

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08330

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫に対する新規CAR-T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel CAR-T cell therapy for multiple myeloma

研究代表者

朝井 洋晶 (Asai, Hiroaki)

国際医療福祉大学・国際医療福祉大学三田病院・准教授

研究者番号：00726838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫の60%程度に高発現するがん精巢抗原であるNY-ESO-1を標的として、自然界ではTCRによって認識されるHLA-A2/NY-ESO-1_157ペプチド複合体を特異的に認識するキメラ抗原受容体(CAR)を作成した。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入により体外で増幅可能となったHLA-A2/NY-ESO-1_157特異的CAR導入T細胞を用いて行った検討により、同CAR導入T細胞は、HLA-A2陽性、NY-ESO-1陽性の多発性骨髄腫株に対する免疫反応と細胞障害活性を認め、同骨髄腫細胞株を移植したマウスに対する治療実験において抗腫瘍効果を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫に対する新規治療法が開発されているが、未だ治療に結びつける治療法は確立されていない。本研究は、本来T細胞がTCRを介して認識するがん抗原ペプチドとHLA複合体を抗体で認識させるという極めてがん特異性に富んだ治療法である。類似の研究はこれまでWT1-HLA-A2複合体に対するCAR-T開発が米国で行われているのみである。本研究のような抗原特異的細胞免疫療法は難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫に対する治療を目指す新規治療法となり得ることが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：NY-ESO-1 is an immunogenic cancer-testis antigen reported to express in approximately 60% of advanced myelomas, and correlated to tumor proliferation and high-risk features. Here, we have generated CAR possessing the single chain fragment variable (scFv) specific for the HLA-A2/NY-ESO-1_157-165 complex (A2/NY-ESO-1_157). Using HLA-A2+NY-ESO-1+ myeloma cells and peptides presented by HLA-A2 molecules as a model, these redirected CAR-T cells recognized and killed HLA-A2+NY-ESO-1+ myeloma cells in an A2/NY-ESO-1_157-specific manner in vitro. Moreover, CAR-activated T cells showed sufficient functional avidity, as assessed by cytokine production and killing activity, and displaying antitumor reactivity against HLA-A2+NY-ESO-1+ myeloma cells in vivo. Thus, our experimental findings strongly support the continued development of NY-ESO-1-TCR engineered T cells for treatment of myeloma.

研究分野：造血器腫瘍学

キーワード：遺伝子改変T細胞療法 CAR-T NY-ESO-1 多発性骨髄腫

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫に対しては2006年以降、プロテアソーム阻害剤、Immunomodulatory drugs(IMiDs) [レナリドミド/ポマリドマイドなど]の登場をはじめとする治療法の進歩により、大量化学療法+自家末梢血幹細胞移植が適応となる患者のみならず、適応とならない多発性骨髄腫患者においても生命予後は著しく改善した。さらに臨床研究から微小残存病変が検出できない患者ほど生存期間が延長するとの知見もえられ、多発性骨髄腫治療では、いかに微小残存病変を減らすことができるかが重要である。また、再発・難治性多発性骨髄腫に対する治療は依然として困難である。

現状では多発性骨髄腫は抗がん剤による化学療法のみでは治癒をえられないことから、新たな治療法の研究開発が進められている。再発抑制を目的とした微小残存病変に対する免疫監視、化学療法抵抗性骨髄腫に対する免疫を介した細胞障害活性による抗腫瘍効果、これら2つの病態に対する新規治療法の候補として、がん免疫療法が期待されている。

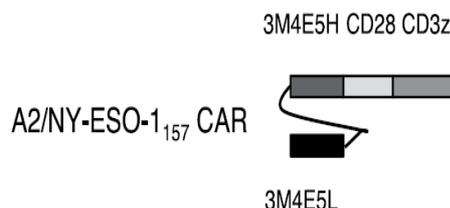
がん免疫療法では、腫瘍特異抗原に対する抗体を投与し、体内に存在する免疫細胞や補体の反応を介して腫瘍を攻撃する抗体免疫療法と、多発性骨髄腫関連抗原特異的な受容体遺伝子[T細胞受容体: T-cell receptor (TCR)、キメラ抗原受容体: Chimeric antigen receptor (CAR)]を導入したT細胞を輸注する細胞免疫療法がある。前者にはSLMF7を標的とするElotuzumab、CD38を標的とするDaratumumab、Isatuximabが臨床試験で治療効果、安全性が示され保険承認されているが、後者はいまだ多発性骨髄腫に対して実地臨床で使用可能な製剤はない。

一方、再発・難治性CD19陽性B細胞性腫瘍(急性Bリンパ性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)に対しては、CD19を標的としたCAR遺伝子導入T細胞輸注療法が臨床試験で劇的な治療効果を認め、本邦でも保険承認をえられている(*NEJM* 2014, *NEJM* 2015, *Sci Transl Med* 2013, *J Clin Oncol* 2014)。

NY-ESO-1はがん精巢抗原の一つであるが、多発性骨髄腫の60%で高発現していると報告されている(*Blood* 2005)。2015年にHLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ペプチド複合体に特異的なTCRを遺伝子導入した遺伝子改変T細胞を自家移植後に輸注する第I/II相臨床試験が報告された。その結果は、重篤な副作用は確認されず、また難治性多発性骨髄腫に対して80%に臨床効果をもとめ、無増悪生存期間中央値19.1カ月、輸注後3か月時点で70%がnearCRまたはCR、10%がVGPRと良好な奏効率を示していた(*Nat Med* 2015)。しかし、このようなT細胞輸注療法にも質を改善し、体内で長期的に維持する点においては未だ多くの課題を抱えている。

我々の研究グループはこれまでに、自然界ではTCRによって認識されるHLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ペプチド複合体を特異的に認識する抗体(clone: 3M4E5)の抗原認識部位(Fab部分)を単鎖抗体(scFv)の形で利用し、CD28とCD3鎖を細胞内シグナル伝達ドメインとして用いた第2世代CAR(Chimeric antigen receptor)を作成した(図1)。そしてレトロウイルスベクターにHLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CARを組み込み、末梢血T細胞に遺伝子導入することで、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇CAR-T細胞を体外で増幅することに成功した。

図1. HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR



2. 研究の目的

本研究では、上記の知見を統合して、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CARを遺伝子導入したT細胞を用いた多発性骨髄腫に対する新たな細胞免疫療法の基盤的研究を行う。その中で、多発性骨髄腫に対する自家造血幹細胞移植併用大量化学療法と組み合わせることで、骨髄腫特異的CAR-T細胞を長期的かつ永続的に産生し、多発性骨髄腫の治療に繋げる新たな治療法の確立を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR導入T細胞の抗骨髄腫細胞効果の検討

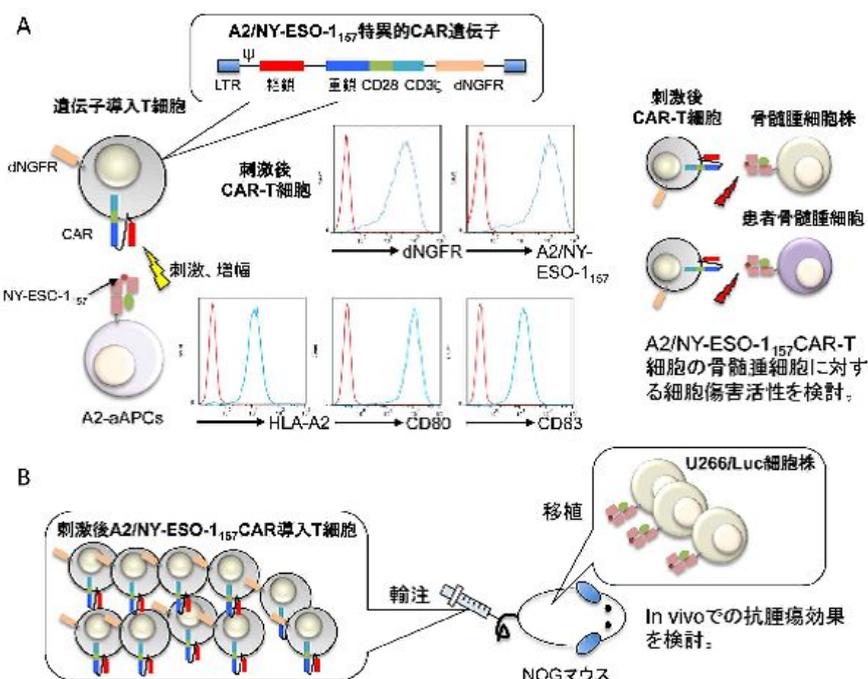
健常人ドナーより、ヒト末梢血単核球を分離し、IL-2存在下で抗CD3抗体を添加し刺激する。3日後、コントロールおよびHLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CARをそれぞれのドナー由来T細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR導入T細胞を作成する。図2Aに示すように、遺伝子導入細胞を、NY-ESO-1₁₅₇ペプチドをパルスした人工抗原提示細胞で刺激して増幅する。刺激後のHLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR-T細胞のペプチド特異性をELISPOT法およびテトラマー法を用いて確認後、標的特異的サイトカイン産生に関して、

