

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430155

研究課題名(和文)成人T細胞白血病に対するキメラ抗原受容体発現T細胞を用いた免疫遺伝子療法の開発

研究課題名(英文)Development of immunogene therapy using T-cells expressing a chimeric antigen receptor for adult T-cell leukemia

研究代表者

塚原 智典(Tsukahara, Tomonori)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10362120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性成人T細胞白血病(ATL)に対するキメラ抗原受容体(CAR)発現T細胞を用いた免疫遺伝子療法の開発研究を行った。ATL細胞を標的化するため、CADM1(Cell Adhesion Molecule 1)またはCD30抗原に対する単鎖抗体とCD28およびCD3のシグナル分子を連結させたCARを作製した。レトロウイルスベクターによりCAR遺伝子を健康人末梢血単核球へ導入した。体外増幅した抗CD30-CAR発現T細胞がCD30陽性ATL細胞株を効率良く殺傷することを試験管内で確認した。以上の結果から、抗CD30-CAR発現T細胞は、ATL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)：We conducted experiments to develop immunogene therapy using T-cells expressing a chimeric antigen receptor (CAR) for the treatment of refractory adult T-cell leukemia (ATL). For targeting ATL cells, CARs consisting of an anti-CADM1 antibody or an anti-CD30 antibody, fused to CD28 and CD3 signal domains, were constructed. Normal peripheral blood mononuclear cells were transduced with retroviral vectors containing CARs. CD30-CAR-transduced T-cells were expanded ex vivo, and efficiently lysed CD30(+) ATL cells lines but not a CD30(-) B-cell line in vitro. These results indicate that CD30-CAR T-cells could be useful in the treatment of ATL.

研究分野：癌遺伝子治療学

キーワード：免疫遺伝子療法 キメラ抗原受容体 T細胞 造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia; ATL) は、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (Human T-cell Leukemia Virus Type I; HTLV-I) 感染者の一部に発症する CD4 陽性 T 細胞腫瘍である。ATL は、化学療法に耐性で予後不良である。一方、同種造血幹細胞移植では移植片対白血病効果による長期生存例が認められており、腫瘍に対する免疫応答の有効性が示唆されている。しかし、患者の多くが 65 歳以上であり、同種造血幹細胞移植に適用する患者は限定される。また、ATL において、再発・難治例に対する治療法は未だ確立されておらず、新規治療法の開発が強く望まれている。

近年、新たな癌免疫療法として、キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor; CAR) 発現 T 細胞を用いた養子免疫遺伝子療法の開発が進んでいる。この治療法は、分子標的と細胞療法の利点を兼ね備えており、将来有望な標的化免疫療法と考えられている。米国で行われた難治性悪性 B リンパ腫・白血病に対する臨床研究では、優れた治療効果が報告されている。

そこで、難治性 ATL の新規治療法の開発を目指し、CAR 発現 T 細胞を用いた免疫遺伝子療法の開発研究を行うこととした。

(1) ATL 細胞特異的 CAR の作製:

CAR は、細胞外に単鎖抗体と細胞内に T 細胞副刺激分子 CD28 および T 細胞受容体 CD3 のシグナルドメインから構成される。そのため、CAR 発現 T 細胞は、抗体部分で腫瘍細胞の表面分子を認識し、CD3 -CD28 シグナルドメインを介して T 細胞を活性化することで、腫瘍細胞を効率よく殺傷することができる。CAR を用いて ATL 細胞を標的化するため、ATL に特異的な表面分子の検索を行った。標的抗原候補として、ATL 細胞に特異的かつ高発現している表面分子として最近同定された (Cell adhesion molecule 1; CADM1) と、ATL 細胞表面マーカー (ATL の一部に発現) として知られている CD30 を選択した。ATL 細胞特異的 CAR として、CADM1 または CD30 抗原を認識する CAR の作製を試みた。

(2) CAR 発現レトロウイルスベクター産生細胞の作製: 高力価のレトロウイルスベクターを得るため、PG13 細胞をベースとして、CAR を搭載したレトロウイルスベクターを産生するプロデューサー細胞の樹立を試みた。

(3) CAR 発現 T 細胞の作製: (2) で調整したレトロウイルスベクターをヒト末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) に導入することで、CAR 発現 T 細胞の作製を試みた。

(4) CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞株に対する抗腫瘍効果の評価: 作製した CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞に対する特異的な殺細胞効果を試験管内およびマウス腫瘍モデルで評価することとした。

2. 研究の目的

(1) ATL 細胞特異的 CAR の作製:

ATL 細胞の標的化のために、ATL 細胞の表面分子ある CADM1 および CD30 抗原に対する単鎖抗体を持つ CAR を作製し、レトロウイルスベクターに組み込む。

(2) CAR 発現レトロウイルスベクター産生細胞の作製: CAR を搭載したレトロウイルスベクターを PG13 細胞に導入し、レトロウイルスベクター産生細胞を樹立する。作成した産生細胞の培養上清から、高力価のレトロウイルスベクターを調整する。

(3) CAR 発現 T 細胞の作製:

