

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290058

研究課題名(和文)成人T細胞性白血病に対する腫瘍抗原特異的T細胞受容体遺伝子導入細胞療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of redirected Tax-specific T-cell immunotherapy against adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者

神田 善伸 (KANDA, YOSHINOBU)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30334379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,300,000円

研究成果の概要(和文)：ATLはヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)を原因とする難治性造血器腫瘍である。我々はこれまでにATLに対する造血幹細胞移植後にHTLV-1に由来するTaxを標的とする細胞傷害性T細胞(CTL)が増加し、特定のアミノ酸配列(PDR)を含むT細胞受容体(TCR)レパトアを持つCTLが強い細胞傷害活性を有すること、このようなCTLは患者間をまたいで普遍的に存在することを示した。そしてこのCTLのTCR全長DNAを健康人末梢血単核球に遺伝子導入して作製したTax特異的CTLは、免疫不全マウスにHTLV-1感染細胞を接種する系でHTLV-1感染細胞を強力に傷害することを示した。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is a hematological malignancy caused by HTLV-1 infection. ATL is refractory to chemotherapy and the prognosis of patients with ATL is extremely poor. We have revealed that cytotoxic T-cells (CTLs) against Tax, a protein produced by HTLV-1, increased after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for ATL and found that CTLs with T-cell receptor (TCR) repertoire containing "PDR" motif exhibit strong cytotoxic activity against HTLV-1 infected cells. In addition, we produced redirected Tax-specific CTL by transducing the full-length TCR alpha and beta genes of the "PDR"-containing TCR to peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers using retroviral vector, and showed that the redirected CTLs also had strong cytotoxic activity against HTLV-1 infected cells both in vitro and in vivo (patent pending).

研究分野：血液内科学

キーワード：遺伝子導入免疫細胞療法

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-I)を原因とする造血器腫瘍である。極めて難治性であり、新しい治療法の開発が期待されている。抗腫瘍免疫を利用した治療法が悪性腫瘍に対する治療として注目を集めているが、多くのがん抗原は元々ヒトの細胞が発現している抗原を標的としているため、正常細胞とがん細胞を区別することが困難であった。しかし、ATL の腫瘍細胞は人体に存在しないウイルス抗原を発現しているため、正常細胞とは明確に区別することができる。すなわち、抗原特異的免疫療法に適した腫瘍であると考えられる。

我々はこれまでに single-cell RT-PCR 法での T 細胞受容体(TCR) レパトア解析によって、ATL に対する造血幹細胞移植後に HTLV-I に由来する転写活性因子 Tax を標的とする細胞傷害性 T 細胞(CTL)が増加し、その中でも特定のアミノ酸配列を含む TCR レパトアを有する CTL が強い細胞傷害活性を有することを報告した(Cancer Res 2010;70:6181-6192)。また、このような TCR レパトアを持つ CTL は移植前後をまたいで、あるいは患者間をまたいで普遍的に存在することを示してきた(J Clin Immunol. 2012;32:1340-1352、Immunology Letters 2014;158:120-125)。

2. 研究の目的

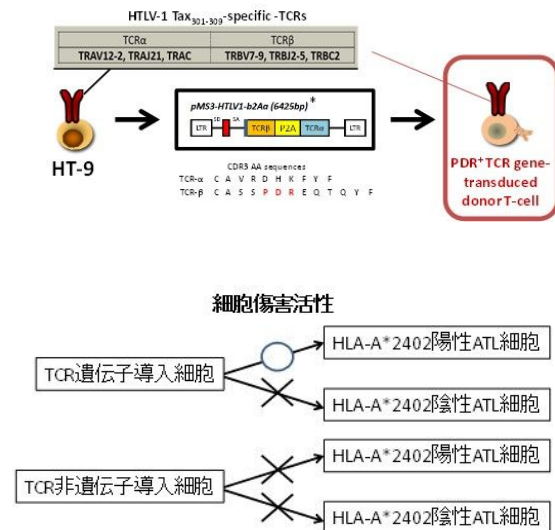
本研究では強力な細胞傷害活性を發揮する CTL の TCR の全長 DNA をクローニングしてレトロウイルスベクターを用いて健常人末梢血単核球に遺伝子導入し、その効果を in vivo、in vitro の系で評価する。最終的な目標として、ATL に対する特異的免疫療法の臨床応用を実現する。

3. 研究の方法

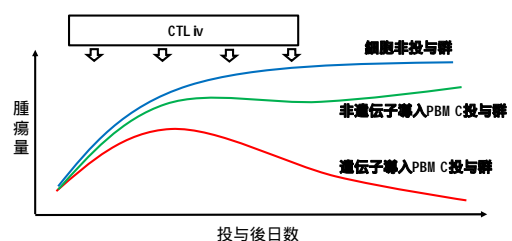
これまでの研究で同定された、強力な細胞傷害活性を有する Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞クローンから TCR 及び 遺伝子をクローニングする。その塩基配列を決定してレトロウイルスベクターに組み込み、健常人末梢血単核球に遺伝子導入する。得られた遺伝子導入細胞について、まず Tax ペプチドで刺激した T2A24 細胞(抗原提示細胞)を認識して細胞傷害活性を示すかどうかを評価し、活性が見られた場合はさらに複数の患者由来 ATL 細胞株に対する細胞傷害活性を in vitro の系および NOD/scid/ cnull (NOG)マウスを用いた in vivo の系で評価を行う。マウスの系においては他の正常臓器への影響がみられないかどうかについても確認を行う。

4. 研究成果

細胞傷害活性の強い CTL クローンの TCR 遺伝子をタカラバイオ社の協力を得てクローニングし、その遺伝子全長をレトロウイルスベクターに組み込み、健常人末梢血単核球に遺伝子導入することによって、大量の CTL を産生することを試みた。産生された CTL について、まず in vitro で HTLV-I 感染細胞に対する細胞傷害活性の評価を行ったところ、遺伝子導入 CTL は感染細胞に対して HLA-A24 拘束性に特異的かつ強力な細胞傷害活性を示すことがわかった。



さらに、6 週齢の NOD/scid/ycnull (NOG) マウスに、ルシフェラーゼ(LUC)遺伝子導入 MT-2 細胞(HTLV-1 感染細胞) 1×10⁶cells を腹注し、3 週経過後にマウス体内で MT-2 細胞が十分に増殖したのを発光 in vivo イメージングシステム (IVIS) で確認した後に、ヒト T リンパ球に上記 TCR 遺伝子を導入した遺伝子導入 T 細胞 1×10⁶cells を尾静脈より投与する系によって、遺伝子導入 T 細胞の in vivo での HTLV-I 感染細胞傷害効果が確認された(以上の研究は科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)基盤研究(B)「成人 T 細胞性白血病に対する腫瘍抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子導入細胞療法の開発」において行った。以下の図は特許出願中の未公表データのため、実データではなくイメージ図である)。



今後の展望としては、ATL 患者を対象とした医師主導治験を開始し、それを完遂したのちに承認申請を行い、TCR 遺伝子導入細胞療法を診療現場に届けることが具体的な目標となる。一方、本研究を臨床応用するうえでの懸念のひとつは、ATL 患者の末梢血から十分な量の T 細胞受容体遺伝子導入細胞を得ることができるかどうかであり、初回化学療法後に腫瘍細胞が減少した状態での末梢血単核球に遺伝子導入を行う、CD8 陽性細胞を分離してから遺伝子導入を行うなどの試行錯誤を行う予定である。もう一つの懸念は腫瘍細胞の Tax の発現の問題である。ATL 腫瘍細胞を体外に採取した状態では Tax の発現は強く抑制されている。一方、Tax の発現は生体内できわめて低い発現状態になっているにもかかわらず、Tax 特異的 CTL の標的となりえることが示されており、Tax を検出する検査系の感度の問題が指摘されている。そこで、ATL 症例から採取した腫瘍細胞についてゲノム異常の評価を行い、Tax のさまざまな発現レベルの腫瘍細胞に対する遺伝子導入 CTL の効果を評価し、5' -LTR 領域にメチル化がみられた腫瘍細胞についてはメチル化阻害薬である azacitidine の併用効果についても検討する。

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 78 件)

1. Hideki Nakasone, Kiriko Terasako-Saito, Rie Yamazaki, Miki Sato, Yukie Tanaka, Kana Sakamoto, Masakazu Kurita, Ryoko Yamasaki, Hidenori Wada, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Tomohito Machishima, Masahiro Ashizawa, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Aki Tanihara, Junya Kanda, Shinichi Kako, Junji Nishida, Shigeki Yamada and Yoshinobu Kanda.
2. Impact of high-/middle-molecular-weight adiponectin on the synthesis and regulation of extracellular matrix in dermal fibroblasts. *Experimental Hematology* 42:261-273,2014
3. Rie Yamazaki, Yukie Tanaka, Hideki Nakasone, Miki Sato, Kiriko Terasako-Saito, Kana Sakamoto, Yu Akahoshi, Hirofumi Nakano, Tomotaka Ugai, Ryoko Yamasaki, Hidenori Wada, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Masahiro Ashizawa, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Shinichi Kako, Junya Kanda, Aki Tanihara, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda.
4. Kiriko Terasako-Saito, Hideki Nakasone, Yukie Tanaka, Rie Yamazaki, Miki Sato, Kana Sakamoto, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Yu Akahoshi, Jin Hayakawa, Hidenori Wada, Naonori Harada, Hirohumi Nakano, Kazuaki Kameda, Tomotaka Ugai, Ryoko Yamasaki, Masahiro Ashizawa, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Aki Tanihara, Junya Kanda, Shinichi Kako, Junji Nishida, and Yoshinobu Kanda. Persistence of recipient-derived as well as donor-derived clones of CMV pp65-specific cytotoxic T cells long after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease* 16:930-940,2014
4. Yukie Tanaka, Rie Yamazaki, Kiriko Terasako-Saito, Hideki Nakasone, Yu Akahoshi, Hiroshi Nakano, Tomotaka Ugai, Hidenori Wada, Ryoko Yamasaki, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Kana Sakamoto, Masahiro Ashizawa, Miki Sato, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Shinichi Kako, Junya Kanda, Aki Tanihara, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda. Universal cytotoxic activity of a HTLV-1 Tax-specific T cell clone from an HLA-A*24:02+ patient with adult T-cell leukemia against a variety of HTLV-I-infected T-cells. *Immunology Letters* 158:120-125,2014
5. Koji Kawamura, Rie Yamazaki, Yu Akahoshi, Hirofumi Nakano, Tomotaka Ugai, Hidenori Wada, Ryoko Yamasaki, Yuko Ishihara, Kana Sakamoto, Masahiro Ashizawa, Miki Sato, Kiriko Terasako-Saito, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Hideki Nakasone, Junya Kanda, Shinichi Kako, Aki Tanihara, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda. Evaluation of the immune status against measles, mumps, and rubella in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Hematology* 20:77-82,2015

〔学会発表〕(計 94 件)

1. Koji Kawamura, Yukie Tanaka¹, Yuko Ishihara¹, Hideki Nakasone, Kazuaki Kameda, Hidenori Wada, Kiriko Saito-Terasako, Miki Sato, Misato Kikuchi, Shun-ichi Kimura, Shinichi Kako, Seiichiro Kobayashi, Tsukasa Ohmori, Satoshi Nishimura, Kaoru Uchimaru, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Hiroshi Shiku, Yoshinobu Kanda.
Development of Tax-redirected T-cell immunotherapy for adult T cell leukemia.
22th Annual Congress of European Hematology Association, Madrid, 2017

〔図書〕(計 4 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：成人T細胞性白血病を含むHTLV-1ウイルス感染に対する腫瘍抗原特異的T細胞

発明者：神田 善伸、仲宗根 秀樹、他

権利者：自治医科大学、タカラバイオ株式会社

番号：特願 2016-214426

出願年月日：2016年11月1日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 善伸 (KANDA, Yoshinobu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30334379

(2) 研究分担者

仲宗根 秀樹 (NAKASONE, Hideki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50757903

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()