

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08713

研究課題名（和文）キメラ型抗原受容体遺伝子導入Tリンパ球による原発性骨髄線維症に対する細胞免疫療法

研究課題名（英文）Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for Primary Myelofibrosis

研究代表者

谷本 一史 (Tanimoto, Kazushi)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40724779

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）：原発性骨髄線維症（PMF）に対する新規細胞免疫療法の開発のため、PMF患者の細胞表面に発現する、変異calreticulin（mCALR）とMPLの複合体を標的とした治療法の研究を行った。MPL遺伝子とmCALR遺伝子を導入し、細胞表面にMPL/mCALR複合体を表出する標的細胞株を作成し、MPL/mCALRを特異的に認識するCAR-T細胞を作成し、標的細胞との反応性を確認した。結果は、mCALR特異的CAR-T細胞は標的細胞を抗原特異的に認識し活性化することが明らかとなった。これらの結果より、mCALRを標的としたPMFの治療として、CAR-T療法は有効な治療となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血不全や急性白血病へ至る疾患の一つであるPMFは、高齢者に発症する造血器悪性疾患であり、多くは同種移植の適応とならず予後不良である。今回我々が新しく開発した、mCALR/MPLを標的としたCAR-T細胞療法は、従来の治療とは異なる方法で、PMFの治療を目指す治療法である。すでにいくつかの造血器腫瘍に対してCAR-T細胞療法が用いられているが、PMFを始めとする骨髄増殖性疾患に対して、疾患・細胞特異的な分子を標的とする、より効果的な一本鎖抗体およびCAR-T細胞を用いることで、従来治療困難であった移植非適応の高齢者造血器腫瘍患者に、有望な治療選択肢として提供できる新規治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Immunotherapy with chimeric antigen receptor (CAR) - T cell therapy would be a novel treatment for primary myelofibrosis. Gene mutated calreticulin (mCALR) and MPL complex will be the new target of the PMF. Gene modified CALR and MPL were transduced in to the target cells and confirmed the expression on the cell surface. And mCALR/MPL specific CAR-T cells were established. Created CAR-T cells recognize mCALR/MPL and were activated via target specific reaction. These results suggest that CAR-T cell therapy targeting mCALR/MPL might be new therapeutic strategies for PMF.

研究分野：血液内科

キーワード：キメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞） 原発性骨髄線維症 CALR MPL 骨髄増殖性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性疾患 (MPN) は高齢者に発症する造血器悪性腫瘍の一つで、造血幹細胞レベルでの細胞の腫瘍化により発症し、血液細胞の著しい増加を伴い、比較的長い経過で段階的に悪化し、造血不全や急性白血病へ至る疾患である。高齢者であるがゆえに治癒を目標とした治療法である同種移植の適応とならない場合が多く、現在も予後の改善が得られていない。MPN の一つである原発性骨髄繊維症 (PMF) 患者の新規治療として、PMF に特異的な抗原を標的とするキメラ遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T 細胞) 療法を開発することで、その高い治療関連毒性のために同種造血幹細胞移植の恩恵に与れない高齢の PMF 患者に、移植以外に有望な治療の選択肢を提供することが可能となる。

2. 研究の目的

PMF 患者の約 30% が calreticulin (CALR) の遺伝子変異を伴っており、この変異 CALR (mCALR) とトロンボポエチン受容体である MPL とが結合することで、恒常的な増殖シグナルが細胞内へ伝達される。さらに mCALR/MPL 複合体は細胞表面に出現した状態で活性を有することが報告されていることから、我々は細胞表面の mCALR/MPL に親和性の高いモノクローナル抗体を作成し、これを基にキメラ遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T 細胞) を作製し、臨床応用に向けた研究を行い、造血幹細胞移植の適応のない高齢の PMF 患者に対する新規治療の開発を目的とし、本研究を行った

3. 研究の方法

(1) 我々の開発した抗体の可変領域の組み替えの技術を用いて、mCALR と MPL の複合体の細胞外ドメインを認識する mCALR/MPL 複合体特異的抗体の作成を行う。新規特異的抗体の可変領域の組み換えにより、より効果的な一本鎖抗体 (scFv) を作成し、作成した一本鎖抗体と T 細胞の活性化ドメインとのキメラ受容体遺伝子 (CAR) を導入した CAR-T 細胞を作成する。作成した CAR-T 細胞を短期間で安定して得られる「培養系」を確立する。
(2) CAR 遺伝子を導入した mCALR/MPL 特異的 CAR-T 細胞の標的細胞に対するアフィニティーや CAR-T 細胞自身の活性化、サイトカイン産生能をフローサイトメトリーにて検討する。
(3) 生体内における CAR-T 細胞の機能の評価として、PMF の再構築によるマウスモデルを作成し、mCALR/MPL-CAR-T 細胞をエフェクター細胞として輸注し、腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果と残存している CAR-T 細胞の疲弊マーカーを含む表面形質、mCALR/MPL 発現細胞応答性を詳細に検討し、PMF に対する細胞免疫療法のゴールを目指す。

4. 研究成果

(1) 健常人ヒト末梢血 B 細胞を回収し、5' RACE PCR 法を用いて免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域遺伝子をクローニングした。続いて、mCALR タンパクの C 末端を特異的に認識する抗体の可変領域を用いて、一本鎖抗体 (scFv) を作製した。加えて、MPL 陰性 CALR 陰性である K562 細胞株に、MPL 遺伝子と、代表的な mCALR である de152、ins5 をそれぞれ遺伝子導入して、K562/MPL、K562/mCALR (de152)、K562/mCALR (ins5) 細胞株を樹立した。
(2) 抗体の標的特異性の検討として、His タグ標識可溶性 scFv を作製し、各標的細胞株に対する結合性を確認した。その結果、mCALR scFv は K562/MPL 細胞株に結合しないこと、一方で、K562/mCALR (de152)、K562 (ins5) 細胞株には選択的に結合することを明らかにした。
(3) 我々の開発した Eumbody System を用いて、mCALR scFv の可変領域遺伝子の片方をヒト免疫グロブリン可変領域に由来するライブラリー配列に置換し、より効果的な scFv を搭載する CAR-T 細胞の開発研究を行った。MPL 遺伝子と、de152 または ins5 変異をもつ CALR 遺伝子をそれぞれ導入した 2 種類の標的細胞株を樹立し、細胞表面への mCALR/MPL 複合体の表出を確認した後に、mCALR を特異的に認識する scFv を搭載した CAR 遺伝子導入ヒト末梢血 T 細胞を用いて、CAR-T 細胞の変異 CALR への標的特異的な反応の確認を行った。遺伝子導入を行った mCALR 発現細胞株と mCALR 特異的 CAR-T 細胞 (mCALR-CAR-T 細胞) を共培養した時に、CAR-T 細胞表面上の CD69 ならびに CD107a 分子の発現の増加が認められた。このことから、CAR-T 細胞が、標的細胞表面の mCALR/MPL 複合体を認識して活性化していることが明らかとなった。
(4) 作成した mCALR-CAR-T 細胞の生体内における標的特異性や細胞障害活性、抗腫瘍効果を確認すべく、現在 PMF マウスモデルを作成中である。マウスへ輸注した mCALR-CAR-T 細胞の長期エフェクター細胞としての機能を解析し、その効果、安全性の評価を行い、移植非適応の高齢者 PMF 患者に対する新規治療としての応用を検討中である。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda Yuichi, Tanimoto Kazushi, Azuma Taichi, Fujiwara Hiroshi, Ochi Toshiki, Asai Hiroaki, Nabe Shogo, Maruta Masaki, Takeuchi Kazuto, Yamanouchi Jun, Kitazawa Sohei, Takenaka Katsuto	4. 巻 -
2. 論文標題 Disseminated infection with novel human adenovirus (genotype 79) following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	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） 10.1007/s00277-020-04151-x	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平川直樹, 小西達矢, 近藤史孟, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 山之内純, 越智俊元, 竹中克斗
2. 発表標題 CD8分子はキメラ抗原受容体導入T細胞の機能を増強しうる
3. 学会等名 第119回日本内科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本一史, 加藤潤一, 名部彰悟, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 小西達矢, 越智俊元, 波呂卓, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 臍帯血移植におけるレテルモビル終了後の遅発性CMV腸炎
3. 学会等名 第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山一成, 谷本一史, 丸田雅樹, 名部彰悟, 越智俊元, 宮崎幸大, 波呂卓, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 不明熱の診断に苦慮した横行結腸子宮内膜症の1例
3. 学会等名 第126回日本内科学会四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西達矢, 越智俊元, 平川直樹, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 安川正貴, 竹中克斗
2. 発表標題 CAR-T細胞の機能性におけるCD8分子の役割