細胞内サイトカイン染色法を用いて解析する。加えて、HLA-A2 陽性骨髄腫細胞に対する細胞傷害活性を ^{51}Cr 放出試験で確認する。(図 2A)

(2) HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞の *in vivo* における抗骨髄腫細胞効果の検討

HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性ヒト骨髄腫細胞株 U266 に Luciferase 遺伝子(SLR)を導入し、U266/SLR 細胞株を樹立する。放射線照射した NOG マウスに、U266/SLR を移植してヒト骨髄腫の *in vivo* モデルを作製する。コントロール及び HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR-T 細胞を尾静脈より週 1 回程度、計 2-3 回投与して、抗腫瘍効果を我々のグループがこれまで報告してきた *in vivo* イメージング法により経時的に観察する。腫瘍縮小効果が得られたマウスにおいて、腫瘍局所ならびに骨髄内における HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞の集積と表面形質とを病理学的手法やテトラマー法等で詳細に解析する(図 2B)

図2. A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞による抗骨髄腫効果の検討

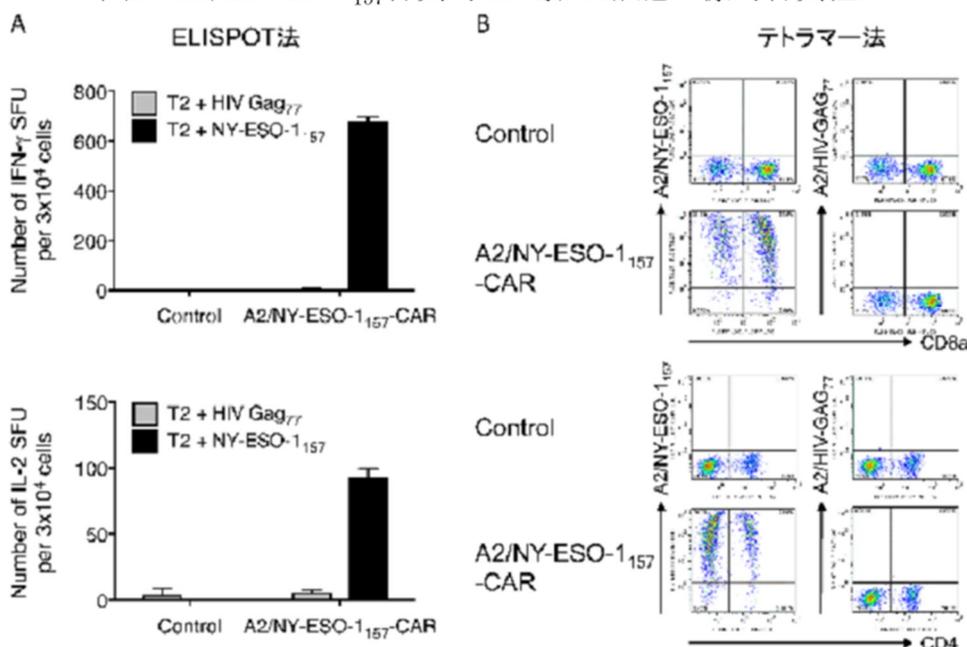


4. 研究成果

(1) HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞の抗骨髄腫細胞効果の検討

健康人ドナーよりヒト末梢血単核球を分離し、IL-2 + 抗 CD3 抗体で刺激後、レトロウイルスを用い当研究グループで作成した HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的の第 2 世代 CAR をドナー由来 T 細胞に遺伝子導入し、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞を作成した。

