

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08369

研究課題名(和文)成人T細胞性白血病に対するTax特異的免疫細胞療法の実現のための基礎的研究

研究課題名(英文)Preclinical research for the clinical application of T-cell receptor gene therapy targeting tax for adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者

神田 善伸 (Kanda, Yoshinobu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30334379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)はHTLV-1ウイルスを原因とする難治性造血器腫瘍である。我々はHTLV-1に由来するTaxに特異的なT細胞受容体の全長DNAを健常人末梢血単核球に遺伝子導入して作成した細胞傷害性T細胞(CTL)はHTLV-1感染細胞に対して強力な細胞傷害活性を有することを示した。本研究では実際の治療に近い条件としてATL患者由来の末梢血単核球へ遺伝子導入の最適化を行い、その条件を設定することができた。また、Taxの発現と遺伝子導入CTLの有効性との相関の評価のためにTax mRNAの発現を定量する系を確立し、コンパニオン診断薬としてキット化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)は極めて難治性の造血器腫瘍であり、同種造血幹細胞移植が唯一の根治的治療法であるが、その予後も決して優れたものではなく、また、同種造血幹細胞移植を受けることができる患者も限られている。そのため、新しい治療法の開発が熱望されている。本研究のTax特異的T細胞受容体遺伝子導入免疫細胞療法は、既存の治療法とは全く異なり機序で抗腫瘍効果をもたらすものであり、本研究結果によって、今後、この治療法を診療現場に届けための医師主導治験につなげることができる。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia/lymphoma is a hematological malignancy caused by Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). We have previously transduced TCR-alpha/beta genes, cloned from a tax-specific CTL clone, into peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy volunteers, and those cells showed strong cytotoxic activity against HTLV-1 infected cells. In this study, we identified an ideal condition to transduce those genes into PBMCs from patients with ATL, because we are planning to use autologous gene-modified cells in clinical settings. In addition, we have established a blood test tool to quantitate Tax mRNA, and currently developing it as a companion diagnostic test to evaluate the sensitivity to Tax-specific immunotherapy.

研究分野：血液内科学

キーワード：免疫細胞療法 成人T細胞性白血病 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-I)を原因とする難治性の造血器腫瘍である。ATL の発症には、HTLV-I の転写活性化因子 Tax が重要であるとされているが、この Tax を認識する細胞傷害性 T 細胞(CTL)が、患者体内でのウイルス感染細胞の除去に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々も 4 名の同種造血幹細胞移植後 ATL 患者において Tax 特異的 CTL が増加していることを確認した(Cancer Research 2010;70:6181-6192)。さらに、single-cell RT-PCR 法での TCR レパトア解析によって、移植後に特徴的なアミノ酸配列(“ P-D/P-R ”)を有する TCR レパトアを持つ CTL が増加することを報告した(Cancer Research 2010;70:6181-6192)。この強力な CTL は移植後 3 年以上長期にわたって存在し続けることが示し (J Clin Immunol. 2012;32:1340-1352)、さらにこれらの CTL は他の患者の HTLV-I 感染細胞に対する細胞傷害性も示すことを見いだした。

次に、細胞傷害活性の強い CTL クローンの TCR 遺伝子全長をレトロウイルスベクターに組み込み、健常人末梢血単核球に遺伝子導入することによって、大量の CTL を産生することを試みた。産生された CTL について、まず *in vitro* で HTLV-I 感染細胞に対する細胞傷害活性の評価を行ったところ、遺伝子導入 CTL は感染細胞に対して HLA-A24 拘束性に特異的かつ強力な細胞傷害活性を示すことがわかった。さらに、6 週齢の免疫不全(NOG)マウスに、ルシフェラーゼ(LUC)遺伝子導入 MT-2 細胞(HTLV-1 感染細胞) 1×10^6 cells を腹注し、3 週経過後にマウス体内で MT-2 細胞が十分に増殖したのを発光 *in vivo* イメージングシステム (IVIS) で確認した後に遺伝子導入細胞 1×10^6 cells を尾静脈より投与する系によって、遺伝子導入細胞の *in vivo* での HTLV-I 感染細胞傷害効果が確認された。

以上の成果から、遺伝子導入 Tax 特異的 CTL は ATL 患者に対する新規治療法として期待されるが、臨床応用するにあたって障壁となりえる点について、基礎的な検討を積み重ねるために本研究を実施する。具体的な障壁として、ATL 患者自身の末梢血から十分な細胞傷害活性を有する十分な細胞数の遺伝子導入 CTL を誘導できるかという点と、ATL 患者の体内において Tax の発現が低下あるいは欠失することがあるという点が懸念される。

2. 研究の目的

本研究では実際に ATL 患者の末梢血からの CTL 誘導を試みるとともに、ATL 細胞の Tax の発現の程度と遺伝子導入 CTL の有効性の相関について評価し、さらにメチル化阻害薬や抗 PD-L1 抗体を併用することによって遺伝子導入 CTL の細胞傷害活性が上昇するかどうかを評価する。

3. 研究の方法

本研究では、倫理委員会の承認を受けたのちに ATL 患者由来の ATL 細胞を集積し、実際の治療に近い条件として治療前、あるいは治療後の ATL 患者由来の末梢血単核球へ遺伝子導入の最適化を行うために、まずは効率よく患者由来 T 細胞を増幅する条件について検討した。また、Tax の発現と遺伝子導入 CTL の有効性との相関の評価のために、まずは Tax mRNA の発現を定量する系について検討した。

4 . 研究成果

ATL 患者由来凍結末梢血単核球は、当初の条件では十分な増殖が見られなかったが、培養初期細胞濃度の調整、IL-2 濃度、OKT3 濃度等の再検討によって増殖率の改善が見られた。また、ATL 腫瘍細胞の Tax mRNA 発現を定量する系について、アクチンを内在性コントロールとして、Pa03453397_s1 プライマーを用いて定量 PCR を行う系を確立し、検証を行った。現在はコンパニオン診断薬としてキット化を進めている。

本研究の Tax 特異的 T 細胞受容体遺伝子導入免疫細胞療法は、既存の治療法とは全く異なる機序で抗腫瘍効果をもたらすものであり、本研究成果によって、今後、この治療法をより洗練された治療として診療現場に届けたための医師主導治験につなげることができる。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawamura K, Tanaka Y, Nakasone H, Ishihara Y, Kako S, Kobayashi S, Tanaka Y, Ohmori T, Uchimaru K, Okamoto S, Mineno J, Shiku H, Nishimura S, Kanda Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Development of a Unique T Cell Receptor Gene-Transferred Tax-Redirected T Cell Immunotherapy for Adult T Cell Leukemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Blood Marrow Transplant.	6. 最初と最後の頁 1377-1385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbmt.2020.04.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	仲宗根 秀樹 (Nakasone Hideki) (50757903)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

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