

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09842

研究課題名(和文) EBウイルス関連腫瘍に対するiPS細胞由来T細胞療法の開発

研究課題名(英文) The development of iPSC-derived CTL therapy for EBV-associated lymphoma

研究代表者

安藤 美樹 (Ando, Miki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10424251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究グループは、機能的に若返ったiPS細胞由来抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が、長期間にわたりマウス生体内で生存できることを証明した。そして、末梢血由来のT細胞とは異なり、iPS細胞由来のエプスタイン・バール(EB)ウイルス特異的CTLが、極めて難治性のリンパ腫であるNK細胞リンパ腫の増殖を長期間にわたって強力に抑え続けることを見出し、NK細胞リンパ腫を治癒することに成功した。本研究はヨーロッパ血液学会雑誌であるHaematologica オンライン版に2019年7月11日付けで先行公開された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、iPS細胞由来EBウイルス特異的CTLを用いた細胞療法が難治性のEBウイルス関連リンパ腫の強力な新規治療法となる可能性を示唆した。また、投与したiPS細胞由来EBウイルス特異的CTLが生体内で長期にわたって生存し、腫瘍を排除し続けるという結果はT細胞の若返りという意味でも非常に有望であり、我々の研究グループが計画を進めている「EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りT細胞療法」の臨床研究実現化に向けた大きな加速が予想される。

研究成果の概要(英文)：Antigen-specific T lymphocytes (CTL) generated from iPSC have higher proliferative capacity and longer telomeres than the original CTL and are functionally rejuvenated (rejT). We could generate EBV-CTL clones from donors and T-iPSCs were subsequently established from each CTL clone. All T-iPSCs derived from various EBV antigen-specific CTLs efficiently differentiated into rejT. These rejT had equally high specificity while showing stronger cytotoxicity against EBV-infected tumor cell lines when compared to the original EBV-CTL. We also demonstrated prolonged and robust eradication of EBV+ NK cell lymphoma in vivo by EBV-rejT, with rejT persisting as central memory T cells in mouse spleen for at least 6 months. We believe that rejT therapy provides a promising and safe approach to “off-the-shelf therapy” for EBV-associated lymphomas.

研究分野：血液学、再生医学、遺伝子免疫細胞療法

キーワード：CTL iPSC由来若返りCTL EBウイルス関連リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

EBウイルスは、バーキットリンパ腫や上咽頭癌ではほぼ100%の感染を認め、ヒト腫瘍ウイルスとして知られている。びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の20%、ホジキンリンパ腫の40%、節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)では90%以上の症例にEBウイルスが感染しており、中でも特にENKLは多剤耐性で、通常のリンパ腫に用いる抗癌剤に耐性を示し極めて予後が悪い。日本臨床腫瘍研究グループの報告では、悪性リンパ腫の通常の化学療法を行なった場合の1年生存率は10%であったのに対し、L-アスパラギナーゼを含むSMILE療法では55%と劇的に改善した。しかしL-アスパラギナーゼに不応性の症例があり、また肝機能障害によりL-アスパラギナーゼを中断する症例も経験する。そのような患者では有効な救援療法がなく非常に予後が悪いため、寛解が期待できるような有効な治療法の開発が必要である。

