

平成30年6月14日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04858

研究課題名(和文) 新規遺伝子改変T細胞による難治性白血病の治癒を目指した治療戦略

研究課題名(英文) Development of novel gene-modified T cell therapy against chemotherapy-resistant leukemia

研究代表者

安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60127917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規遺伝子改変T細胞技術を開発し、以下の成果が得られた。1) WT1特異的TCR発現ベクターを用いて作製したWT1-TCR-T細胞を養子免疫することによって、化学療法抵抗性白血病幹細胞を排除できた。2) CD16-CD3 キメラレセプター発現T細胞が抗体療法との併用によって、腫瘍細胞増殖を著明に抑制した。3) HLA-A2/NY-ESO-1157特異的CAR-T細胞を作製し、骨髄腫細胞など腫瘍細胞をHLA-A2拘束性に傷害することを示した。4) HLA-A2/NY-ESO-1157特異的二重特異抗体を作製し、末梢血T細胞がCAR-T細胞同様に抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We performed the series of experiment in order to establish the novel gene-engineered immunotherapy targeting hematological malignancies. 1) WT1-TCR-gene-transduced CTLs exerted cytotoxicity against chemotherapy-resistant leukemia stem cells. 2) CD16-CD3 chimeric antigen receptor gene-modified CD8+ T cells showed strong ADCC activity in the presence of monoclonal antibody targeting malignant cells. 3) HLA-A2/NY-ESO-1157 CAR-T cells appeared to exert HLA-A2-restricted cytotoxicity against hematopoietic malignancy including myeloma cells. 4) Peripheral blood CD8 T cells showed HLA-A2-restricted cytotoxicity against tumor cells in the presence of HLA-A2/NY-ESO-1157-bispecific antibody. These data strongly suggest that immunotherapy using gene-modified CTLs can establish the cure of chemotherapy-resistant hematological malignancies.

研究分野：血液学、感染症学、腫瘍免疫学、細胞治療

キーワード：がん免疫療法 遺伝子改変T細胞 CAR-T細胞 T細胞レセプター 白血病 WT1 NE-ES01 CD16

1. 研究開始当初の背景

2013年、国際的に権威ある科学雑誌 Science 誌は、Breakthrough of the year 2013 に、Cancer immunotherapy を選出した。その理由は、CTLA-4やPD-1/PD-L1などの免疫系を負に制御するいわゆる免疫チェックポイント機構を正に転換できる抗体が臨床の場において用いることが可能になり、その臨床効果が示された事である。特に、抗 PD-1 抗体ニボルマブは世界に先駆けてわが国で製造販売承認が得られ、大きな期待を集めるとともに、がん治療における位置づけが議論になっている。もう一つのブレイクスルーは、chimeric antigen receptor (CAR)や T-cell receptor (TCR) の遺伝子改変 T 細胞を用いた adoptive immunotherapy (T 細胞養子免疫療法) の驚くべき抗腫瘍効果である。CAR ならびに TCR 遺伝子改変 T 細胞療法の抗腫瘍効果は今や万人の認めるところであり、現在の課題は T 細胞の過剰反応や正常組織への cross-reactivity などに起因する有害事象を回避する安全性の担保である。CAR ならびに TCR 遺伝子改変 T 細胞療法は次世代のがん治療の中心的役割を担うと期待されているが、様々な課題も山積しているのが現状である。まず、CAR に関しては、1) 対象疾患によって標的抗原分子を使い分ける必要があり、理想的 binding avidity を有する様々な種類の CAR-T 細胞を作製しなければならない煩雑性があること、2) 重篤な有害事象を回避し選択的に抗腫瘍効果を引き出せる T 細胞活性化ドメインを有する理想的 CAR vector が未だ完成されていないことなどが挙げられる。他方 TCR 遺伝子治療に関しても、1) 正常細胞に cross-reactivity を示さない理想的標的抗原が未だに明らかになっていないこと、2) 有害事象を回避できる理想的 binding affinity を有する TCR 遺伝子が限られていることなどが挙げられる。また、共通の課題として、1) 体内輸注後の継続的活性化や増殖が期待できる方法の確立、2) エフェクター T 細胞の腫瘍病変局所への集積、3) がん幹細胞を標的にし、その完全排除が期待できることなどが挙げられる。他方、様々な悪性腫瘍に対して抗体療法の効果が期待されているが、その効果は限定されている。抗体療法における治療成績向上のためには、抗体の antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 効果を上げる工夫が必要である。本研究では、遺伝子改変 T 細胞養子免疫療法と抗体療法におけるこれらの課題を解決し、次世代のがん免疫細胞遺伝子治療を確立することを目指し研究を遂行した。