レトロウイルスベクターにより CAR 遺伝子を PBMC へ導入し、CAR 発現 T 細胞を樹立する。

(4) CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞株に対する抗腫瘍効果の評価: 作製した CAR 発現 T 細胞を培養により増幅し、ATL 細胞株に対する抗腫瘍活性を試験管内およびマウス腫瘍モデルで評価する。

3. 研究の方法

(1) ATL 細胞特異的 CAR の作製:

CADM1 特異的 CAR は、連携研究者から提供して頂いた CADM1 抗体の配列情報をもとに、抗 CADM1 単鎖抗体遺伝子を人工合成し、CD28 と CD3 ζ シグナルドメインにタンデムに連結して作製した。また、CD30 特異的 CAR は、抗 CD30 単鎖抗体遺伝子 (Ki-4 クローン) を同様に人工合成し、上記のシグナルドメインに連結させ作製した。T 細胞への遺伝子導入のため、各々の CAR 発現カセットをレトロウイルスベクターに組み込んだ。

(2) CAR 発現レトロウイルスベクター産生細胞の作製: まず、リン酸カルシウム法を用いて、293 細胞へレトロウイルス構成タンパク質発現ベクターと CAR 搭載レトロウイルスベクターを一過性に遺伝子導入し、組み換えレトロウイルスを調整した。次に、それらを用いて、PG13 細胞に安定的に CAR 遺伝子を導入することで、レトロウイルスベクター産生細胞を樹立した。産生細胞の培養上清から調整したレトロウイルスベクターが機能的かどうかを調べるために、レトロネクチン法を用いて、Jurkat 細胞に遺伝子導入を行い、CAR の発現をフローサイトメトリーで確認した。CAR の発現率を指標にして、Jurkat 細胞への遺伝子導入効率が 50% 以上のレトロウイルスベクターストックを PBMC への遺伝子導入に用いた。

(3) CAR 発現 T 細胞の作製:

まず、健康人末梢血から、フィコール密度勾配遠心分離法を用いて PBMC を調整した。次に、レトロネクチン法を用いて、レトロウイルスベクターによる PBMC への CAR 遺伝子の導入を行った。遺伝子導入 T 細胞は、IL-2 存在下で培養を行い、体外増幅させた。増幅した遺伝子導入 T 細胞の細胞表面における CAR の発現はフローサイトメトリーで確認した。

(4) CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞株に対する細胞傷害活性の評価:

ターゲット細胞である蛍光色素カルセインで標識した ATL 細胞株と、エフェクター細胞である CAR 発現 T 細胞を共培養し、培養上清中に放出されたカルセイン量を測定することで、CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞株に対する殺細胞効果を試験管内で評価した。

マウス腫瘍モデルとして、遺伝子導入によりルシフェラーゼを安定的に発現する ATL 細胞株を作製した。免疫不全マウスに作製したルシフェラーゼ発現細胞を移植して、経時的に生体イメージングを行い、マウス個体内における ATL 細胞の増殖を確認した。

4. 研究成果

(1) ATL 細胞特異的 CAR の作製:

遺伝子組み換えにより、CADM1 および CD30 抗原に対する CAR を搭載したレトロウイルスベクターの構築に成功した。作製したベクターの大量精製を行い、以下の実験に用いた。ベクター由来の CAR タンパク質の発現を調べるために、まず、各々の CAR 発現ベクターを 293 細胞へ一過性に遺伝子導入した。遺伝子導入細胞の抽出液をウエスタンブロットで解析したところ、細胞内の抗 CADM1-CAR または抗 CD30-CAR の発現を確認した。

(2) CAR 発現レトロウイルスベクター産生細胞の作製: PG13 細胞をベースとして、各々の CAR を発現するレトロウイルスベクター産生細胞を作製した。これらの産生細胞から調整した組み換えレトロウイルスの活性は、Jurkat 細胞を用いた遺伝子導入実験で調べた。その結果、抗 CD30-CAR レトロウイルスベクターの遺伝子導入効率は高値 (> 70%) であったが、抗 CADM1-CAR レトロウイルスベクターの遺伝子導入効率は低かった。改善策として、抗 CADM1-CAR レトロウイルスベクターを複数回調整したが、高力価のレトロウイルスは得られなかった。そのため、主に抗 CD30-CAR レトロウイルスベクターに焦点を絞って、以下の実験を進めた。

(3) CAR 発現 T 細胞の作製:

レトロウイルスベクターを用いて、活性化したヒト PBMC へ抗 CD30-CAR 遺伝子の導入を行った。遺伝子導入 T 細胞は、G-Rex 培養フラスコ等を用いて体外増幅した。フローサイトメトリー解析から、遺伝子導入 T 細胞の細胞表面の抗 CD30-CAR の発現は、良好であった (~80%)。ウエスタンブロット解析からも、遺伝子導入 T 細胞の細胞内の CAR の発現を確認した。

(4) CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞株に対する細胞傷害活性の評価: カルセイン遊離法を用いた解析から、抗 CD30-CAR 発現 T 細胞は、CD30 陽性 ATL 細胞株に対して殺細胞効果を示した。一方、コントロールである CD30 陰性 B 細胞株には、ほとんど細胞傷害活性を示さなかった。これらの結果から、抗 CD30-CAR 発現 T 細胞は、ATL 細胞に特異的な細胞傷害活