図3. A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞の標的特異性



ELISPOT 法を用いた検討では、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞はペプチド特異的に認識することを確認した(図 3A)。

また、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマー法において、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞が内在性 TCR の発現に影響されことなく（さらには CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞 関係なく）染色されることも併せて確認した (図 3B)。

図4A. 人工抗原提示細胞を用いたA2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR導入T細胞の抗原特異性の検討 (細胞内サイトカイン染色法の結果)

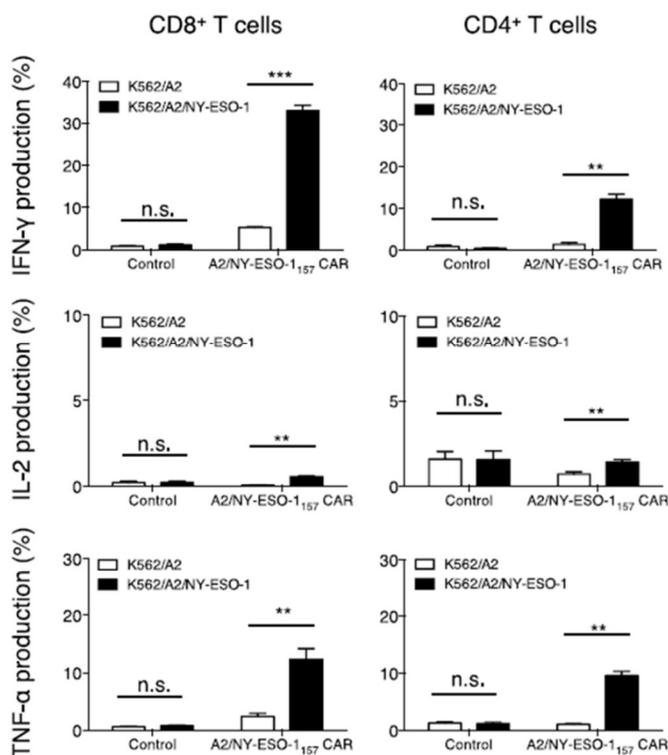
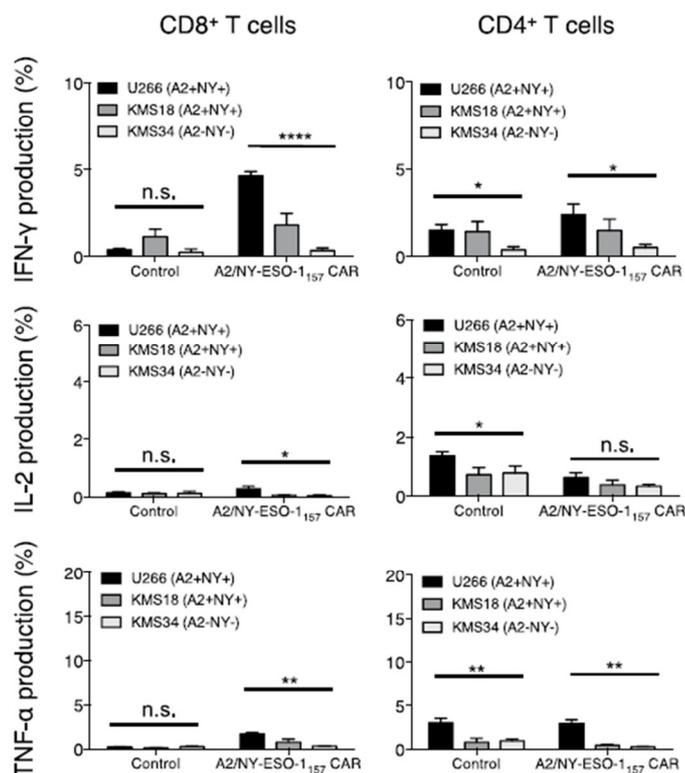


図4B. 骨髄細胞株を用いたA2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR導入T細胞の抗原特異性の検討 (細胞内サイトカイン染色法の結果)



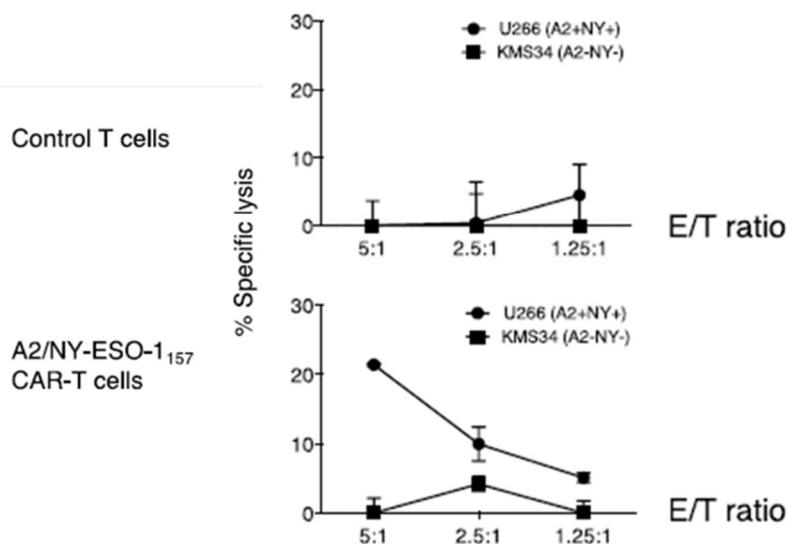
細胞内サイトカイン染色法を用いた検討でも、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞は NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした人工抗原提示細胞(K562/A2 細胞)の刺激に対して、抗原特異的に IFN- γ 、IL-2、TNF- α を産生した(図 4A)。

さらに骨髄腫細胞株を用いた検討でも、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞は、HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性骨髄腫細胞株(U266、KMS18)に対して IFN- γ 産生をみとめたが、HLA-A2 陰性かつ NY-ESO-1 陰性細胞株(KMS34)や HLA-A2 陽性・NY-ESO-1 陰性細胞株(KMS26)に対する有意なサイトカイン産生を認めなかった(図 4B)。

以上の検討から HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞の HLA 拘束性と抗原特異性が確認できた。

さらに、⁵¹Cr 放出試験を用いた検討でも HLA-A2 かつ NY-ESO-1 陽性骨髄腫細胞に対して Effector 細胞数依存性に細胞傷害活性を認め確認できた(図 5)。

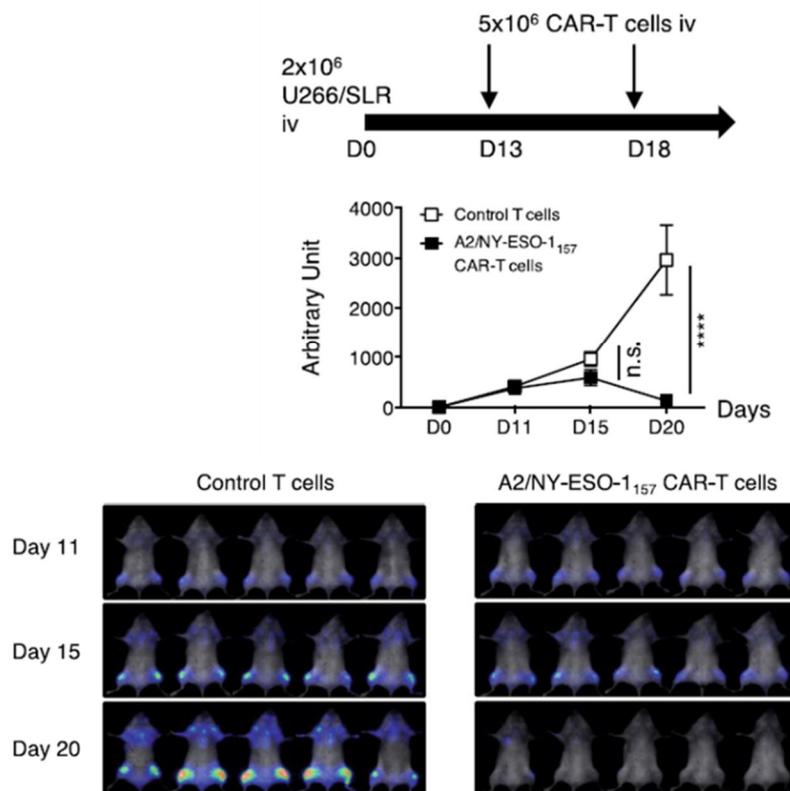
図5. 骨髄細胞株を用いたA2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR導入T細胞の細胞障害活性の検討 (⁵¹Cr放出試験の結果)



(2) HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞の *in vivo* における抗骨髄腫細胞効果の検討

Luciferase の一つである SLR 遺伝子を導入した HLA-A2 陽性かつ NY-ESO-1 陽性の骨髄腫細胞株である U266 細胞を免疫不全マウス(NOG マウス)に 1.5Gy の全身放射線照射ののちに、 2×10^6 個尾静脈から静注し、生物発光イメージング法で追跡した。その結果、移植後 11 日目に骨髄内への腫瘍の生着が確認できた。次に骨髄腫細胞株(U266/SLR)移植 NOG マウスに骨髄腫細胞移植後 13 日目と 18 日目に我々が作成した HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞とコントロールとして遺伝子導入していない活性化 T 細胞をそれぞれ 5×10^6 個を尾静脈から輸注し、生体発光イメージング法を用いて、U266/SLR に対する抗腫瘍効果を経時的に評価した。コントロール T 細胞治療群では腫瘍の増悪がみられたが、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞治療群では骨髄腫細胞移植後 20 日目(治療後 7 日目)に SLR による骨髄内での発光が消失し、腫瘍の抑制が得られた(図 6)。

図6. HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇特異的CAR導入T細胞の *in vivo*における抗骨髄腫細胞効果の検討



以上より *in vitro* のみならず骨髄腫細胞株移植免疫不全マウス(NOG マウス)における *in vivo* 実験においても我々が作成した CAR-T 細胞は十分な抗腫瘍効果を確認できた。

最後に、我々が作成した HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇-CAR-T 細胞は NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした HAL-A*0206 発現 K562 細胞に対しても HLA-A*0201 同様に IFN- γ 産生反応を示した。さらには NY-ESO-1 と相動性のあるペプチド (xLxMWIxxx 配列) をパルスした T2 cell への反応性を検討した結果、Solute carrier family 13 member 2 (SLC13A2)、Taste receptor type 2 member 8 (TAS2R8)、Lysophospholipase-like protein 1 (LYPLAL1) にも IFN- γ 産生反応を示した。

この結果は、がん抗原を標的とする遺伝子改変 T 細胞を臨床応用して治療に用いる場合、標的分子以外への反応による有害事象(Off-target effect)、中でも CD19-CAR 導入 T 細胞療法においてもみられたサイトカイン放出症候群を生じる可能性を示唆している。サイトカイン放出症候群に対しては、ステロイド、tocilizumab に代表される抗 IL-6 受容体抗体製剤などの対応が実地臨床でも行われており、A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 導入 T 細胞を臨床応用する際にも同様の対策が重要と考える。

これらの結果をふまえて、現在、HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR をヒト臍帯血由来造血幹細胞に遺伝子導入し、NOG マウスに移植することで骨髄腫特異的 CAR-T 細胞を長期的かつ持続的に産生し、多発性骨髄腫の治癒に繋げる新たな治療法の確立を目指すべく、*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

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 M Maruta, T Ochi, K Tanimoto, H Asai, M Yasukawa, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Direct comparisoin of target-reactivity and cross-reactivity induced by CAR-and BiTE-redirceted T cells for the development of antibody-based T-cell therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	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） 10.1038/s41598-019-49834-2.	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	安川 正貴 (Yasukawa Masaki) (60127917)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関