

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461450

研究課題名(和文)造血幹細胞へのT細胞レセプター遺伝子導入による革新的造血幹細胞移植療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel hematopoietic stem cell transplantation using T-cell receptor gene transduction into hematopoietic stem cells

研究代表者

東 太地 (Taichi, Azuma)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10396252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：移植片対宿主病に依存しない白血病に対する新たな造血幹細胞移植療法の開発の目的で、HLA-A24拘束性WT1特異的T細胞レセプター(TCR)遺伝子を造血幹細胞に遺伝子導入し、ヒト化マウスの実験系を用いて、WT1特異的ヒト細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を試みた。HLA-A24トランスジェニックマウスにWT1遺伝子導入CD34+ヒト造血幹細胞を移入したところ、WT1特異的ヒトCTLが分化増殖することが確認された。これらのCTLはHLA-A24拘束性にヒト白血病細胞を傷害することが示された。本研究によって、造血幹細胞へのがん特異的TCR遺伝子導入による新たな造血幹細胞移植療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We performed the series of experiment in order to establish the novel hematopoietic stem cell transplantation independent on graft-versus-host disease (GVHD) using transduction of HLA-A24-restricted WT1-specific T-cell receptor (TCR) gene into hematopoietic stem cells. Human hematopoietic stem cells were transduced with HLA-A24-restricted and WT1-specific TCR gene and they were transplanted in HLA-A24-transgenic mice. WT1-specific and HLA-A24-restricted human cytotoxic T lymphocytes (CTL) were detected in humanized mice. These CTL exerted HLA-A24-restricted cytotoxicity against human leukemia cells. Our study shows the feasibility of a novel hematopoietic stem cell transplantation using transduction of cancer-specific TCR gene into hematopoietic stem cells.

研究分野：血液学、腫瘍免疫学、細胞治療

キーワード：白血病 がん免疫療法 T細胞レセプター 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植 (Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; allo-HSCT) は、白血病をはじめとする造血器腫瘍に対して治癒が期待できる治療法として、治療成績の向上に多大に貢献してきた治療法である。しかしながら、その治療効果は、移植片対宿主病 (graft-vs-host disease; GVHD) に大きく依存しており、いかに GVHD を来さずに、graft-vs-leukemia (GVL) 効果を誘導することが本治療法の重要な課題となっている。GVHD と GVL はそれぞれ同種 (アロ) 抗原と白血病関連抗原に対する細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) の機能に依存している。つまり、アロ抗原特異的 CTL を誘導せず、白血病特異的 CTL のみを患者体内で選択的に誘導することが可能であれば、その目的が達成できることになる。CTL は T 細胞レセプター (T-cell receptor; TCR) を介して、ウイルス感染細胞やがん細胞表面に発現している標的抗原由来ペプチドと HLA との複合体を特異的に認識する。従って、CTL 由来 TCR 遺伝子を T 細胞に遺伝子導入することによって抗原特異性が獲得できることが期待され、事実われわれはこのことを実証してきた。本研究では、TCR 遺伝子治療の概念をさらに進め、自己造血幹細胞に白血病特異的 TCR 遺伝子を導入し、自己移植することによって、GVHD を全く来さず、GVL を効率よく、また持続的に患者体内で誘導することの着想に至った。

2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対して治癒が期待できる治療法として確立している。しかし、その治療効果は、GVHD に大きく依存しており、いかに GVHD を来さずに、graft-vs-leukemia (GVL) 効果を誘導することが重要な課題となっている。本研究では、GVL 効果をアロ反応に依存せず、腫瘍特異的に自己造血幹細胞移植によって効率的かつ持続的に誘導することを目的とした。その目的を達成するために、白血病特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) から単離した T 細胞レセプター (T-cell receptor; TCR) 遺伝子を自己造血幹細胞に遺伝子導入して、移植することを考案した。本研究では、ヒト化マウスの実験系を用いてその可能性を検証し、将来の臨床応用に結び付けることを目標に掲げた。

3. 研究の方法

(1) WT1 特異的 TCR 遺伝子導入:

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 (図 1)。

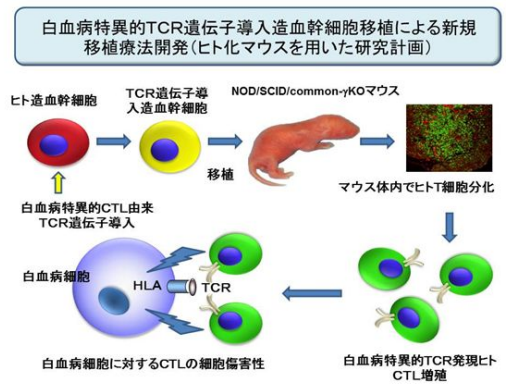


図 1. 研究計画概念図

4. 研究成果

(1) WT1 特異的 TCR 遺伝子導入による抗白血病効果:

