

平成30年6月15日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19577

研究課題名(和文) 化学療法抵抗性白血病を治癒に導く新規細胞免疫療法の開発研究

研究課題名(英文) Development of novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy to cure the chemotherapy-resistant leukemia

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

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)：日本人に最も多いHLA-A24陽性白血病細胞を選択的に認識できるWilms tumor 1特異的細胞傷害性T細胞クローン由来T細胞レセプター遺伝子(A24/WT1-TCR)の中で、標的親和性と安全性とを高めた新規A24/WT1-TCR遺伝子の同定に成功した。白血病細胞はIFN- γ 存在下でPD-L1の発現し、A24/WT1-TCR-T細胞(活性化T細胞)はPD1を高発現しており、白血病細胞と遺伝子導入T細胞との間にPD-L1/PD1 axisが存在することを明らかにした。免疫チェックポイント阻害剤を併用することで、白血病特異的T細胞療法の治療効果をさらに高めることができる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We achieved the development of novel redirected HLA-A24-restricted CD8+ T-cell based adoptive immunotherapy targeting Wilms tumor 1(WT1) which strengthened affinity and safety. On the one hand, leukemia cells express PD-L1 under the presence of IFN- γ , but at the same time HLA-A24-restricted WT1-CTLs express PD-1. This result support the existence of PD-L1/PD-1 axis between leukemia cells and A24/WT1-TCR-CTLs. Thus, our experimental findings strongly suggest that we can enhance the clinical efficacy of redirected T cell based adoptive immunotherapy by using adjunctively with anti-PD-1/PD-L1 monoclonal antibodies.

研究分野：腫瘍治療学・細胞免疫療法

キーワード：遺伝子改変T細胞療法 Wilms tumor 1 PD-L1 PD1 チェックポイント阻害剤

1. 研究開始当初の背景

急性白血病は化学療法によって血液学的寛解の状態に持ち込むことができるものの、多くの患者で再発がみられる疾患である。近年、血液分野の研究の進歩に伴って、白血病幹細胞が同定されるようになった。そして、白血病幹細胞が化学療法抵抗性であるため、白血病再発の原因となることが認知されるようになった。

同種造血幹細胞移植は、細胞免疫療法の1つである。一部に白血病が治癒する患者が存在するが、それは、免疫細胞、特に細胞傷害性T細胞(CTL)が白血病幹細胞を監視して傷害しているためであると考えられている(移植片対白血病効果:GVL効果)。その一方で、免疫細胞が患者自身の正常細胞に対して反応すると、移植片対宿主病(GVHD)を発症することもよく知られている。従って、GVHDを発症することなく、GVL効果をうまく誘導する新たな免疫療法の開発が急務であると考えられる。

我々は、これまでに白血病幹細胞を含めた白血病細胞に幅広く高発現がみられる標的抗原である、Wilms tumor 1(WT1)を標的とした免疫療法の開発研究に携わってきた。WT1は細胞内に発現するタンパクであるが、WT1由来のペプチドであるWT1₂₃₅₋₂₄₃は、日本人で最も頻度の高いアリルであるHLA-A24分子とともに複合体を形成し(A24/WT1₂₃₅)、白血病細胞表面に表出される。一方で、WT1の発現はごく一部の正常細胞に限られていること、正常細胞におけるWT1発現が白血病細胞と比べて低いことなどから、正常細胞表面のA24/WT1₂₃₅複合体の量は発現していても少ないと推察される。従って、CTLは自身が発現するT細胞受容体(TCR)を用いて、白血病細胞表面のA24/WT1₂₃₅を認識して、白血病細胞を選択的に傷害する。これまでにWT1(A24/WT1₂₃₅)を標的とした様々な免疫療法の開発ならびに臨床試験が執り行われてきた。我々は、A24/WT1₂₃₅を特異的に認識するCTLクローンを樹立し、そのTCR遺伝子を単離した。そして、レトロウイルスベクターにTCR遺伝子を組み込んで末梢血T細胞に遺伝子導入することで、安全かつ効率よくA24/WT1₂₃₅特異的TCR-T細胞を体外で増幅することに成功した。さらに、A24/WT1₂₃₅特異的TCR-T細胞を増幅し、難治性白血病患者に輸注する養子免疫療法の臨床試験を開始している。

一方で、新たな免疫療法としてチェックポイント阻害剤が開発され、抗PD-1抗体を代表としたがんに対する免疫療法の臨床試験が進められた。その結果、再発難治性の固形がんを中心に治療効果が確認された。しかし、患者体内のT細胞に依存するため、治療効果が得られるまでに時間を要すること、また、T細胞を非特異的に活性化するために生じる免疫学的有害事象の発症などが今後の改良点として注目されるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、A24/WT1₂₃₅特異的TCR-T細胞療法と、チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体とを併用する複合的免疫療法の可能性を検討するために、ヒト免疫細胞を用いたトランスレショナルリサーチを展開する。その中で、A24/WT1₂₃₅特異的TCR-T細胞の持つ抗白血病効果が、抗PD-1抗体との併用により増強されることを確認して、臨床応用に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) A24/WT1₂₃₅特異的TCR-T細胞の作製

