

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10103

研究課題名(和文) 小児白血病治療を目指したGM-CSF受容体特異的キメラ抗原受容体T細胞の最適化

研究課題名(英文) Optimization of chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) targeting GM-CSF receptor for the treatment of pediatric leukemia

研究代表者

中野 茂 (Nakano, Shigeru)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：30791313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GM-CSF受容体特異的キメラ抗原受容体T細胞の臨床応用に向けた種々の基礎的な橋渡し研究を本助成期間で実施した。初年度には、既に確立されていた初代GMR CAR-Tを改変し、腫瘍殺傷時に自己分泌するGM-CSFを低下させるshRNA搭載型のCAR-T細胞を樹立し、その抗腫瘍細胞活性が初代よりも優れていることを証明した。2年目には、GMR CAR-Tの受容体選択性を我々が樹立した受容体安定発現細胞を用いて評価した。最終年度には、臨床応用に向け、組織交差性試験に用いているCAR-Tの細胞外ドメインタンパクを調製し試験を開始した。以上の結果をもとに、我々は医師主導試験の準備を開始している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JMMLに対するCAR-T細胞療法はこれまで国内外で報告されていない。GMRを標的としたCAR-T細胞の前例もなく、JMMLおよびAMLに対する安全で有効性の高い新たな治療選択肢を提供できる。GMR CAR-T細胞の臨床開発の実現は、AML治療において大きな臨床的意義をもたらすと期待される。トランスポゾン遺伝子改変技術を用いたCAR-T細胞療法の開発は、研究分担者のグループで臨床応用に向けた準備が進められており、本邦における速やかな臨床試験への移行が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We performed translational researches of our chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) targeting GM-CSF receptor for the treatment of pediatric leukemia in this grant. We have previously developed 1st generation GMR CAR-T cells. In 2017, we established the modified GMR CAR-T that has ability of GM-CSF knock-down by shRNA to reduce GM-CSF secretion from itself during killing of leukemia cells, and its anti-tumor activity was superior to 1st generation one. In 2018, we assessed the receptor selectivity of GMR CAR-T using our established GMR or stably-expressing K562 cells. In final year, we prepared the extracellular-domain protein of GMR CAR-T as part of safety study for clinical applications and tissue cross-reactivity study has been started. Based on our results, we are preparing to start a doctor-initiated clinical trial of GMR CAR-T.

研究分野：小児血液学

キーワード：キメラ抗原受容体T細胞 GM-CSF リガンド 骨髄性白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) は、乳幼児期に発症する骨髄異形成 / 骨髄増殖性腫瘍であり、本邦での発症率は 100 万人あたり 1-2 人とされ、小児全白血病の約 3% を占め、日本では年間約 20 人が発症すると推測される。JMML に対する化学療法の有効性は証明されておらず、造血幹細胞移植 (HSCT) が治癒を期待できる唯一の治療法であるが、再発例も多く治療満足度は低い。以上より、JMML の治療においては、抗がん剤耐性に依存しない新規治療法の開発が強く望まれる。

腫瘍関連抗原を標的とするキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) を遺伝子導入した T 細胞 (CAR-T 細胞) を使用した養子免疫療法は抗腫瘍効果が強力であることが報告され、近年開発が急速に進んでいる。今後、CAR-T 細胞療法の導入によって治療抵抗性白血病の予後が飛躍的に改善する可能性が示唆されている。現在最も開発が進んでいる CD19 CAR-T 細胞は、B 細胞性の ALL に対して 80-90% の完全寛解をもたらしている。一方で、骨髄系白血病である AML に対する CAR-T 細胞療法は、CD33 や CD123 を標的とした先行開発品の報告はあるが、その臨床効果は満足できるものではなく開発途上であるといえる。さらには、JMML を対象とした CAR-T 細胞療法もこれまで国内外で報告されていない。

研究分担者は、平成 24-25 年度科学研究費 (基盤研究 B) の中で、リガンド型 CAR の開発に成功している。JMML 患者の CD34 細胞に GMR が高発現することに着目し、GMR 細胞表面領域に特異的かつ高親和性に結合する遺伝子配列をクローニングし、GMR 特異的 CAR を作製した。この GMR 特異的 CAR を導入することによって作製された初代 GMR CAR-T 細胞は、JMML 幹細胞に由来する白血病コロニーの形成を高度に抑制した (Nakazawa et al. 2016)。