性を持つことが示された。

ATL 患者 PBMC から CAR T 細胞を調整することを想定した場合、CD4 陽性 T 細胞は、ATL 細胞 (あるいは HTLV-1 感染細胞) の可能性がある。そのため、CD4 ではなく CD8 陽性 T 細胞をエフェクター細胞として使用するのが適切である。そこで、CD8 磁気ビーズを用いた細胞分画法により、CD8 陽性の抗 CD30-CAR 発現 T 細胞の調整を行った。これらの CD8⁺ 抗 CD30-CAR 発現 T 細胞の ATL 細胞株に対する特異的な細胞傷害活性をカルセイン遊離法により確認した。

抗 CD30-CAR 発現 T 細胞の抗腫瘍効果 (*in vivo*) を評価するために、マウスモデルを作製した。ルシフェラーゼ発現 ATL 細胞株を免疫不全マウスに移植して、経時的に生体イメージングを行ったところ、ATL 細胞の増殖が確認できた。今回は実施できなかったが、今後、このマウス腫瘍モデルを用いて、CAR 発現 T 細胞を投与し、抗腫瘍効果を評価していきたい。

本研究から、ATL に対する新規治療法として、CD8 陽性抗 CD30-CAR 発現 T 細胞を用いた養子免疫遺伝子療法が有効である可能性が示唆された。今後、実験動物を用いた治療実験などから、その有効性を確認していきたい。

CAR 発現 T を用いた免疫遺伝子療法は、B 細胞性腫瘍に対する臨床開発が進んでいる。一方、標的抗原の選択や CAR に使用する単鎖抗体の種類や最適化など基礎研究も必要であると考えられる。当該免疫療法は、ATL を含め多くの癌に対して応用可能であり、今後の進展を期待したい。

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6件)

Tsukahara T, Iwase N, Kawakami K, Iwasaki M, Yamamoto C, Ohmine K, Uchibori R, Teruya T, Ido H, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Brentjens R, and Ozawa K.: The *To12* transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. *Gene Ther*, 査読有, 22巻, 2015, 209-15, DOI: 10.1038/gt.2014.104.

Uchibori R, Tsukahara T, Ohmine K, Ozawa K.: Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells, *Int J Hematol*, 査読有, 99巻, 2014, 377-82 DOI:10.1007/s12185-014-1537-7

Yamamoto C, Tsukahara T, Ohmine K, Teruya T, Ido H, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Ozawa K.: IL-21 is not necessary for

anti-lymphoma effects of T cells expressing second-generation CD19-specific chimeric antigen receptors in a xenograft mouse model. Jichi Medical University Journal, 査読有, 36 巻, 2013, 23-31

Uehara T, Kanazawa T, Mizukami H, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Misawa K, Carey TE, Suzuki M, Ichimura K, Ozawa K.: Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. Cancer Science, 査読有, 105 巻, 2014, 72-80

DOI:10.1111/cas.12315

Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, Uchibori R, Ido H, Teruya T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J, Takesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K.: CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有, 438 巻, 2013, 84-89

DOI:10.1016/j.bbrc.2013.07.030

Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K.: NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. Cancer Research, 査読有, 1 巻, 2013, 364-372

DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-0088

[学会発表](計 8 件)

Ohmine K, Adoptive immunotherapy with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T Cells. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場(名古屋)

大嶺 謙, CD19 特異的キメラ抗原受容体(CAR)発現 T 細胞を用いた養子免疫療法の臨床開発, 第 7 回血液疾患免疫療法研究会学術集会, 2015 年 9 月 26 日, 東京大学伊藤国際学術研究センター内伊藤謝恩ホール(東京)

Tsukahara T, To12 transposon-mediates gene transfer of CD19-CAR to primary human T-cells for the treatment of B-cell malignancies. 第 20 回日本遺伝子治療学会, 2014 年 8 月 8 日, 東京慈恵会医科大学(東京)

Tsukahara T, Generation of T-cells expressing a CD19-specific CAR by the To12 transposon system. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日, パシフィコ横浜(横浜)

Tsukahara T, To12 transposon-based gene transfer of CD19-specific chimeric

antigen receptors into human T-cells. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014 年 11 月 2 日, 大阪国際会議場(大阪)

Tsukahara T, Tumor targeting and anti-tumor activity mediated by T-lymphocytes with CD19-specific CAR in human B-cell lymphoma models. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 2013 年 7 月 5 日, 岡山コンベンションセンター(岡山)

Tsukahara T, Anti-tumor activity of CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T-cells for B cell lymphoma. 第 72 回日本癌学会学術集会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(横浜)

Tsukahara T, Tumor targeting T-lymphocytes with an anti-CD19 chimeric antigen receptor for B cell lymphoma. 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11 日, ロイトン札幌(札幌)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

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・講師

研究者番号: 10362120

(2) 研究分担者

大嶺 謙(OHMINO, Ken)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90316521

(3) 連携研究者

森下和広(MORISHITA, Kazuhiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 80260321