

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	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
論文題目	Enhanced expression of anti-CD19 chimeric antigen receptor in <i>piggyBac</i> transposon-engineered T cells (抗 CD19 キメラ抗原受容体の発現を増強した <i>piggyBac</i> トランスポゾン遺伝子改変 T 細胞)
(論文の内容の要旨)	<p>【緒言】腫瘍関連抗原を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) を用いた養子免疫療法は、血液悪性腫瘍に対する新たな治療戦略の一つで、特に CD19. CAR-T 細胞は難治性の急性リンパ性白血病に対して目覚ましい臨床効果をもたらしている。通常、T 細胞への CAR 遺伝子導入はウイルスベクターを用いるが、その高額な製造コストを削減すべく、我々は <i>piggyBac</i> トランスポゾン法による非ウイルス遺伝子改変 CAR-T 細胞の開発を行ってきた。しかし我々の方法は電気穿孔法を必要とするため、多くの T 細胞がアポトーシスを来す。そのために、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 は <i>in vivo</i> での抗腫瘍活性を減弱し得る IgG1-CH2CH3 スペーサー領域を有していたことも改良が必要な点であった。この研究は、<i>piggyBac</i> 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、以下の3つの仮説を立て、我々の従来の培養法と比較して検証した。1) 自己活性化 T 細胞 (ATCs) をフィーダー細胞として添加すると細胞死が軽減する、2) 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ると細胞死が軽減する、3) IgG-CH2CH3 のない CAR は <i>in vivo</i> での抗腫瘍効果を発揮する。</p> <p>【方法】従来の培養法 (original condition) では、電気穿孔法を用いて、CD19. CAR トランスポゾンプラスミドと <i>piggyBac</i> トランスポゼースプラスミドを PBMC に導入したのち、抗 CD3/CD28 モノクローナル抗体で増殖刺激を加え (Day1)、14 日間培養する。これに対し、2 つ目の培養法は、day0 および day7 に照射した自己 ATCs を加えて 14 日間共培養し (CD3/CD28-ATC condition)、3 つ目の培養法では、抗 CD3/CD28 モノクローナル抗体の代わりに、ウイルスペプチドをパルスした自己 ATCs を day0 および day7 に加えて 14 日間共培養した (ACE condition)。さらに、この CD19. CAR 遺伝子から IgG1-CH2CH3 スペーサー領域を取り除いた新たな CD19. CAR 遺伝子 (CH2CH3-free) を作製・培養し、オリジナル CD19. CAR-T 細胞と比較した。</p> <p>【結果】3 つの培養法のうち ACE condition で最も高い CAR 発現率、CAR 陽性 T 細胞数が得られた。ACE CD19. CAR-T 細胞を CD19 陽性腫瘍細胞と <i>in vitro</i> 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。IgG1-CH2CH3 スペーサーを取り除いた CD19. CAR (CH2CH3-free) 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、CAR 陽性 T 細胞数も多い傾向となった。<i>In vivo</i> マウスモデルでも、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。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。</p> <p>【考察】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 細胞を短期間で製造することが可能となった。我々の CAR-T 細胞は Tn 分画を多く有しており、臨床応用した際には抗腫瘍効果の持続性が高い可能性がある。</p> <p>【結語】我々は最小限の手技および、臨床使用可能な試薬のみで新たな <i>piggyBac</i> トランスポゾン改変 CD19. CAR-T 細胞培養法を開発した。シンプルな培養工程及び高い費用対効果を併せると、ウイルスベクター法に代わる CAR-T 細胞療法となり得ると考えられる。我々はこの技術を用いて、近く臨床試験を計画している。</p>

