

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700923

研究課題名（和文） 悪性 B リンパ腫に対する免疫遺伝子治療法の開発研究

研究課題名（英文） Development research on immuno-gene therapy for malignant B-cell lymphoma

研究代表者

塚原 智典（TSUKAHARA TOMONORI）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10362120

研究成果の概要（和文）：

難治性悪性 B リンパ腫（B 細胞性非ホジキンリンパ腫）に対する治療のため、CD19 抗原を認識するキメラ抗原受容体発現 T 細胞を用いた養子免疫遺伝子治療法の開発を試みた。その結果、これらの遺伝子改変 T 細胞が B リンパ腫細胞を効率よく殺傷することを試験管内および B リンパ腫移植マウスモデルで明らかにした。以上の結果から、遺伝子改変 T 細胞は、難治性 B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

For the treatment of refractory malignant B-cell lymphoma (B-cell non-Hodgkin lymphoma), we conducted experiments to develop an adoptive immuno-gene therapy using T-cells expressing a CAR (chimeric antigen receptor) targeting CD19. We demonstrated that genetically engineered T-cells efficiently lysed CD19-positive B-cell lymphoma in vitro and in a mouse xenograft model. These results indicate that functional engineered T-cells would be effective for the treatment of refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫、T 細胞、腫瘍標的化、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性 B リンパ腫（B 細胞性非ホジキンリンパ腫）は、世界的に増加傾向にある致死性の血液腫瘍である。近年の抗体医薬の導入より、悪性 B リンパ腫の治療成績は、改善

したが、未だ再発・難治例は少なくない。したがって、これらの難治例に対する根拠的な治療法の開発は重要課題である。

(2) 癌の標的化免疫療法として、生体で

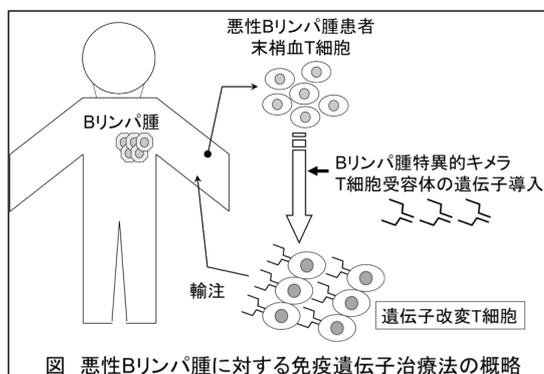
最も強力な抗腫瘍効果を発揮する T 細胞に着目し、遺伝子操作により腫瘍標的化能を付与した T 細胞を用いた新たな免疫遺伝子治療法の開発が欧米を中心に進められている。そこで、難治性悪性 B リンパ腫の臨床応用を目指し、これらの免疫遺伝子治療法の開発を計画した。

2. 研究の目的

難治性 B 細胞性非ホジキンリンパ腫の新たな治療戦略として、CD19 抗原を認識するキメラ抗原受容体を発現させた T 細胞を体外で大量に調整し体内に戻す養子免疫遺伝子治療法の開発研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

悪性 B リンパ腫に対する養子免疫遺伝子治療法（下図）の開発のため、以下の項目を検討した。



(1) 健常人末梢血 T 細胞へのキメラ抗原受容体遺伝子の導入：同意の得られた健常人から全血を採取し、末梢血 T 細胞を比重遠心法により分離した。これらの T 細胞を固層化した抗 CD3 抗体とレトロネクチンで活性化し、これらに CD19 特異的なキメラ抗原受容体（抗 CD19 単鎖抗体、CD28 と T 細胞受容体 CD3z のシグナルドメインから構成される）遺伝子を組換えレトロウイルスベクターを用いて導入した。

(2) キメラ抗原受容体導入 T 細胞の選択的増幅：遺伝子導入 T 細胞と放射線照射したヒト CD19 強制発現マウス繊維芽細胞 NIH3T3 (3T3-CD19) 細胞との共培養を行った。

(3) キメラ抗原受容体の発現：T 細胞表面のキメラ抗原受容体の発現は、抗 CD3 抗体と抗イムノグロブリン抗体による二重染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。細胞内のキメラ抗原受容体の発現は、抗 CD3z 抗体を用いたウエスタンブロットで確認した。

(4) 抗原特異的なサイトカイン産生：キメラ抗原受容体発現 T 細胞と 3T3-CD19 細胞を 48 時間培養後、培養上清中の IL-2 や IFN γ の産生量を ELISA で測定した。

(5) 遺伝子改変 T 細胞の細胞障害活性 *in vitro*：遺伝子改変 T 細胞（エフェクター）の CD19 陽性 B リンパ腫細胞株 (Raji および Daudi) (ターゲット) に対する細胞障害活性は、⁵¹Cr クロミウム遊離法により測定した。

(6) 遺伝子改変 T 細胞の抗腫瘍効果 *in vivo*：ルシフェラーゼで標識した Raji 細胞を免疫不全マウスに移植し、その後、遺伝子改変 T 細胞を投与した。遺伝子改変 T 細胞の抗腫瘍効果は、ルシフェリン投与後の腫瘍細胞由来の発光量を生体イメージング装置により解析し、評価を行った。

4. 研究成果

悪性 B リンパ腫に対する養子免疫遺伝子治療法の開発のため、基礎検討を行い、以下の研究結果を得た。

(1) CD19 特異的キメラ抗原受容体発現 T 細胞の作製および体外増幅法：レトロウイルスベクターによる末梢血 T 細胞へのキメラ抗原受容体遺伝子の導入効率をフローサイトメトリーで解析したところ、約 50% の導入効率が得られた。次に、これらの遺伝子改変 T 細胞を選択的に体外で増幅させるために、3T3-CD19 細胞による抗原刺激を行ったところ、遺伝子改変 T 細胞は 3~4 週間の培養で約 1000 倍まで増幅した。また、増幅した T 細胞上のキメラ抗原受容体の発現は、約 80% に到達した。

(2) 抗原特異的な遺伝子改変 T 細胞のサイトカイン産生：遺伝子改変 T 細胞は、抗原刺激前に比べて、抗原刺激後に有意に IL-2 および IFN γ を産生した。

(3) 遺伝子改変 T 細胞の細胞障害活性 *in vitro*：遺伝子改変 T 細胞は、エフェクター比の上昇に伴い、CD19 陽性 Raji および Daudi 細胞を効率良く殺傷した。一方、非遺伝子導入 T 細胞は、殺細胞効果をほとんど示さなかった。

(4) 遺伝子改変 T 細胞の抗腫瘍効果 *in vivo*：B リンパ腫移植マウスモデルの未治療群では、経時的に腫瘍増殖が認められたのに対して、遺伝子改変 T 細胞を投与した治療群では、腫瘍増殖抑制効果が生体イメージング解析により認められた。

今後の展望

今回の前臨床試験から、キメラ抗原受容体発現 T 細胞の抗腫瘍効果が試験管内およびマウスモデルで明らかになった。これらの遺伝子改変 T 細胞の抗腫瘍効果の増強を目的に、キメラ抗原受容体の他にサイトカイン IL-21 等を搭載した改良型も作製した。今後、その機能評価を行う予定である。これらの新規標的化免疫療法が、難治性 B リンパ腫の有効な治療として、応用されることを期待したい。

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 3 件)

① Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, and Ozawa K.: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther.* 2011 doi: 10.1038/gt.2011.183. [Epub ahead of print]、査読有

② 塚原智典: キメラ抗原受容体発現 T 細胞を用いた難治性 B 細胞腫瘍に対する養子免疫遺伝子療法. *医学のあゆみ* 237, 223-226, 2011. 査読無

③ 塚原智典: キメラ抗原受容体発現 T 細胞による癌に対する養子免疫遺伝子療法. *最新医学* 65, 1813-1818, 2010. 査読無

[学会発表] (計 5 件)

① Tsukahara, T., Ohmine, K., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Riviere, I., Sadelain, M., Brentjens, R. J., Ozawa K.: Engineered T lymphocytes expressing an anti-CD19 CAR specifically eradicate

B-lymphoma cells. Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Fukuoka, July 7, 2011.

② Tsukahara, T., Ohmine, K., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Validation of anti-tumor effects mediated by anti-CD19CAR T-cells for B cell lymphoma. XXIII Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Milano, Italy, October 23, 2010.

③ Tsukahara, T., Ohmine, K., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Cytotoxicity of primary T-lymphocytes expressing a chimeric antigen receptor targeting CD19 against B-cell lymphoma cells. Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, September 22, 2010.

④ 塚原 智典, 大嶺 謙, 内堀 亮介, 卜部 匡司, 水上 浩明, 久米 晃啓, 小澤 敬也 : B リンパ腫細胞に対する抗 CD19 キメラ抗原受容体発現 T 細胞の細胞障害活性. 造血器腫瘍免疫療法研究会, 松山, 2010 年 8 月 29 日

⑤ Tsukahara, T., Sakurai, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Riviere, I., Sadelain, M., Brentjens, R. J., Ozawa K.: Ex vivo expansion of primary T-lymphocytes expressing a chimeric antigen receptor targeting CD19 with antigen stimulation. Annual Meeting of Japan

Society of Gene Therapy, Utsunomiya,

July 1, 2010.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 智典 (TSUKAHARA TOMONORI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10362120

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。