同意の得られた健常人、または患者よりヒト末梢血単核球(PBMCs)、ヒト白血病細胞を採取し保存する。

HLA-A24陽性白血病細胞を選択的に認識できるWT1特異的CTLクローン由来TCR遺伝子(A24/WT1₂₃₅-TCR)を用いる。タカラバイオ株式会社が開発した、内在性TCRを抑制することで遺伝子導入するTCRの発現を安全に高めることができる、次世代型siTCRレトロウイルスベクターにA24/WT1₂₃₅-TCR遺伝子を組み込む。PG13細胞株にA24/WT1₂₃₅-TCR遺伝子を導入して、T細胞指向性GaLVレトロウイルスを作製する。

ヒトPBMCsを、ヒトIL-2、抗ヒトCD3抗体(OKT-3)存在下で刺激する。刺激2日後、T細胞の分裂増殖が得られた時点で、上述のとおり作製したGaLVレトロウイルスをT細胞に感染させて、A24/WT1₂₃₅特異的TCR-T細胞を作製する(図1)。

図1. TCR遺伝子導入T細胞の作製

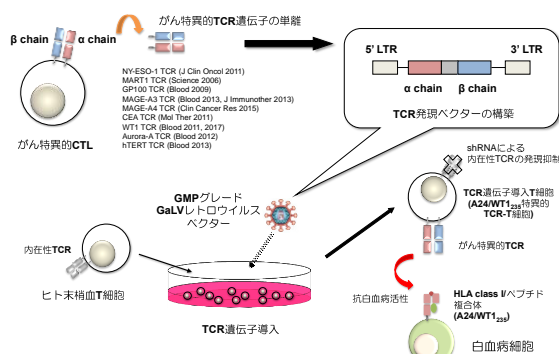


図1. TCR 遺伝子導入 T細胞の作製方法。

(2) 白血病細胞と A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現解析

上述の方法により得られた A24/WT1₂₃₅ 特

異的 TCR-T 細胞表面の PD-1 分子の発現を、フローサイトメトリー法で確認する。具体的には、APC 標識マウス抗ヒト PD-1 抗体 (clone EH12.2H7)、FITC 標識マウス抗ヒト CD4 抗体、PE 標識マウス抗ヒト CD8 抗体を用いて A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞を染色する。

また、白血病細胞における PD-L1 分子の発現も同様にフローサイトメトリー法で確認する。PE 標識マウス抗ヒト PD-L1 抗体 (clone 29E.2A3) を用いて白血病細胞を染色する。

(3) 抗 PD-1 抗体処理による A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞の抗白血病効果の増強の検討

抗 PD-1 抗体、もしくはアイソタイプ抗体存在下に、A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞と、A24 陽性ヒト白血病細胞もしくはヒト正常細胞とを共培養する。A24/WT1₂₃₅ 特異的 T 細胞がヒト白血病細胞を特異的に認識することを、CD107a 法、細胞内サイトカイン染色、⁵¹Cr 放出試験などを用いて *in vitro* で検討する。さらに、アイソタイプ抗体存在下と比べて、抗 PD-1 抗体存在下において抗白血病効果の増強が得られることと、正常細胞に対する反応性の増強がみられないこととを、同様の方法を用いて詳細に検討する。

次に、ヒト白血病細胞を NOG マウスに移植して、白血病モデルマウスを作製する。このマウスに A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞を経静脈的に投与する。そして、アイソタイプ抗体もしくは抗 PD-1 抗体を同様に経静脈的に投与して、*in vivo* においても抗白血病効果の増強が得られることを比較検討する。

4. 研究成果

(1) A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞の作製

我々は、まず効果的な白血病特異的 T 細胞療法の実験系を試みた。上述した方法で、A24/WT1₂₃₅-TCR レトロウイルスを作製して、末梢血 T 細胞に遺伝子導入した。その結果、A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞は、*in vitro* および *in vivo* の実験系において、A24/WT1₂₃₅ 陽性白血病細胞を選択的に傷害した。さらに、標的親和性と安全性とを高めた新規 A24/WT1₂₃₅-TCR 遺伝子の同定にも成功し、これらの TCR 遺伝子を導入した T 細胞が A24/WT1₂₃₅ 陽性白血病細胞をより効率よく認識できる可能性を示した。

(2) A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現解析

抗白血病効果の増強を目的として、

A24/WT1₂₃₅ TCR-T 細胞療法と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の可能性を検討した。

我々は、まず A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞における PD-1 の発現をフローサイトメトリー法を用いて検討した。*In vitro* で刺激、増幅された A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞は、図 2 に示すとおり、PD-1 を高発現していることが明らかとなった。

図2. A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞における PD1 の発現

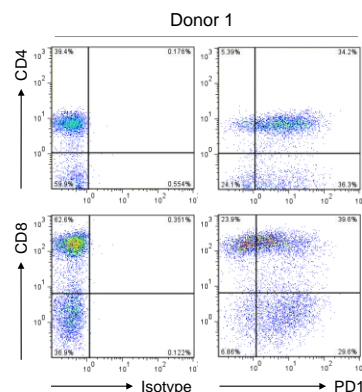


図 2. A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞における PD1 の発現。

A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR 導入 CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞が、ともに PD1 を発現していることが明らかとなった (右)。

また、同様にフローサイトメトリー法を用いて、白血病細胞が PD-L1 を発現していることを明らかとした (図 3 上)。一方で、一部の細胞においては PD-L1 の発現がみられなかった。しかしながら、IFN- γ 存在下によってこのような細胞が PD-L1 の発現を獲得することを見出した (図 3 下)。

図3. 白血病細胞における PD-L1 の発現

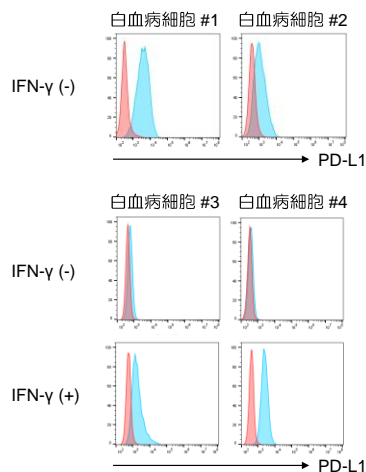


図 3. 白血病細胞における PD-L1 の発現。
PD-L1 の発現が低い白血病細胞においても、
IFN- γ 存在下において PD-L1 の発現が上昇す
ることが明らかとなった (下)。

以上より、白血病細胞と遺伝子導入 T 細胞
との間には PD-L1/PD1 axis が存在するこ
とを明らかとした。遺伝子導入 T 細胞が産生
する IFN- γ によって、逆に白血病細胞が PD-L1
を発現し、T 細胞による抗白血病効果からエ
スケープする可能性がある。従って、免疫チ
ェックポイント阻害剤を併用することで、白
血病特異的 T 細胞療法の治療効果をさらに高
めることができる可能性が示された。これを
踏まえて、現在、抗 PD-1 抗体存在下に
A24/WT1₂₃₅ 特異的 TCR-T 細胞の抗白血病効
果が増強されるか、詳細な *in vitro* ならびに
in vivo 実験を遂行中である。

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 3 件)

- ① Iida S, Wakabayashi M, Tsukasaki K, Miyamoto K, Maruyama D, Yamamoto K, Takatsuka Y, Kusumoto S, Kuroda J, Ando K, Kikukawa Y, Masaki Y, Kobayashi M, Hanamura I, Asai H, Nagai H, Shimada K, Tsukamoto N, Inoue Y, Tobinai K. Bortezomib plus dexamethasone vs thalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer Sci.* 2018 May;109(5):1552-1561. 査読有
Doi: 10.1111/cas.13550. Epub 2018 Apr 17.
- ② Hasebe S, Tanaka K, Miyake Y, Asai H, Takeuchi K, Fujii T, Kawazoe H, Tanimoto K, Yamanouchi Y, Azuma A, Yasukawa M, Yakushijin Y. Analysis of clinical factors and mortality in diffuse large B-cell lymphoma patients over or under 80 years of age. *International Journal of Gerontology* 2017. (<https://doi.org/10.1016/j.ijge.2017.11.001>).
- ③ 小林加奈, 村上朱里, 小松紗綾, 西山加那子, 山下美智子, 杉森和加奈, 亀井義明, 朝井洋晶, 大木元明義, 本田和男, 高田泰次. 乳癌治療経過中に Pulmonary Tumor Thrombotic Microangiopathy (PTM) を発症しがんの薬物治療により長期生存を得た 1 例. *癌と化学療法* 44(3): 243-246, 2017

[学会発表] (計 主な 3 件)

- ① 朝井洋晶, 竹内一人, 谷本一史, 東太地, 田口千蔵, 濱本泰, 中井昌紀, 薬師神芳洋, 安川正貴. 特定の癌腫に準じた治療を行った患者を含む原発不明癌 7 例の後方視的解析. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会(ワークショップ), 2017. 07. 27, 神戸市.
- ② 朝井洋晶, 竹内一人, 東太地, 薬師神芳洋, 安川正貴. 悪性リンパ腫の精査中に見つかった重複がん 18 例の治療に関する後方視的解析. 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016. 07. 29. 神戸市
- ③ 朝井洋晶, 竹内一人, 谷本一史, 山之内純, 東太地, 藤原弘, 薬師神芳洋, 羽藤高明, 安川正貴. 関節リウマチ患者におけるメソトレキセート関連リンパ増殖性疾患 19 例の臨床病理学的解析. 第 78 回日本血液学会, 2016. 10. 13. 横浜市.

[図書] (計 1 件)

- ① 朝井洋晶 「ホジキンリンパ腫 1stline ABVD(d)療法」エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2017. pp 975-978 メディカルレビュー社 2017

[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/school/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

(4) 研究協力者: なし