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 2)。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 WT1 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。

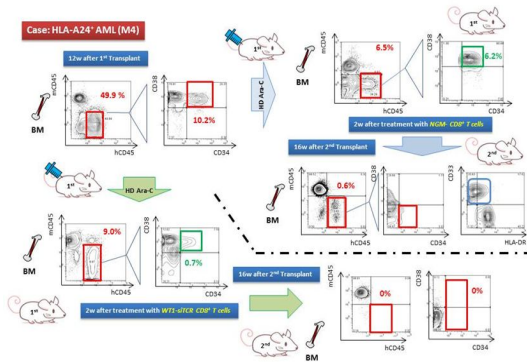


図2. WT1-TCR 遺伝子改変 T 細胞輸注による白血病幹細胞排除の可能性

(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 を来する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3)。

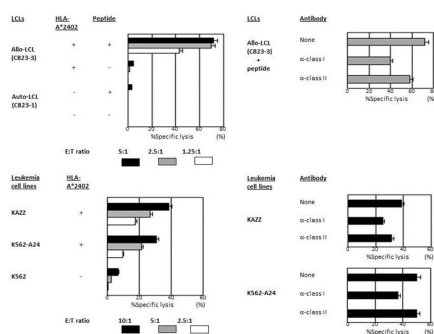


図3. WT1-TCR 遺伝子導入造血幹細胞移植による白血病特異的 CTL のマウス体内での分化・増殖

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7件)

1. Matsubara E, Yamanouchi J, Kitazawa R, Azuma T, Fujiwara H, Hato T, Yasukawa

M. Usefulness of Low-Dose Splenic Irradiation prior to Reduced-Intensity Conditioning Regimen for Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Elderly Patients with Myelofibrosis. Case Rep Hematol. 2016;8751329, 2016. (査読有)

2. Kaneko M, Azuma T, Yasukawa M, Shinomiya H. A fatal case of severe fever with thrombocytopenia syndrome complicated by hemophagocytic lymphohistiocytosis. Kansenshogaku Zasshi. 89:592-596, 2015. (査読有)
3. Azuma T, Suemori K, Murakami Y, Yasukawa M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome mimicking intravascular lymphoma. Rinsho Ketsueki. 56:491-495, 2015. (査読有)
4. Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Dramatic and prompt efficacy of Helicobacter pylori eradication in the treatment of severe refractory iron deficiency anemia in adults. Ann Hematol. 93:1779-1780, 2014. (査読有)
5. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, and Saijo M.: The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. J Infect Dis. 209:816-827, 2014. (査読有)
6. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Azuma T, and Yasukawa M.: Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIb/IX monoclonal IgM antibody. Ann Hematol. 93:711-712, 2014. (査読有)
7. Shikata H, Yakushijin Y, Yamanouchi J, Azuma T, Yasukawa M.: Analysis of chemotherapy-induced neutropenia and optimal timing for prophylactic use of G-CSF in B-cell non-Hodgkin lymphoma patients treated with R-CHOP. Int J Clin Oncol. 19:178-185, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1. Azuma T, Tanimoto K, Asai H, Takeuchi K, Yamanouchi J, Fujiwara H, Hato T, Yasukawa M. Dasatinib combined with IFN- induces a major molecular response in a patient with T315I-CML. 第78回日本血液学会学術集会, パシフィコ横浜, 横浜市西区, 2016年10月13~15日
2. Asai H, Takeuchi K, Tanimoto K, Yamanouchi J, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Clinicopathological analysis of 19 cases of MTX associated LPDs in rheumatoid arthritis. 第78回日本血液学会学術集会, パシフィコ横浜, 横浜市西区, 2016年10月13~15日
3. 谷本 一史, 藤原 弘, 越智 俊元, 東 太地, 竹内 一人, 葛島 清隆, 安川 正貴 治療抵抗性急性骨髄性白血病に対する Aurora Kinase ペプチドワクチン療法. 第75回日本癌学会総会, パシフィコ横浜, 横浜市西区, 2016年10月6~8日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.m
ed1/](http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.m
ed1/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 太地 (Azuma, Taichi)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10396252

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

(4)研究協力者

なし