3. 学会等名 第14回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森康雄, 原田卓哉, 河野健太郎, 栗山拓郎, 小田原淳, 上野稔幸, 浦田真吾, 谷本一史, 河野徳明, 吉本五一, 加藤光次, 伊藤能清, 上村智彦, 谷本一樹, 片山雄太, 牟田毅, 小川亮介, 岩崎浩己, 藤崎智明, 衛藤徹也, 竹中克斗, 長藤宏司, 宮本敏浩, 赤司浩一
2. 発表標題 移植後CMVモニタリング: 定量PCR法とアンチゲネミア法の比較解析
3. 学会等名 第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本一史, 加藤潤一, 名部彰悟, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 小西達矢, 越智俊元, 波呂卓, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 臍帯血移植におけるレテルモビル終了後の遅発性CMV腸炎
3. 学会等名 第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西達矢, 越智俊元, 平川直樹, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 安川正貴, 竹中克斗
2. 発表標題 The role of CD8 molecule involved in the functionality of CAR-T cells
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本一史, 丸田雅樹, 名部彰悟, 宮崎幸大, 越智俊元, 小西達矢, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 C2 targeted cyclosporine treatment for T-LGL leukemia with neutropenia
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西達矢, 越智俊元, 平川直樹, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 安川正貴, 竹中克斗
2. 発表標題 The role of CD8 molecule in the reactivity of T cells redirected with chimeric antigen receptor
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎幸大, 名部彰悟, 丸田雅樹, 小西達矢, 越智俊元, 波呂卓, 谷本一史, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 Azacitidine and venetoclax therapy for two untreated patients with erythroid leukemia
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸田雅樹, 村上忍, 宮本仁志, 小西達矢, 名部彰悟, 宮崎幸大, 越智俊元, 波呂卓, 谷本一史, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 Probiotic-related Clostridium butyricum bacteremia in an allogeneic HSCT recipient
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森康雄, 内田直之, 原田卓哉, 片山雄太, 和氣敦, 岩崎浩己, 衛藤徹也, 森重聡, 藤崎智明, 伊藤能清, 上村智彦, 高橋勉, 今村豊, 谷本一史, 石塚賢治, 杉田純一, 河野徳明, 谷本一樹, 吉本五一, 崔日承, 日高智徳, 小川亮介, 高松泰, 宮本敏浩, 赤司浩一, 長藤宏司
2. 発表標題 Risk factors for impaired antibody response after SARS-CoV-2 mRNA vaccine in HSCT recipients
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯ゆい, 宮崎幸大, 熊木天児, 井上明宏, 名部彰悟, 丸田雅樹, 越智俊元, 谷本一史, 山之内純, 竹中克斗
2. 発表標題 複視を契機に診断された多発性骨髄腫の1例
3. 学会等名 第127回日本内科学会四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 4)谷本一史, 池田祐一, 名部彰悟, 丸田雅樹, 越智俊元, 竹内一人, 竹中克斗
2. 発表標題 再発難治性ALK陰性ALCLに対する同種造血幹細胞移植の有効性
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 5)名部彰悟, 谷本一史, 丸田雅樹, 池田祐一, 越智俊元, 竹内一人, 竹中克斗
2. 発表標題 当院におけるPlerixaforによる自家末梢血幹細胞採取の有効性の検討
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 27)越智俊元, 丸田雅樹, 谷本一史, 倉田美恵, 増本純也, 竹中克斗, 安川正貴
2. 発表標題 次世代型一本鎖抗体作製技術に基づき調整したCAR-T細胞を用いた有効かつ安全な免疫療法の開発
3. 学会等名 第12回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ochi, T., Maruta, M., Tanimoto, K., Kurata, M., Masumoto, J., Takenaka, K., Yasukawa, M.
2. 発表標題 Fine-tuned scFv-expressing CAR-T cells show marked antitumor reactivity in vivo
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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

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