2. 研究の目的

悪性黒色腫など一部の腫瘍に対する、抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)療法の有効性は既に確立されているが、慢性的な感染状態によりCTLが疲弊、老化し、しばしば効果を発揮できないことが知られている。我々の研究グループはHIV-1感染患者のCTLから樹立したiPS細胞(iPSC)から、再びHIV-1ウイルス特異的CTLを再分化誘導する技術開発に成功している(Nishimura et al. Cell Stem Cell 2013)。iPSCから誘導されたCTLは抗原特異性を維持しつつ、高い増殖能とテロメア長の伸展を認め、機能的な若返りを認めた(rejuvenated CTL; rejT)。しかし当時iPSC由来rejTの*in vivo*での抗腫瘍効果が証明されていなかったため、我々はEBウイルス感染腫瘍モデルを作製した。腫瘍量は生体内蛍光イメージングで経時的に評価した。無治療マウスでは腫瘍が経時的に増大するのに対し、EBウイルス特異的rejTを投与したマウスグループでは明らかな腫瘍縮小を認めた。更に臨床応用を目指し、自殺遺伝子iCaspase9によるアポトーシス誘導システムを構築しiPSC由来rejT療法の安全を確保した(Ando et al. Stem Cell Reports 2015)。このように有効性と安全性を確立したため、iPSC技術を用いる難治性腫瘍に対する新規治療開発のための基礎的検討を計画した。本研究は、ENKL、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫などの難治性EBウイルス関連腫瘍患者ドナーからEBウイルス特異的rejTを実際に作製できるか検討し、そのEBウイルス特異的rejTがEBウイルス感染腫瘍に対し、十分な抗腫瘍効果を示すか確認することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) リンパ腫細胞のEBウイルス抗原の発現解析
初発、再発・難治悪性リンパ腫の患者を対象に、インフォームドコンセントを行い同意が得られた患者の登録を行った。腫瘍細胞のEBウイルス感染の有無は、リンパ節生検の病理標本よりEBER(EBV-encoded small RNAs)を*in situ hybridization*法を用いて判定した。
- 2) ドナー末梢血単核球からEBウイルス特異的CTL作製とそのT細胞機能評価
ペプチドで刺激したドナー末梢血単核球より抗原特異的CTLを誘導後、シングルセルクローニングを行なった。機能解析のため、それぞれのCTLクローンのEBウイルス抗原(LMP1, LMP2, BZLF1)に対する抗原特異性をテトラマー染色で確認した。EBウイルス感染細胞(ドナー由来リンパ芽球様細胞(LCL))に対する殺細胞効果は⁵¹Cr放出試験で評価した。
- 3) EBウイルス特異的CTLクローンからT-iPSCの樹立
CTLクローンより山中4因子(OSKM)とSV40 large T抗原を2つのセンダイウイルスベクターを用いT-iPSCを樹立した。
- 4) iPSC細胞由来EBウイルス特異的CTL作製とT細胞機能評価
樹立したT-iPSCを10T1/2というフィーダー細胞上にまき、2週間培養後できた袋状のものの中から血球前駆細胞を取り出し、notch ligandを発現させた10T1/2細胞上に移しFLT-3L, SCF, IL7存在下で更に4週間培養した。浮遊細胞を回収し、TCR刺激後、CD8陽性テトラマー陽性細胞をセレクションした。抗原特異性をテトラマー染色で、EBウイルス感染細胞(ドナー由来リンパ芽球様細胞(LCL))に対する殺細胞効果は⁵¹Cr放出試験で評価した。
- 5) 末梢血由来EBウイルス特異的CTLとiPS細胞由来EBウイルス特異的CTLの*in vivo*での抗腫瘍効果の比較
NOGマウスにルシフェラーゼでラベルしたENKL細胞株であるNK-YSを腹腔内注射後、無治療群と2つの治療群にわけ、HLA一致の末梢血由来LMP2抗原特異的CTL(LMP2-

CTL)、もしくはiPSC由来LMP2-rejTを週1回、計3回投与した。生体内蛍光イメージングにより腫瘍量をモニター後末梢血由来CTLとiPS細胞由来CTLで腫瘍縮小効果と生存期間延長効果を比較した。

- 6) 免疫チェックポイント阻害剤併用による抗腫瘍効果増強の可能性を探る
末梢血由来LMP2-CTLもしくはiPSC由来LMP2-rejTに抗PD-1抗体を併用した場合、抗腫瘍効果が増強するか検討した。

