

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390260

研究課題名(和文) 白血病性幹細胞に対するキメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of T lymphocytes expressing chimeric antigen receptor for leukemic stem cells

研究代表者

小池 健一 (KOIKE, Kenichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：40143979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：PiggyBacトランスポゾン法を用いて正常人およびJMML患者のT細胞へGM-CSFを遺伝子導入したGMR.CAR-Tを作製し、本症患者のCD34陽性細胞に対する殺傷効果を解析した。GMR.CAR-T細胞はJMMLのCD34陽性細胞から形成されるコロニー数を著明に減少させたのに対して、mock-T細胞では明らかなコロニー数の減少は認められなかった。GMR.CAR-T細胞はJMML患者のCD34陽性CD38陰性白血病性幹細胞に対しても殺傷効果を示した。一方、臍帯血や骨髓由来のCD34陽性細胞に対しては明らかな影響を示なかった。以上から、本症に対して有望な免疫治療法となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated anti-proliferative potential of T cells non-virally engineered to bind to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor (GMR.CAR T cells) against juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) CD34+ cells. The co-culture of healthy or JMML GMR.CAR T cells with CD34+ cells of JMML patients in the presence of stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO) and interleukin-3 for 2 days significantly decreased the total colony growth. Seven-day co-culture of GMR.CAR T cells with JMML CD34+ cells resulted in a marked suppression on the expansion of CD34+ cells, particularly CD34+CD38- cells, under stimulation with SCF+TPO on AGM-S3 cells. Meanwhile, GMR.CAR T cells exerted no effects on the colony growth of normal CD34+ cells. Thus, our GMR.CAR T cells may provide a novel adoptive immunotherapy for this disease.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：白血病性幹細胞 キメラ抗原受容体T細胞 小児白血病 若年性骨髄単球性白血病 CD34陽性細胞 GM-CSF receptor

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) は、造血幹細胞の異常に起因する代表的な小児科領域の難治性血液疾患である。小児の MDS の中で、若年性骨髄単球性白血病 (JMML) は最も多い病型で、乳幼児期に好発する。唯一の根治療法は造血幹細胞移植であるが、満足できる移植成績は得られておらず、中でも PTPN11 変異を持つ JMML の移植後生存率は約 30% に過ぎない。また、移植後二次癌などの晩発障害は小児患者にとって大きな問題であることから、新規治療法の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

JMML の根源的な白血病細胞と言える白血病性幹細胞に発現しているサイトカイン受容体 (GM-CSF receptor, GMR) に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞を作製し、特異的な殺傷効果を示すか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

GMR に結合する GM-CSF の open reading frame をトランスポゾンプラスミドにサブクローニングし、piggyBac トランスポゾン法を用いて正常同種あるいは本症患者の T 細胞へ遺伝子導入した GMR.CAR-T を作製し、JMML 患者の CD34 陽性細胞に対する殺傷効果を解析する。コントロールとして非導入 T 細胞 (mock-T) を用いる。また、臍帯血 CD34 陽性細胞や正常骨髄 CD34 陽性細胞に対する影響も検討する。

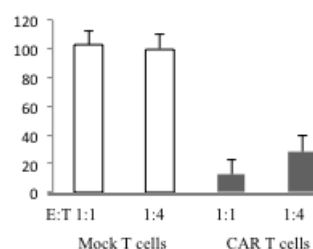
4. 研究成果

CD3/CD28 刺激と IL-15 により体外増幅された GMR.CAR-T 細胞を flow cytometry で解析した結果、約 85% は CD8 陽性で、NK 細胞はほとんど含まれていなかった。

GMR.CAR-T 細胞は、GMR を発現している

M07e 細胞に対して、E/T 比 = 2:1 で明らかな殺傷効果を発揮したが、mock T 細胞では無添加時と差はなかった。一方、GMR を発現していない K562 白血病細胞の増殖には GMR.CAR-T 細胞は影響を及ぼさなかった。健常ドナー由来の GMR.CAR-T 細胞と、PTPN11 変異や NRAS 変異を有する 5 名の JMML 患者の CD34 陽性細胞を 1:1、1:4 で混和し、stem cell factor (SCF)、thrombopoitin (TPO)、interleukin-3 (IL-3) 存在下で、2 日間培養し、コロニー数を算定した。図 1 に示すように、GMR.CAR-T 細胞は E/T 比 = 1:1 で JMML 患者 CD34 陽性細胞から形成されるコロニー数を約 10% に減少させたのに対して、mock-T 細胞では明らかなコロニー数の減少は認められなかった。また、6MP 治療を受けていた JMML 患者の末梢血から作製した GMR.CAR-T 細胞は、自身の診断時の CD34 陽性細胞に対して明らかな殺傷効果を示し、その効果は健常人の GMR.CAR-T 細胞と同等であった。さらに、臍帯血移植後のドナー由来の末梢血由来 GMR.CAR-T 細胞は、自身の JMML CD34 陽性細胞を殺傷した。興味深いことに、臍帯血由来の正常 CD34 陽性細胞や骨髄由来の正常 CD34 陽性細胞に対しては、GMR.CAR-T 細胞は明らかな殺傷効果を示さなかった。GMCSFR.CAR-T は GM-CSF の open reading frame から作製したため、GM-CSF 刺激下においても殺傷効果を発揮するのかを検討した。その結果、SCF、TPO、IL-3 刺激下と同等に、JMML 患者の CD34 陽性細胞に対して抑制効果を示した。

