

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591245

研究課題名（和文） 免疫系は白血病幹細胞を拒絶できるかーヒト化マウスを用いた解析ー

研究課題名（英文） Attempts to answer the crucial question if the anti-tumor cellular immune system can eradicate leukemia stem cells - an analysis using humanized mouse system-

研究代表者

藤原 弘 (FUJIWARA HIROSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20398291

研究成果の概要（和文）：白血病治療を目指して、抗がん剤抵抗性であるヒト白血病幹細胞（LSC）に特徴的に発現している抗原を特異的に認識する T 細胞受容体（TCR）遺伝子を新たな機能改良型ベクターを用いて遺伝子導入して作成した白血病細胞傷害性ヒト T リンパ球（遺伝子改変 CTL）を利用する細胞免疫療法の開発研究を行っている。本研究において、LSC に発現している 2 つの白血病抗原（WT1 と Aurora kinase A）を標的とした人工 CTL が、それぞれ白血病に対する細胞免疫療法として臨床応用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Aiming at cure of leukemia, we are developing a novel cellular immunotherapy using genetically modified T lymphocytes to express leukemia antigen specific T-cell receptor (TCR) which can recognize leukemia stem cells (LSCs). In this study, we have demonstrated the clinical feasibility of two therapeutic options targeting Wilms' tumor gene product 1(WT1) and Aurora kinase A (AURKA), and the usefulness of a novel TCR gene expression vector (siTCR vector) which simultaneously encodes silencers for endogenous TCRs. Currently, this on-going study using a xenografted NOG mouse model are accumulating positive lines of evidence that adoptively transferred LSC-specific CTLs can prohibit leukemia progression in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子、遺伝子改変 T リンパ球、白血病性幹細胞、細胞免疫療法、同種造血幹細胞移植術

1. 研究開始当初の背景

近年、抗がん剤治療抵抗性を示す白血病幹細胞 (Leukemia Stem Cell: LSC) が治療抵抗性や再発に重要な役割を果たすことが明らかにされた。我々の共同研究グループも、自ら確立したヒト免疫系を再構築した免疫不全マウス (NOD/SCID/IL2 receptor γ chain^{null}) (ヒト化マウス) (Blood 106:1565-73, 2005) を用いて、骨髄ニッチに局在し細胞周期上静止期 (G0 期) にあり抗がん剤抵抗性を示す急性骨髄性白血病幹細胞 (AML-LSC) が患者骨髄細胞中の CD34⁺CD38⁻ 白血病細胞分画に存在することを示した。 (Nat Biotechnol.;25: 115-21, 2007)。一方で、白血病に対する同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) の長期的治療効果が、生着したドナーリンパ球が担う移植片対白血病 (Graft vs. leukemia, GvL) 効果によることが明らかにされ、抗腫瘍細胞性免疫系が LSC を制御出来る可能性が示唆されている。

正常細胞から白血病細胞を特異的に識別して攻撃する細胞免疫療法は絨毯爆撃の様な抗がん剤治療と異なり、有害事象が少ないと期待されている。この細胞免疫療法が LSC を確実に制御できれば、より有害作用が少なく、より有効性が高い白血病治療が実現できる可能性があると考えられるが、現在その直接的なエビデンスは殆ど得られていない。

2. 研究の目的

我々は、これまで抗白血病効果を発揮する細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導できる腫瘍抗原エピトープを複数同定し、白血病治療用ペプチドワクチン開発を進めてきた。その究極の目的は、抗がん剤と異なり副作用のほとんどない細胞免疫療法を用いて、「長期寛解から白血病治癒」を誘導することにある。従って、抗白血病性 CTL が LSC を傷害・排除出来るかどうかを明らかにすることは、細胞性免疫療法が白血病治癒を誘導できるか否かを左右する非常に重要なテーマである。本研究において、この点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 白血病幹細胞 (LSC) を標的とした臨床応用可能な細胞免疫療法の技術開発:

