

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591533

研究課題名(和文) 進行性神経芽腫に対するGD2特異的キメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変T細胞療法

研究課題名(英文) GD2-specific chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy against advanced neuroblastoma

研究代表者

中沢 洋三 (NAKAZAWA, Yozo)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：60397312

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)：PiggyBacトランスポゾン技術とヌクレオフェクション技術を用いてキメラ抗原受容体(CAR)を非ウイルス的に簡便且つ安全にT細胞に導入し、その遺伝子改変T細胞を無血清培地内で効率良く大量増幅することに成功した。

GD2特異的CAR-T細胞は、in vitroでGD2陽性腫瘍株(神経芽腫、網膜芽細胞腫、髄芽腫、膠芽腫)に対して様々な程度で細胞死を誘導した。さらに、薬物Aの添加によってCAR-T細胞の抗腫瘍効果は飛躍的に増強した。

非ウイルス遺伝子導入法の簡便性、安全性、経済性も考慮して、トランスポゾン遺伝子改変GD2特異的T細胞療法は、小児神経原性腫瘍に対する新たな治療法となりうる。

研究成果の概要(英文)：We successfully generated chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells using piggyBac transposon and nucleofection systems, and efficiently expanded the CAR-T cells using a serum-free culture system.

GD2-specific CAR-T cells induced in vitro cell death to various extents against GD2-positive tumor cell lines (neuroblastoma, retinoblastoma, medulloblastoma, and glioblastoma). Additionally, addition of the agent A markedly increased the anti-tumor ability.

Considering the simplicity, safety, and cost-benefit of non-viral gene modification, piggyBac transposon-based GD2-specific T-cell therapy may be a novel therapeutic option against pediatric neurogenic tumors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：キメラ抗原受容体 トランスポゾン GD2 小児がん がん免疫療法 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は最も難治性の高い小児がんの一つで、MYCN 遺伝子増幅例や遠隔転移例などの高リスク群に対しては手術、化学療法、放射線療法、造血幹細胞移植を組み合わせた集学的治療が行われているが、その予後は最近10年間ほとんど改善されていない。

近年、難治性がんに対する抗原特異的免疫療法が注目されているが、がん細胞の有する腫瘍免疫回避機構のため期待されるほどの効果は得られていない。2008年に米国から進行性神経芽腫に対するGD2特異的キメラ抗原受容体(GD2.CAR)を用いた遺伝子改変T細胞療法の優れた臨床成績が報告された。しかし、その遺伝子導入にレトロウイルスベクターが使用されており安全面で課題を残した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗腫瘍効果の高いGD2.CAR治療と非ウイルス遺伝子改変技術piggyBacトランスポゾン法を組み合わせた、進行性神経芽腫に対する有効性と安全性の高い遺伝子改変T細胞療法の開発を開発することであった。

3. 研究の方法

(1) 健康成人の末梢血10mlより単核球を分離し、piggyBacトランスポゾンシステム(DNAプラスミド遺伝子導入法)と4Dnucleofectorシステムを併用して、非ウイルス的にCAR遺伝子をT細胞に導入した。続いて、遺伝子導入T細胞をインターロイキン(IL)-15添加無血清培地内で3週間拡大培養した。途中で1回CARに対する時期ピーズセレクションを行った。本培養系に、動物由来材料、非自己材料、腫瘍細胞株、ウイルス感染細胞は用いなかった。

(2) 培養3週後に得られた細胞(CAR-T細胞)の表面マーカーおよびCAR蛋白の発現をフローサイトメトリー法で解析した。

(3) 神経原性腫瘍細胞株、神経芽腫1株、

網膜芽細胞腫2株、髄芽腫2株、膠芽腫1株におけるGD2糖脂質の発現頻度・強度をフローサイトメトリー法で解析した。

(4) GD2.CAR-T細胞の抗腫瘍効果を評価するために、CAR-T細胞とGD2陽性腫瘍株を1:2の比で、サイトカイン非添加条件で混合培養した。培養1週間後にT細胞とGD2陽性腫瘍細胞比をフローサイトメトリー法で解析した。