4. 研究成果

現在までに13名のEBウイルス関連リンパ腫患者(ENKL 3名、ホジキンリンパ腫 2名、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 3名、メソトレキセート関連リンパ増殖性疾患 5名)と1名の健常人ドナーにご登録いただいた。誘導開始した8名のドナー末梢血よりLMP1, LMP2, BZLF1など様々なEBウイルス抗原に特異的なCTLクローンの誘導に成功し、iPSC樹立とiPSC由来rejTの誘導を行なった。誘導したLMP1/2もしくはBZLF-1抗原特異的rejTともとの末梢血CTLのEBウイルス関連リンパ腫に対する細胞傷害活性をクロム放出試験で比較検討した。LMP1/2抗原特異的rejT、BZLF-1抗原特異的rejTは、末梢血CTLと同等かそれ以上の細胞傷害活性を持つことが確認できた。

またEBウイルス関連リンパ腫の中でも特に治療抵抗性で、有効な救済療法のないENKLに対し、EBウイルス特異的rejTが有効であるかマウスモデルを用いて検討した。その結果、LMP2抗原特異的rejTは長期間にわたり生体内でメモリーT細胞として存在し、腫瘍を排除し続けたことが確認できた。一方で末梢血CTLでは短期間では腫瘍抑制効果を認めたが、長期間の観察では生存期間延長効果は認めなかった。またLMP2-rejTのENKLに対する抗腫瘍効果は強力であり、抗PD-1抗体の併用による腫瘍抑制増大効果は認めなかった。

これらの成果はHaematologicaに報告し、2019年7月にオンライン先行掲載、2020年3月号に掲載となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ando Miki, Ando Jun, Yamazaki Satoshi, Ishii Midori, Sakiyama Yumi, Harada Sakiko, Honda Tadahiro, Yamaguchi Tomoyuki, Nojima Masanori, Ohshima Koichi, Nakauchi Hiromitsu, Komatsu Norio | 4. 巻 105 |
| 2. 論文標題 Long-term eradication of extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type, by induced pluripotent stem cell-derived Epstein-Barr virus-specific rejuvenated T cells in vivo | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Haematologica | 6. 最初と最後の頁 796 ~ 807 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.223511 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miki Ando, Jun Ando, Tadahiro Honda, Midori Ishii, Hiromitsu Nakauchi, and Norio Komatsu | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 iPSC-derived rejuvenated T cell therapy for Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal | 6. 最初と最後の頁 200-205 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ando Jun, Ngo Minhtran C., Ando Miki, Leen Ann, Rooney Cliona M. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Identification of protective T-cell antigens for smallpox vaccines | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cytotherapy | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.04.098 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 安藤美樹, 中内啓光, 小松則夫 | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りT細胞療法 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 臨床血液 | 6. 最初と最後の頁 932-938 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.11406/rinketsu.59.932. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Itakura Go, Kawabata Soya, Ando Miki, Nishiyama Yuichiro, Sugai Keiko, Ozaki Masahiro, Iida Tsuyoshi, Ookubo Toshiki, Kojima Kota, Kashiwagi Rei, Yasutake Kaori, Nakauchi Hiromitsu, Miyoshi Hiroyuki, Nagoshi Narihito, Kohyama Jun, Iwanami Akio, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Fail-Safe System against Potential Tumorigenicity after Transplantation of iPSC Derivatives | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 673 ~ 684 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Iizuka-Koga Mana, Asashima Hiromitsu, Ando Miki, Lai Chen-Yi, Mochizuki Shinji, Nakanishi Mahito, Nishimura Toshinobu, Tsuboi Hiroto, Hirota Tomoya, Takahashi Hiroyuki, Matsumoto Isao, Otsu Makoto, Sumida Takayuki | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Functional Analysis of Dendritic Cells Generated from T-iPSCs from CD4+ T Cell Clones of Sjögren's Syndrome | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1163 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.010 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Miki Ando and Hiromitsu Nakauchi | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 “Off-the-shelf” Immunotherapy with iPSC-Derived Rejuvenated Cytotoxic T Lymphocytes | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 2-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2016.10.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Miki Ando, Jun Ando, Midori Ishii, Yumi Sakiyama, Sakiko Harada, Tadahiro Honda, Masako Fujita, Norio Komatsu, and Hiromitsu Nakauchi |
| 2. 発表標題 The Preclinical Study of iPSC-derived CTL Therapy for EBV-associated Lymphoma |
| 3. 学会等名 ISSCR 2018 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹 |
| 2. 発表標題 医師主導型臨床研究を目指したiPS細胞由来若返りT細胞療法 |
| 3. 学会等名 お茶の水がん学アカデミア第143回集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安藤美樹、安藤純、石井翠、原田早希子、本田匡宏、藤田雅子、中内啓光、小松則夫 |
| 2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りCTL療法の前臨床試験 |
| 3. 学会等名 第10回血液疾患免疫療法学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹 |
| 2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りT細胞療法 |
| 3. 学会等名 第1回静岡血液フォーラム（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹 |
| 2. 発表標題 iPSC-derived CTL therapy for EBV-associated lymphomas |
| 3. 学会等名 1st Kushiro Lymphoma Workshop（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹、中内啓光 |
| 2. 発表標題 The preclinical study of iPSC-derived CTL therapy with a safeguard system |
| 3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹 |
| 2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来若返りT細胞療法の前臨床試験 |
| 3. 学会等名 第15回日本免疫治療学研究会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹、安藤純、石井翠、崎山祐未、藤田雅子、原田早希子、本田匡宏、小松則夫、中内啓光 |
| 2. 発表標題 EBウイルス関連リンパ腫に対するiPS細胞由来CTL療法の前臨床試験 |
| 3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安藤美樹 |
| 2. 発表標題 安全システムを備えたiPS細胞由来CTL療法の前臨床試験 |
| 3. 学会等名 第23回東海HSCT（造血幹細胞移植）懇話会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Miki Ando, Toshinobu Nishimura, Satoshi Yamazaki, Tomoyuki Yamaguchi, Malcolm K. Brenner and Hiromitsu Nakauchi |
| 2. 発表標題 Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T-Cell Therapy with Suicide Gene-based Safeguard System |
| 3. 学会等名 ISSCR 2016 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Miki Ando, Toshinobu Nishimura, Satoshi Yamazaki, Jun Ando, Malcolm K. Brenner, Akimichi Osaka, Norio Komatsu and Hiromitsu Nakauchi |
| 2. 発表標題 " iPSC-derived T-Cell Therapy with the Safeguard System Targeting EBV-associated lymphoma " |
| 3. 学会等名 第78回日本血液学会学術集会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Miki Ando |
| 2. 発表標題 " Preclinical Study of iPSC-Derived T cell Therapy with a Safeguard System " |
| 3. 学会等名 2016 World Alliance Forum in San Francisco (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安藤美樹 |
| 2. 発表標題 安全システムを備えたiPS細胞由来CTL療法の前臨床試験 |
| 3. 学会等名 AMED 『革新的先端研究開発支援事業 LEAP』協賛シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安藤美樹、石井翠、崎山祐未、渡部素夫、山崎聡、山口智之、西村聡修 安藤純、大坂顯通、小松則夫、Malcolm K Brenner、中内啓光 |
| 2. 発表標題 安全システムを備えたiPS細胞由来CTL療法の前臨床試験 |
| 3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 安藤美樹、中内啓光 | 4. 発行年 2016年 |
| 2. 出版社 “感染 炎症 免疫”, 羊土社 | 5. 総ページ数 9 |
| 3. 書名 ウイルス関連腫瘍に対する安全で有効なiPS細胞由来抗原特異的CTL療法 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>順天堂大学 プレスリリースiPS細胞由来の免疫キラーT細胞を用いることで悪性リンパ腫の治癒に成功 ~ 難治性NK細胞リンパ腫に対する新規細胞治療法へ期待 ~ 2019年7月26日 https://www.juntendo.ac.jp/news/20190726-01.html</p> |
|--|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | | |
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |