

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791050

研究課題名(和文) Ph陽性急性リンパ性白血病に対するCD19抗原特異的遺伝子改変T細胞療法の開発

研究課題名(英文) PiggyBac transposon-mediated CD19-specific T cells against Ph+ acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

齋藤 章治 (SAITO, Shoji)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10623762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：難治性白血病に対する新規治療法として、白血病細胞の表面抗原を標的とした抗原特異的T細胞療法の研究が進んでいる。我々は、トランスポゾン遺伝子導入法および改良された培養技術を用いて、健常人の血液10mlから平均で 1.3×10^8 個と十分な数の抗原特異的T細胞を得ることに成功した。この抗原特異的T細胞は、難治性白血病の一つであるPh陽性急性リンパ性白血病に対し、薬剤耐性の有無にかかわらず強い抗白血病効果を発揮するだけでなく、白血病細胞と接触することで平均で37倍に増殖し、その機能も増強することがわかった。我々の開発した新規治療法は、難治性白血病に対し、新規の治療選択肢の一つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To develop an alternative treatment for Ph+ALL resistant to tyrosine kinase inhibitors (TKIs), we evaluated anti-Ph+ALL activity of T-cells nonvirally engineered to express a chimeric antigen receptor (CAR) targeting CD19. A CD19-CAR gene was delivered into mononuclear cells from healthy donors using piggyBac transposons and 4D-Nucleofector System. We successfully generated an adequate number of CAR-T cells from 10-ml blood using piggyBac transposons, 4D-Nucleofector, and serum-free, tumor cell/virus-free culture method to reduce a potential risk and facilitate cGMP approval. CAR-T cells exhibited marked cytotoxicity against Ph+ALL regardless of TKI-resistance and subsequent proliferation by autocrine IL-2 secretion. Our CD19-specific T-cell therapy may be an effective and safe option for relapsed/refractory Ph+ALL.

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：がん 細胞免疫療法 キメラ抗原受容体 急性リンパ性白血病 チロシンキナーゼ阻害薬 フィラデルフィア染色体

1. 研究開始当初の背景

強力な化学療法や造血幹細胞移植に加えてチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が開発された事により、小児と成人に共通する難治性白血病の1つであるフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph+ALL) の予後は向上した。しかし、再発難治例や ABL ドメイン内の点突然変異 (T315I) を有する例の予後はいまだ不良であり、解決すべき課題である。

近年米国では、B細胞性リンパ腫/慢性リンパ性白血病に対する次世代治療法として、CD19 抗原を標的とするキメラ抗原受容体 (CD19CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法の治験が開始されている。CD19-CAR T 細胞は、CD19 抗原特異的に高い細胞傷害活性を発揮するため、CD19 抗原を発現している Ph+ALL に対しても治療への応用が期待される。しかし、米国の治験では高価かつ癌原遺伝子への親和性が高いレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われており、本邦における臨床実施にむけては、コストや安全性の証明等の解決すべき問題は多い。

本研究では、抗腫瘍効果の高い CD19-CAR 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、Ph+ALL に対する有効性と安全性の高い遺伝子改変 T 細胞療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

より安価で安全性の高い抗原特異的 T 細胞療法を開発するため、我々は非ウイルス遺伝子導入法である *piggyBac* トランスポゾン法に着目し、この方法を用いて CD19-CAR 遺伝子を T 細胞に導入することで、CD19-CAR T 細胞の樹立を目指す。

同時に CD19-CAR T 細胞の作成において、血清、動物材料、ウイルス感染細胞、腫瘍細胞を一切用いない改良された培養行程の開発を行う。

上述の新規遺伝子導入法、培養技術を用いて作成した CD19-CAR T 細胞の抗腫瘍効果を確認するため、難治性白血病である Ph+ALL 細胞に対する抗腫瘍効果を評価する。評価にあたっては、チロシンキナーゼ阻害薬に感受性の細胞株と高度耐性を示す (T315I 変異陽性) 細胞株の両方を用いて、CD19-CAR T 細胞に対する感受性の違いについても評価を行う。

3. 研究の方法

CD19-CAR 遺伝子の導入

3 人の健常ドナーから 10ml 採血を行い、末梢血単核球を分離した。4-D nucleofector を用いて *piggyBac* トランスポゾンベクター (pCMV-piggyBac) と CD19 特異的キメラ抗原受容体 (CD19-CAR) トランスポゾンベクター (pIRII-CD19CAR) を末梢血単核球に遺伝子導入した。

CD19-CAR T 細胞の培養

遺伝子導入された T 細胞は IL-15 添加培地で培養し、Day1-4 まで抗ヒト CD3 抗体、および抗ヒト CD28 抗体で刺激した。刺激 6 日後にマイクロビーズ標識抗ヒト IgG (H+L) 抗体を用いてポジティブセレクションを行い CD19-CAR 陽性細胞を純化した。CD19-CAR 陰性分画は放射線照射を行いその後の培養行程におけるフィーダー細胞として用いた。抗ヒト CD3 抗体、および抗 CD28 ヒト抗体で 2 回目の刺激を 4 日間行い、その後 G-rax10 デバイス (Wilson Wolf Manufacturing Inc.) 内でさらに 10 日間培養した。培養中 4-5 日毎に IL-15 を添加し、培養終了後は、トリパンプルー法により細胞数カウントを施行後、凍結保存した。

CD19-CAR T 細胞の細胞表面抗原の解析
上記方法により培養された T 細胞における CD19-CAR の発現は、ヤギ FITC 標識抗ヒト IgG (H+L) 抗体および APC 標識抗ヒト CD3 抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。また T 細胞表面抗原プロファイル解析では、それぞれ抗ヒト CD4, CD8, CD3, CD56, CD62L, CD45RO 抗体を用い、フローサイトメトリーで解析した。

In vitro 実験系を用いた CD19CAR-T 細胞の Ph+ALL 細胞株に対する抗原特異性および抗腫瘍効果の評価

チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) 感受性 Ph+ALL 細胞株 4 株 (SU-Ph2, TCY-Y, KOPN57bi, KOPN 30bi) と、TKI 耐性 T315I 変異陽性株 3 株 (SU/SR, TCC-Y/sr, SK-9) をターゲットとして共培養実験を行った。Effector / Target は 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 に設定し、7 日間の共培養を行った。コントロール群として CD19-CAR を遺伝子導入していない活性化 T 細胞を用いた。

Ph+ALL 細胞との共培養による、CD19-CAR T 細胞の増殖、サイトカイン産生および表面抗原の変化の評価

CD19-CAR 細胞と T315I 変異陽性 Ph+ALL 細胞株である SU/SR を Effector / Target 比 1:5 で共培養し、Day 1, 3, 5, 7, 10, 14 において細胞数 (および CD19 or CD3 陽性細胞比率) 細胞表面 CD19-CAR の発現、培養液中の IL-2、IFN 濃度について、それぞれトリパンプルー法、フローサイトメトリー、ELISA 法を用いて解析した。

また、Day10 において一部の CD19-CAR T 細胞に対し SU/SR 細胞を Effector / Target 比 1:5 になるように加え、さらに 10 日間共培養した。SU/SR 付加後 Day 1, 3, 5, 7, 10 において同様の解析を行った。

Ph+ALL 細胞における TRAIL receptor の発現および、Ph+ALL 細胞との共培養における CD19-CAR T 細胞表面上の TRAIL の発現変化の評価

チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) 感受性 Ph+ALL 細胞株 4 株 (SU-Ph2, TCY-Y, KOPN57bi, KOPN 30bi) と、TKI 耐性 T315I 変異陽性株 3 株 (SU/SR, TCC-Y/sr, SK-9)

の計7株における細胞表面のDR4, DR5分子についてフローサイトメトリーを用いて解析した。また、CD19-CAR細胞と放射線照射を行ったSU/SRをEffector / Target比1:5で共培養し、Day 1, 3, 5, 7, 10, 14において、CD3陽性細胞表面のTRAILの発現につき、フローサイトメトリーを用いて解析した。陰性コントロールとしてCD19-CARを遺伝子導入していない活性化T細胞を用いた。