(5)(4)の混合培養条件に、薬剤Aを添加し、CAR-T細胞の抗腫瘍効果に与える影響を評価した。

4. 研究成果

米国の臨床試験では、T細胞へのキメラ抗原受容体(CAR)の導入にはレトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターが用いられている。また、CAR遺伝子改変T細胞の体外増幅には通常、動物血清や腫瘍細胞株が用いられる。それに対し、本研究ではpiggyBacトランスポゾン技術とヌクレオフェクション技術を併用することによって、CAR遺伝子を非ウイルス的に簡便且つ安全にT細胞に導入する方法を確立した。末梢血10mlから分離された単核球は、非ウイルス的に遺伝子改変され、IL-15を含有する無血清培地を用いて培養開始3週間後に 1.3×10^8 まで増幅した。増幅された細胞は99%以上CD3陽性であった(CD4⁺, 25.4%; CD8⁺, 71.3%)。その約80%は、近年T memory stem cellsに近いとされるCD45RAおよびCCR7を共発現していた。また、全体の約40%の細胞表面にCARの発現が認められた。

体外増幅されたGD2特異的CAR-T細胞は、GD2陽性腫瘍株との混合培養において、様々な程度でGD2陽性腫瘍細胞に細胞死を誘導した。一部の細胞株では、GD2特異的CAR-T細胞に対する抵抗性が認められたが、混合培養の培地中に薬剤Aを添加することによって、GD2特異的CAR-T細胞の抗腫瘍効果は飛躍的

に増強した。

以上の結果および非ウイルス遺伝子導入技術の簡便性、安全性、および経済性も考慮して、*piggyBac* トランスポゾン遺伝子改変 GD2 特異的 T 細胞療法は、難治性神経原性小児がんに対する新たな治療法になる可能性が示唆された。今後、細胞製剤化を目指した前臨床試験に取り組みたい。

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 1 件)

Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, Maeda Y, Sato Y, Okabe S, Inukai T, Sugita K, Wilson MH, Rooney CM, and Koike K. Anti-leukemic potency of *piggyBac*-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014 in press. 査読あり

[学会発表](計 9 件)

Yoza Nakazawa

PiggyBac Transposon-Mediated Cancer Immunotherapy.

第 17 回日米細胞・遺伝子治療会議 . 2014 年 3 月 6 日、ワシントン DC .

末木茜、中沢洋三、松田和之、小池健一
神経芽腫における新規糖脂質抗原の同定 .

第 55 回日本小児血液・がん学会総会 . 2013 年 11 月 29 日 12 月 1 日、福岡 .

中沢洋三、末木茜、松田和之、坂下一夫、
小池健一

若年性骨髄単球性白血病に対する GM-CSF 受容体を標的とした遺伝子改変 T 細胞療法の開発 .

第 55 回日本小児血液・がん学会総会 . 2013 年 11 月 29 日 12 月 1 日、福岡 .

中沢洋三

進行性神経芽腫に対するキメラ抗原受容体

を用いた遺伝子改変 T 細胞療法 .

第 54 回日本小児血液・がん学会総会 . 2012 年 11 月 30 日 12 月 2 日、横浜 .

平林耕一、中沢洋三、齋藤章治、松田和之、金兼弘和、小池健一

網膜芽細胞腫に対する *piggyBac* トランスポゾン遺伝子改変 GD2 特異的 T 細胞療法の開発 .
第 54 回日本小児血液・がん学会総会 . 2012 年 11 月 30 日 12 月 2 日、横浜 .

齋藤章治、中沢洋三、田中美幸、柳沢龍、松田和之、前田裕弘、犬飼岳史、杉田完爾、小池健一

薬剤耐性 Ph 陽性急性リンパ性白血病に対する *piggyBac* トランスポゾン遺伝子改変 CD19 特異的 T 細胞療法の開発 .

第 54 回日本小児血液・がん学会総会 . 2012 年 11 月 30 日 12 月 2 日、横浜 .

Nakazawa Y, Saito S, Tanaka M, Koike K. CD19-specific T-cell therapy for drug-resistant Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia using *piggyBac* transposons.

第 18 回日本遺伝子治療学会総会 . 2012 年 6 月 28 30 日、熊本 .

Saito S, Nakazawa Y, Tanaka M, Yanagisawa R, Maeda Y, Inukai T, Sugita K, Wilson MH, Rooney CM, Koike K. CD19-specific T-cell therapy for refractory

Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia using *PiggyBac* transposon-based gene modification and low autoserum-containing, but xeno-free and tumor cell line-free culture system. 15th American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting. May 15-19, 2012, Philadelphia.

中沢洋三

キメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変 T 細胞療法

第 34 回日本造血細胞移植学会総会 . 2012 年

2 月 24 日 25 日、大阪

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 洋三 (NAKAZAWA, Yozo)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 60397312

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :