

## 論文審査の結果の要旨

報 告 番 号	甲 第 1130 号	氏 名	盛 田 大 介
論 文 審 査 担 当 者	主 査      小 泉 知 展 副 査      伊 藤 研 一 ・ 菅 野 祐 幸		

(論文審査の結果の要旨)

難治性の急性リンパ性白血病に対する CD19. キメラ抗原受容体 (CAR)-T 細胞療法は高い臨床効果を示す一方で、ウイルスベクターを用いることによる高額な製造コストが問題となっている。低コストで製造できる我々の *piggyBac* トランスポゾン改変 CAR-T 細胞は、電気穿孔法によって生じる細胞死のために十分な CAR 遺伝子導入率が得られず、臨床応用へ向けての課題となっていた。また、我々の CAR 遺伝子は *in vivo* での抗腫瘍活性を減弱し得る IgG1-CH2CH3 スペーサー領域を有することも改良が必要な点であった。

本研究では、*piggyBac* トランスポゾン法における CAR 遺伝子導入率の向上を目的とし、従来の培養法 (original 法) に加えて以下 2 つの培養法を考案した。1) original 法に、自己活性化 T 細胞 (ATCs) をフィーダー細胞として添加した培養法 (ATC 法)、2) original 法で用いる抗 CD3/CD28 モノクローナル抗体に代わり、ウイルス抗原提示細胞によるより生理的な増殖刺激を用いた培養法 (ACE 法)。上記 3 つの培養法における、CAR 発現率、CAR 陽性細胞数、CD19 陽性腫瘍細胞株に対する抗腫瘍効果、を比較して検証した。また、製造した CAR-T 細胞の immuno-phenotype を検証した。さらに IgG-CH2CH3 を除いた CAR 遺伝子 (CD19. CH2CH3-free CAR) を作成し、CAR 発現率、CAR 陽性細胞数、*in vivo* マウスモデルでの抗腫瘍効果を検証した。その結果、盛田は次の結果を得た。

1. 3 つの培養法のうち ACE 法で最も高い CAR 発現率 (33%)、CAR 陽性 T 細胞数が得られた。
2. ACE CD19. CAR-T 細胞を CD19 陽性腫瘍細胞と *in vitro* で 5 日間共培養した結果、非常に低い濃度でも腫瘍細胞の増殖を著しく抑制した。
3. ACE CAR-T 細胞は CD8 優位の T 細胞であり、そのほとんどがナイーブ T 細胞 (Tn) の表現型を示した。
4. CD19. CH2CH3-free CAR T 細胞は、従来の CAR と同等の細胞増殖を示し、CAR 発現率が優位に高く (51%)、CAR 陽性 T 細胞数も多い傾向となった。
5. *In vivo* マウスモデルで、ACE CH2CH3-free CD19. CAR-T 細胞は CD19 陽性腫瘍細胞株に対して高い抗腫瘍効果を示した。

これらの結果より、フィーダー細胞の存在およびウイルス抗原提示細胞による生理的な増殖刺激が、電気刺激を受けた T 細胞の細胞死を減少し、CAR 陽性 T 細胞率の上昇に寄与したことが示唆された。遺伝子導入率の改善により臨床応用に十分な CAR-T 細胞を短時間で製造することが可能となった。我々の CAR-T 細胞は Tn を多く有しており、臨床では抗腫瘍効果の持続性が高い可能性がある。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。