研究代表者は、平成 27 年から GMR CAR-T 細胞の臨床応用に向けた研究に従事している。該研究機関で既に確立されたヒト T 細胞の遺伝子改変・培養技術であるトランスポゾン法 (Nakazawa et al. 2009; Saha, Nakazawa et al. 2012; Nakazawa et al. 2013) により作製された初代 GMR CAR-T 細胞の抗白血病効果を AML 細胞株に対して検討した。まず、AML 細胞株数種につき、GMR CAR-T 細胞の腫瘍細胞表面の標的受容体である GMR (CD116) の陽性率が 80~90% 以上であることを確認した。さらに、それら AML 細胞株に対する GMR CAR-T 細胞の強力な殺傷効果を証明し学会発表を行った (中野 茂他、第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、中野 茂他、第 78 回日本血液学会学術集会)。

研究代表者はその後の検討により、GMR CAR-T 細胞が腫瘍細胞表面の GMR を認識・活性化し、腫瘍細胞を殺傷する過程で、GM-CSF を自己分泌することを見出した。さらに、GM-CSF の共存下、GMR CAR-T 細胞と腫瘍細胞表面の GMR との結合を競合的に阻害し、GMR CAR-T 細胞の抗白血病効果を減弱させることを見出した。したがって、GMR CAR-T 細胞を臨床応用するためには、現有する GMR CAR-T 細胞から臨床応用への最適化フォームを決定する必要性が考えられ、本申請の着想に至った。

2. 研究の目的

- 1) GMR CAR-T 細胞の臨床応用に向けた最適化: 抗白血病活性のさらなる向上を志向した改変型・変異型 GMR CAR-T 細胞の作製と最適化フォームの決定
- 2) GMR α および β の全長配列のクローニングおよび腫瘍細胞での発現細胞の樹立と GMR CAR-T 細胞の殺傷効果の検討により、GMR CAR-T 細胞の受容体選択性を明らかとする。
- 3) 速やかな臨床試験への移行を目的に改変型・変異型 GMR CAR-T 細胞の *in vivo* 薬効試験および安全性試験を実施する。
- 4) 臨床試験プロトコルの策定し、早期の臨床試験への移行を目指す。

3. 研究の方法

[平成 29 年度]

1) 改変型 GMR CAR-T の樹立 (第二世代)

初代 GMR CAR トランスポゾンベクターを鋳型として、GMR への結合領域の変異導入や、CAR のスペーサー部分欠失体など、分子生物学的手法により、種々の改変型・変異型 CAR を作製した。具体的には、初代 GMR CAR-T 細胞の腫瘍細胞殺傷と伴に自己分泌される GM-CSF を低下させ、抗白血病活性を向上させる目的で、GM-CSF siRNA を初代 GMR CAR トランスポゾンベクター搭載させた。ヒト GM-CSF の 5'側非翻訳領域において GM-CSF 特異的にノックダウンを可能とする siRNA をデザインし、shRNA としてプロモーターと連結させ初代 GMR CAR トランスポゾンベクターへ組込み、そのベクターを用いて改変型 GMR CAR-T を樹立した。その第二世代 GMR CAR-T 細胞の抗白血病活性を評価し、初代のそれと比較した。

2) アミノ酸改変型 GMR CAR-T の樹立 (第三世代)

第二世代 GMR CAR-T とは別のアプローチにて、第三世代 GMR CAR-T を樹立した。具体的には、アミノ酸改変により GMR CAR-T の抗原結合領域である GM-CSF の点変異体を複数個作成し、その変異型 GMR CAR-T の抗白血病活性を比較し、初代のそれと比較した。

[平成 30 年度]

1) GMR α または β のトランスポゾンベクターの作製と腫瘍細胞における安定的発現細胞の樹立

GMR CAR-T の受容体選択性を評価する目的で、ヒト GMR α 又は β の全長配列を細胞表面で CD19 を発現するトランスポゾンベクターに組込んだ。K562 細胞にベクターをエレクトロポレーション法によって遺伝子導入し、細胞表面の CD19 を目印に磁気分離法を用いて GMR α 又は β 安定発現株の取得を試みた。

2) In vitro 実験系を用いた GMR CAR-T 細胞の受容体選択性の検討

[平成 31 年度]

1) 安全性試験と一環として実施する組織交差性試験に用いる GMR CAR-T の細胞外ドメインタンパクの調製

2) 組織交差性試験の実施

4. 研究成果

[平成 29 年度]

