

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16395

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病に対するCLL-1特異的キメラ抗原受容体T細胞療法の改良

研究課題名（英文）Improvement of CLL-1 CAR-T cells for AML

研究代表者

田代 晴子（Tashiro, Haruko）

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50433884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：CLL-1.CAR/C7R-T細胞（C7R-T）は、サイトカイン非存在下で、リン酸化STAT5を持続的に発現することを、リン酸化フローサイトメトリーにて確認した。サイトカイン非存在下で長期培養を行ったとき、CLL-1.CAR-T細胞（CAR-T）はDay 30には死滅したが、C7R-Tは有意に長期間培養された。CAR-TとC7R-TをそれぞれCLL-1陽性細胞株であるHL60と共培養した際、C7R-Tはより長期間抗腫瘍効果を示した。in vivo実験においては、HL60を投与したNSGマウスにC7R-TあるいはCAR-Tを投与し、抗腫瘍効果の増強を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T細胞療法は、今後血液がんのみならず固形がんにも応用されていくことが予想される。より効果的なCAR-Tであるためには、persistenceが重要であり、C7Rを導入することにより、Persistenceが向上することは示された。

研究成果の概要（英文）：CLL-1.CAR/C7R-T cell showed phosphorylation of STAT5 in the absence of any cytokines. Although CLL-1.CAR-T did not survive more than 30 days without cytokines or antigen stimulation, CLL-1.CAR/C7R persisted until day 100. In a serial co-culture assay, CLL-1.CAR/C7R-T cells showed longer anti-tumor activity than CLL-1.CAR-T cells. In in vivo assay, NSG mice were received CLL-1+ AML cell line, HL60 and then received CLL-1.CAR/C7R-T cells or CLL-1.CAR-T cells. The CLL-1.CAR/C7R-T cells group showed better tumor control.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：CAR-T AML CLL-1

## 1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病に対する治療はここ40年大きな変遷を遂げていない。同種骨髄移植が現状では最も有効な治療法であり、その効果は Graft-vs-leukemia 効果によるところが大きい。前処置の毒性を軽減した Reduced intensity conditioning によって、移植療法はより幅広い患者層に行われるようになってきているとはいえ、毒性の強い治療であり、またいかに移植を行ったとしても、移植時に寛解でない症例ではその予後は依然として極めて悪い。移植後の予後の向上のためには、移植時に寛解に入っていることが大切ではあるが、標準的な化学療法で寛解に入らない場合、それ以外の抗がん剤に不応のことも多い。最近になって AML に対するいくつかの新規薬剤が使用可能になりつつあるが、現状、標準化学療法で寛解にはならない AML 症例では、再発前提で非寛解状態での移植に踏み切らざるを得ないことも多く、患者・家族、また医療者にとっても厳しい戦いを強いられる。一方、ALL に対しては、CD19.CAR-T 細胞療法の登場で、治療のストラテジーが今後大きく変わっていく可能性がある。すでに大手製薬会社が製剤化しており、費用の面など問題も多いが、薬物療法不応で非寛解の ALL も CD19.CAR-T 細胞療法によって、寛解導入され、CAR-T 療法が造血細胞移植へのブリッジとなっている症例も多い。AML においても、特に薬物療法不応例に対する CAR-T 細胞療法の開発は必須であると考えられる。申請者らは、先行研究において CLL-1.CAR-T 細胞療法を開発し、マウス異種移植モデルで、MRD を念頭に置いた、比較的少数の腫瘍細胞を使用したモデルにおいて抗腫瘍効果と生存期間の延長を示したが、高腫瘍量モデルでは、十分な抗腫瘍効果を示すことができなかった。MRD に対してだけでなく、再発難治例への使用を念頭に置いた AML に対する CAR-T 細胞療法であるなら、より高い抗腫瘍効果が求められる。

## 2. 研究の目的

薬物療法不応 AML に対して有用な CAR-T を開発することが本研究の目的である。すでに開発した CLL-1 を標的とした CLL-1.CAR-T 細胞に、恒常的な IL-7 シグナルを起こす Constitutive signaling from an engineered IL-7 receptor (C7R) を共発現させることによって、CLL-1.CAR-T 細胞の抗白血病効果を増強し、CLL-1 陽性 AML により高い殺細胞効果を有する CAR-T 細胞療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 効率の良い CLL-1.CAR/C7R-T 細胞の作成

CLL-1.CAR と C7R を一つのレトロウイルスベクターに組み込む。293T 細胞に、RD114, PegPAM と共に transfection し、CAR ウイルスを作成する。次に CD3, CD28 抗体で刺激した健常ドナー由来のリンパ球に Transduction して CAR-T 細胞を作成する。IL-7, IL-15 存在下で培養し増殖させる。メモリーフェノタイプ、疲弊マーカーの検討を行う。

### (2) 培養細胞系での CLL-1.CAR/C7R-T 細胞の抗腫瘍効果と安全性の評価

CLL-1.CAR/C7R-T 細胞と CLL-1.CAR-T 細胞を比較し、サイトカイン非存在下での増殖、腫瘍細胞との連続共培養アッセイなどを行い、抗腫瘍効果を評価する。また、毒性試験として正常臍帯血由来造血幹細胞を用いたコロニーフォーミングアッセイを行う。

### (3) マウス異種移植モデルにおいて、CLL-1.CAR/C7R-T 細胞の抗白血病効果

hGM-CSF/IL-3-NOG マウス (NSG) マウスは 2Gy 放射線照射したのち、CLL-1 発現 AML 細胞株である HL60 を尾静脈より投与する。そののち、CLL-1.CAR/C7R-T 細胞あるいは CLL-1.CAR-T 細胞の投与を行い、マウスの生存を比較する。

## 4. 研究成果

本研究では、AML への有効な CAR-T 細胞を作成することを目的とした。造血幹細胞に発現していない CLL-1.CAR-T の抗腫瘍効果を高めるために、恒常的な IL-7 シグナルを生じさせるコンストラクトである C7R を組み込んだウイルスベクターを作成した。1つのベクターに組み込むことによって効率的に CLL-1.CAR/C7R-T を健常ドナー T 細胞に発現させることに成功した。C7R を共発現することによっても、細胞のメモリーフェノタイプに変化を与えなかったが、サイトカイン・抗原非存在下で長期培養を行った場合、CLL-1.CAR-T 細胞は Day 30 までに死滅したが、CLL-1.CAR/C7R-T 細胞は Day 14 までは増殖し、そこからは次第に収束したが、Day 100 ころまで培養が可能であった。連続共培養試験においても、CLL-1.CAR/C7R-T 細胞は CLL-1.CAR-T 細胞と比較して長期間の抗腫瘍効果を示した。これらの成果から、in vivo 実験に進んだ。CLL-1.CAR/C7R-T 細胞は CLL-1 陽性 HL60 担がんマウスに対して CLL-1.CAR-T 細胞と比較してより強い抗腫瘍効果を示したが、この群において GVHD によると考えられる早期死亡が増えたため、生存率の改善には寄与しなかった。本事象は GD2.CAR-T 細胞を用いた元実験では認められておらず (Shum, Tashiro, et al. Cancer Discov 2017) AML に特有のものであるかを含め検討中である。



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 0件）

1. 著者名 田代晴子	4. 巻 47
2. 論文標題 急性骨髄性白血病に対するCAR-T細胞療法の開発	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 帝京医学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruko Tashiro, Thomas Shum, Ryosuke Shirasaki, Bilal Omer, Cliona M. Rooney, Stephen Gottschalk, Malcolm K. Brenner.
2. 発表標題 Combining a constitutively active IL-7 receptor with CLL-1 CAR T-cells for treatment of acute myeloid leukemia
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 Haruko Tashiro
2. 発表標題 A constitutively active IL-7 receptor augments the activity of CLL-1 CAR T-cells against AML
3. 学会等名 Thailand Hub of Talents in Cancer Immunotherapy International Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------