

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591419

研究課題名(和文)オーロラAキナーゼを標的とした成人T細胞白血病に対する新たな包括的治療戦略

研究課題名(英文)Development of a novel comprehensive therapy targeting aurora kinase-A for adult T cell leukemia

研究代表者

東 太地 (Azuma, Taichi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10396252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性T細胞性腫瘍である成人T細胞白血病(ATL)に対する新たな細胞免疫療法の確立を目的に、新規治療標的抗原の探索と標的抗原を特異的に認識するT細胞受容体(TCR)遺伝子を高機能型TCR遺伝子導入ベクターを用いて導入した細胞傷害性ヒトTリンパ球(TCR-T細胞)を利用する細胞免疫療法の臨床応用を目指して研究を続けている。本研究において、Human Telomerase Reverse Transcriptase(hTERT)を治療標的抗原とする新たな細胞免疫療法可能性が示された。加えて、キメラ型受容体遺伝子改変T細胞を用いる新たな治療体系の技術的基盤を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, aiming at a development of novel adoptive immunotherapy against adult T-cell leukemia (ATL) which is one of the most treatment-refractory T-lymphoid malignancy, we newly demonstrated the clinical feasibility of adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase (hTERT) for the treatment of ATL, and also demonstrated the potential advantage of Aurora kinase-A (AURKA) as a novel therapeutic target for ATL. In addition, we started to extend our therapeutic strategy against ATL from that based on T-cell receptor gene-modified T-cell to newly designed chimeric receptor gene-modified T cell-based one.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血器腫瘍 細胞免疫療法

1. 研究開始当初の背景

日本人に好発するヒトTリンパ球向性レトロウイルス型(HTLV-1)感染に起因した成人T細胞性白血病(ATL)は、60歳以降に多発し、発症後1年以内に大部分の患者が死亡する治療抵抗性リンパ系悪性腫瘍である。現在も標準的治療は確立されておらず、年間1500名程度の患者が死亡している重要な疾患である。現在汎用されている治療法は、複数の抗がん剤を投与する多剤併用化学療法であるが、まだまだ十分な治療効果が得られていないのが現状である。一方で同種造血幹細胞移植治療法では30%程度のATL患者に10年に及ぶ長期寛解が得られることが報告されており、同種細胞免疫による抗腫瘍効果が存在し、重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。標準的な抗がん剤治療では難治性であるATLに対して、がん特異的抗原を利用した細胞免疫療法の開発が、今後の治療として必要であると考えられる。

2. 研究の目的

成人T細胞白血病(ATL)細胞に過剰発現して、「がん形質」の維持に重要な働きをしている新規「がん抗原タンパク質」であるHuman Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) および Aurora-A kinase (Aurora-A) を治療標的とした新たな細胞免疫療法の開発を目的とした。hTERT を特異的に認識して白血病細胞を傷害する遺伝子導入Tリンパ球による細胞免疫療法を応用した治療法の開発経口投与可能な Aurora-A 特異的分子標的薬と Aurora-A を特異的に認識して白血病細胞を傷害するTリンパ球(CTL) さらに Aurora-A 特異的CTLを誘導出来る活性をもつ Aurora-A 由来の9アミノ酸ペプチドからなるペプチドワクチンを持った細胞免疫療法を併用することで、患者への身体的負担がより少なく、それでいてなおかつ有効性が望める、全く新しい視点からの包括的治療戦略を、現代の難病であるATLに対して構築することを目的とする。

3. 研究の方法

ATLを標的とした臨床応用可能な細胞免疫療法研究開発:

HTLV-1ウイルス感染Tリンパ球の腫瘍化であるATL細胞を標的とする新たな細胞免疫療法の標的抗原候補として、我々は Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) と Aurora Kinase A (AURKA) を同定した。HLA-A*2402 拘束性に hTERT を認識する CTL クローン K3-1 から、HLA-A*0201 拘束性に AURKA を認識する CTL クローン AUR2 からそれぞれ T 細胞受容体遺伝子を単離し、臨床使用可能な GMP グレードのレトロウイルスベクターに組み込み、正常 T リンパ球、ATL 患者の場合、腫瘍細胞が CD4 陽性 T リンパ球であるため、正常 CD8 陽性 T リンパ球に遺伝子導入して作成した人工 CTL の抗 ATL 効果を、ATL 細胞株、患者 ATL 細胞を用いて、試験管内及び ATL 細胞を移植したヒト化マウスに対する治療モ

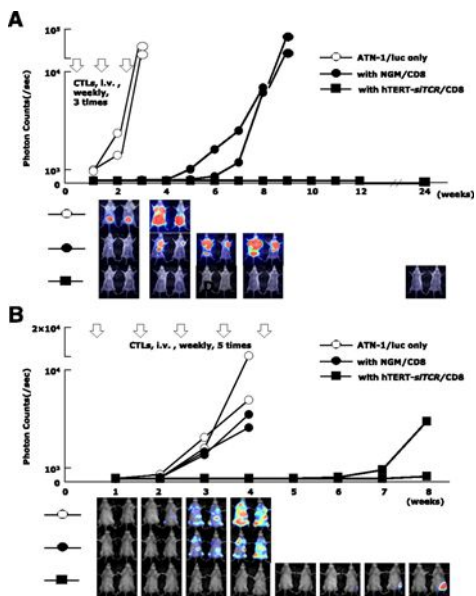
デルを作成して詳細に検討した。hTERT 特異的 TCR は、我々の共同開発である機能強化型 hTERT 特異的 TCR 遺伝子 (hTERT-siTCR) を導入して作成した機能改良型人工 CTL を用いて治療モデル実験等を行った。その人工 CTL の抗 ATL 効果の検討に際して、新に可視化するアッセイ系の開発も進めた。HLA-A*2402 陽性 hTERT 陽性 ATL 細胞株 ATN-1 にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株 ATN-1/luc を含めて複数のルシフェラーゼ遺伝子導入 ATL 及び HTLV-1 感染 T 細胞株を作成し、死細胞が赤に発色する系を新に構築して Time-lapse 法を用いて抗腫瘍効果の可視化と定量化を可能にした。さらにヒト化マウスを用いた治療実験においても、皮下接種マウス (リンパ腫モデル) での腋窩リンパ節への転移の様子や、静脈播種させたマウス (白血病型モデル) をそれぞれ作成し、より臨床病型に近いモデルを作成して、腫瘍細胞の動態と治療効果を可視化して検討した。

4. 研究成果

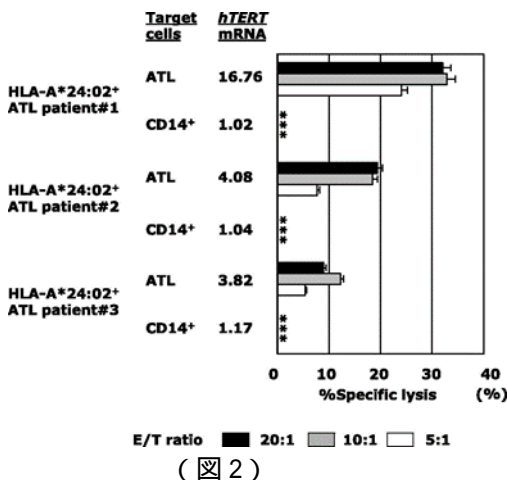
(1) hTERT を治療標的とする細胞免疫療法の開発: (論文発表 Blood, 2013)

HTLV-1 ウイルスがコードする転写活性因子 Tax が感染 T 細胞の hTERT mRNA の発現を亢進させると言う観察結果を基に、HTLV-1 感染細胞株、ATL 細胞株、患者 ATL 細胞が hTERT mRNA と hTERT タンパクを過剰発現していることを、それぞれ qRT-PCR 法と Western blot 法で確認し、さらに、HLA-A*2402 陽性 ATL 患者末梢血リンパ球中に、hTERT₄₆₁₋₄₆₉ ペプチド (YGFVRAQL) を HLA-A*2402 拘束性に認識する memory CTL が選択的に存在することを確認して、ATL 患者体内で実際に hTERT₄₆₁₋₄₆₉ ペプチドが抗原性を発揮している事実を明らかにした。次に、この hTERT₄₆₁₋₄₆₉ ペプチド特異的 CTL クローン K3-1 から TCR / 鎖全長を単離し遺伝子変換 (codon-optimization) を施して、遺伝子導入先の T 細胞の内因性 TCR 遺伝子を選択的に抑制する shRNA を組み込んだ GMP グレードの高機能型 TCR 発現ベクター (hTERT-siTCR) を開発し遺伝子導入して、健常者或いは ATL 患者 CD8 陽性 T 細胞を用いて抗 ATL 人工 CTL を作成した。健常者 CD8 から得られた hTERT 特異的 CTL は抗 ATL 効果を試験管内及び ATN-1/luc を静脈播種及び皮下接種させた NOG マウスに対して経静脈投与で抗腫瘍効果を示し、NOG マウスの生存期間を延長した (図 1)。さらに、抗がん剤治療を受けた患者末梢血 CD8 陽性 T 細胞を遺伝子改変して得られた人工 CTL は、患者自身の ATL 細胞に対して抗腫瘍効果を発揮した (図 2)。hTERT は増殖周期にある正常細胞でもその発現が亢進していることが知られているが、我々の hTERT 特異的 TCR の抗原親和性 (affinity) range では、PHA で活性化した正常 T リンパも、臍帯血 CD8 陽性 T 細胞を遺伝子改変した hTERT 特異的人工 CTL を、同じ臍帯血 CD34 陽性細胞 (造血前駆細胞) を複数のサイトカインで分裂・分化刺激を加えて

共培養しても、正常リンパ球・正常造血前駆細胞ともに傷害せず、臨床的に安全に使用できる可能性が示された。現在、臨床応用へ向けた準備を進めている。これらの結果の一部は、2013年ヨーロッパ造血細胞移植学会でも報告した。



(図1)



(図2)

(2) AURKAを治療標的とする細胞免疫療法の開発:

2012年に Nagai らが報告した HLA-A*0201 拘束性 AURKA₂₀₇₋₂₁₅ (YLILEYAPL) ペプチド特異的 CTL クローン AUR2 から単離された TCR 遺伝子 (Nagai K et al. Blood 2012) を、In-Fusion PCR 法を用いて、AURKA-siTCR ベクターを新たに作成した。このベクターを用いると遺伝子導入 T 細胞の 80%以上が、導入した TCR となり、遺伝子導入効率を著しく改善することに成功した。現在、この AURKA-siTCR ベクターで遺伝子改変した人工 CTL の標的抗原特異性、抗腫瘍効果を検討している (論文投稿予定)。HLA-A*0201 は日本人の 10%程度の頻度の為、ATL 患者細胞での検討の進みが遅いが、AURKA-siTCR ベクター作成に成功したことで、より抗腫瘍効果の高い人工 CTL の安定的作成

が可能となったことから、研究のスピードアップが期待出来る。

(3) 抗体療法と細胞免疫療法の融合を可能にする治療体系の基盤的技術開発:

ここ数年の ATL 治療における劇的な変化は、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) を利用した抗 CCR4 モノクローナル抗体 (mogamulizumab) の実臨床への導入である。我々は、この治療薬の臨床試験に参加して臨床的試験を行って来た。その中で、モノクローナル抗体の臨床的有効性を規定する一つの重要な因子として、モノクローナル抗体と結合して CD16 分子を介して ADCC 活性を発揮する患者体内のエフェクター細胞である Natural Killer (NK 細胞) を始めとする CD16 陽性細胞群の抗がん剤治療に続発する減少があることに気付いた。そこで、我々の共同研究グループの Ochi らが開発した人工 ADCC エフェクター細胞であるキメラ型 CD16 受容体遺伝子導入 T 細胞 (cCD16z-T 細胞) (Ochi F et al. Cancer Immunology Research 2014) を用いて mogamulizumab の臨床的有効性の改善が得られるのではないかと仮定して、現在、検討を進めている。cCD16z-T 細胞は、ADCC 活性を利用する治療体系 (がんに対するモノクローナル抗体療法) において、NK 細胞の代替として利用できるデータを得て、論文化を進めている。

(4) その他の業績: 我々は、2013年7月以降、HLA-A*2402 拘束性 WT1-siTCR-T 細胞を用いて急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群を治療する細胞免疫療法の多施設共同臨床試験を開始した。この臨床試験に付随して、WT1 特異的 TCR 遺伝子改変 T 細胞を用いる細胞免疫療法において、同様に遺伝子改変して得られる CD4 陽性 T 細胞の意義を詳細に検討した。その結果、様々な機序を介して、この遺伝子改変 T 細胞を用いる細胞免疫療法の有効性を高めることを確認して、昨年アメリカ血液学会で発表した。現在、論文投稿中である。

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)

- Shikata H, Yakushijin Y, Yamanouchi J, Azuma T, Yasukawa M. Analysis of chemotherapy-induced neutropenia and optimal timing for prophylactic use of G-CSF in B-cell non-Hodgkin lymphoma patients treated with R-CHOP. Int J Clin Oncol. 19(1):178-85. 2014 査読有
- Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for

- adult T-cell leukemia.
Blood.121(24):4894-901. 2013 査読有
3. Shikata H, Yakushijin Y, Matsushita N, Sakai A, Sugita A, Nakamura N, Yamanouchi J, Azuma T, Hato T, Yasukawa M. Role of activation-induced cytidine deaminase in the progression of follicular lymphoma. Cancer Sci.103(3):415-21. 2012 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. Fujiwara H, Azuma T, Yasukawa M, et al. Co-Administration of Gene-Modified CD4⁺ T Cells Targeting HLA Class I-Restricted WT1 Epitope Diversely Enhances The Antitumor Effect Mediated By Redirected T-Cell Based Adoptive Immunotherapy Against Human Leukemia. 55th American Society of Hematology, Annual meeting and Exposition. New Orleans, LA, USA, December 8th, 2013
2. Fujiwara H, Azuma T, Yasukawa M, et al. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-cell receptor gene transfer redirects T cells to display an effective antitumor reactivity against adult T-cell leukemia. 39th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. London, UK, April 8th, 2013

〔図書〕(計2件)

1. 東 太地, 安川 正貴 「多発性骨髄腫」高齡者総合診療ノート 375-381 頁 日本医事新報社 2014
2. 東 太地, 安川 正貴 「組織球・樹状細胞の異常と血球貪食症候群」カラーテキスト血液病学(第2版) 590-595 頁 中外医学社 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 太地 (Azuma, Taichi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10396252

(2)研究分担者

(3)連携研究者

安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60127917