4. 研究成果

我々は4-D Nucleofector Systemを用いたトランスポゾン遺伝子導入法および血清、細胞株、ウイルスを用いない独自のT細胞培養系を用いて、10mlの健常ドナー末梢血から平均で 1.3×10^8 個のCD19-CAR T細胞を得ることに成功した。得られたCD19-CAR T細胞数は臨床应用到耐えうる十分な数であった。

得られたCD19-CAR T細胞の細胞表面プロファイル解析では、CD3陽性細胞が $99.3 \pm 0.4\%$ で、CD4陽性細胞が $25.4 \pm 9.1\%$ 、CD8陽性細胞が $71.3 \pm 9.4\%$ であった。CD3-/CD56+細胞は1%未満であった。T細胞の多くがCD45RO / CD62L陽性細胞であり、CAR発現率は $46.7 \pm 7.7\%$ であった。

得られたCD19-CAR T細胞のPh+ALLに対する抗腫瘍効果の評価

T315I変異陽性TKI高度耐性株3株を含むPh+ALL 7株とCD19-CAR T細胞を7日間共培養したところ、CD19-CAR T細胞はEffector / Target比(E/T比)=1:5, 1:10において7つの細胞株すべてを除去し、E/T比=1:50においても白血病細胞を十分に減少させることを確認した。このCD19-CAR T細胞の抗白血病細胞効果は薬剤耐性の有無に関わらず同等であった。

CD19-CAR T細胞は白血病細胞との共培養下において、20日間で平均37倍増殖し、2度の白血病細胞の曝露刺激によって、導入されたCD19CAR遺伝子の発現およびIL-2の産生が、2度とも増大することが確認された。

Ph+ALL細胞表面には薬剤耐性の有無に関わらずDR4, DR5の発現を認め、CD19-CAR T細胞表面には $22.5 \pm 9.5\%$ のTRAIL発現を認めた。TRAILの発現はPh+ALL細胞の刺激により一時的に増大することを確認した。

<結論>

トランスポゾン遺伝子導入法は、現在広く用いられているレトロウイルス遺伝子導入法と比較し安価であり、我々の開発したCD19-CAR T細胞を用いた細胞免疫療法は、薬剤耐性Ph陽性急性リンパ性白血病に対し、新規の治療選択肢のひとつとなる可能性がある。(論文reivise中)

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)

1. Shoji Saito, Yozo Nakazawa, Miyuki Tanaka, Ryu Yanagisawa, Akane Sueki, Kazuyuki Matsuda, Yasuhiro Maeda, Yuko Sato, Seiichi Okabe, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Matthew H. Wilson, Cliona M. Rooney, and Kenichi Koike. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytherapy* 2014, in press. (査読あり)

[学会発表](計4件)

1. 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」小児血液がん学会、0-114、横浜市、2012年12月1日、口頭発表(査読あり)
2. Shoji Saito, Yozo Nakazawa, Miyuki Tanaka, Ryu Yanagisawa, Kazuyuki Matsuda, Yasuhiro Maeda, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Kenichi Koike. CD19-specific T-cell therapy for Ph+ALL using piggyBac transposon-based gene modification. 日本血液学会、OS-2-106、京都市、2012年10月20日、口頭発表(査読あり)
3. Shoji Saito, Yozo Nakazawa, Miyuki Tanaka, Ryu Yanagisawa, Yasuhiro Maeda, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Matthew H Wilson, Cliona M Rooney, and Kenichi Koike. 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. Annual Meetings of American Society of Gene Therapy, 475, Philadelphia PA, May 18, 2012. ポスター発表(査読あり)
4. 齋藤章治、中沢洋三、平林耕一、松田和之、杉田完爾、小池健一「難治性急性リンパ性白血病に対するCD19特異的遺伝子改変T細胞療法の開発」日本小児科学会、O-149、福岡市、2012年4月21日、口頭発表(査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 章治 (SAITO, Shoji)
信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10623762

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：