

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830109

研究課題名(和文) 白血病性幹細胞を標的とした細胞免疫遺伝子治療の開発研究

研究課題名(英文) Development of redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting leukemia stem cells

研究代表者

朝井 洋晶 (ASAI, HIROAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院職員)

研究者番号：00726838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：白血病性幹細胞を標的とした細胞免疫療法確立を目的に、高機能改良型ベクターでWT1を特異的に認識するT細胞受容体(TCR)遺伝子を遺伝子導入した細胞傷害性ヒトTリンパ球(CTL)を用いた研究を続けている。本研究では、WT1を標的とする人工CTLは細胞周期非依存性に白血病細胞を傷害でき、ヒト白血病細胞移植NOGマウスに対する人工CTL治療モデルで継代移植による白血病の誘導が抑制され、白血病性幹細胞を制御できる可能性が示された。さらにWT1-TCR発現CD4陽性T細胞はWT1-TCR-CD8陽性CTLの白血病細胞への集積/遊走を誘導し、細胞傷害性を増強させることが示された。

研究成果の概要(英文)：Suppression of leukemia stem cells (LSC) is reasonably necessary to cure the leukemia. To this end, we are developing a redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting WT1, which LSCs have been shown to overexpress. In this study, we have demonstrated WT1-siTCR/CD8+ T cells killed Fucci-labeled leukemia cell lines irrelevantly to the cell-cycle status of target leukemia cells with in vitro time lapse assay, and also demonstrated WT1-siTCR/CD8+ T cells seem be able to kill cell-cycle quiescent LSCs using a xenograft NOG mouse model in vivo. In addition, we found that WT1-siTCR/CD4+ T cells migrated to leukemia sites, subsequently attracted WT1-siTCR/CD8+ T cells via chemotaxis, and augmented cytotoxic activity against human leukemia through longer survival and enhanced formation of memory T cells by WT1-siTCR/CD8+ T cells. Collectively, our experimental findings strongly suggest that this strategy would be clinically advantageous for the treatment of human leukemia.

研究分野：腫瘍治療学・細胞免疫療法

キーワード：細胞免疫療法 白血病性幹細胞 WT1

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は強力な化学療法により“骨髄中の白血病細胞が減少し、正常造血能が回復する状態”である血液学的寛解に持ち込むことができるが、多くの患者で再発し抗がん剤治療のみで治癒に至る患者は限られている。近年の研究により、白血病におけるがん性幹細胞が同定され(Nature 414:105-111, 2001) その白血病性幹細胞は骨髄ニッチに局在し、細胞周期を静止期に維持することで強力な化学療法に対する抵抗性を発揮することが報告された(Nat Biotechnol 25:1315-21, 2007) 一方、同種造血幹細胞移植により長期寛解を維持できた患者の寛解維持の機序としてドナーリンパ球による免疫学的な抗白血病効果(GVL; Graft-versus-leukemia effect)が中心的な役割を演じていると考えられている(Blood 75: 555-562, 1990)。更に、治療関連毒性の為に同種造血幹細胞移植を施行出来ない高齢者や臓器障害を有する患者では予後は極めて悪い。これらを背景に、世界では現在、化学療法抵抗性白血病患者の治療成績向上に免疫遺伝子治療が新たな治療戦略として注目されている。

我々は、今までにWilms' tumor 1(WT1)、Aurora-A kinase、Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) が白血病関連抗原であることを同定し、これらのタンパク質由来合成ペプチドを用いてHLA-A24 拘束性WT1およびhTERT 特異的CTLクローン、HLA-A*0201 拘束性Aurora-A 特異的CTLクローンをそれぞれ樹立した(Blood 95: 286-293, 2001. Blood 97: 2903-2907, 2001. Blood 113: 66-74, 2009.)。それらCTLクローンからT細胞受容体遺伝子(TCR)を単離し、さらにタカラバイオ株式会社、三重大学との共同研究により、内源性TCR発現を効率に抑制するTCR遺伝子発現ベクターであるsiTCRレトロウイルスベクターを開発した(Cancer Research 69: 9003-9011, 2009.)。

白血病患者の長期寛解維持には、骨髄ニッチに局在し細胞周期静止期にある白血病性幹細胞の制御が重要であるが、この白血病性幹細胞はWilms' tumor1(WT1)を高発現していると報告されており(Sci Transl Med 2: 1-11, 2010.) WT1を標的とした細胞免疫遺伝子治療は白血病患者の長期寛解維持を導く治療として期待されている。

2. 研究の目的

我々は、WT1が白血病関連抗原であり、WT1特異的siTCR遺伝子導入を用いて正常T細胞からHLA-A24 拘束性WT1 特異的CTLを誘導できることを報告し、細胞免疫療法の研究開発を進めてきたが、本研究では、in vitroならびにヒト白血病細胞を移植した免疫不全マウスを用いたin vivo 治療実験系を用いて、WT1 特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が、化学療法抵抗性白血病性幹細胞を体内から排除

して長期寛解に導けるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) in vitroでの検討:

HLA-A2402 拘束性にWT1を特異的に認識するT細胞受容体遺伝子(WT1-siTCR)を組み込んだレトロウイルスベクターに用いて正常Tリンパ球へ遺伝子導入して作成した機能改良型人工CTLが、白血病細胞を細胞周期にかかわらず傷害できるかを、蛍光たんぱく質の発現により細胞周期を可視化できるFucci (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) 遺伝子を導入したHLA-A24陽性WT1 陽性ヒト白血病細胞株であるMEG01/Fucci細胞、WT1 陽性白血病細胞株であるK562細胞にHLA-A24を遺伝子導入したK562-A24/Fucci細胞を標的としてTime-lapse法による直接観察で検討した。

(2) 患者由来の白血病細胞移植ヒト化NOGマウスを用いた検討:

6週齢のNOD/scid/ c^{null} (NOG)マウスへ全身放射線照射による前処置後HLA-A24陽性の白血病患者骨髄から直接分離したヒトCD34陽性白血病細胞を移植したHLA一致ヒト白血病細胞移植NOGマウスに細胞周期依存性抗がん剤であるシタラビン(Ara-C)大量投与を実施1週間後、コントロールT細胞またはWT1特異的人工CTLを毎週1回経静脈的に投与し、約3~4ヶ月後にそれぞれのマウス骨髄中のヒト白血病細胞の残存の有無をフローサイトメトリー法により検討すると同時にその治療後マウス骨髄細胞を次世代マウスへ継代移植し白血病再発誘導する方法を用いて、白血病性幹細胞の制御を検討した。

4. 研究成果

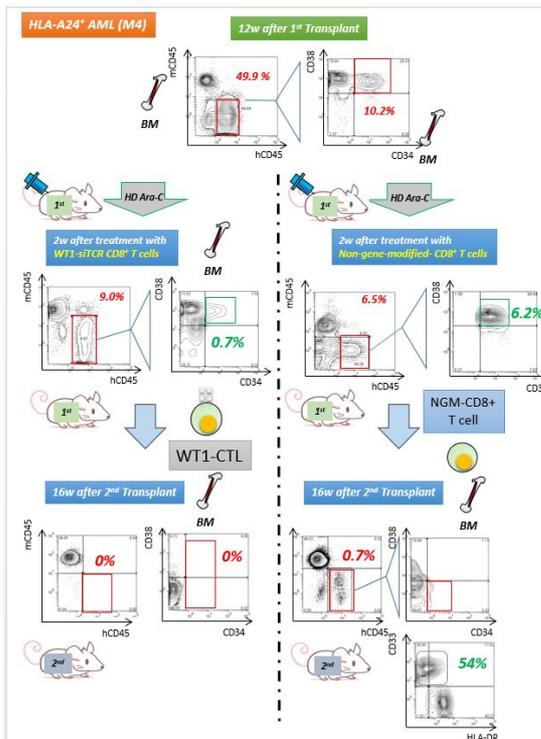
(1) in vitroでの検討:

WT1-siTCR 遺伝子導入して得られた人工CTLは、Time-lapse法を用いた直接観察において、Fucci 遺伝子を導入したHLA-A24陽性かつWT1陽性白血病細胞株(MEG01/Fucci)に対して細胞周期に依存せず細胞傷害活性を発揮した。即ち細胞周期の静止期(G0期)にあることで細胞周期依存性抗がん剤に対する抵抗性を発揮すると考えられている白血病性幹細胞に対しても抗腫瘍効果発揮できる可能性が示された

(2) 患者由来の白血病細胞移植ヒト化NOGマウスを用いた検討:

白血病患者骨髄のCD34陽性細胞をNOGマウスへ継代移植する方法を用いてLeukemia initiating cellとしての白血病性幹細胞の評価が可能であることを確認した。ついで白血病患者骨髄CD34陽性細胞を移植後、細胞周期依存性抗がん剤であるシタラビン投与するとマウス骨髄中の白血病細胞は減少するが、その骨髄抑制期の細胞を継代移植するとヒト化マウスに白血病が誘導されることからマウス骨髄中には抗がん剤抵抗性の白血病

性幹細胞が存在することを確認した。この継代移植モデルを用いて、WT1 特異的人工 CTL による治療（細胞免疫療法群）と遺伝子を導入していないコントロール T リンパ球による治療（コントロール群）を行ったのちに継代マウスの骨髄を評価したところ、コントロール群では白血病の誘導が認められたが、WT1 特異的人工 CTL 治療群は白血病細胞が検出されなかった（図 1）。すなわち抗がん剤治療抵抗性である白血病性幹細胞が遺伝子改変人工 CTL で制御できる可能性が示唆された。これらのデータをもとに論文化を進めている。



（図 1；患者由来の白血病細胞移植ヒト化 NOG マウスを用いた検討の結果）

（3）その他の業績：

ヒトへの臨床応用を視野にいれた安全性に関する検討：

遺伝子改変により得られた WT1 特異的人工 CTL は、試験管内での共培養においてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を傷害しないことを確認できた。また遺伝子導入により HLA-A24 を強制発現させた WT1 を高発現する腎臓たこ足細胞に対しては、試験管内の直接共培養では細胞傷害性を認めたが、HLA-A24 トランスジェニックマウスを用いた人工 CTL の輸注による *in vivo* の検討では、病理組織学的に WT1 特異的人工 CTL の腎臓への特異的な遊走/集積や、腎臓の構造的破壊を認めず、さらには尿たんぱく/血尿などの機能的障害も認めなかった。これらのデータは、WT1 を標的とした人工 CTL を用いた細胞免疫療法における臨床的な腎障害の可能性は低く安全性を示唆すると考えられた。

遺伝子改変人工 CTL の組織遊走能に関する検討：

白血病骨髄組織で高発現が認められるケ

モカインの一つとして CXCL12 (SDF-1) が知られており、そのレセプター遺伝子である CXCR4 (CD184) の発現に関して、WT1-siTCR を遺伝子導入した人工 CTL で検討したところ、WT1-siTCR 遺伝子導入 CD8 陽性 T リンパ球 (WT1 特異的人工 CTL) でも発現を認め、このことが骨髄中への遊走に寄与していると考えられた。加えて、CD4 陽性ヘルパー T リンパ球に WT1-siTCR を遺伝子導入した人工ヘルパー T リンパ球 (WT1 特異的人工 HTL) は WT1 特異的人工 CTL よりも更に高い CXCR4 発現陽性率を認め、トランスウェルを用いた遊走能評価試験においても CXCR4 陽性人工 CTL は CXCL12 濃度依存性に遊走能を発揮した。さらに WT1 特異的人工 HTL は白血病細胞を認識して活性化されるとケモカイン CCL3/CCL4-CCR5 の系を介して WT1 特異的人工 CTL を白血病細胞へ集積させると同時に Th1 ヘルパー機能を介して抗腫瘍効果を増強させるとともに、遺伝子改変していない (WT1 特異的ではない) CD4 陽性ヘルパー T リンパ球と比較して統計学的に有意差をもって WT1 特異的人工 CTL のセントラルメモリー・エフェクターメモリー細胞への分化を促進させた。その過程で人工 CTL 上の IL-7 受容体や細胞内 Bcl2 の発現上昇を認め、記憶幹細胞の誘導が示唆された。この点は現在追跡中である。以上の結果から、WT1 特異的人工 HTL を同時に輸注することで、WT1 特異的人工 HTL がケモカイン CXCR4-CXCL12 系を介して骨髄中に遊走し、骨髄において WT1 を発現する白血病細胞/白血病性幹細胞を認識するとケモカイン CCL3/CCL4-CCR5 の系を介して WT1 特異的人工 CTL を白血病局所へ遊走させるとともに、Th1 ヘルパー機能を介して WT1 特異的人工 CTL の抗腫瘍効果を増強させ、さらには WT1 特異的人工 CTL の免疫記憶細胞化を促すことでより長期間にわたる抗腫瘍効果維持が期待できることを示唆している。

白血病性幹細胞を標的とする場合、腫瘍抗原特異的人工 CTL にくわえ、腫瘍抗原特異的ヘルパー機能を発揮する人工 HTL の併用が有効な方法となり得る可能性が示された（発表論文）。

以上、本研究を通して白血病性幹細胞を標的とする細胞免疫伝子治療に関する新たな知見が得られた。さらに PD-1/PD-L1、CTLA-4 などの免疫チェックポイントが CTL の抗腫瘍活性において負に作用し、その阻害剤投与により臨床的抗腫瘍効果が得られていることから、骨髄性白血病特異的人工 CTL 上の PD-1 分子と白血病細胞上の PD-L1 分子に注目して免疫チェックポイント阻害効果の併用も検討を進めている。

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 1 件)

Fujiwara H, Ochi T, Ochi F, Miyazaki Y, Asai H, Narita M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Antileukemia multifunctionality of CD4+ T cells genetically engineered by HLA classI-restricted and WT1-specific T-cell receptor gene transfer. *Leukemia* 2015;29:2393-2401. 査読有
DOI 10.1038/leu.2015.155.

〔学会発表〕(計 3件)

朝井洋晶、藤原弘、安川正貴ほか、HLA classI 拘束性 WT1 特異的 Th1 および Th17CD4+T 細胞作製の試み、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、大阪府大阪市
朝井洋晶、藤原弘、安川正貴ほか、TCR 遺伝子改変 HLA クラス I 拘束性 CD4 陽性 T 細胞サブタイプ作成の試み、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、神奈川県横浜市
朝井洋晶、藤原弘、安川正貴ほか、HLA classI 拘束性 WT1 特異的 Th1 および Th17CD4+T 細胞作製の試み、第18回日本がん免疫学会総会、2014年7月31日、ひめぎんホール、愛媛県松山市

〔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〕

愛媛大学大学院医学系研究科
血液・免疫・感染症内科学(第一内科)ホームページ
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/schol/int.med1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

朝井 洋晶 (Asai, Hiroaki)
愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)
研究者番号: 00726838

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし