウスでは優位に増加していた。

3) 骨髄腫モデルマウスの治療実験：

腫瘍を移植してから 6 週間後の骨髄腫モデルマウスに、 1×10^6 個の CAR-T 細胞を投与した。IVIS での経時的観察で、CAR-T 細胞投与後 2 週間以内に骨髄腫細胞は消滅した。胸骨の免疫染色でも、未治療群および非遺伝子導入 T 細胞投与群では骨髄内が骨髄腫細胞で満たされていたが、CAR-T 細胞投与群では骨髄内に骨髄腫細胞は認められなかった。骨髄細胞から抽出した DNA を用いた PCR の検討結果では、ヒト由来細胞の存在は認められたが、腫瘍細胞の指標としたルシフェラーゼ遺伝子は増幅されなかったため、CAR-T 細胞を含むヒト T 細胞は骨髄内に存在するが、がん細胞は存在しないと結論づけた。また、ルシフェラーゼで標識した CAR-T 細胞の体内動態を骨髄腫モデルマウスでの体内動態を観察すると、がん細胞の存在する部位でのみ活性化し、腫瘍の消失とともに CAR-T 細胞も減弱または消失することがわかった。

骨病変に対する治療の影響を大腿骨の組織標本および μ CT で解析した。CAR-T 細胞を輸注した 3 週間後に行った解析では、骨髄内に腫瘍細胞は存在しないが、既に破壊されていた骨髄内の骨梁の修復は認められなかった。しかし、骨表面の解析では、未治療群および非遺伝子導入 T 細胞投与群では骨表面や骨頭の破壊が進行していたのに対して、CAR-T 細胞投与群では正常なマウスと同じ構造を保っていた。CAR-T 細胞の輸注により、骨病変の進行が抑制されたと考えられる。骨髄内骨病変の改善を観察するために長期飼育を試みたが、CAR-T 細胞輸注後 1 ヶ月で、ヒトの T 細胞をマウスに移植したことに伴う xenogenic GVHD が発症してしまった。

4) CD269-CAR の実用化に向けた基礎検討：

骨髄腫患者由来の T 細胞に CAR-T 遺伝子を導入して種々の解析を行った。健常者由来の T 細胞と比較すると細胞増殖効率や遺伝子導入効率は若干低いものの、CD269 陽性の細胞に対してのみ細胞傷害活性と IFN- γ の産生を認め、抗原特異的に反応を示した。また、骨髄腫モデルマウスに対しても、健常者のものと同等の治療効果を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. 内堀亮介, 小澤敬也. CAR-T cell(キメラ抗原受容体発現 T 細胞)Therapy. 医薬ジャーナル 54(1): 79-85, 2018.
2. 内堀亮介. 多発性骨髄腫に対する CAR-T 細胞療法の開発研究. 血液フロンティア 27(7): 49-56, 2017.
3. 内堀亮介. 多発性骨髄腫に対するキメ

ラ抗原受容体 T 細胞療法の可能性. 血液内科 74(3): 392-397, 2017.

4. 内堀亮介. キメラ抗原受容体を用いた養子免疫遺伝子療法. 医学のあゆみ 257(3): 239 -243, 2016.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Uchibori R. CAR-T therapy for multiple myeloma. The 23rd Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy. 岡山県岡山市, 2017 年 7 月 20 日.
2. 内堀 亮介. CD269 (BCMA) を標的とした多発性骨髄腫に対する CAR-T 療法. 第 23 回血液科学セミナー, 東京都港区, 2017 年 7 月 15 日.
3. Uchibori R, Ohmine K, Mineno J, Takesako K, and Ozawa K. CD269-CAR-T therapy for bone lesions in myeloma model mice. The 8th JSH International Symposium. 宮崎県宮崎市, 2017 年 5 月 19 日.
4. Uchibori R, Ohmine K, Sehara Y, Urabe M, Mizukami H, Mineno J, Takesako K, and Ozawa K. Effect of CAR-T therapy on bone lesions in an orthotopic multiple myeloma mouse model. 20th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. Washington D.C., USA. May 10, 2017.
5. 内堀 亮介. CAR-T 療法の基礎. 第 32 回悪性リンパ腫治療研究会, 東京中央区, 2017 年 4 月 15 日.
6. Uchibori R, Ohmine K, Urabe M, Saga Y, Mizukami H, Mineno J, Ozawa K. Therapeutic efficacy of CD269-specific CAR T cells in an orthotopic mouse model of multiple myeloma. 第 78 回日本血液学会学術集会. 神奈川県横浜市, 2016 年 10 月 14 日.
7. Uchibori R, Ohmine K, Urabe M, Mizukami H, Mineno J, and Ozawa K. Therapeutic efficacy of CD269-targeted CAR-modified T cells in an orthotopic mouse model of multiple myeloma. 第 75 回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜, 2016 年 10 月 8 日.
8. 内堀 亮介, 照屋 武志, 大嶺 謙, 峰野 純一, 小澤 敬也. 同所性多発性骨髄腫モデルマウスを用いた 269-CAR T 療法の有効性評価. 第 8 回血液疾患免疫療法学会, 北海道札幌市, 2016 年 9 月 3 日.
9. Uchibori R, Teruya T, Ohmine K, Urabe M, Saga Y, Mizukami H, Mineno J, Takesako K, Ozawa K. CD269-targeted CAR-modified T cells showed promising therapeutic efficacy in an orthotopic mouse model of multiple myeloma. The 22th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 東京都港区, 2016 年 7 月

28 日.

10. Uchibori R, Teruya T, Ohmine K, Mineno J, Takesako K, Ozawa K. Assessment of the efficacy and safety of CD269-specific CAR-expressing T cells using an orthotopic multiple myeloma mouse model. The 7th JSH International Symposium. May 13, 2016. 兵庫県淡路市.
11. Uchibori R, Ohmine K, Urabe M, Saga Y, Mizukami H, Mineno J, Ozawa K. CD269 (BCMA)-specific CAR-expressing T cells dramatically eradicate myeloma cells from bone marrow of an orthotopic multiple myeloma mouse model. 19th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. Washington D.C., USA, May 5, 2016.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内堀 亮介 (Uchibori, Ryosuke)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 20458285

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者 ()