

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17375

研究課題名（和文）成人T細胞白血病に対する複数抗原を標的とした新規T細胞療法の開発基盤

研究課題名（英文）Adoptive immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma with ex vivo expanded multi-tumor associated antigen specific cytotoxic T-cells

研究代表者

葉名尻 良（Hanajiri, Ryo）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40861810

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）：本研究は、成人T細胞白血病・リンパ腫をはじめとする難治性血液悪性腫瘍に対する、複数抗原を標的とした抗原特異的T細胞療法およびキメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞療法の治療効果を高めるために、標的抗原、細胞源、T細胞の代謝状態に着目し検討した。抗原としてオーバーラッピングペプチド、細胞源として臍帯血が養子免疫T細胞療法に利用可能であり、さらにT細胞の細胞内代謝状態を制御することにより、T細胞の機能向上に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養子免疫T細胞療法において、1) 抗原エピトープが不明な場合でもオーバーラッピングペプチドによる抗原特異的T細胞の作製が可能であること、2) 細胞源として成人と比較しより多くのナイーブT細胞が含まれる臍帯血が利用可能であること、3) T細胞の代謝制御による機能向上により、より高い抗腫瘍効果を発揮するT細胞製剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the target antigen, cell source, and metabolic state of T-cells to enhance the therapeutic efficacy of antigen-specific T-cell therapy targeting multiple antigens and chimeric antigen receptor gene transfer T-cell therapy for refractory hematologic malignancies including adult T-cell leukemia and lymphoma. It was suggested that overlapping peptides as antigens and umbilical cord blood as a cell source could be used for developing the adoptive immune T-cell product, and furthermore, manipulation of the intracellular metabolic state of T-cells could lead to improvement of T-cell function.

研究分野：血液内科学

キーワード：免疫療法 細胞療法 抗原特異的T細胞 HLA 臍帯血 キメラ抗原受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんに対する養子免疫療法は、がん特異的 T 細胞を体外で培養・増幅後に、患者に輸注し腫瘍細胞を攻撃させる治療法であるが、主に遺伝子改変 T 細胞療法 (TCR-T) とキメラ抗原受容体導入 T 細胞療法 (CAR-T) がある。TCR-T では、例えば成人 T 細胞白血病・リンパ腫での Tax 抗原のように、単一抗原を標的とした場合、標的抗原の発現低下・変異などによる免疫逃避が起こり、細胞療法の効果が減弱することが報告されている。また、CAR-T では、化学療法抵抗性となった再発難治性 B 細胞腫瘍に一定の臨床効果を認めているが、CAR-T 輸注後に完全寛解とならず、CD19 抗原が陽性にも関わらず CAR-T 療法に初回治療抵抗性を示す症例が少なからず存在することが臨床上的問題となっている。これらの問題を解決する方策として、標的抗原、細胞源、T 細胞の代謝状態のそれぞれに着目する必要がある。標的抗原については、複数抗原を標的とする T 細胞療法は、免疫逃避を引き起こし難いと考えられる。とくにオーバーラッピングペプチドを使用した方法では、理論的にはすべての HLA に対応可能であるため全ての患者が治療の対象となり、未知の T 細胞エピトープも含めた複数の抗原を標的となりうるため有効な方法である (Hanajiri et al. *Cytotherapy* 2019)。細胞源については、臍帯血に含まれる T 細胞は成人ドナーとは異なる新規の抗原エピトープを認識する可能性があり、免疫逃避を生じにくいと考えられ、また臍帯血は低い HLA 適合度が許容されるため、患者体内で拒絶されにくい可能性が報告されている (Hanley et al. *Sci Transl Med* 2015)。さらに、T 細胞代謝リプログラミングの違いを介して T 細胞機能を制御することにより、腫瘍微小環境で抗腫瘍活性を保持しつつ、より長期に生体内で生存可能な T 細胞療法を行うことが可能になると考えられる。したがって、養子免疫療法の治療成績を向上させるためには、T 細胞の標的抗原、細胞源、代謝状態の制御を適切に組み合わせることが必要である。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では、T 細胞の標的抗原、細胞源、代謝状態の制御を行うことにより T 細胞機能の向上に繋げることを目的とした。具体的には、以下の項目に沿って、研究を進めた。

