

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790969

研究課題名(和文)キメラ抗原レセプターを遺伝子導入したリンパ球細胞の作成方法の至適化

研究課題名(英文)Optimization of chimeric antigen receptor-gene modified T lymphocyte generation

## 研究代表者

寺倉 精太郎(Terakura, Seitaro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40625141

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)：CD19を標的としたキメラ抗原レセプター(CD19CAR)遺伝子導入T細胞の作成方法の至適化を行った。同種の細胞を用いた系における改良として、ウイルス特異的T細胞において効率よくCD19CARを遺伝子導入した細胞を作成する方法について検討した。培養系の検討としてサイトカインの至適組み合わせについて検討した。その結果、IL-2とIL-21の組み合わせが最適であった。また自家の細胞を用いた系における改良として、drug-inducible systemを用いて、CD19CARの発現をコントロールするシステムの開発を行い、発現をコントロールできることを示した。

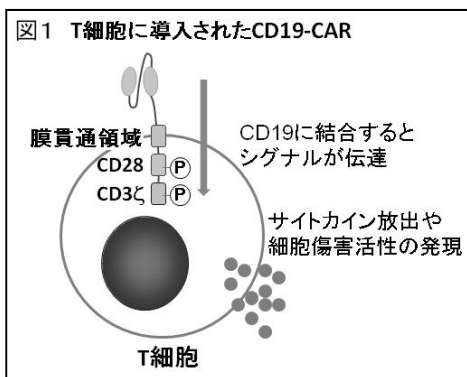
研究成果の概要(英文)：We aimed to optimize the method for generation of chimeric antigen receptor-gene modified T lymphocyte (CD19CAR-T). For the generation of allogeneic CD19CAR-T lymphocytes, we analyzed the method for better generation of virus-specific/ CD19CAR-gene modified T lymphocytes. We tested the possible combination of cytokine combination and concentration. As a result, the IL-2 and IL-21 combination was better than other conditions. For the optimization of autologous CD19CAR-T lymphocytes, we developed drug-inducible expression system of CD19CAR, and demonstrated that we could successfully control CD19CAR expression under drug administration.

研究分野：遺伝子導入T細胞療法学

キーワード：キメラ抗原レセプター 細胞療法 遺伝子導入T細胞 免疫療法 リンパ性白血病 悪性リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍特異的免疫細胞を作成する方法としてキメラ抗原レセプター (Chimeric antigen receptor, CAR) は近年盛んに研究されている。CAR とは、抗体の単鎖可変領域と C 領域を細胞外ドメインとし、それに膜貫通領域と CD3 $\zeta$  と共刺激シグナルを伝える分子の細胞内ドメインをつないだもので (図 1)、抗原に結合することにより T 細胞にシグナルが伝達され標的細胞の傷害が起こる。遺伝子導入によって T 細胞に特異性を与えることが可能で、T 細胞レセプターの遺伝子導入では特定の HLA を持つ場合のみ治療可能であるが、CAR には HLA 拘束性がない点において



より有利である。2011年には化学療法不応となった慢性リンパ性白血病 (CLL) に対して、CD19 特異的 CAR (CD19-CAR) を遺伝子導入した CD8 陽性 T 細胞が持続的な抗腫瘍活性を示すことが報告された (New England Journal of Medicine, 2011; Science Translational Medicine, 2011)。この報告はこれまでの T 細胞を用いた養子免疫療法と比較して、患者体内への投与後、投与した T 細胞が長期間体内に残り、実際の抗腫瘍活性を示した点において画期的である。成功した理由として、この報告では非常に強い免疫抑制状態にある CLL 患者を対象とすることによって、「宿主の免疫システムによる排除」を回避しえたのではないかと推測された。申請時に既に申請者らは、CD19 特異的 CAR を遺伝子導入した T 細胞を、同種造血幹細胞移植後の患者において投与するための遺伝子導入・培養増幅方法の確立に取り組んでいた。同種移植後に再発予防・治療として CD19-CAR<sup>+</sup> T 細胞を投与する場合、遺伝子導

入される細胞は既知の特異性を持つ細胞である必要がある。さもなくば患者体内への移入後、CD19-CAR<sup>+</sup> T 細胞はもともと持っている T 細胞レセプター (TCR) の特異性に従い、移植後の重篤な合併症である移植片対宿主病を引き起こす可能性がある。そこで我々はウイルス特異的 TCR を持つ細胞を選択的に培養し、同時に CD19-CAR を遺伝子導入する系を確立した。これにより作成された細胞はウイルス特異性と CD19 に対する特異性の両方を備えており (Bi-specific)、それぞれの刺激に対して同等の機能および分裂能力を持っていることが分かった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は CD19 CAR を遺伝子導入した T 細胞を、同種あるいは自家の T 細胞から作成する方法を至適化することである。

(1) 同種細胞を用いた系では、日本人において頻度の高いウイルス特異的 T 細胞に CD19-CAR を遺伝子導入し、同時に新たなサイトカインを含んだ培養条件の至適化にも取り組むことにした。

(2) 自家細胞を用いた系では、CAR の細胞内ドメインを入れ替えることによって、どのような反応の違いがでるのか検討し、抗原密度と細胞内ドメインとの相関について検討することにした。

(3) これまで用いてきた CD19CAR では、CD19CAR-T 細胞を患者体内に投与すると、これに反応する CD19 抗原陽性細胞がなくなるまで非常に強い反応が起こり続け、それによる致命的合併症も報告されている。今回我々は薬剤を投与したときだけ CD19CAR が発現するようにする新たなシステムの検討をも行うことにした。

## 3. 研究の方法

(1) 日本人に多い HLA 型とそのサイトメガロウイルス (CMV)・EB ウイルス (EBV) 特異的エピトープを認識する T 細胞に対して CD19-CAR を遺伝子導入し、Bi-specific T 細胞を樹立できるかを検討した。我々が

既に Bi-specific T 細胞が樹立できることを報告したウイルス特異的エピトープは A\*0201-CMV, B\*0702-CMV, B\*0801-EBV などであるが (Terakura et al. Blood, 2012)、日本人に多い HLA-A\*2402 等のエピトープ特異的 T 細胞に関しては試みておらず、これらのエピトープにおいて同様に作成可能であることを示すことにより、本邦において臨床試験が可能かどうか検討した。

(2) 培養方法の改良。初期の培養において T 細胞の生存シグナルである IL-15 あるいは IL-21 を併用することで、特異的刺激を受けた細胞をより選択的に培養・増幅できるか検討した。

(3) CAR の細胞内ドメインの最適化に取り組んだ。細胞内ドメインの異なる CAR を作成し、それらの働きを検討した。どの細胞内ドメインが最も反応が強くなるか検討した。

(4) 薬剤を投与したときだけ CAR が発現するシステムの開発を行った。レトロウイルスを用いてベクターを構築することを試みた。これを T 細胞に遺伝子導入し、CAR の発現を薬剤によってコントロールできるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

患者あるいはドナーから細胞その他の材料を採取する場合には、当院 IRB で審査を受け、適切なインフォームド・コンセントのもと行っている。研究遂行にあたって必要な倫理指針などを遵守して行った。

#### 4. 研究成果

(1) 日本人に頻度の高い HLA に拘束される CMV/EBV エピトープの同定とそれらを用いた Bi-specific T 細胞の作成を行った。CMV 特異的 T 細胞に比べて EBV 特異的 T 細胞は増幅しづらいことがわかった。CMV 特異的細胞は増幅しやすいものの、CMV 陽性ドナーの割合は日本人の 60%程度とそれほど高くないため、新たなエピトープの同定が必要であると考えられた。EBV は日本人のほぼ 100%が陽性であるが、前駆細胞の割合に比べて、培養中の

増幅が不良であった。培養方法の更なる工夫が必要であると考えられた。

(2) IL-15 および IL-21 を用いた Bi-specific T 細胞の培養条件の最適化;IL-2 に加えて IL-15 および IL-21 を加えた培養系で Bi-specific T 細胞の培養を行い、IL-2+IL-21 の培養系において有意に高い遺伝子導入効率を得た。この培養系が最適であると考えられた。

(3) 自家の細胞を用いた系における改良：我々の用いてきた CAR の細胞内ドメインは CD28 のものを用いているが、近年臨床的有用性が報告されている 4-1BB や CD27 を用いて更なるシグナル伝達の効率化を検討した。これまでの CD28 細胞内ドメインに替えて、4-1BB や CD27 の細胞内ドメインを合成し、4-1BB や CD27 の細胞内ドメインを持つウイルスベクターを作成した。これらの CAR によるシグナル伝達をより容易に比較・定量するために、細胞を用いたアッセイの構築を行った。これは T 細胞の腫瘍細胞株に CAR と reporter vector を遺伝子導入し、これを CAR の標的抗原で刺激することによって CAR を介して伝達するシグナルを定量しようと試みた。reporter vector を遺伝子導入し、次に CAR を遺伝子導入した細胞を作成したが、刺激後に意図したような蛍光の発現は見られなかった。そのため、刺激後にリン酸化するタンパクを細胞内フローサイトメトリーで検討した。

(4) CAR の発現を薬剤で自由にコントロールすることが出来れば、これまで自殺遺伝子の導入などを行っていたところを、薬剤でコントロールし、遺伝子導入免疫細胞は生かしたまま治療を一旦中断するなど柔軟な対応が可能となり、期待される。そのため、このベクターシステムを構築した。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 6 件)

Terakura S, Martin PJ, Shulman HM, Storer BE. Cutaneous macrophage infiltration in acute graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant.

2015 In press.

Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3  $\zeta$  Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol*. 2015 Feb 1;194(3):911-20.

Terakura S, Nishida T, Inamoto Y, Ohashi H, Naoe T, Murata M. Successful unrelated cord blood transplantation for adult acquired aplastic anemia using reduced intensity conditioning without ATG. *Immunol Lett*. 2014 Jul;160(1):99-101.