2. 研究の目的

我々の研究グループはこれまで、遺伝子改変 T 細胞を用いて主として白血病幹細胞を標的とした、「治癒を目指す真のがん免疫療法」の開発を行ってきた。本研究では、様々な工夫によって、上記した現在の遺伝子改変

T 細胞療法の様々な課題を解決し、新規遺伝子改変 T 細胞が、化学療法抵抗性の白血病を始めとする造血器腫瘍細胞を体内から完全に排除できることを、ヒト化マウス実験系を用いて直接的に証明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. WT1 特異的 TCR 遺伝子改変 T 細胞の作製と白血病に対する抗腫瘍効果：

WT1 特異的 HLA-A24 拘束性 CTL クローンから TCR 遺伝子を単離し、内在性 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、ヒト CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入し、その抗白血病効果を *in vitro* ならびに *in vivo* 実験系で検討した。

2. CD16-CD3 ζ キメラレセプター-遺伝子発現 T 細胞の作製と機能的解析：

CD16-CD3 ζ キメラレセプターベクターを作製し、末梢血 CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入した。CD16-CD3 ζ 発現 CTL の抗体併用による抗腫瘍効果を *in vitro* ならびにヒト腫瘍細胞移植免疫不全 NOG マウスを用いた *in vivo* 実験系によって検討した。

3. HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 CAR-T 細胞の作製とその機能解析：

HLA-A*02:01/NY-ESO-1157-165(A2/NY-ESO-1157) を特異的に認識する抗体 (clone 3M4E5) の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカー配列で連結して、HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 scFv (3M4E5-scFv) を作製した。3M4E5-scFv を、CD28 膜貫通領域、CD3 ζ 鎖を持つ第二世代 CAR に組み込んで、3M4E5-CAR を作製した。CAR 遺伝子導入 T 細胞を検出するために、NGFR (nerve growth factor receptor) 遺伝子をタグ遺伝子として利用した。一方、ヒト CD3 に結合する T 細胞刺激抗体 (clone OKT3) の可変領域配列を同様にリンカー配列で連結して、ヒト CD3 特異的 scFv (CD3-scFv) も同様に作製した。3M4E5-scFv と CD3-scFv とをリンカー配列で連結して、HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 二重特異性抗体 (BsAb: bispecific antibody) を作製した。BsAb には 6xHis 標識して、精製および検出が可能となるよう工夫した。ヒト末梢血単核球 (PBMCs) を採取、保存し研究に用いた。100 U/mL IL-2、50 ng/mL ヒト CD3 抗体 (OKT3) 存在下においてヒト T 細胞を刺激増幅し、3M4E5-CAR 遺伝子を導入した。具体的には、3M4E5-CAR をレトロウイルスベクターに組み込み、PG13 細胞株に遺伝子導入して、T 細胞指向性をもつレトロウイルスを作製し、ヒト T 細胞に遺伝子導入した。次に、3M4E5-CAR 遺伝子導入 T 細胞の機能解析を行った。HLA-A2 テトラマー (HLA-A2/NY-ESO-1157 テトラマー、HLA-A2/HIV Gag77 テトラマー) を用いて 3M4E5-CAR 導入 T 細胞を染色し、その標的特異性を確認した。また、HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性標的細胞に対するサイトカイ

ン産性能についても、細胞内サイトカイン染色法を用いて検討した。

4 . HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 BsAb の作製とその機能解析 :

ヒト末梢血単核球を採取、保存し研究に用いた。3M4E5-BsAb を 293T 細胞に遺伝子導入して、その上清を回収し、3M4E5-BsAb タンパクを精製した。3M4E5-BsAb が標的的特異的に結合することを、PE 標識抗 His 抗体を用いて検討した。また、3M4E5-BsAb 存在下に、ヒト末梢血 T 細胞と HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性標的細胞とを共培養して、T 細胞における HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的サイトカイン産生能についても細胞内サイトカイン染色法を用いて検討を行った。

5 . HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 scFv 改変抗体による in vivo 抗骨髄腫効果の検討 :

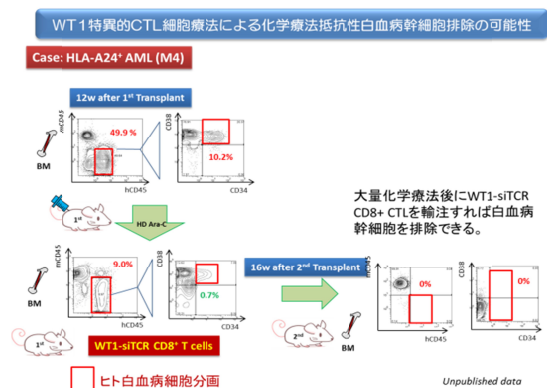
HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性骨髄腫細胞株 (U266) に luciferase 遺伝子を導入して、U266/SLR 細胞株を樹立した。NOG マウスに移植して骨髄腫モデルマウスを作製した後、3M4E5-CAR 導入 T 細胞、もしくは T 細胞と 3M4E5-BsAb とを輸注して、それぞれの in vivo 抗骨髄腫効果を検討した。

4 . 研究成果

1 . WT1 特異的 TCR 遺伝子改変 T 細胞の作製と白血病に対する抗腫瘍効果 :

末梢血 T 細胞に遺伝子導入したところ、TCR 発現 T 細胞 (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。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 (図 1)。

図 1 . WT1-TCR 遺伝子改変 T 細胞による化学療法抵抗性白血病幹細胞の排除



2 . CD16-CD3 ζ キメラレセプター遺伝子発現 T 細胞の作製と機能的解析 :

CD16-CD3 ζ -CAR 発現 CTL は、CD20 陽性悪性リンパ腫細胞ならびに Her2/neu 陽性乳がん細胞に対して、それぞれ rituximab および trastuzumab 添加時に高い ADCC 活性を呈することが明らかとなった。また、成人 T 細胞白血病細胞に対する mogamulizumab の抗腫瘍効果の向上も確認できた。さらに、CD20 陽性悪性リンパ腫細胞 Her2/neu 陽性乳がん細胞および成人 T 細胞白血病細胞を免疫不全 NOG マウスに移植し、CD16-CD3 ζ -CAR 発現 CTL の in vivo 抗腫瘍効果を検討したところ、それぞれ rituximab、trastuzumab、mogamulizumab を併用した場合のみに高い腫瘍細胞増殖抑制効果が認められた。

3 . HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 CAR-T 細胞の機能解析 :

3M4E5-CAR 導入 T 細胞は、HLA-A2/NY-ESO-1157 テトラマーに特異的に染色された。さらに、異なる 5 人のドナーから樹立した 3M4E5-CAR 導入 T 細胞は、CD8⁺ T 細胞も CD4⁺ T 細胞も、どちらも再現性をもって HLA-A2/NY-ESO-1157 テトラマーによって染色された。3M4E5-CAR 導入 CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞は、NY-ESO-1157 ペプチドをパルスした HLA-A*02:01 陽性である T2 細胞を選択的に認識して、各サイトカインを産生した。

4 . HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 BsAb を用いた T 細胞活性化解析 :

精製した 3M4E5-BsAb は、NY-ESO-1157 ペプチドをパルスした T2 細胞に特異的に結合した。また、末梢血未刺激 T 細胞は、NY-ESO-1157 ペプチドをパルスした T2 細胞を特異的に認識して、各サイトカインを産生した。

5 . HLA-A2/NY-ESO-1157 特異的 scFv 改変抗体による in vivo 抗骨髄腫効果 :

HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性 U266/SLR 細胞株を NOG マウスに経静脈的に輸注した。輸注 11 日目に、発光イメージング法によって U266/SLR の生着を確認した。生着を確認後、control T 細胞、3M4E5-CAR 導入 T 細胞、また、T 細胞と共に 3M4E5-BsAb、もしくは irrelevant BsAb を経静脈的に輸注した。その結果、3M4E5-CAR 導入 T 細胞投与群、T 細胞/3M4E5-BsAb 投与群において抗骨髄腫効果を確認した。

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 21 件)

1. Casey N, Fujiwara H, Azuma T, Murakami Y, Yoshimitsu M, Masamoto I, Nawa Y, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, and Yasukawa M: An unusual, CD4 and CD8 dual-positive, CD25 negative, tumor cell

phenotype in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2018 in press. (査読有)

2. Ishizaki J, Takemori A, Suemori K, Matsumoto T, Akita Y, Sada K, Yuzawa Y, Amano K, Takasaki Y, Harigai M, Arimura Y, Makino H, Yasukawa M, Takemori N, and Hasegawa, H.: Targeted proteomics reveals promising biomarkers of disease activity and organ involvement in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther*. 19:218, 2017. (査読有)

3. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, Ikeda H, Tanimoto K, Terakura S, Mutara M, Inaguma Y, Masuya M, Inoue N, Kidokoro T, Okamoto S, Tomura D, Chono H, Nukaya I, Mineno J, Naoe T, Emi N, Yasukawa M, Katayama N, and Shiku H.: Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood* 130:1985-1994, 2017. (査読有)

4. Liu S, Hasegawa H, Takemasa E, Suzuki Y, Oka K, Kiyoi T, Takeda H, Ogasawara T, Sawasaki T, Yasukawa M, and Maeyama K.: Efficiency and safety of CRAC inhibitors in human rheumatoid arthritis xenograft models. *J Immunol*. 199:1584-1595, 2017. (査読有)

5. Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M.: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 28:189-192, 2017. (査読有)

6. Yamanouchi J, Hato T, Shiraishi S, Takeuchi K, Yakushijin Y, and Yasukawa M.: Vancomycin-induced immune thrombocytopenia proven by the detection of vancomycin-dependent anti-platelet antibody with flow cytometry. *Intern Med*. 55:3035-3038, 2016. (査読有)

7. Adnan E, Matsumoto T, Ishizaki J, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M, and Hasegawa H.: Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal for functional regulatory T cell induction – a comparative study. *Clin Immunol*. 173:96-108, 2016. (査読有)

8. Yamada T, Kanoh M, Nabe S, Yasuoka T, Suzuki J, Matsumoto A, Kuwahara M, Maruyama S, Fujimoto T, Sakisuka R, Yasukawa M, and Yamashita M.: Menin plays a critical role in the regulation of the antigen-specific CD8+ T cell response upon *Listeria* infection. *J. Immunol*. 2016. 197:4079-4089, 2016. (査読有)

9. Yasuoka, T., Kuwahara, M., Yamada, T., Maruyama, S., Suzuki, J., Taniguchi, M., Yasukawa, M. and Yamashita, M.: The transcriptional repressor Gfi1 plays a critical role in the development of NKT1- and NKT2-type iNKT cells. *PLoS One*. 11:e0157395, 2016. (査

読有)

10. Kuwahara M, Ise W, Ochi M, Suzuki J, Kometani K, Maruyama S, Izumoto M, Matsumoto A, Takemori N, Takemori A, Shinoda K, Nakayama T, Ohara O, Yasukawa M, Sawasaki T, Kurosaki T, and Yamashita M.: Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. *Nat Commun*. 7:12596, 2016. (査読有)

11. Casey, N.P., Fujiwara H., Tanimoto, K., Okamoto, S., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., and Yasukawa M.: A functionally superior second-generation vector expressing an Aurora Kinase-A-specific T-cell receptor for anti-leukaemia adoptive immunotherapy. *PLoS One* 11:e0156896, 2016. (査読有)

12. Suzuki J, Maruyama S, Tamauchi H, Kuwahara M, Horiuchi M, Mizuki M, Ochi M, Sawasaki T, Zhu J, Yasukawa M, Yamashita M.: Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the Th1 program in activated CD4 T cells. *Immunology* 147:476-487, 2016. (査読有)

13. Najima Y, Tomizawa-Murasawa M, Saito Y, Watanabe T, Ono R, Ochi T, Suzuki N, Fujiwara H, Ohara O, Shultz LD, Yasukawa M, and Ishikawa F.: Induction of WT1 specific human CD8+ T cells from human HSCs in HLA class I Tg NOD/SCID/Il2 γ KO mice. *Blood* 127:722-734, 2016. (査読有)

14. Tanaka H, Fujiwara H, Ochi F, Tanimoto K, Casey N, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Sugiyama T, Barrett J, and Yasukawa M.: Development of engineered T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor to improve the clinical efficacy of mogamulizumab therapy against adult T cell leukemia. *Clin Cancer Res*. 22:4405-4416, 2016. (査読有)

15. 安川正貴 造血器腫瘍に対する免疫療法の進展 *日本内科学雑誌* 105:1061-1066, 2016. (査読無)

16. 越智俊元、安川正貴 AMLにおけるMRDと免疫療法、ペプチドワクチン療法の現状 *血液フロンティア* 26:1263-1272, 2016. (査読無)

17. Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, Niiya T, Nakamura H, and Yasukawa M.: A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia. *Ann Hematol*. 94:1599-1600, 2015. (査読有)

18. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, Fujiwara H, Yasukawa M, Butler MO, and Hirano N.: Optimization of T-cell reactivity by exploiting TCR chain centricity for the purpose of safe and effective antitumor TCR gene therapy. *Cancer Immunol Res*. 3:1070-1081, 2015. (査読有)

19. Fujiwara H, Ochi T, Ochi F, Miyazaki Y, Asai H, Narita M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima

K, Shiku H, and Yasukawa M: Antileukemia multifunctionality of CD4+ T cells genetically engineered by HLA class I-restricted and WT1-specific T-cell receptor gene transfer. *Leukemia* 29:2393-2401, 2015. (査読有)

20. Onishi S, Adnan E, Ishizaki J, Miyazaki T, Tanaka Y, Matsumoto T, Suemori K, Shudou M, Okura T, Takeda H, Sawasaki T, Yasukawa M, and Hasegawa H.: Novel autoantigens associated with lupus nephritis. *PLoS One* 10:e0126564, 2015. (査読有)

21. 安川正貴 免疫チェックポイントのコントロールで造血器腫瘍を治療できるか 内科 116:1036-1039, 2015. (査読無)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Masaki Maruta, Toshiki Ochi, Kazushi Tanimoto, Taichi Azuma, Hiroshi Fujiwara, and Masaki Yasukawa. Development of T-Cell Therapy By Exploiting Modified Antibodies Specific for A2/NY-ESO-1 for Refractory Myeloma. American Society of Hematology 2017 Annual Meeting. 2017年12月06日 Atlanta, USA

2. Kazushi Tanimoto, Hiroshi Fujiwara, Isao Tawara, Masahiro Masuya, Shinichi Kageyama, Tetsuya Nishida, Makoto Murata, Seitaro Terakura, Yoshiki Akatsuka, Hiroaki Ikeda, Yoshihiro Miyahara, Ikuei Nukaya, Kazutoh Takesako, Nobuhiko Emi, Naoyuki Katayama, Hiroshi Shiku, Masaki Yasukawa. Phase I Clinical Trial of Adoptive Immunotherapy for Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome, Using Gene-Modified Autologous Lymphocytes Expressing WT1-Specific T-Cell Receptor. American Society of Hematology 2016 Annual Meeting. 2016年12月05日 San Diego, USA

3. Hiroaki Ikeda, Yasushi Akahori, Motohiro Yoneyama, Yuki Orito, Yoshihiro Miyahara, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Fujiwara, Masaki Yasukawa, Hiroshi Shiku. Immunotherapy with Chimeric Antigen Receptor Targeting Intracellular WT1 Gene Product Complexed with HLA-A*24:02 Molecule. American Society of Hematology 2015 Annual Meeting. 2015年12月04日 Orland, USA

4. Nicholas Casey, Hiroshi Fujiwara, Kazushi Tanimoto, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kiyotaka Kuzushima, Hiroshi Shiku, Masaki Yasukawa. Targeting Aurora Kinase with a Superior T-Cell Receptor Gene-Transfer Vector. American Society of Hematology 2015 Annual Meeting. 2015年12月04日 Orland, USA

〔図書〕(計 1 件)

1. 安川正貴 「細胞免疫療法」 血液疾患最新の治療 2017 - 2019 南江堂 334-338頁 東京 2017

2.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

藤原 弘 (Fujiwara, Hiroshi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20398291

(4)研究協力者

なし