(A) JMML PB CD34⁺ cells (n=5)



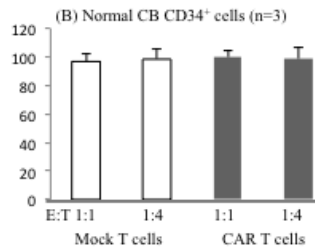


図1 GMR.CAR-T細胞のJMMLおよび臍帯血CD34陽性細胞に対する影響

上記の研究過程で、JMML患者の末梢血CD34陽性細胞をAGM-S3細胞上でSCFとTPOを添加して培養すると、2週後に平均20倍のCD34陽性細胞を増幅でき、約90%以上はCD38陰性であった。また、培養7日目のCD34陽性細胞の中にマウスの体内で増殖する白血病性幹細胞が存在することを世界で初めて明らかにした(Sakashita, Koike et al., Leukemia, 2014)。そこで、培養開始後7日目にCD34陽性細胞やCD34陽性CD38陰性細胞数を算定し、白血病性幹細胞の増殖に対する抑制効果を検討した。その結果、GMR.CAR-T細胞は、7 monosomyを有するJMML患者と、8 trisomy+PTPN11変異を有するJMML患者のCD34陽性細胞だけではなく、CD34陽性CD38陰性細胞の増殖をも著明に抑制した。一方、臍帯血由来のCD34陽性細胞には明らかな影響を及ぼさなかった。以上から、GMR.CAR-T細胞はJMML患者のCD34陽性細胞、中でも白血病性幹細胞に対しても殺傷効果を示すことが明らかとなり、本症に対して有望な免疫治療法となりうることを示唆された。

また、JMMLの遺伝子解析を行う中で、一部の症例においてはGM-CSF受容体-RAS/MAPKシグナル経路の遺伝子変異に加えてJAK3やSETBP1遺伝子変異を有することを見出した。これらのPTPN11変異+JAK3変異やPTPN11変異+SETBP1変異のクローンは診断時から存在し、6-MPに対して抵抗性を示した(Matsuda, et al. Leukemia 2014)。

<引用文献>

- 1) Hirano N, et al. Identification of an immunogenic CD8+ T-cell epitope derived from gamma-globin, a putative tumor-associated antigen for juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2006;108: 2662-8.
- 2) Saito S, Nakazawa Y, Koike K et al. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014; 16:1257-69.

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23件)

Shigemura T, Nakazawa Y, Amano Y, Sudo A, Watanabe M, Kobayashi M, Kobayashi N, Koike K, Agematsu K, Nishimura K. Subcutaneous abscess due to the basidiomycete *Phellinus mori* in a patient with chronic granulomatous disease. *Infection*. in press 査読有り

Shigemura T, Nakazawa Y, Hirabayashi K, Kobayashi N, Sakashita K, Agematsu K, Koike K. Dramatic improvement in the multifocal positron emission tomography findings of a young adult with chronic granulomatous disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Immunol*. in press 査読有り

Saito S, Yanagisawa R, Yoshikawa K, Higuchi Y, Koya T, Yoshizawa K, Tanaka M, Sakashita K, Kobayashi T, Kurata T, Hirabayashi K, Nakazawa Y, Shiohara M, Yonemitsu Y, Okamoto M, Sugiyama H, Koike K, Shimodaira S. Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of WT1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: A case report and review of the literature. *Cytotherapy*. 2015 17:330-5. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.10.003. 査読有り

Hirabayashi K, Nakazawa Y, Sakashita K, Kurata T, Saito S, Yoshikawa K, Tanaka M, Yanagisawa R, Koike K. Reduced-toxicity myeloablative conditioning consisting of 8-Gy total body irradiation, cyclophosphamide and fludarabine for pediatric hematological malignancies. *Sci Rep*. 2014; 4:6942. doi: 10.1038/srep06942. 査読有り

Sakashita K, Kato I, Daifu T, Saida S, Hiramatsu H, Nishinaka Y, Ebihara Y, Ma F, Matsuda K, Saito S, Hirabayashi K, Kurata T, Uyen LT, Nakazawa Y, Tsuji K, Heike T, Nakahata T, Koike K. In vitro expansion of CD34+CD38- cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2014 29:606-14. doi: 10.1038/leu.2014.239. 査

読有り

Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, Maeda Y, Sato Y, Okabe S, Inukai T, Sugita K, Wilson MH, Rooney CM, Koike K. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014 16:1257-69. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.05.022. 査読有り

Al-Kzayer LF, Sakashita K, Al-Jadiry MF, Al-Hadad SA, Uyen LT, Liu T, Matsuda K, Abdulkadhim JM, Al-Shujairi TA, Matti ZI, Hasan JG, Al-Abdullah HM, Inoshita T, Kamata M, Sughayer MA, Madanat FF, Koike K. Frequent coexistence of RAS mutations in RUNX1-mutated acute myeloid leukemia in Arab Asian children. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 61:1980-5. doi: 10.1002/pbc.25151. 査読有り

Shigemura T, Nakazawa Y, Matsuda K, Sano K, Yaguchi T, Motobayashi M, Saito S, Noda S, Kobayashi N, Agematsu K, Honda T, Koike K. Serial monitoring of Mucorales DNA load in serum samples of a patient with disseminated mucormycosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 2014 100:206-9. doi: 10.1007/s12185-014-1597-8. 査読有り

Yoshikawa K, Nakazawa Y, Katsuyama Y, Hirabayashi K, Saito S, Shigemura T, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Koike K. Safety, tolerability, and feasibility of antifungal prophylaxis with micafungin at 2 mg/kg daily in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Infection*. 2014 42:639-47. doi: 10.1007/s15010-014-0601-9. 査読有り

Hirabayashi K, Nakazawa Y, Matsuura H, Hara Y, Kurata T, Hirabayashi K, Saito S, Yoshikawa K, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Koike K. Risk factors for diabetes mellitus and impaired glucose tolerance following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with hematological malignancies. *Int J Hematol*. 2014 99:477-86. doi: 10.1007/s12185-014-1536-8. 査読有り

Matsuda K, Nakazawa Y, Iwashita C, Kurata T, Hirabayashi K, Saito S, Tanaka M, Yoshikawa K, Yanagisawa R, Sakashita K, Sasaki S, Honda T, Koike K. Myeloid progenitors with PTPN11 and non-RAS pathway gene mutations are refractory to treatment with 6-mercaptopurine in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2014 28:1545-8. doi: 10.1038/leu.2014.58. 査読有り

Al-Kzayer LF, Uyen LT, Al-Jadiry MF, Al-Hadad SA, Al-Badri SA, Ghali HH, Ameen NA, Liu T, Matsuda K, Abdulkadhim JM, Al-Shujairi TA, Matti ZI, Hasan JG, Al-Abdullah HM, Al-Ani MH, Saber PA, Khalil HM, Inoshita T, Kamata M, Koike K, Sakashita K. Analysis of Class I and II Aberrations in Iraqi Childhood Acute Myeloid Leukemia Using Filter Paper Cards. *Ann Hematol*. 2014 93:949-55. doi: 10.1007/s00277-014-2007-2. 査読有り

Shigemura T, Nakazawa Y, Yoshikawa K, Hirabayashi K, Saito S, Kobayashi N, Sakashita

K, Shiohara M, Wada T, Shimodaira S, Agematsu K and Koike K. Successful cord blood transplantation after repeated transfusions of unmobilized neutrophils in addition to antifungal treatment in an infant with chronic granulomatous disease complicated by invasive pulmonary aspergillosis. *Transfusion*. 2014 54:516-21. doi: 10.1111/trf.12325. 査読有り

Hirabayashi K, Shiohara M, Yamada K, Sueki A, Ide Y, Takeuchi K, Hagimoto R, Kinoshita T, Yabuhara A, Mudd SH, Koike K. Neurologically normal development of a patient with severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency after continuing dietary methionine restriction. *Gene*. 2013 530:104-8. doi: 10.1016/j.gene.2013.08.025. 査読有り

Sakashita K, Saito S, Yanagisawa R Miyuki Tanaka M, Yoshikawa K, Hirabayashi K, Tsukahara K, Motobayashi M, Nakazawa Y, Koike K. Usefulness of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in first complete remission for pediatric blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with skin involvement: a case report and review of literature. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 60:E140-2. doi: 10.1002/pbc.24622. 査読有り

