

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430168

研究課題名(和文) 養子免疫遺伝子療法における遺伝子改変T細胞の疲弊化および老化関連分子の解析

研究課題名(英文) Safety and persistence of genetically modified T-cells in patients with non-Hodgkin lymphoma

研究代表者

大嶺 謙 (OHMINE, KEN)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90316521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD19特異的CARの臨床試験を遂行中である。患者Tリンパ球から作製したT細胞への遺伝子導入効率は健常人と同等だったが、OKT3とレトロネクチンの刺激による増幅効率が低下していた。7例の非ホジキンリンパ腫患者全例で輸注予定細胞を得ることが可能であった。3例に対しCAR-T細胞の輸注を行ったところいずれの症例も末梢血中のCARベクターのコピー数が一過性に上昇した。うち1例で臨床的な効果を認められた。しかし輸注したCAR-Tの長期の体内存続が得られておらず、CAR-Tの治療効果を高めるためには、CAR-Tに対する免疫反応や疲弊化などに対する何らかの工夫が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We are conducting a clinical trial to evaluate the safety and efficacy of administering CD19 specific CAR-Ts manufactured from a patient's autologous T-cells to combat relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphomas. We established a protocol to manufacture a sufficient number of CAR-Ts stimulated by OKT3 onto Retronectin-coated substratum. We demonstrated small scale test using patient's blood. The patients' T-cells showed much lower fold expansion compared to healthy donors'. The gene transfer efficiency of patient's T-cells was equivalent to that of healthy donors. Enrollment started in December 2014. All of seven patients had successful CAR-T production, and three patients safely received an infusion. Although clinically relevant responses seen, PCR analyses failed to show the presence of CAR-Ts in one patient. There remains a need for new therapeutic modalities. These early experiences demonstrate the feasibility and significant clinical impact of CAR-T therapy.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子改変T細胞療法 CD19抗原 非ホジキンリンパ腫 細胞疲弊化

1. 研究開始当初の背景

近年、造血器腫瘍に対するキメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR) を用いた養子免疫遺伝子療法の有効性を示した臨床報告が相次いでいる。CARは腫瘍細胞膜蛋白抗原を認識するモノクローナル抗体のFab部分とCD3 の細胞内シグナルドメインを結合させた分子である。現在のところ、CARを導入するTリンパ球は、主に患者自己細胞が用いられている。しかし、難治性造血器腫瘍患者は複数の化学療法を受けているために、末梢血中のTリンパ球の機能障害が起こっている可能性がある。CAR-Tによる十分な抗腫瘍効果を得るためには、輸注したCAR-Tが患者体内で存続し、機能を維持することが重要である。

2. 研究の目的

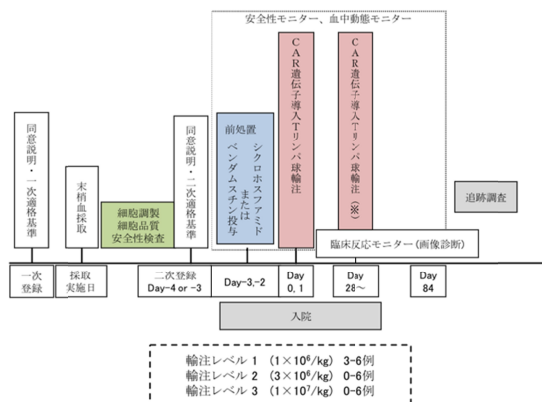
(1)「CD19 特異的キメラ抗原受容体発現 T リンパ球を用いた難治性 B 細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究」の実施

(2)その実施にあたり、患者末梢血 T リンパ球を用いた CAR-T の機能を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)臨床試験実施に先立ち、患者末梢血 T リンパ球を用いた CAR-T の作製効率とその機能を検討した。

(2)「CD19 特異的キメラ抗原受容体発現 T リンパ球を用いた難治性 B 細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究」の研究計画書を作成し、厚生労働省の審査を受けた。



以下に本臨床研究の概略を記す。本臨床研究は治療抵抗性のB 細胞性非ホジキンリンパ腫を対象とした第 I / 相臨床試験である。CD19 を特異的に認識するCAR (19-28zCAR) 遺伝子を導入した自己T リンパ球輸注の用量漸増試験を行い、輸注細胞の用量制限毒性の評価、最大耐用量の推定、推奨用量の決定を行う。また併せて探索的な有効性評価も行う。治療スケジュールを図に示す。一次登録後に、患者から採取した末梢血から単核細胞 (PBMC) と血漿を分離し、レトロウイルスベクターによりPBMC に含まれているT リンパ球に19-28zCAR 遺伝子を導入する。CART は、10 日間程度の拡大培養を経て、輸注用T リンパ球として調製され、凍結保存される。CART が品質試験に合格した後に二次登録を行う。前処置としてシクロホスファミドまたはベンダムスチンを投与した後にCART 輸注を行う。主要評価項目は以下とする

CART の検定(遺伝子導入効率、生存率、無菌性、細胞内IFN- γ 産生機能)

有害事象の評価 (一般臨床検査、血清中免疫グロブリン濃度測定、増殖性レトロウイルス(RCR)検査、ウイルスベクター挿入変異によるクローナルな細胞増殖および発がんの監視)また、主な副次的評価項目は、本治療による抗腫瘍効果(骨髄検査、全生存率、無増悪生存率)、CART のサブセット解析、ヒト抗マウス抗体(HAMA)試験である。

4. 研究成果

(1) 患者末梢血 T リンパ球を用いた CAR-T 細胞の機能検討：6 名の非ホジキンリンパ腫患者の末梢血から得られた T リンパ球を用いて、CAR-T 細胞を作製し、健常者から得た T リンパ球から作製した CAR-T 細胞との比較検討を行った。健常人の細胞に比し、患者由来の細胞の増殖率低下している。健常人では増殖率にばらつきが少なかった一方で、患者間で、増殖率に差がありました。細胞増殖率の差を

工程間別にみると、d0 から d4 までの OKT-3 と RN による細胞刺激の過程で、健常人細胞が 4 倍から 9 倍に増殖していたのに比し、患者細胞の反応低下していた。一方、CAR-T 遺伝子を導入した後の増殖率に関しては、両者に差がなかった。回収した T 細胞中の CAR 陽性細胞率は患者細胞で 11 から 24% (med 17%)、健常人で 15 から 29% (med 23%) だった。また、細胞中のベクターコピー数は、患者で 0.14 から 0.5 コピー (med 0.21)、健常人で 0.1 から 0.43 (med 0.25) だった。Raji を用いた検討では、2 つの患者由来 CAR-T の細胞傷害活性が、健常人と同等だった。

(2) 臨床試験の遂行: H26 年 12 月に臨床研究実施計画書「CD19 抗原特異的キメラ抗原受容体発現 T リンパ球を用いた難治性 B 細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究」が厚生労働省にて承認された。これまでに 7 例の非ホジキンリンパ腫患者を登録した。被験者の末梢血を採取し、院内の細胞プロセッシング室にてレトロウイルスベクターを用いて CAR-T 細胞を作製した。以下に登録症例 7 例の CAR-T 細胞に関する研究データを示す。年齢中央値は 58 歳 (43 歳 ~ 68 歳)、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 3 例、濾胞性リンパ腫からの形質転換 2 例、リンパ芽球性リンパ腫 1 例、遺伝子導入効率は 49.5% (31.3 ~ 57.9%)、CAR-T 作製後の細胞生存率は中央値 89.5% (80.6 ~ 94.3%)、CAR-T 機能を *in vitro* における細胞内 IFN- γ 産生能にて評価したところ中央値 43.8% (27.6% ~ 59.6%) であった。検討した全例で 1×10^6 個/kg の輸注予定細胞を得ることが可能であった。3 例に対しシクロフォスファミドによる前処置化学療法後に CAR-T 細胞の輸注を行った。うち 1 例では輸注後 28 日目に画像診断上、腫瘍量が 50% 以下まで減少するなど臨床的な効果を認めた。CAR-T の輸注を行った 3 例における輸注前後の末梢血検体を調整・保存し、体内における CAR-T 細胞の動態の検討を行っ

たところ、いずれの症例も末梢血中の CAR ベクターのコピー数が一過性に上昇し、その後検出限界値以下となった。本臨床試験の治療効果の評価は今後行われるが、輸注した CAR-T の末梢血における長期の存続が得られておらず、CAR-T の治療効果を高めるためには、何らかの工夫が必要と考えられる。

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 32 件)

1. Umino K, Fujiwara SI, Ikeda T, Toda Y, Ito S, Ohmine K, et al. Clinical outcomes of myeloid/lymphoid neoplasms with fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) rearrangement. *Hematology*. 2018;1-8.
2. Nakamae H, Fukuda T, Nakaseko C, Kanda Y, Ohmine K, Ono T, et al. Nilotinib vs. imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: long-term follow-up of the Japanese subgroup of the randomized ENESTnd trial. *Int J Hematol*. 2018;107(3):327-36.
3. Minakata D, Sato K, Ikeda T, Toda Y, Ohmine K, Mashima K, et al. A leukemic double-hit follicular lymphoma associated with a complex variant translocation, t(8;14;18)(q24;q32;q21), involving BCL2, MYC, and IGH. *Cancer Genet*. 2018;220:44-8.
4. Kawasaki Y, Sato K, Hayakawa H, Takayama N, Nakano H, Ohmine K, et al. Comprehensive Analysis of the Activation and Proliferation Kinetics and Effector Functions of Human Lymphocytes, and Antigen Presentation Capacity of Antigen-Presenting Cells in Xenogeneic

- Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018.
5. Fujiwara SI, Shirato Y, Ikeda T, Ohmine K, Toda Y, Ito S, et al. Successful treatment of follicular lymphoma with second-generation tyrosine kinase inhibitors administered for coexisting chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2018;107(6):712-5.
 6. Umino K, Fujiwara SI, Sato K, Ohmine K, Nakano H, Yamasaki R, et al. High-Dose Methotrexate and Cytarabine-Based Multi-Agent Chemotherapy (Modified Bonn Protocol) for Systemic Lymphoma with CNS Involvement. *Acta Haematol*. 2017;137(2):93-9.
 7. Umino K, Fujiwara SI, Ito S, Mashima K, Minakata D, Ohmine K, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor level at diagnosis predicts transformation in patients with follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(2):316-23.
 8. Umino K, Fujiwara SI, Ikeda T, Ohmine K, Ito S, Mashima K, et al. Prognostic value of the soluble interleukin-2 receptor level after patients with follicular lymphoma achieve a response to R-CHOP. *Hematology*. 2017;22(9):521-6.
 9. Nakano H, Fujiwara SI, Ito S, Mashima K, Ohmine K, Minakata D, et al. The prognostic significance of rapid peripheral blood blast clearance during the initial course of induction chemotherapy in young patients with de novo acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol*. 2017;35(3):357-64.
 10. Minakata D, Fujiwara SI, Ikeda T, Toda Y, Ohmine K, Mashima K, et al. Relationship between white blood cell count elevation and clinical response after G-CSF priming chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2017;106(3):411-7.
 11. Ito S, Fujiwara SI, Mashima K, Ohmine K, Minakata D, Nakano H, et al. Development of acute myeloid leukemia in patients with untreated chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2017;96(5):719-24.
 12. Fujiwara SI, Muroi K, Yamamoto C, Hatano K, Ohmine K, Sato K, et al. CD25 as an adverse prognostic factor in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2017;22(6):347-53.
 13. Yamamoto C, Ito S, Mashima K, Umino K, Ohmine K, Yamasaki R, et al. Dose-reduced combination of mitoxantrone, etoposide, and cytarabine (miniMEC) for relapsed and refractory acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(11):2541-7.
 14. Suzuki T, Kobayashi H, Kawasaki Y, Ohmine K, Hatano K, Fujiwara S, et al. Efficacy of combination therapy with anti-thymocyte globulin and cyclosporine A as a first-line treatment in adult patients with aplastic anemia: a comparison of rabbit and horse formulations. *Int J Hematol*. 2016;104(4):446-53.
 15. Sugimoto M, Ito S, Mashima K, Umino K, Ohmine K, Nakano H, et al. Retrospective evaluation of the MEAM regimen as a conditioning regimen before autologous peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma in two centers with different dosing schedules of melphalan. *Ann Hematol*. 2016;95(9):1513-9.
 16. Ohmine K. Overview. *Rinsho*

Ketsueki. 2016;57(11):2345.

17. Oh I, Oh Y, Ohmine K. Adoptive immunotherapy utilizing anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cells for B-cell malignancies. Rinsho Ketsueki. 2016;57(11):2365-72.

18. Minakata D, Fujiwara S, Ito S, Ohmine K, Umino K, Nakano H, et al. A low-dose cytarabine, aclarubicin and granulocyte colony-stimulating factor priming regimen versus a daunorubicin plus cytarabine regimen as induction therapy for older patients with acute myeloid leukemia: A propensity score analysis. Leuk Res. 2016;42:82-7.

19. Yoshida A, Watanabe M, Ohmine K, Kawashima H. Central retinal vein occlusion caused by hyperviscosity syndrome in a young patient with Sjogren's syndrome and MALT lymphoma. Int Ophthalmol. 2015;35(3):429-32.

20. Tsukahara T, Iwase N, Kawakami K, Iwasaki M, Yamamoto C, Ohmine K, et al. The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. Gene Ther. 2015;22(2):209-15.

21. Suzuki T, Oh I, Ohmine K, Meguro A, Mori M, Fujiwara S, et al. Distribution of serum erythropoietin levels in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. Int J Hematol. 2015;101(1):32-6.

22. Uchibori R, Tsukahara T, Ohmine K, Ozawa K. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells. Int J Hematol. 2014;99(4):377-82.

23. Muroi K, Fujiwara S, Tatara R, Sato K, Oh I, Ohmine K, et al. Two

granulocytic regions in bone marrow with eosinophilia evaluated by flow cytometry. J Clin Exp Hematop. 2014;54(3):243-5.

24. Ishihara A, Ohmine K, Weisbrode SE, Bertone AL. Effect of Intra-Medullary and Intra-Venous Infusions of Mesenchymal Stem Cells on Cell Engraftment by In-Vivo Cell Tracking and Osteoinductivity in Rabbit Long Bones: A Pilot Study. Orthop Muscular Syst. 2014;3(3).

25. Fujiwara S, Muroi K, Tatara R, Ohmine K, Matsuyama T, Mori M, et al. Intrathecal administration of high-titer cytomegalovirus immunoglobulin for cytomegalovirus meningitis. Case Rep Hematol. 2014;2014:272458.

26. 永山 隆史, 大嶺 謙. キメラ抗原受容体 T 細胞療法. 最新医学. 2018;73(2):83-91.

27. 皆方大祐, 大嶺 謙. ALL に対する CD19 を標的とした CAR-T 療法. 血液内科. 2017;75(3):330-7.

28. 大嶺 謙, 皆方大祐. B 細胞性造血器腫瘍 (白血病・悪性リンパ腫) に対する CD19 特異的 CAR-T 療法の臨床開発. 血液フロンティア. 2017;27(7):41-8.

29. 岡塚貴世志, 大嶺 謙. CD19 特異的キメラ抗原受容体を発現させた T リンパ球を用いる癌遺伝子治療. 血液フロンティア. 2015;25:71-7.

30. 海野 健斗, 大嶺 謙. CD19 特異的 CAR 発現 T 細胞を用いた造血器腫瘍の治療 (話題). 血液内科. 2015;493-9.

31. 大嶺 謙. 難治性 B 細胞性造血器腫瘍に対する CD19 特異的キメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子治療は今後の細胞免疫療法の行方を占うか? 内科. 2015;116:1030-5.

32. 大嶺 謙. パノピノスタット. 最

新医学 別冊 診断と治療の ABC 血液領域の
分子標的治療薬. 2015:102:187-196.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 大嶺 謙. キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いた B 細胞性造血器腫瘍に対する免疫細胞療法の臨床開発. 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018 年 3 月 21 日~23 日, パシフィコ横浜(横浜).
2. 大嶺 謙. CAR-T 療法の実際と問題点. バイオロジクスフォーラム 第 15 回学術集会, 2018 年 1 月 10 日, 文京シビックホール小ホール(東京).
3. Ken Ohmine, Ryosuke Uchibori, Keiya Ozawa. Clinical development of CAR-T Therapy for Multiple Myeloma. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017 年 10 月 20 日~22 日, 東京国際フォーラム(東京).
4. Ken Ohmine. Clinical development of adoptive immunotherapy with Chimeric Antigen Receptor-modified T-cells in patients with Multiple Myeloma. 1st Annual AMN Summit, 2017 年 10 月 15 日, Seoul.
5. 大嶺 謙. 産学協同による CAR-T 療法の開発. 第 38 回造血幹細胞移植学会総会, 2016 年 3 月 3 日~5 日, 名古屋国際会議場(名古屋)
6. 大嶺 謙. Phase 1/2 trial of CD19 Chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed and refractory Hon-Hodgkin lymphoma. 第 7 回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム, 2016 年 5 月 13 日~14 日, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路島.
7. 大嶺 謙. CD19 特異的キメラ抗原受容体(CAR) 療法の臨床試験. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2016 年 4 月 28 日~30 日, 国立京都国際会館(京都).
8. 大嶺 謙. CD19 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いた養子免疫療法. 第

74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日~10 日, 名古屋国際会議場(名古屋)

9. 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. 血液疾患免疫療法研究会第 7 回総会, CD19 特異的キメラ抗原受容体(CAR)発現 T 細胞を用いた悪性リンパ腫に対する遺伝子治療. 第 55 回日本リンパ網内系学会総会, 2015 年 7 月 9 日~11 日, 岡山コンベンションセンター(岡山)
10. 大嶺 謙. キメラ抗原受容体発現 T リンパ球を用いた B 細胞性腫瘍に対する遺伝子治療. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2014 年 5 月 17 日, 奈良.
11. 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).
12. 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).

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大嶺 謙 (OHMINE, Ken)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90316521

(2)研究分担者

塚原 智典 (TZUKAHARA, Tomonori)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10362120