- (1) ペプチド刺激による抗原特異的 T 細胞の誘導
- (2) 臍帯血を用いた CAR-T の誘導
- (3) CAR-T 細胞内代謝状態の解析

3. 研究の方法

- (1) ペプチド刺激による抗原特異的 T 細胞の誘導

HLA-A2 陽性の成人ドナー由来の末梢血単核球から磁気ビーズにて CD8 を単離した。HLA 陰性の白血病細胞株 K562 に HLA-A2 を発現させ、NY-ESO-1 または Tax 由来の HLA-A2 拘束性ペプチドを添加し、抗原提示細胞として用いた。IL-6, IL-7, IL-12, IL-15 添加下で共培養し、抗原提示細胞による刺激を週 1 回、合計 2 回繰り返した。刺激後の T 細胞の抗原特異性について、細胞内サイトカイン染色にて評価した。

- (2) ヒト T 細胞の培養・遺伝子導入

健常ドナー末梢血または臍帯血からフィコール法を用いて単核球を分離し、磁気ビーズにより CD8+リンパ球を単離した。抗 CD3/28 ビーズにて刺激後、レトロネクチンを用いたレトロウイルスベクター法により CD8+リンパ球へ、CD19 を標的とした CAR コンストラクトを遺伝子導入した。CAR 遺伝子は、クローン FMC63 由来の単鎖可変領域フラグメントに CD28、4-1BB、または CD79A/CD40 と CD3z の細胞内ドメインを連結した CAR を用いた。

- (3) 細胞外フラックスアナライザー

CAR-T の細胞内代謝を解析するために、CD19 抗原による週 1 回の繰り返し刺激を行い、1 週間後・3 週間後に、細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度 (OCR) を測定した。CD19 抗原刺激は放射線照射した腫瘍細胞株 NALM6 を用い、5:1 の比率で CAR-T と共培養した。基礎呼吸、ATP 産生、最大呼吸を計測することによりミトコンドリア機能を評価した。また解糖系への依存性を評価するために、乳酸産生をマーカーとした細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。

4. 研究成果

- (1) ペプチド刺激による抗原特異的 T 細胞の誘導

健常ドナー由来 T 細胞より腫瘍特異的 T 細胞の誘導を試みたところ、ペプチド刺激後に Tax 特異的 T 細胞を誘導することが可能であったが、NY-ESO-1 特異的 T 細胞を誘導することはできなかった。Tax は腫瘍特異的抗原であると同時に、ATL 細胞に感染している HTLV-I ウイルス抗原であるため、比較的容易に特異的 T 細胞が誘導可能であったと考えられた。一方、NY-ESO-1 に対する高親和性 T 細胞は胸腺で負の選択を経ていると考えられ、今回の方法では特異的 T 細胞を簡便に誘導することは困難であった。

(2) 臍帯血を用いた抗原特異的 T 細胞の誘導

臍帯血より単核球を分離し、CD8 リンパ球に単離後、CAR を遺伝子導入した。遺伝子導入効率を iEGFR をマーカーとして評価したところ、ヒト末梢血由来 CAR-T 作製時と同程度の遺伝子導入効率を得られた(図1)。また、CAR-T 導入後の細胞数は導入前の CD8 リンパ球数の 3.9 倍となっており、こちらは末梢血由来 CAR-T とくらべ、増殖能がやや劣っている傾向を認めた。次に臍帯血由来 CAR-T の炎症性サイトカイン産生能を評価するために、CD19-K562 と共培養し、細胞内サイトカイン染色をおこなった。臍帯血由来 CAR-T から IFN- γ の産生は認められたが、TNF- α および IL-2 の産生は非常に低値であった(図2)。また、IFN- γ 、IL-2 の産生能は、CD28 CAR-T が最も優れていた。これまでのヒト末梢血由来 CAR-T の検討では、4-1BB もしくは CD79A/CD40 を細胞内シグナル伝達ドメインにもつ CAR-T のサイトカイン産生能が優れており、臍帯血由来 CAR-T で観察された現象は臍帯血特有の可能性が考えられた。

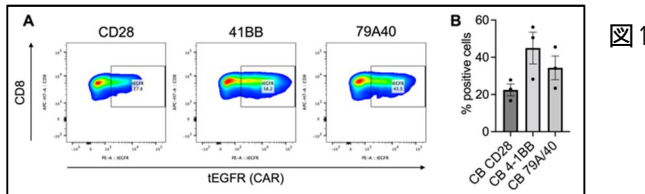


図1

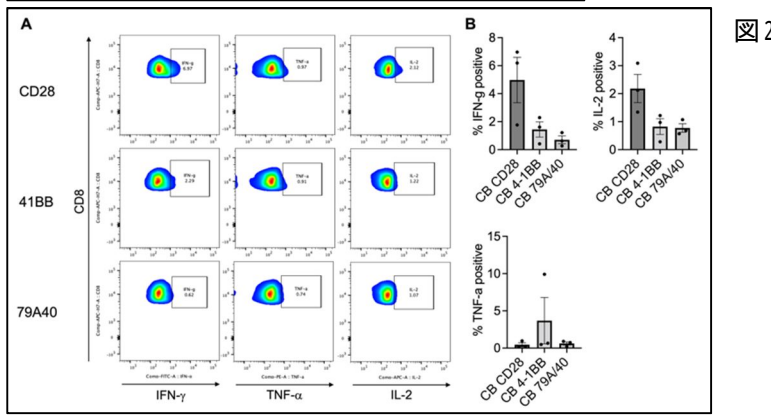


図2

(3) CAR-T 細胞内代謝状態の解析

細胞内シグナル伝達ドメインの違いによる T 細胞機能変化と細胞内代謝状態の変化のメカニズムを明らかにするために、CAR-T 細胞の遺伝子発現プロファイル RNA シークエンスにより網羅的に解析した。CAR-T 細胞を CD19 陽性白血病細胞である NALM6 で繰り返し刺激後、1 週間後および 3 週間後に CD8+CAR+ 分画をセルソーターで抽出し、RNA を採取した。クラスタリング解析および PCA 解析では、CD28 CAR-T は 4-1BB CAR-T および CD79A/CD40 CAR-T とは異なる遺伝子発現プロファイルを示す一方で、4-1BB CAR-T と CD79A/CD40 CAR-T とは似た遺伝子発現プロファイルを示した。DEG 解析において、 $q < 0.25$ とした場合、CD79A/CD40 vs 4-1BB、CD79A/CD40 vs CD28、4-1BB vs CD28 の比較において、遺伝子 X の発現低下を認めた。上記の結果に示されるように、4-1BB CAR-T と CD79A/CD40 CAR-T は細胞内代謝状態および遺伝子発現プロファイルが非常に類似していた。とくに長期の CD19 抗原繰り返し刺激後では、両者とも酸化リン酸化が亢進していた。さらに、遺伝子発現において、両者は CD28 CAR-T と比較し、遺伝子 X が高発現していることを見出した(図3)。本結果は暫定的な結果ではあるが、遺伝子 X は制御性 T 細胞で重要な遺伝子として知られており、この発現低下が抗腫瘍効果に有利に働く可能性が考えられた。しかしながら、CAR-T における遺伝子 X の役割は全くわかっておらず、今後は、遺伝子 X のノックアウトおよび強制発現実験を行うことにより、細胞内代謝状態を変化させ、より強力な抗腫瘍効果を発揮することができるか検討する予定である。

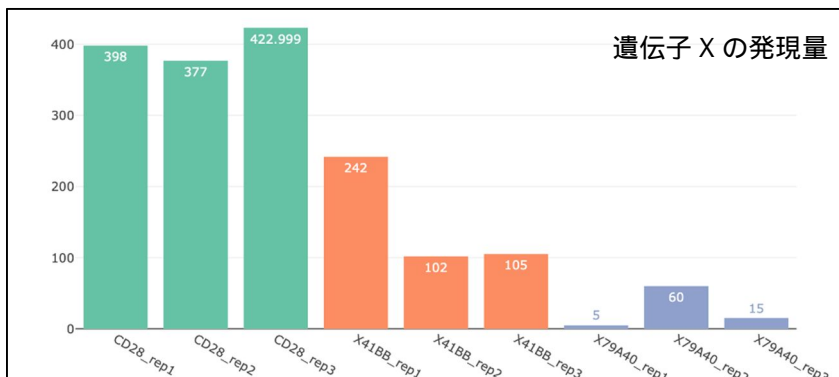


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Adachi Yoshitaka, Sakai Toshiyasu, Terakura Seitaro, Shiina Takashi, Suzuki Shingo, Hamana Hiroshi, Kishi Hiroyuki, Sasazuki Takehiko, Arase Hisashi, Hanajiri Ryo, Goto Tatsunori, Nishida Tetsuya, Murata Makoto, Kiyoi Hitoshi	4. 巻 115
2. 論文標題 Downregulation of HLA class II is associated with relapse after allogeneic stem cell transplantation and alters recognition by antigen-specific T cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 371 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03273-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Julamane Jakrawadee, Terakura Seitaro, Umemura Koji, Adachi Yoshitaka, Miyao Kotaro, Okuno Shingo, Takagi Erina, Sakai Toshiyasu, Koyama Daisuke, Goto Tatsunori, Hanajiri Ryo, Hudecek Michael, Steinberger Peter, Leitner Judith, Nishida Tetsuya, Murata Makoto, Kiyoi Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Composite CD79A/CD40 costimulatory endodomain enhances CD19CAR-T cell proliferation and survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2021.04.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jo T, Yoshihara S, Okuyama Y, Fujii K, Henzan T, Kahata K, Yamazaki R, Takeda W, Umezawa Y, Fukushima K, Ashida T, Yamada-Fujiwara M, Hanajiri R, Yonetani N, Tada Y, Shimura Y, Nishikii H, Shiba N, Mimura N, Ando J, Sato T, Nakashima Y, Ikemoto J, Iwaki K, Fujiwara SI, Ri M, Nagamura-Inoue T, Tanosaki R, Arai Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Risk factors for CAR-T cell manufacturing failure among DLBCL patients: A nationwide survey in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.18831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 葉名尻 良、古川 勝也、中島 麻梨絵、牛島 洋子、島田 和之、石川 裕一、寺倉 精太郎、村田 誠、清井 仁	4. 巻 64
2. 論文標題 Tisagenlecleucel治療を受けたびまん性大細胞型B細胞リンパ腫患者におけるCAR-Tの短期的な体内動態と治療成績	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 167 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.64.167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi N, Hanajiri R, Suzuki M, Anan C, Inagaki A, Kishida D, Ozawa S, Kohri S, Kamiya N, Sato M, Sato J	4. 巻 85
2. 論文標題 Myelodysplastic syndrome with trisomy 8 presenting periodic fever and multiple MEFV gene variants outside exon 10: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.85.1.195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 葉名尻 良, 川島 直実, 牛島 洋子, 島田 和之, 石川 裕一, 寺倉 精太郎, 西田 徹也, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 高IgE症候群に併発したDLBCLの化学療法中に膿瘍を合併するもドレナージ術にて安全に治療可能であった1例
3. 学会等名 第10回日本血液学会東海地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 慶高, 寺倉 精太郎, 奥野 友介, 佐藤 好隆, 尾崎 正英, 今井 奏衣, 梅村 晃史, 堺 寿保, 葉名尻 良, 西田 徹也, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR-Cas9 screening to identify the genes regulating human CAR-T cells proliferation
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 慶高, 奥野 真吾, 寺倉 精太郎, Julamane Jakrawadee, 堺 寿保, 宮尾 康太郎, 梅村 晃史, 村瀬 篤史, 島田 和之, 葉名尻 良, 西田 徹也, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 The optimal signal can be obtained by fine-tuning the spacer length of CD37CAR-T cells
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 慶高, 奥野 真吾, 寺倉 精太郎, Julamane Jakrawadee, 堺 寿保, 宮尾 康太郎, 村瀬 篤史, 尾崎 正英, 今井 奏衣, 梅村 晃史, 葉名尻 良, 島田 和之, 西田 徹也, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 CD37CAR-T細胞のスペーサーの長さを微調整することで最適なシグナルを得ることができる
3. 学会等名 第13回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葉名尻 良
2. 発表標題 造血幹細胞移植におけるHLA 抗体の臨床的意義
3. 学会等名 第4回東海北陸HLA研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葉名尻 良, 川島 直実, 牛島 洋子, 島田 和之, 石川 裕一, 寺倉 精太郎, 西田 徹也, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 高IgE症候群に併発したDLBCLの化学療法中に膿瘍を合併するもドレナージ術にて安全に治療可能であった1例
3. 学会等名 第10回日本血液学会東海地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葉名尻 良, 古川 勝也, 中島麻梨絵, 牛島 洋子, 島田 和之, 石川 裕一, 寺倉 精太郎, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 チサゲンレクルユーセル輸注後におけるCAR-Tの体内動態と治療成績の検討
3. 学会等名 第11回日本血液学会東海地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内 裕貴, 葉名尻 良, 牛島 洋子, 島田 和之, 石川 裕一, 後藤 尚絵, 寺倉 精太郎, 村田 誠, 富田 章裕, 清井 仁
2. 発表標題 CAR-T療法不応であったMCD type CD5陽性DLBCLに対してチラブルチニブが奏効した1例
3. 学会等名 第11回日本血液学会東海地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井 奏衣, 寺倉 精太郎, 奥野 真吾, 安達 慶高, 尾崎 正英, 竹内 裕貴, 梅村 晃史, 葉名尻 良, 島田 和之, 村田 誠, 清井 仁
2. 発表標題 Dual CAR-T cells targeting CD19 and CD37 is effective in target-antigen-loss B-cell tumor models
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------