Yanagisawa R, Shimodaira S, Kojima S, Nakasone N, Ishikawa S, Momose K, Honda T, Yoshikawa K, Saito S, Tanaka M, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Akino M, Hirayama J, Azuma H, Koike K. Replaced platelet concentrates containing a new additive solution, M-sol: safety and efficacy for pediatric patients. *Transfusion*. 2013 53:2053-60. doi: 10.1111/trf.12025. 査読有り

Nakazawa Y, Saito S, Yanagisawa R, Suzuki T, Ito T, Ishida F, Muramatsu H, Matsumoto K, Kato K, Ishida H, Umeda K, Adachi S, Nakahata T, Koike K. Recipient seropositivity for adenovirus type 11 (AdV11) is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2013 48:737-9. doi: 10.1038/bmt.2012.206. 査読有り

Hirabayashi K, Nakazawa Y, Katsuyama Y, Yanagisawa T, Saito S, Yoshikawa K, Shigemura T, Sakashita K, Ichikawa M, Koike K. Successful ganciclovir therapy in a patient with human herpesvirus-6 encephalitis after unrelated cord blood transplantation: usefulness of longitudinal measurements of viral load in cerebrospinal fluid. *Infection*. 2013 41:219-23. doi: 10.1007/s15010-012-0329-3. 査読有り

Sakashita K, Nakazawa Y, Yanagisawa R, Tanaka M, Saito S, Yoshikawa K, Hirabayashi K, Kusakari M, Kato S, Hidaka N, Nakayama Y, Shigemura T, Kobayashi N, Kobayashi M, Shiohara M, Koike K. Food allergy after cord blood transplantation in children. *Br J Haematol*. 2012 158:672-6. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09204.x. 査読有り

Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi

H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. Blood. 2012 120:1485-8. doi: 10.1182/blood-2012-02-406090. 査読有り

21 Al-Kzayer LF, Sakashita K, Matsuda K, Al-Hadad SA, Al-Jadiry MF, Abed WM, Abdulkadhim JM, Al-Shujairi TA, Hasan JG, Al-Abdullah HM, Al-Ani MH, Saber PA, Inoshita T, Kamata M, Koike K. Genetic evaluation of childhood acute lymphoblastic leukemia in Iraq using FTA cards. Pediatr Blood Cancer. 2012 59:461-7. doi: 10.1002/pbc.24055. 査読有り

22 Matsuda K, Yoshida N, Miura S, Nakazawa Y, Sakashita K, Hyakuna N, Saito M, Kato F, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Kobayashi C, Ito T, Ishida F, Manabe A, Kojima S, Koike K. Long-term haematological improvement after non-intensive or no chemotherapy in juvenile myelomonocytic leukaemia and poor correlation with adult myelodysplasia spliceosome-related mutations. Br J Haematol. 2012 157:647-50. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09063.x. 査読有り

〔学会発表〕(計8件)

Hama A, Manabe A, Koike K, et al. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in 11 children. 第76回日本血液学会学術集会 2014年10月31日～11月2日 大阪

Sakashita K, Koike K. International cooperation for Belarus and Iraq 第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11日～13日 名古屋

平林耕一、小池健一、他 小児血液悪性疾患における8-Gy全身放射線照射をベースとする前処置の有効性 第36回日本造血細胞移植学会総会 2014年3月7日～9日 沖縄

中沢洋三、小池健一、他 若年性骨髄単球性白血病に対するGM-CSF受容体を標的とした遺伝子改変T細胞療法の開発 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 2013年11月29日～12月1日 福岡

小池健一 小児領域のMDS/MPNの分子病態 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月19日～21日 京都

重村倫成、中沢洋三、松田和之、小池健一 トランスポゾンを用いた慢性肉芽腫症に対する新たな遺伝子治療法の開発 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20日～22日 福岡

齋藤章治、中沢洋三、平林耕一、小池健一 他 難治性急性リンパ性白血病に対するCD19特異的遺伝子改変T細胞療法の開発 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20日～22日 福岡

〔図書〕(計5件)

小池健一 医学書院、小児のHIV感染症 『今日の治療指針』2014年、2ページ

中沢洋三、小池健一 小児の組織球増殖性疾患 『ネルソン小児医学』第19版(日本語版)2015年、2057ページ～2061ページ

〔その他〕

ホームページ等準備中。

6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 健一 (KOIKE Kenichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：40143979

(2)研究分担者

坂下 一夫 (SAKASHITA Kazuo)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：10345746

中沢 洋三 (NAKAZAWA Yozo)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：60397312