抗白血病ペプチドワクチン治療の臨床効果の限界はワクチンで誘導される抗白血病性 CTL の治療的“質と量”が患者間で異なることによる。その解決法として、抗白血病性 CTL 自体を患者体外で“容易に”かつ“大量に”しかも“適時に”作成することを目的として、LSC での発現を我々が確認した白血病抗原として Wilms' Tumor gene product 1 (WT1) と Aurora Kinase A (AURKA) を候補とし、HLA-A2402 拘束性に WT1 を、HLA-A0201 拘束性に AURKA をそれぞれ認識して抗白血病作用を発揮する CTL クローンを樹立し、そ

こから直接抗原認識を司る T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) 遺伝子を単離して治療用レトロウイルスベクターに組み込み、正常 T リンパ球に遺伝子導入することで、LSC を標的とした抗白血病性 CTL を短期間で培養・増幅できる系を作成した。この系を用いて作成した人工 CTL の、ヒト白血病細胞株、患者白血病細胞に対する抗白血病効果と、その安全性を試験管内及び白血病細胞を移植したヒト化マウスに対する治療モデルを用いて詳細に検討した。

(2) 白血病幹細胞 (LSC) の同定と人工 CTL の LSC 抑制効果の検討: 白血病患者骨髄 CD34⁺細胞を NOG マウスに継代移植する方法を用いて Leukemia initiating cells として LSC を同定した。比較対照として正常ヒト造血前駆細胞である臍帯血 CD34⁺を用いた。この患者白血病細胞移植 NOG マウスを患者自身及び健常者 CD8⁺T 細胞に改良型 WT1 特異的 TCR 遺伝子 (WT1-siTCR) を導入して作成した機能改良型人工 CTL を用いて治療モデル実験を行った。一方、試験管内での検討では、HLA-A24 を遺伝子導入したヒト白血病細胞株 K562-A24 細胞に Cell cycle indicator: Fucci 遺伝子を導入して、Time-lapse 法を用い WT1 特異的 TCR 遺伝子を導入した人工 CTL に対する白血病細胞の感受性と細胞周期の相関関係を検討した。

4. 研究成果

(1) 白血病幹細胞 (LSC) を標的に出来る細胞免疫療法の達成へ向けた技術開発:

抗白血病性 CTL を用いる細胞免疫療法の開発、特に、LSC を標的とする抗白血病性 CTL を開発する目的で、白血病性幹細胞分画である骨髄白血病細胞中の CD34⁺CD38⁻陰性分画に過剰発現を確認した WT1 と AURKA を標的抗原とした。HLA-A2402 拘束性に WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド (CM(Y)TW NQMNL) を、HLA-A0201 拘束性に AURKA₂₀₇₋₂₁₅ ペプチド (YLILEYAPL) を認識して傷害する CTL クローンを樹立し、そこから TCR 遺伝子を単離した。**WT1 特異的 TCR 遺伝子に関して**、WT1 特異的 TCR α/β 鎖全長に遺伝子変換 (codon-optimization) を施して、遺伝子導入先の T 細胞の内因性 TCR 遺伝子を選択的に抑制する shRNA を組み込むことで治療的 WT1 特異的 TCR の発現効率を向上させ、結果として TCR 遺伝子導入した人工 CTL の抗白血病効果が単一細胞当たりの WT1 応答性 Interferon- γ 産生性や CD107a アッセイで示される細胞傷害性脱顆粒反応を増強し、総じてより有効な抗白血病効果が得られることを明らかにした (発表論文②、⑧)。同時に、この TCR が日本人には極めて稀な HLA である B5701 とは交差反応を示し、異なる人種に用いる際は注意を要すること明らかにし (発表論文⑥)、さらに臍

帯血 CD34⁺細胞を用いて WT1 を軽度発現する正常造血前駆細胞は人工 CTL によって傷害されず、臨床的に安全性が高いことも示した (発表論文②)。さらに、WT1 発現量が高く予後が著しく不良な MLL 遺伝子変異を伴う乳児白血病に対して WT1 特異的 CTL を用いる細胞免疫療法が導入可能であること示した (発表論文④)。**AURKA 特異的 TCR 遺伝子に関して**、白色人種の約 60% を網羅する HLA-A0201 拘束性に AURKA₂₀₇₋₂₁₅ ペプチド抗原を認識する本遺伝子を導入した CD8 陽性人工 CTL が、やはり HLA-A24 陽性白血病細胞に対して有効であることを in vivo 及び in vitro の系で明らかにした (発表論文①)。AURKA は白血病に留まらず、広くがん細胞に過剰発現していることが知られている。そこで、がん特異的細胞免疫療法への適応拡大を目指して、この HLA-A0201 拘束性 AURKA 特異的 TCR 遺伝子は国内特許のみならず国際特許を申請した (WO2010/114129A1)。この研究に付随して、同様に遺伝子改変した CD4⁺T 細胞のヘルパー機能の有効利用に関する可能性を示した、この人工ヘルパー CD4 細胞の機能は WT1 特異的 TCR を用いた系に移して、現在詳細に検討している (論文投稿予定)。

(2) **LSC の同定と人工 CTL の LSC 抑制効果の検証へ向けた技術開発**： 白血病患者骨髄 CD34⁺細胞を NOG マウスへ継代移植する方法を用いて、Leukemia initiating cell として LSC が検出できることを確認した。加えて、細胞周期依存性抗がん剤 (Cytosine Arabinoside : Ara-C) の大量投与を用いて臨床的な骨髄抑制期 (Nadir state) を再現し、白血病細胞数が非常に低下した Nadir でも、LSC は存在して白血病再発を誘導出来ること、すなわち抗がん剤治療単独では LSC を排除出来ないことを確認した。次に Ara-C 大量療法に抵抗性を示す HLA-A2402 陽性患者白血病骨髄 CD34⁺細胞を移植したヒト化マウスを WT-siTCR を導入した患者自身の人工 CTL を静注して抑制出来ることを確認した、即ち抗がん剤治療抵抗性 LSC が遺伝子改変人工 CTL で抑制出来る可能性を示した (学会発表)。さらに、LSC が抗がん剤耐性を示す機序の一つとされる細胞周期静止期 (G0 期) と人工 CTL の細胞傷害活性との関係を、白血病細胞周期をきたまま検出できる Fucci システムを独自に改良した系を用いて患者白血病細胞を含むヒト白血病細胞は細胞周期とは無関係に人工 CTL によって傷害されることを示した (学会発表、論文準備中)。さらに、ルシフェラーゼと Fucci を同時に CD34⁺ヒト白血病細胞に導入して NOG マウスに移植したヒト化マウスを用いて、移植された白血病細胞がマウス骨髄のどこへ生着し分裂増殖のかを明らかにすべく、実験

系を組み立てている。

(3) **その他の業績**：上記の研究に付随して、共同研究等によって、ヒト HLA を遺伝子導入した NOG マウスを用いてヒト化マウスを作成すると、抗 EB ウイルス免疫応答が再現でき、ワクチン開発での前臨床試験に応用可能であることを示した (発表論文⑦)。また、ある種の抗がん剤によってすい臓がん細胞の WT1 発現が増強し、WT1 特異的人工 CTL に対する感受性を増強できること (文献③)、治療抵抗性末梢性 T 細胞リンパ腫が血球貪食症候群を合併する機序の一つに、腫瘍細胞上の TCR が重要な働きをしていること (発表論文⑤) 等が、技術開発の過程での検討によって明らかになった。また、これらの結果は、本研究を進める上で新たな考察を得る直接・間接的な契機となった。

以上の様に、本研究を通して、白血病治療を目指した細胞性免疫療法の開発へ向けて、根幹となる技術開発を達成すると共に、その理論的根拠となる「白血病幹細胞」に対する人工エフェクター CTL の抑制効果を確認するアッセイ系の開発を進めている。現在、さらにデータを蓄積しつつあり、合わせて論文化を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件中主な 13 件)

① Nagai K, Ochi T, Fujiwara H, An J, Shirakata T, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Melenhorst J, Gostic E, Price D.A., Ishii E, Yasukawa M. Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T-lymphocytes to display effective anti-leukemia reactivity. *Blood*, 119(2): 368-76. 2012 査読有

② Ochi T, Fujiwara H, Okamoto S, An J, Nagai K, Shirakata T, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked anti-leukemia reactivity and safety. *Blood*; 118(6):1495-503. 2011 査読有

③ Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T,

Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother.*; 60(9):1289-97.2011 査読有

④ Nagai K, Fujiwara H, Ochi T, Okamoto S, Mineno J, Shiku H, Koh K, Sugita K, Ishii E, Yasukawa M. Feasibility of gene-immunotherapy using WT1-specific T-cell receptor gene transfer for infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. *Blood Cancer Journal* . 1: e10; doi:10.1038/bcj.2011.8 査読有

⑤ An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, Kuzushima K, Yasukawa M. Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int J Hematol.*;93(2):176-185. 2011. 査読有

⑥ 藤原 弘. 遺伝子改変 T 細胞を用いた悪性腫瘍に対する細胞免疫療法 臨床血液 52(5);243-255, 2011 査読無

⑦ Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Requisite considerations for successful adoptive immunotherapy with engineered T-lymphocytes using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer (Review). *Expert Opin Biol Ther.* ; 11(6):699-713. 2011 査読有

⑧ Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Application of adoptive T-cell therapy

using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer for the treatment of human leukemia. (Review) *J Biomed Biotechnol.*; 2010: 521248.2010 査読有

⑨ Yasukawa M, Nagai K, Fujiwara H, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J and Shiku H. Allo-HLA reactivity of leukemia-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, e-Letters, 19 April 2010 査読有

⑩ Shultz LD, Saito Y, Najima Y, Tanaka S, Ochi T, Tomizawa M, Doi T, Sone A, Suzuki N, Fujiwara H, Yasukawa M, Ishikawa F. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;107(29): 13022-7. 2010 査読有

⑪ Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.*;69(23): 9003-11. 2009 査読有

⑫ Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Aurora-A kinase: a novel target both for cellular immunotherapy and molecular target therapy against human leukemia. *Expert Opin Ther Targets.* ;13(12): 1399-410. 2009 (Review.) 査読有

⑬ 藤原 弘. 造血器腫瘍関連抗原の同定と臨床応用 臨床血液 50(5);340-351, 2009 査読無

[学会発表] (計 90 件中主な 18 件)
<主な国際学会及び海外招聘講演>

① Yukihiro Miyazaki et al. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-cell receptor gene transfer redirects T

-lymphocytes to exert effective antitumor reactivity against adult T-cell leukemia. 第 53 回アメリカ血液学会総会、2011/12/12, San Diego, CA,USA

②Toshiki Ochi et al. Redirected CD4+ T cells using WT1-specific T-cell receptor gene transfer can supply multifactorial help to enhance the anti-leukemia reactivity mediated by similarly redirected CD8+ T cells using the identical gene transfer. 第 53 回アメリカ血液学会総会、2011/12/12, San Diego, CA,USA

③Hiroaki Aasai et al. Forced expression of CC chemokine receptor 2 enhances anti-cancer reactivity mediated by T lymphocytes beforehand redirected toward WT1 inside the tumor microenvironment. 第 53 回アメリカ血液学会総会、2011/12/10, San Diego, CA,USA

④Anti-leukemia functionality mediated by redirected T cells using LAA-specific TCR ; aiming at the persistent control of leukemia stem cells. (招聘講演) Hiroshi Fujiwara, Invited lecture at National Heart, Lung and Blood Institute/NIH, Bethesda, MA, USA.2011/09/21

⑤Hiroshi Fujiwara et al. Dual engineering of human CD8+ T-cells with WT1-specific TCR gene and chemokine receptor gene transfer confers functionally strengthened anti-cancer reactivity. 5th International Conference on WT1 in Human Neoplasia (招聘講演),2011/04/15, Turin, Italy

⑥Engineered T-lymphocytes using a novel anti-leukemia antigen, aurora-Akinase-specific T-cell receptor gene transfer successfully displayed anti-leukemia

reactivity. 37thAnnual Congress of European Group for Blood and Barrow Transplantation (EBMT 総会) (Van Bekkum Award 受賞講演)

Hiroshi Fujiwara et al. Paris France, 2011/04/03

⑦ Toshiki Ochi et al. Augmented expression of WT1-specific TCR and inhibition of mispaired TCR formation in TCR-gene modified T cells can concomitantly be achieved using a novel retroviral vector with silencers for endogenous TCRs. 第 52 回アメリカ血液学会総会、2010/12/07, Orlando, FL,USA

⑧Kozo Nagai et al. Dual engineering of human CD8+ T cells with WT1-specific TCR gene and chemokine receptor gene transfer confers functionally strengthened anti-cancer reactivity. 第 52 回アメリカ血液学会総会、2010/12/06, Orlando, FL,USA

⑨ Yukihiro Miyazaki et al. Engineered human T cells with a novel Aurora-A kinase-specific T-cell receptor gene transfer confers anti-leukemia reactivity. 第 52 回アメリカ血液学会総会、2010/12/06, Orlando, FL,USA

⑩Our current attempts to develop a novel gene-immunotherapy against human leukemia. (招聘講演) Hiroshi Fujiwara, Invited lecture at National Heart, Lung and Blood Institute/NIH, Bethesda, MA, USA.2010/08/02

⑪ Development of gene-immunotherapy against human leukemia with engineered T-cells using WT-1-specific T-cell receptor gene transfer. 36th EBMT 総会 Hiroshi Fujiwara et al. 2010/03/23, Vienna

Austria

⑫ Kozo Nagai et al. Development of a novel anti-leukemia immunogenetherapy using Aurora-A kinase-specific T-cell receptor genes transfer. 第 51 回アメリカ血液学会総会、2009/12/07, New Orleans, LA,USA

⑬ Toshiki Ochi et al. Development of novel stem cell transplantation and gene-immunotherapy using WT1-specific T-cell receptor gene. 第 51 回アメリカ血液学会総会、2009/12/07, New Orleans, LA,USA

<主な国内学会及び招聘講演>

⑭ 藤原 弘 他. 抗白血病性 T 細胞ネットワークを輸注する次世代型遺伝子免疫療法の開発研究. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会 (ワークショップ)。2012/2/24、大阪市

⑮ Hiroshi Fujiwara et al. Detailed assessment of anti-leukemia effect and safety of redirected T cells using WT1-siTCR vector. 第 73 回日本血液学会学術集会、2011/11/14、名古屋市

⑯ Hiroshi Fujiwara. Gene-engineered T-cell therapy against malignancies. (招聘講演) 第 72 回血液学会学術集会・シンポジウム 1 Cancer immunotherapy: Current status and future prospects、2010/10/24、横浜市

⑰ Hiroshi Fujiwara. Genetically engineered T-cell therapy for cancer. (招聘講演) 第 16 回日本遺伝子治療学会 (JSGT) 年次学術集会・Joint Symposium with the Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies Cancer Immunotherapy & Gene Therapy. 2010/07/03、宇都宮市

⑱ Hiroshi Fujiwara et al. Development of immune-gene therapy using Aurora-A kinase specific T-cell receptor gene. 第 68 回日本癌学会学術集会、2009/10/03、横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: T 細胞レセプター及び該レセプターをコードする核酸

発明者: 安川正貴、藤原 弘、越智俊元、峰野純一、加藤 郁之進

権利者: 国立大学法人愛媛大学、タカラバイオ (株)

種類:

番号: 国際公開番号 W02010/114129A1

取得年月日: 国際公開日 2010 年 10 月 7 日

国内外の別: 国内及び海外

[その他]

愛媛大学大学院生体統御内科学分野ホームページ

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.m.ed1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 弘 (FUJIWARA HIROSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20398291

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし