

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390245

研究課題名(和文) 白血病幹細胞根絶を目指した人工CTLによる新規免疫遺伝子治療の開発研究

研究課題名(英文) Development of the novel gene-immunotherapy using artificial CTL targeting leukemia stem cells

研究代表者

安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60127917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：WT1特異的TCR発現ベクターを用いて作製したWT1-TCR-T細胞を養子免疫することによって、白血病細胞の増殖を抑制した。さらに、ヒト化マウス実験系によって、ヒト白血病幹細胞を排除できる可能性が示唆された。WT1-TCRをヒト造血幹細胞に遺伝子導入し、HLA-A24-TG-NSGマウスに移植したところ、白血病細胞に対するCTLが分化増殖することが示された。他方、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現ベクターを作製し、抗体療法との併用による新規がん免疫細胞療法を開発した。CD16-CD3⁺-T細胞は、高いADCC活性を呈することがin vitroならびにin vivo実験系で示された。

研究成果の概要(英文)：We performed the series of experiment in order to establish the novel gene-immunotherapy targeting leukemia stem cells. WT1-TCR-gene-transduced CTLs exerted cytotoxicity against leukemia cells but not normal cells. It was strongly suggested that leukemia stem cells might be eliminated completely by administration of WT1-TCR gene-modified T cells. WT1-specific and HLA-restricted CTLs could be generated in HLA-TG-NSG mice by transplantation of WT1-TCR gene-transduced human hematopoietic stem cells. CD16-CD3⁺ chimeric antigen receptor gene-modified CD8⁺ T cells showed strong ADCC activity in the presence of anti-CD20 monoclonal antibody targeting malignant lymphoma cells. These data strongly suggest that immunotherapy using gene-modified CTLs can establish the cure of chemotherapy-resistant hematological malignancies.

研究分野：血液学、感染症学、腫瘍免疫学、細胞治療

キーワード：白血病 がん免疫療法 細胞傷害性T細胞 T細胞レセプター 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な基礎的研究や造血幹細胞移植療法における臨床的研究などから、免疫監視機構が悪性腫瘍の発症ならびに進展の阻止に重要であることが明らかにされつつある。このような背景のもと、がんに対する免疫療法の開発が進んでいる。最近、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント制御抗体の抗腫瘍効果が明らかにされ、がん治療は新たな時代を迎えようとしている。また、CAR-T細胞やT細胞レセプター(TCR)遺伝子改変T細胞などの免疫遺伝子治療の開発によって難治性悪性腫瘍の治療成績が大きく改善されようとしている。このように、新規がん免疫療法は化学療法抵抗性の難治性白血病に対してもブレークスルーを期待できる治療法と言える。

2. 研究の目的

我々の研究グループはこれまでの研究成果をもとに、現在、白血病幹細胞を標的とした、「治癒を目指す真の免疫療法」の開発を行っている。本研究では、in vitro ならびに白血病ヒト化マウスを用いた in vivo 実験系によって、白血病特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が、化学療法抵抗性白血病幹細胞を体内から完全に排除でき、化学療法後一時的寛解に留まらず、治癒に導けることを直接的に証明することを目的とした。また、現在広く用いられているがん抗体療法の治療効果を改善する目的で、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)効果を有する遺伝子改変T細胞を作製し、抗体療法との併用による抗腫瘍効果を検証することを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) WT1 特異的 TCR 遺伝子導入によるがん免疫療法の開発 :

WT1 特異的 HLA-A24 拘束性 CTL クローンから TCR 遺伝子を単離し、タカラバイオ株式会社との共同研究によって開発した内源性 TCR 発現を抑制する新規レトロウイルスベクターに組み込み、新規レトロウイルスベクターを構築した。この TCR ベクターを末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、(WT1-TCR-T 細胞)その免疫学的機能と抗腫瘍効果を解析した。白血病患者骨髄から分離したヒト白血病細胞を免疫不全 NOG マウスに移植し、ヒト化白血病モデルマウスを作製した。このヒト化白血病マウスに WT1-TCR-T 細胞を移入し、白血病細胞の増殖抑制効果を観察した。

(2) 造血幹細胞への TCR 遺伝子導入による新規造血幹細胞移植の開発 :

WT1-TCR 遺伝子を臍帯血から純化したヒト CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子導入した。この WT1-TCR 遺伝子導入造血幹細胞を、理化学研究所石川文彦博士との共同で開発した HLA-A24 トランスジェニック NSG マウスに移植した。その後、継時的にマウス体内で分化

するヒト T 細胞の形質を検討した。さらに、HLA-A24 拘束性 WT1 特異的免疫応答と抗白血病機能を検討した。

(3) CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子改変 T 細胞を用いたがん免疫療法の開発 :

生体内で ADCC 機能は、CD16 を発現している NK 細胞のみが担っている。そこで、活性化 CD8 陽性 T 細胞に CD3 シグナルドメインを結合した CD16 遺伝子を導入し、T 細胞に ADCC 活性を獲得させることを試みた。まず、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現ベクターを作製し、末梢血 CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入した。この CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子改変 T 細胞の ADCC 活性を様々な抗体を添加して確認した。さらに、ヒト B 細胞性悪性リンパ腫細胞を NOG マウスに移植した後、rituximab (抗 CD20 抗体)と CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子改変 T 細胞を同時投与し、単独投与との抗腫瘍効果を観察した。

4. 研究成果

(1) WT1 特異的 TCR 遺伝子導入によるがん免疫療法の開発 :

末梢血 T 細胞に遺伝子導入したところ、WT1-TCR-T 細胞は元の CTL クローン同様、HLA-A24 拘束性に白血病細胞を殺傷することが in vitro 実験系で確認された。次に、ヒト白血病細胞移植ヒト化マウスの実験系を用いて検討したところ、WT1-TCR-T 細胞を養子免疫することによって、ヒト白血病細胞の増殖を著明に抑制した。さらに、ヒト化マウス継代実験によって、ヒト白血病幹細胞を排除できる可能性が示唆された(図1)。また、WT1-TCR 発現 CD4 陽性 T 細胞の機能解析を行ったところ、WT1 抗原刺激によって Th1 タイプのサイトカインを産生することが示された。さらに、WT1-TCR 発現 CD4 陽性 T 細胞は WT1-TCR-CD8 陽性 CTL の細胞傷害性を増強させ、白血病細胞へのトラフィッキングを誘導することが示された。遺伝子導入 T 細胞は Aurora-A kinase 発現白血病細胞を HLA 拘束性に殺傷した。これらの結果から、腫瘍特異的 TCR 遺伝子導入による免疫遺伝子治療の抗腫瘍効果が確認された。他方、難治性白血病と骨髄異形成症候群に対する WT1 特異的 TCR 遺伝子治療第 相臨床試験を開始し、これまでに 3 例実施した。重篤な有害事象は認めていない。

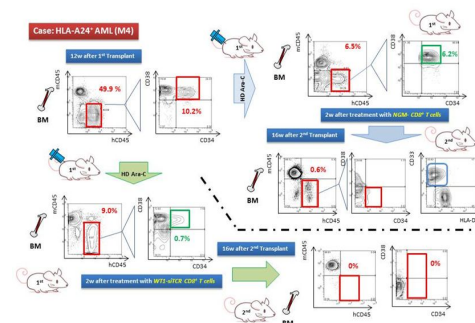


図 1 . WT1-TCR 遺伝子改変 T 細胞輸注による白血球幹細胞排除の可能性

(2) 造血幹細胞への TCR 遺伝子導入による新規造血幹細胞移植の開発：
 現在世界的に広く実施されている白血病に対する同種造血幹細胞は、抗白血病効果が Graft-versus-host disease (GVHD) に依存しており、しばしば重篤な GVHD を来すことが問題となっている。この課題を克服し、GVHD に依存しなく Graft-versus-leukemia (GVL) 効果のみ期待できる新規造血幹細胞移植療法を開発する目的で研究を遂行した。つまり、WT1-TCR 遺伝子を臍帯血から純化したヒト CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子導入し、理化学研究所石川文彦博士との共同で開発した HLA トランスジェニック NSG マウスに移植した。その後、継時的にマウス体内で分化するヒト T 細胞の形質と機能を検討した。その結果、WT1 特異的 TCR 遺伝子をヒト造血幹細胞に遺伝子導入することで、WT1 特異的 HLA-A24 拘束性 CTL がマウス体内で分化増殖することが示された (図 2)。

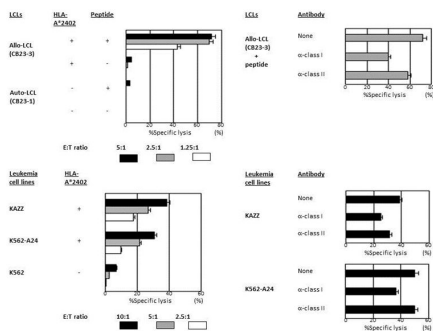


図 2 . WT1-TCR 遺伝子導入造血幹細胞移植による白血病特異的 CTL のマウス体内での分化・増殖

(3) CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子改変 T 細胞を用いたがん免疫療法の開発：
 まず、6-CD3 キメラレセプター遺伝子発現レトロウイルスベクターを構築した (図 3)。次に、D16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現レトロウイルスベクターを末梢血 CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入し、その機能を解析した。その結果、CD20 陽性悪性リンパ腫細胞ならびに Her2/neu 陽性乳がん細胞に対して、それぞれ rituximab (抗 CD20 抗体) および trastuzumab (抗 Her2 抗体) 添加時に高い ADCC 活性を呈することが明らかとなった (図 4)。さらに、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現 CD8 陽性 T 細胞の抗体添加時の in vivo 抗腫瘍活性を検討した。CD20 陽性 B 細胞性悪性リンパ腫細胞株を NOG マウスに移植し後、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞および抗 CD20 抗体を様々な組み合わせで投与し、in vivo における抗腫瘍活

性を検討した。その結果、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞と抗 CD20 抗体を同時投与した際にのみ、高い抗腫瘍活性が認められた (図 5)。以上の結果から、当初の計画どおり、CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現レトロウイルスベクターを構築し、CD16-CD3 キメラレセプター発現レトロウイルスベクター遺伝子導入 T 細胞の抗腫瘍活性を in vitro ならびにヒト腫瘍移植ヒト化マウスモデルを用いて in vivo で証明できた。



図 3 . CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子発現レトロウイルスベクター

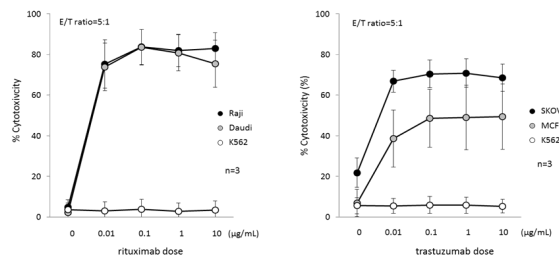


図 4 . CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞の ADCC 活性

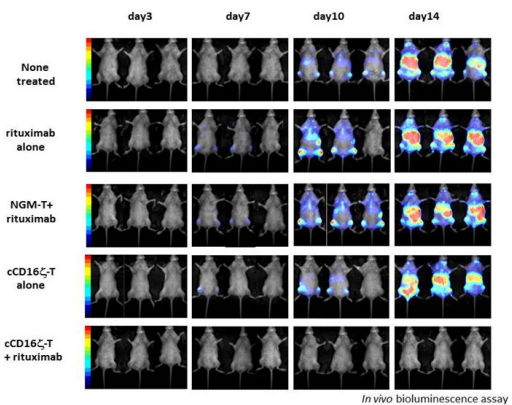


図 5 . CD16-CD3 キメラレセプター遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞と抗 CD20 抗体同時投与による抗 B 細胞性悪性リンパ腫効果

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 24 件)

1. Fujiwara H, Ochi T, Ochi F, Miyazaki Y, Asai H, Narita M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, and

- Yasukawa M.: Antileukemia multifunctionality of CD4+ T cells genetically engineered by HLA class I-restricted and WT1-specific T-cell receptor gene transfer. *Leukemia in press.* (査読有)
2. 安川正貴 免疫チェックポイントのコントロールだけで造血器腫瘍を治療できるか 内科 印刷中 (査読無)
 3. 安川正貴 急性骨髄性白血病をめぐる最近の話題 免疫療法 Hematology Agora 印刷中 (査読無)
 4. Rowan AG, Suemori K, Fujiwara H, Yasukawa M, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham C.: Cytotoxic T lymphocyte lysis of HTLV-1 infected cells is limited by weak HBZ protein expression, but non-specifically enhanced on induction of Tax expression. *Retrovirology* 11:116, 2014. (査読有)
 5. Ochi, F., Fujiwara, H., Tanimoto, K., Asai, H., Miyazaki, Y., Okamoto, S., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Barrett, J., Ishii, E. and Yasukawa, M.: Gene-modified human α/β -T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res.* 2:249-262, 2014. (査読有)
 6. Ohkubo N, Matsubara E, Yamanouchi J, Akazawa R, Aoto M, Suzuki Y, Sakai I, Abe T, Kiyonari H, Matsuda S, Yasukawa M, Mitsuda N.: Abnormal behaviors and developmental disorder of hippocampus in zinc finger protein 521 (ZFP521) mutant mice. *PLoS One* 9:e92848, 2014. (査読有)
 7. Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M.: Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7:3, 2014. (査読有)
 8. Ohkubo N, Suzuki Y, Aoto M, Yamanouchi J, Hirakawa S, Yasukawa M, and Mitsuda N.: Accelerated destruction of erythrocytes in Tie2 promoter-driven STAT3 conditional knockout mice. *Life Sci.* 93:380-387, 2013. (査読有)
 9. Matsumoto T, Hasegawa H, Onishi S, Ishizaki J, Suemori K, and Yasukawa M.: Protein kinase C inhibitor generates stable human tolerogenic dendritic cells. *J Immunol.* 191:2247-2257, 2013. (査読有)
 10. Nagai K, Ochi F, Terui K, Maeda M, Ohga S, Kanegane H, Kitoh T, Kogawa K, Suzuki N, Ohta S, Ishida Y, Okamura T, Wakiguchi H, Yasukawa M, and Ishii E.: Clinical characteristics and outcomes of Chédiak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. *Pediatr Blood Cancer* 60:1582-1586, 2013. (査読有)
 11. Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, and Yasukawa M.: Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood* 121:4894-4901, 2013. (査読有)
 12. Iwami K, Natsume A, Ohno M, Ikeda H, Mineno J, Nukaya I, Okamoto S, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Wakabayashi T.: Adoptive transfer of genetically modified Wilms' tumor 1-specific T cells in a novel malignant skull base meningioma model. *Neuro Oncol.* 15:747-758, 2013. (査読有)
 13. Asai H, Fujiwara H, An J, Ochi T, Miyazaki Y, Nagai K, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Inoue H, Yasukawa M.: Co-introduced functional CCR2 potentiates in vivo anti-lung cancer functionality mediated by T cells double gene-modified to express WT1-specific Tcell receptor. *PLoS One* 8:e56820, 2013. (査読有)
 14. 安川正貴 血球のトラフィックング～基礎と臨床における最新の知見～血液フロンティア 23:1367-1370, 2013. (査読無)
 15. 安川正貴 白血病研究と治療開発の進展 日本内科学会雑誌 102:1649-1651, 2013. (査読無)
 16. 安川正貴 AML に対する免疫療法の現状と新たな展開 血液内科 67:604-612, 2013. (査読無)
 17. 安川正貴 EB ウイルス感染症 診断のポイント 成人病と生活習慣病 43 : 1061-1066, 2013. (査読無)
 18. 安川正貴 造血器腫瘍の免疫療法 臨床免疫・アレルギー科 59:682-690, 2013. (査読無)
 19. Okamoto S, Amaishi Y, Goto Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J.: A promising vector for TCR gene therapy: differential effect of siRNA, 2A peptide, and disulfide bond on the introduced TCR expression. *Mol Ther Nucleic Acids.* 18:1:e63, 2012. (査読有)

20. Kanda, T., Ochi, T., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Okamoto, S., Mineno, J., Kuzushima, K. and Tsurumi, T.: HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther.* 19:566-571, 2012. (査読有)
21. Shikata, H., Yakushijin, Y., Matsushita, N., Sakai, A., Sugita, A., Nakamura, N., Yamanouchi, J., Azuma, T., Hato, T. and Yasukawa, M.: The role of activation-induced cytidine deaminase (AID/AICDA) in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci.* 103:415-421, 2012. (査読有)
22. Nagai, K., Ochi, T., Fujiwara, H., An, J., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Melenhorst, J.J., Gostic, E., Price, D.A., Ishii, E. and Yasukawa, M.: Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood* 119:368-376, 2012. (査読有)
23. 安川正貴 白血病幹細胞に対する WT1 特異的 TCR-T 細胞を用いた養子免疫療法 血液フロンティア 22:1205-1211, 2012. (査読無)
24. 安川正貴 造血器腫瘍に対する免疫療法 臨床血液 53:1759-1767, 2012. (査読無)

〔学会発表〕(計3件)

1. Kazushi Tanimoto, Hiroshi Fujiwara, Hiroki Tanaka, Fumihiro Ochi, Hiroaki Asai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kiyotaka Kuzushima, Hiroshi Shiku, John Barrett, Masaki Yasukawa: Concomitant Administration of Gene-Modified T Cells Expressing a Chimeric CD16-CD3 Receptor with Mogamulizumab Synergistically Suppresses Adult T Cell Leukemia Cells in Vivo. The 56th Annual Meeting of American Society of Hematology. December 5, 2014, San Francisco, USA
2. Jun Yamanouchi, Takaaki Hato, Etsuko Matsubara, Taichi Azuma, Hideyuki Nakanishi, Hiroshi Fujiwara, Yoshihiro Yakushijin, Masaki Yasukawa: Activation Status of Integrin IIb 3 in Essential Thrombocythemia with Calreticulin Mutation. The 56th Annual Meeting of American Society of Hematology. December 5, 2014, San Francisco, USA
3. Hiroshi Fujiwara, Fumihiro Ochi, Toshiki Ochi, Hiroaki Asai, Yukihiro

Miyazaki, Taichi Azuma, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Miwako Narita, Kiyotaka Kuzushima, Hiroshi Shiku, Masaki Yasukawa: 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. The 55th Annual Meeting of American Society of Hematology, December 6, 2013, Atlanta, USA

〔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〕
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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤原 弘 (Fujiwara, Hiroshi)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20398291