1) 第二世代 GMR CAR-T 細胞の樹立と抗腫瘍細胞活性評価

腫瘍細胞殺傷と同時に分泌されるサイトカインの放出を抑えるような shRNA を搭載した遺伝子改変ベクターの構築を行った。本ベクターを健康成人末梢血単核細胞にエレクトロポレーションによって導入し、培養して作製される改変型 GMR CAR-T は、従来の野生型 (shRNA 搭載なし) と比較して、腫瘍細胞への殺傷効果に優れることを確認した。さらに、腫瘍細胞の殺傷効果に優れる第二世代 GMR CAR-T 細胞は、腫瘍細胞殺傷時の GM-CSF 分泌が顕著に抑制されていることを確認した。

2) 第三世代 GMR CAR-T 細胞の樹立と抗腫瘍細胞活性評価

アミノ酸改変によって GM-CSF 点変異体を発現する第三世代 GMR CAR-T を複数個樹立した。さらに、内 2 種の第三世代 GMR CAR-T 細胞の抗腫瘍細胞活性が初代 GMR CAR-T 細胞のそれと比して優れることを見出した。

[平成 30 年度]

GMR CAR-T の GM-CSF 受容体に対する選択性を評価する目的で、慢性骨髄性白血病細胞株 K562 に GMR α または GMR β を単独に発現する安定発現株の取得を試みた。GMR α または GMR β それぞれのトランスポゾンベクターの構築を完了させ、K562 に遺伝子導入し、磁気細胞分離法にて GMR α 単独または GMR β 単独の安定発現株を取得した。取得した安定発現細胞を標的腫瘍細胞として GMR CAR-T の抗腫瘍細胞活性を測定した結果、GMR α 単独の発現細胞に対して傷害活性は有する一方で、GMR β 単独の発現細胞に対してはほとんど傷害活性を示さないことが確認された。

[平成 31 年度]

GMR CAR-T 細胞外領域のタンパク質可溶性画分を、組織交差性試験委託に供給するに足りる収量にて取得する検討を行った。タンパク発現を向上させ得るベクターへの載せ替え、哺乳細胞の培養法などの条件を検討し、結果として試験委託に足りるタンパク質収量を確保できた。また、被験物質 (タンパク質可溶性画分) の凍結融解の活性への影響を凍結前、凍結融解後のサンプルを用いて、SPR 法による GMR α への結合親和性、ELISA 法による GMR α への結合性により評価し、凍結融解による活性への影響がないことを確認できた。

その後、外部委託先選定を行い、A 社を選定した。A 社との手続きを進め、被験物質 CoA の作成、被験物質の送付を完了させ、試験開始となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 CAR-T cell therapy for Pediatric Solid Tumors -Rational Engineering of Chimeric Antigen Receptors- |
| 3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 CD116陽性骨髄系腫瘍を標的とした非ウイルス改変CAR-T療法の開発 |
| 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 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 骨髄系腫瘍に対する国産CAR-T細胞の開発 |
| 3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 CAR-T細胞療法の今後の展開 |
| 3. 学会等名 第8回日本免疫・細胞治療学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 血液腫瘍に対するCAR-T療法 |
| 3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 急性骨髄性白血病に対するCAR-T細胞療法 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 PiggyBacトランスポゾンを用いた非ウイルス遺伝子改変CAR-T療法の開発 |
| 3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 GM-CSF receptor-targeted CAR T cells for myeloid neoplasms |
| 3. 学会等名 第59回日本小児血液がん学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 キメラ抗原受容体T細胞療法 |
| 3. 学会等名 第23回国際個別化医療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 Non-virally engineered CAR T cells for CD116-positive myeloid neoplasms |
| 3. 学会等名 第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 中沢洋三 |
| 2. 発表標題 免疫療法の進歩と展望 |
| 3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 産業財産権の名称 高効率な遺伝子改変細胞の作製方法 | 発明者 中沢洋三、田中美幸、師川紘一、成松翔伍 | 権利者 国立大学法人信州大学・キッセイ薬品工業株式 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/041878 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 外国 |

| | | |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------------|
| 産業財産権の名称 遺伝子改変細胞及びその作製方法 | 発明者 中沢洋三、松田和之、中野茂 | 権利者 国立大学法人信州大学・キッセイ薬品工業株式 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/033582 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 中沢 洋三 (Nakazawa Yozo) (60397312) | 信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601) | |