Nishiwaki S, Nakayama T, Murata M, Nishida T, Terakura S, Saito S, Kato T, Mizuno H, Imahashi N, Seto A, Ozawa Y, Miyamura K, Ito M, Takeshita K, Kato H, Toyokuni S, Nagao K, Ueda R, Naoe T. Dexamethasone palmitate ameliorates macrophages-rich graft-versus-host disease by inhibiting macrophage functions. *PLoS One*. 2014 May 7;9(5):e96252.

Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A\*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8<sup>+</sup> T-cell epitope for adoptive immunotherapy. *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(4):399-405.

Terakura S, Yamamoto TN, Gardner RA, Turtle CJ, Jensen MC, Riddell SR. Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8<sup>+</sup> T cells derived from virus-specific central memory T cells. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):72-82.

[学会発表] (計 26 件)

Watanabe K, Terakura S, Uchiyama S, Martens AC,

van Meerten T, Nishida T, Naoe T, Kiyoi H, Murata M. Excessively High-Affinity Single-Chain Fragment Variable Region in a Chimeric Antigen Receptor Can Counteract T-cell Proliferation. 第 56 回米国血液学会, San Francisco, USA, 2014 年 12 月 7 日

Terakura S, Atsuta Y, Tsukada N, Kobayashi T, Tanaka M, Kanda J, Ohashi K, Fukuda T, Uchida N, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Miyamura K. Comparison of Outcomes of Unrelated BM and CB transplants in Young Adult Leukemia Patients: An Updated Results of Japanese Registration Data. 第 56 回米国血液学会, San Francisco, USA, 2014 年 12 月 6 日

寺倉精太郎、熱田由子、塚田信弘、小林武、田中正嗣、諫田淳也、大橋一輝、福田隆浩、内田直之、高橋聡、長村登紀子、森島泰雄、宮村耕一 Comparison of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in young adult leukemia. 第 76 回日本血液学会総会, 大阪府、大阪市、大阪国際会議場、2014 年 11 月 1 日  
渡邊慶介、寺倉精太郎、内山進、今井美沙、酒村玲央奈、後藤辰徳、葉名尻良、島田和之、西田徹也、直江知樹、富田章裕、清井仁、村田誠 Anti-CD20 chimeric antigen receptor<sup>+</sup> T cells can recognize remarkably low target antigen

expression. 第 76 回日本血液学会総会, 大阪府、大阪市、大阪国際会議場、2014 年 10 月 31 日  
寺倉精太郎. キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞を用いた細胞治療の今後 第 63 回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会, 愛知県、名古屋市、名古屋第一赤十字病院、2014 年 9 月 20 日

渡邊慶介、寺倉精太郎、今井美沙、酒村玲央奈、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、島田和之、富田章裕、西田徹也、村田誠、清井仁 キメラ抗原受容体単鎖抗体部分の強すぎる親和性は

抗原刺激後のT細胞増殖を阻害する 第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会, 京都府、京都市、京都大学医学部芝蘭会館、2014年9月6日

寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、渡邊慶介、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹 同種臍帯血移植を行い良好な生着・生存を得た成人再生不良性貧血の3例 第36回日本造血細胞移植学会, 沖縄県、宜野湾市、2014年3月7日  
渡邊慶介、寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹 新規CD20キメラ抗原レセプター遺伝子導入T細胞の樹立とCD20低発現標的に対する効果の検討 第36回日本造血細胞移植学会, 沖縄県、宜野湾市、2014年3月7日

Watanabe K, Terakura S, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Nishida T, Tomita A, Murata M, Naoe T. Anti-CD20 Chimeric Antigen Receptor Transduced T cells Can Recognize Very Low Antigen Expression: Determination of the Lower Threshold Required to Activate the CAR-T Cells. 第55回米国血液学会総会, New Orleans, USA, 2013年12月9日

渡邊慶介、寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹 新規CD20キメラ抗原レセプター遺伝子導入T細胞の樹立とCD20低発現標的に対する効果の検討 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会, 愛知県、名古屋市、ウインクあいち、2013年8月24日  
寺倉精太郎 新規CD20キメラ抗原レセプターの開発～CD20低発現標的細胞に対する効果 第14回基礎血液懇話会, 愛知県、名古屋市、名古屋大学医学部附属病院、2013年6月28日  
寺倉精太郎 セントラル・メモリーT細胞由来、ウイルス特異的/CD19特異的キメラ抗原レセプター遺伝子導入T細胞の作成 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会, 石川県、金沢市、金沢

市文化ホール、2012年8月18日

[図書] (計1件)

寺倉精太郎、直江知樹、小澤敬也、中尾眞二他、76名8番目. 血液疾患 最新の治療 2014-2016 巻頭トピックス8 新しい細胞免疫療法の進展 2014 380, (42-46). 南江堂

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

名称: ヒト化抗CD20キメラ抗原レセプター

発明者: 寺倉精太郎、渡邊慶介

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許願 2013-234784 号

出願年月日: 2013年11月13日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺倉 精太郎 (TERAKURA, Seitaro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 40625141