

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860789

研究課題名(和文) 小児脳腫瘍に対するGD2特異的キメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of GD2-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in pediatric patients with brain tumor

研究代表者

平林 耕一 (HIRABAYASHI, Koichi)

信州大学・医学部・助教(特定雇用)

研究者番号：10645534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児脳腫瘍および網膜芽細胞腫にGD2が高頻度で発現していることを確認した。次に、非ウイルス遺伝子導入法であるpiggyBacトランスポゾン法を用いてGD2特異的キメラ抗原受容体を遺伝子導入したT細胞(GD2 CAR T細胞)を作製した。GD2 CAR T細胞とGD2陽性腫瘍細胞株(脳腫瘍および網膜芽細胞腫)を混合培養したところ、GD2 CAR非導入T細胞に比べて明らかに腫瘍細胞数が減少し、抗腫瘍効果が示された。抗腫瘍効果を高めるために、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるポリノスタットを併用したところGD2 CAR T細胞の抗腫瘍効果は高まった。

研究成果の概要(英文)：We found that pediatric brain tumors (medulloblastoma and glioblastoma) and retinoblastoma express GD2 highly. Next, we manufactured GD2-specific chimeric antigen receptor-transduced T cell (GD2 CAR-T cell) with piggyBac transposon system which is a non-viral gene transduction method. GD2 CAR T cell killed GD2-positive tumor cell lines dramatically in vitro. We searched combination drugs to enhance the antitumor ability of the GD2 CAR T cell. We found that histone deacetylase inhibitors, vorinostat, can enhance the antitumor ability of the GD2 CAR T cell.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：キメラ抗原受容体(CAR) 遺伝子改変T細胞療法 小児脳腫瘍 網膜芽細胞腫 ポリノスタット

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 小児脳腫瘍と網膜芽細胞腫に対する治療の現状と課題

小児脳腫瘍は、全小児がんの中で白血病に次いで多く約 20% を占め、小児がんの死因の第一位である。胚細胞腫瘍のように、化学療法や放射線治療で治療が期待できるものもあるが、多くは手術により全摘出または減量し、化学療法、放射線治療を組み合わせることによって根治を目指す。しかし、腫瘍の全摘出は困難なことが多く、抗癌剤が血液脳関門を通過しにくいことから、特に髄芽腫・原始神経外胚葉性腫瘍の髄液播種、脳幹部神経膠腫、転移性脳腫瘍の予後は極めて不良である。また、脳腫瘍に対する手術および放射線照射は、正常中枢神経組織に高度かつ永続的な機能障害をもたらすこともあり、長期生存患者には高頻度に重篤な精神神経障害が残りやすい。

網膜芽細胞腫は小児の眼球内に生じる悪性腫瘍であり、5 歳までに 95% が発症する。原因遺伝子である RB1 遺伝子の異常が生殖細胞系列に認める症例が全体の約 40% を占めている。これらの例では、二次がんのリスクが高く、化学療法や放射線療法によってそのリスクはさらに高まり、放射線治療後の二次がんの発症率は 50% に上る。

小児脳腫瘍や網膜芽細胞腫におけるこれらの問題を解決するためには、腫瘍組織に特異的で、かつ過剰に発現している分子を標的とした新規治療法の開発が期待されている。

### (2) 新しい小児固形腫瘍の治療の開発

神経芽腫の細胞表面に過剰発現する GD2 ガングリオシドを標的とする抗 GD2 抗体を化学療法と組み合わせ、2 年の event-free survival が 20% 向上したことが報告された (N Engl J Med. 2010)。また、GD2 特異的に結合する人工 T 細胞受容体 (キメラ抗原受容体; CAR) を用いた神経芽腫に対する遺伝子改変 T 細胞療法 (CAR T 細胞療法) の比較的良好な臨床成績も米国のペイラー医科大学から報告された (Nature Med. 2008)。これらの治療は、治療成績の向上のみならず、今までの治療に比べ腫瘍特異的で、晩期合併症を軽減することが期待される。GD2 は、神経芽腫のみならず、脳腫瘍、網膜芽細胞腫、Ewing 肉腫においても一部で発現していることが報告されている。小児がんにおいて、GD2 が過剰発現している可能性のある腫瘍の割合は約 40% にのぼる。

### (3) CAR T 細胞療法の課題

米国での CAR T 細胞療法の臨床試験では、遺伝子改変にウイルス法が主に用いられている。レトロウイルスなどによる遺伝子改変は、白血病関連遺伝子の活性化を起こしやすいこと、細胞調製者に発癌ウイルスへの暴露機会を与えること、臨床試験の際に取り扱いが複雑で費用が膨大なことなどが課題とし

てあげられる。このため、ウイルスを使用しない遺伝子改変技術の確立が望まれている。

CD19 を標的にしたリンパ性白血病、リンパ腫患者に対する CAR T 細胞療法の劇的な効果が報告されている。一方、固形腫瘍に対する効果は腫瘍の免疫回避機構や腫瘍内への T 細胞の到達困難などの課題があり、現時点では効果は限定的である。

## 2. 研究の目的

(1) 小児脳腫瘍と網膜芽細胞腫での GD2 発現率を確認する。

(2) 非ウイルス法による遺伝子改変により GD2 CAR T 細胞を作製する。

(3) GD2 CAR T 細胞の脳腫瘍に対する有効性を確認する。

(4) GD2 CAR T 細胞の抗腫瘍効果増強法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 腫瘍での GD2 発現の確認

摘出標本および腫瘍株における GD2 の発現を免疫染色法及びフローサイトメトリー法で解析する。

(2) piggyBac トランスポゾン法を用いた T 細胞への GD2 CAR 導入法および遺伝子改変 T 細胞の新規培養法の開発

DNA プラスミドを用いた非ウイルス遺伝子改変法である piggyBac トランスポゾン法を用いて GD2 CAR T 細胞を作製する。ヒト末梢血 10ml から単核球 (PBMC) を分離する。PBMC に GD2 CAR トランスポゾンベクター (pIR11-GD2CAR.28.z) と piggyBac ベクター (pCMV-PB) の両者を、nucleofection 装置を用いて同時に遺伝子導入する。24 時間後に GD2 CAR 導入 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、IL-15 存在下で 7 日間培養する。CAR の発現している T 細胞を beads で selection し、同様の手順で 2 回目の刺激を行い、IL-15 存在下でさらに 14 日間培養する。T 細胞を培養する培地には、無血清培地である TexMACS (GMP 準拠・動物材料不含) を用いる。遺伝子導入後 7 日目と 14 日目にフローサイトメトリーを用いて T 細胞上の GD2 CAR の発現率を測定する。

(3) GD2 陽性脳腫瘍に対する GD2 CAR T 細胞の抗腫瘍効果の確認

GD2 CAR T 細胞と GD2 発現が確認された腫瘍株を混合培養し、GD2 CAR T 細胞の抗腫瘍効果をフローサイトメトリーを用いて評価する。

(4) GD2 CAR T 細胞の抗腫瘍効果増強に関する併用療法の開発

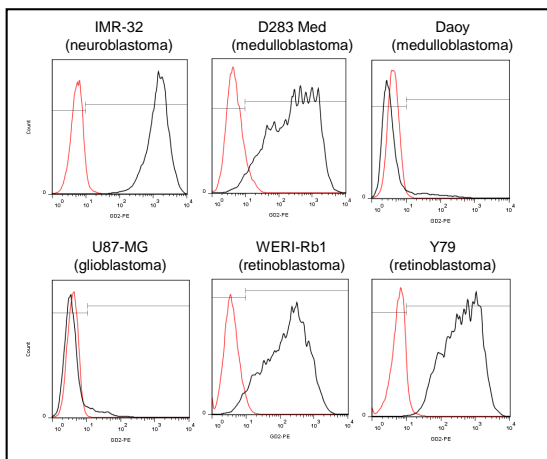
細胞傷害性が少なく、腫瘍の CAR T 細胞へ

の感受性を高める薬剤を探索する。

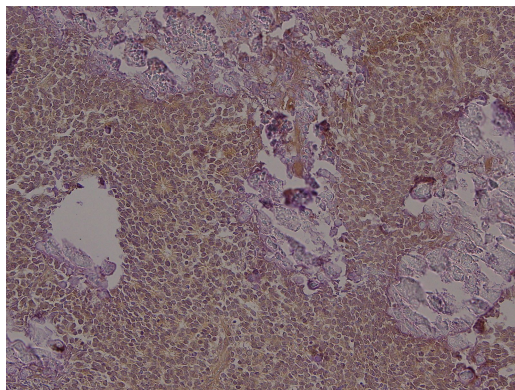
#### 4. 研究成果

##### (1) 小児脳腫瘍と網膜芽細胞腫での GD2 発現

脳腫瘍と網膜芽細胞腫の腫瘍細胞株において、GD2 発現をフローサイトメトリー法で確認した(図1)。網膜芽細胞腫(WERI-Rb-1, Y79)、髄芽腫(D283 Med, Daoy)、神経膠腫(U87-MG)ではGD2の発現が認められた。しかし、神経芽腫(IMR-32)の発現に比べると低発現の細胞株も認められた。さらに網膜芽細胞腫では、摘出検体でもGD2発現を評価した(図2)。9検体すべてでGD2の発現を認めた。以上から、小児脳腫瘍および網膜芽細胞腫はGD2 CAR T細胞療法の対象になり得ることが確認された。



< 図1. 脳腫瘍/網膜芽細胞腫での GD2 発現 >

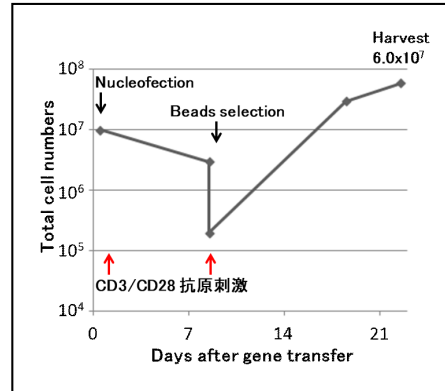


< 図2. 網膜芽細胞腫摘出標本の GD2 発現 >

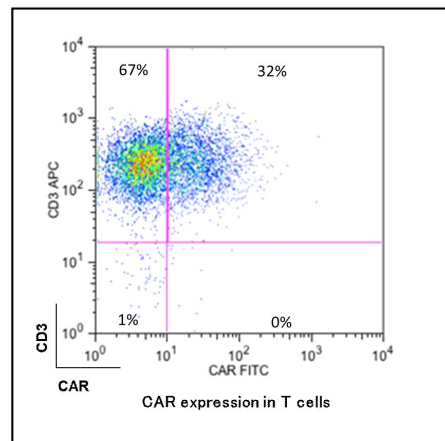
##### (2) PiggyBac トランスポゾン法を用いた GD2 CAR T細胞の開発

当初の想定通り、ヒト末梢血 10ml から 10の7乗位の GD2 CAR T細胞を得られ、臨床応用時に必要な細胞数を得られる可能性が示唆された(図3)。GD2 CARの導入効率は5-15%であった。その後、CARの発現しているT細胞をbeadsでselectionし、さらに培養したところ、最終的にはCAR発現T細胞率は20-60%だった(図4)。培養法に関しては、無血清培地であるTexMACSを用いて培養を行

った。また、動物材料を含まない培地の使用は、臨床応用する際に感染やアレルギー反応の出現などを減少させる利点があるため非常に意義のある結果であると考えられた。



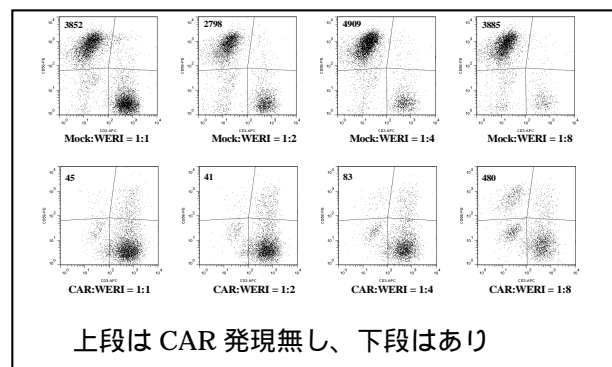
< 図3. GD2 CAR T細胞の細胞数の推移 >



< 図4. Nucleofection後のCAR陽性率 >

##### (3) GD2 CAR T細胞の脳腫瘍・網膜芽細胞腫に対する有効性の確認

GD2 CAR T細胞とGD2陽性腫瘍細胞株を混合培養したところ、GD2CAR非導入T細胞に比べて明らかに腫瘍細胞数が減少し、抗腫瘍効果が示された(図5)。

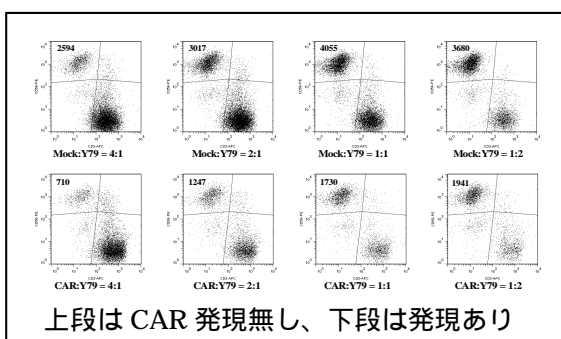


< 図5 網膜芽細胞腫細胞株 WERI-Rb-1 と GD2 CAR T細胞の混合培養 (day4) >

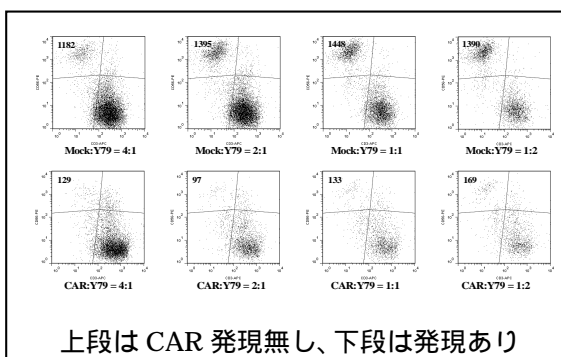
##### (4) GD2 CAR T細胞の抗腫瘍効果増強に関する併用療法の開発

複数の分子標的薬を併用して混合培養実

験を行った。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬であるポリノスタットとの併用により、T 細胞の増殖能に大きな影響を与えずに抗腫瘍効果を増強することを確認した (図 6、図 7)。



< 図 6. 網膜芽細胞腫 Y79 と GD2 CAR T 細胞の混合培養 (ポリノスタット無し、day 4) >



< 図 7. 網膜芽細胞腫 Y79 と GD2 CAR T 細胞の混合培養 (ポリノスタットあり、day 4) >

#### 【研究成果のまとめ】

小児脳腫瘍・網膜芽細胞腫では GD2 の発現を高頻度に認め、GD2 CAR T 細胞療法の対象になると確認できた。また、非ウイルス遺伝子改変法である piggyBac トランスポゾン法を用いた GD2 CAR T 細胞の GD2 陽性脳腫瘍・網膜芽細胞腫に対する抗腫瘍効果も確認できた。固形腫瘍に対する CAR T 細胞の抗腫瘍効果増強についても、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるポリノスタットとの併用が有望であることを突き止めることができた。以上の結果は、GD2 CAR T 細胞療法を本邦で臨床応用するうえで意義のある結果を得られたと考えられる。

#### 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 11 件)

Hirabayashi K, Takatsuki M, Motobayashi M, Kurata T, Saito S, Shigemura T, Nakazawa Y, Sakashita K, Ishizone S, Ota H, Koike K.

Nonocclusive Mesenteric Ischemia after Chemotherapy in an Adolescent Patient with a History of Three Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantations for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Neonatol.* 査読あり、58、2017、81-84. doi: 10.1016/j.pedneo.2014.07.008.

Shibazaki T, Hirabayashi K, Saito S, Shigemura T, Nakazawa Y, Sakashita K, Takagi M, Shiohara M, Adachi K, Nanba E, Sakai N, Koike K. Clinical and laboratory outcomes after umbilical cord blood transplantation in a patient with mucopolisaccharidosis II alpha/beta. *Am J Med Genet A.* 査読あり、170A、2016、1278-1282. doi: 10.1002/ajmg.a.37563.

Hirabayashi K, Yamauchi S, Matsuzaki S, Komatsu K, Sano K, Koike K, Nakazawa Y. Anaplastic Large-Cell Lymphoma of the Left Ventricle Presenting With Arrhythmia and Cerebral Infarction due to Cardiogenic Embolism. *Pediatr Blood Cancer.* 査読あり、63、2016、755-756. doi: 10.1002/pbc.25859.

Hirabayashi K, Kurata T, Horiuchi K, Saito S, Shigemura T, Tanaka M, Yanagisawa R, Matsuda K, Sakashita K, Koike K, Nakazawa Y. Loss of Mismatched HLA on the Leukemic Blasts of Patients With Relapsed Lymphoid Malignancies Following Bone Marrow Transplantation From Related Donors With HLA Class II Mismatches in the Graft Versus Host Direction. *Pediatr Blood Cancer.* 査読あり、63、2016、709-711. doi: 10.1002/pbc.25819.

Shimodaira S, Sano K, Hirabayashi K, Koya T, Higuchi Y, Mizuno Y, Yamaoka N, Yuzawa M, Kobayashi T, Ito K, Koizumi T. Dendritic Cell-Based Adjuvant Vaccination Targeting Wilms' Tumor 1 in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Vaccines (Basel).* 査読あり、3、2015、1004-1018. doi: 10.3390/vaccines3041004.

Higuchi Y, Koya T, Yuzawa M, Yamaoka N, Mizuno Y, Yoshizawa K, Hirabayashi K, Kobayashi T, Sano K, Shimodaira S. Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for the Detection of Wilms' Tumor 1-Specific T Cells Induced by

Dendritic Cell Vaccination. Biomedicines. 査読あり、3、2015、304-315.  
doi: 10.3390/biomedicines3040304.

Chien YH, Abdenur JE, Baronio F, Bannick AA, Corrales F, Couce M, Donner MG, Ficocioglu C, Freehauf C, Frithiof D, Gotway G, Hirabayashi K, Hofstede F, Hoganson G, Hwu WL, James P, Kim S, Korman SH, Lachmann R, Levy H, Lindner M, Lykopolou L, Mayatepek E, Muntau A, Okano Y, Raymond K, Rubio-Gozalbo E, Scholl-Bürgi S, Schulze A, Singh R, Stabler S, Stuy M, Thomas J, Wagner C, Wilson WG, Wortmann S, Yamamoto S, Pao M, Blom HJ. Mudd's disease (MAT I/III deficiency): a survey of data for MAT1A homozygotes and compound heterozygotes. Orphanet J Rare Dis. 査読あり、10、2015、99.  
doi: 10.1186/s13023-015-0321-y.

Shigemura T, Nakazawa Y, Hirabayashi K, Kobayashi N, Sakashita K, Agematsu K, Koike K. Dramatic Improvement in the Multifocal Positron Emission Tomography Findings of a Young Adult with Chronic Granulomatous Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. J Clin Immunol. 査読あり、35、2015、84-86.  
doi: 10.1007/s10875-014-0113-5.

Saito S, Yanagisawa R, Yoshikawa K, Higuchi Y, Koya T, Yoshizawa K, Tanaka M, Sakashita K, Kobayashi T, Kurata T, Hirabayashi K, Nakazawa Y, Shiohara M, Yonemitsu Y, Okamoto M, Sugiyama H, Koike K, Shimodaira S. Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of Wilms tumor 1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: a case report and review of the literature. Cytotherapy. 査読あり、17、2015、330-335.  
doi: 10.1016/j.jcyt.2014.10.003.

Hirabayashi K, Nakazawa Y, Sakashita K, Kurata T, Saito S, Yoshikawa K, Tanaka M, Yanagisawa R, Koike K. Reduced-toxicity myeloablative conditioning consisting of 8-Gy total body irradiation, cyclophosphamide and fludarabine for pediatric hematological malignancies. Sci Rep. 査読あり、4、2014、6942.

doi: 10.1038/srep06942.

Hirabayashi K, Nakazawa Y, Matsuura H, Hara Y, Kurata T, Hirabayashi K, Saito S, Yoshikawa K, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Koike K. Risk factors for diabetes mellitus and impaired glucose tolerance following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with hematological malignancies. Int J Hematol. 査読あり、99、2014、477-486.  
doi: 10.1007/s12185-014-1536-8.

〔学会発表〕(計1件)

平林耕一、小児固形腫瘍に対する非ウイルス遺伝子改変 GD2 特異的 T 細胞療法の開発、信州血液懇話会、2014.9.20、ホテルブエナビスタ(長野県)

〔図書〕(計1件)

Shimodaira S, Hirabayashi K, Yanagisawa R, Higuchi Y, Sano K, Koizumi T. Codon Publications, Wilms Tumor [Internet]、2016、294 (105-123)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 耕一 (HIRABAYASHI, Koichi)  
信州大学・医学部・助教(特定雇用)  
研究者番号: 10645534