

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10106

研究課題名(和文)再発・治療不応性T細胞性白血病に対するキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Developing CAR T cells for relapsed/refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

中沢 洋三 (Nakazawa, Yozo)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：60397312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：再発・治療不応性T細胞性急性リンパ性白血病(ALL)の生命予後はきわめて不良である。再発・治療不応性T細胞性ALLに対する革新的な治療法の開発を目的に、T細胞性ALL細胞に発現する抗原を標的とする新規のキメラ抗原受容体(CAR)を作製し、新規CARを発現するT細胞がALL細胞株を効果的に殺傷することを試験管内実験で確認した。また、T細胞性ALL中枢神経再発に対するCAR-T細胞の効果的な投与方法を開発するために、CAR-T細胞の髄腔内投与マウスモデルを開発し、中枢神経ALLにおいてはCAR-T細胞の髄腔内投与が静脈内投与よりも有用であるというコンセプトを非臨床試験で実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病の中で最も再発・治療不応例の生命予後が不良であるT細胞性急性リンパ性白血病に対しては、世界的でも新薬の開発が進んでいない。その中でCAR-T細胞療法という新しい白血病治療手段を用いて、T細胞性急性リンパ性白血病に特化した治療モデルを提案できた意義はきわめて大きい。本研究成果に基づいて研究開発を進めることによって、きわめて難治な再発・治療不応T細胞性急性リンパ性白血病に対する新しい治療手段の創出が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Patients with relapsed or refractory (r/r) T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) have a very poor prognosis. To develop an innovative therapy for r/r T-ALL, we designed a novel chimeric antigen receptor (CAR) targeting an antigen on T cells, confirming the effective cytotoxicity of the CAR-modified T cells against a T-ALL cell line in vitro. Additionally, to determine an optimal route of administration of CAR T cells for treatment of patients with central nervous system relapse (CNS) of ALL, we established a xenograft mouse model with isolated CNS ALL. Using the in vivo model, we found that the intrathecal administration are more effective than the intravenous administration in CAR T cell therapy for isolated CNS ALL.

研究分野：小児白血病

キーワード：CAR-T細胞 キメラ抗原受容体 T細胞性腫瘍 急性リンパ性白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞性急性リンパ性白血病(ALL)は、小児ALLの10-15%、成人ALLの20-25%を占めるリンパ系腫瘍である。初発T細胞性ALLの生命予後は比較的良好であるが、再発・治療不応例の生命予後は白血病の中でも最も不良である(15%未満)。

再発・治療不応例の治療が困難な理由として、1)白血病細胞の増殖速度が速く移植免疫が効果を発現する前に再発すること、2)中枢神経再発が多いこと、3)T細胞性白血病に特異的な治療標的が少ないことなどが挙げられる。従って、治療効果の発現が速く、中枢神経ALLに対しても有効で、特異性の高い治療法の開発が必要と考えられる。

再発・治療不応性B細胞性ALLに対しては、CD19(B細胞抗原)を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を用いた遺伝子改変T細胞療法がきわめて有効で、2019年にCD19 CAR-T細胞が日本で薬事承認された。CAR-T細胞は、効果発現までの時間が短く、中枢神経ALLに対しても効果を有し、抗原特異性も極めて高い。従って、T細胞性ALLを対象とする新規CAR-T細胞の開発が待望されている。しかし、T細胞特有の特徴からその開発は世界的にも困難をきわめている。その理由として、T細胞性ALLを対象とする場合、(1)標的とする抗原が正常T細胞と共通であるためCAR-T細胞の製造過程でCAR-T細胞同士の殺し合いが生じること、(2)患者体内で末梢血中の大量の正常T細胞を殺傷し早期にCAR-T細胞の免疫疲弊に基づく効果の減弱が生じる、もしくは中枢神経に到達できない、(3)患者体内で末梢血中の大量の正常T細胞を殺傷する際にサイトカイン放出症候群を発症するリスクが高く、特に中枢神経再発例では中枢神経合併症が懸念されることなどが挙げられる。従って、上記問題を克服した新規CAR-T細胞が開発できれば再発・治療不応性T細胞性ALL患者の生命予後が改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、再発・治療不応性T細胞性ALL患者の生命予後の改善を目的に、T細胞性ALL細胞上に発現するT細胞抗原を標的としながらも、付加的な遺伝子改変を組み入れることによってCAR-T細胞同士の殺し合いが起きなくなる、もしくはCAR-T細胞の投与方法を工夫することによって正常T細胞への反応が最小限になるようにし、製造効率、抗腫瘍効果、安全性、中枢神経再発への応用のすべての点でT細胞性ALLに有用なCAR-T細胞の開発を試みた。

3. 研究の方法

1) 抗CD7キメラ抗原受容体(CD7CAR)+CD7ノックダウン(CD7KD)ベクターの構築

CD7はほぼ100%のT細胞性ALL細胞に発現し、T細胞性ALL幹細胞にも発現することが複数の研究から示されている。しかし、正常T細胞にもほぼ100%発現するため、CD7を標的とした場合、CAR-T細胞同士の殺し合いが生じうる。そこでCD7を標的としながらも、自身はCD7を発現しないCAR-T細胞を作製した。まず、CD19CARを鋳型に、CD7と特異的に結合する分子を抗原結合領域にもつ新規CAR(CD7CAR)トランスポゾンベクターを設計した。続いて、CD7をノックダウン(KD)するための配列(CD7KD)を設計し、上記CD7CARベクターに組み入れた。

2) CD7CAR.CD7KD細胞の樹立

研究代表者が報告している非ウイルス遺伝子改変法(piggyBacトランスポゾン法+エレクトロポレーション法)を用いて、健常人末梢血単核球にCD7CAR.CD7KDベクターを遺伝子導入し、インターロイキン(IL)-7+IL-15存在下で2週間培養し、CD7CAR.CD7KD-T細胞を樹立した。

3) CD7CAR.CD7KD-T細胞のin vitro抗白血病効果の評価

CD7CAR.CD7KD-T 細胞を T-ALL 細胞株 (Jurkat) と血清存在・サイトカイン非存在下で 5 日間共培養した。対照群には同様の製法で樹立した CD19CAR-T 細胞を用いた。共培養後はフローサイトメトリー法を用いて腫瘍増殖阻止率を解析した。

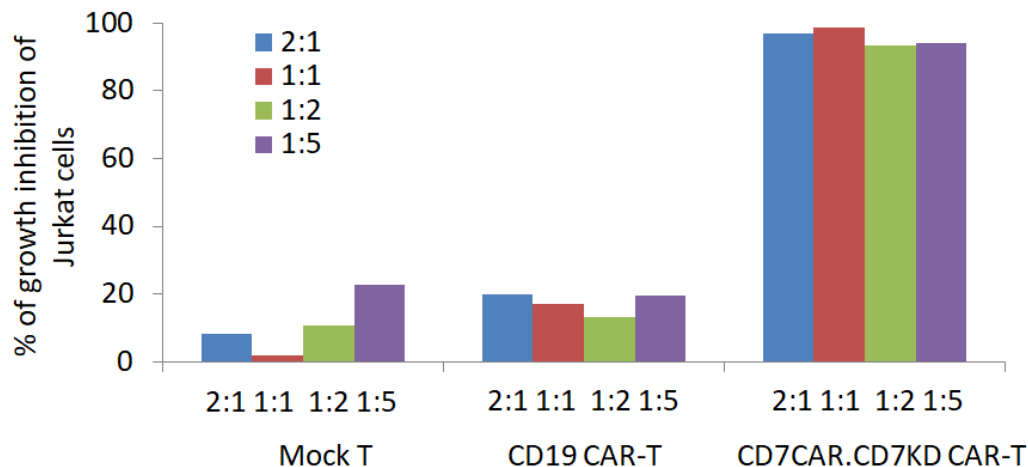
4) ヒト ALL 中枢神経再発治療マウスモデルの作製

免疫不全マウスの脳室内に B 細胞性 ALL 細胞株を移植し、CD19CAR-T 細胞の経静脈投与と髄腔内投与の治療効果を比較した。

4. 研究成果

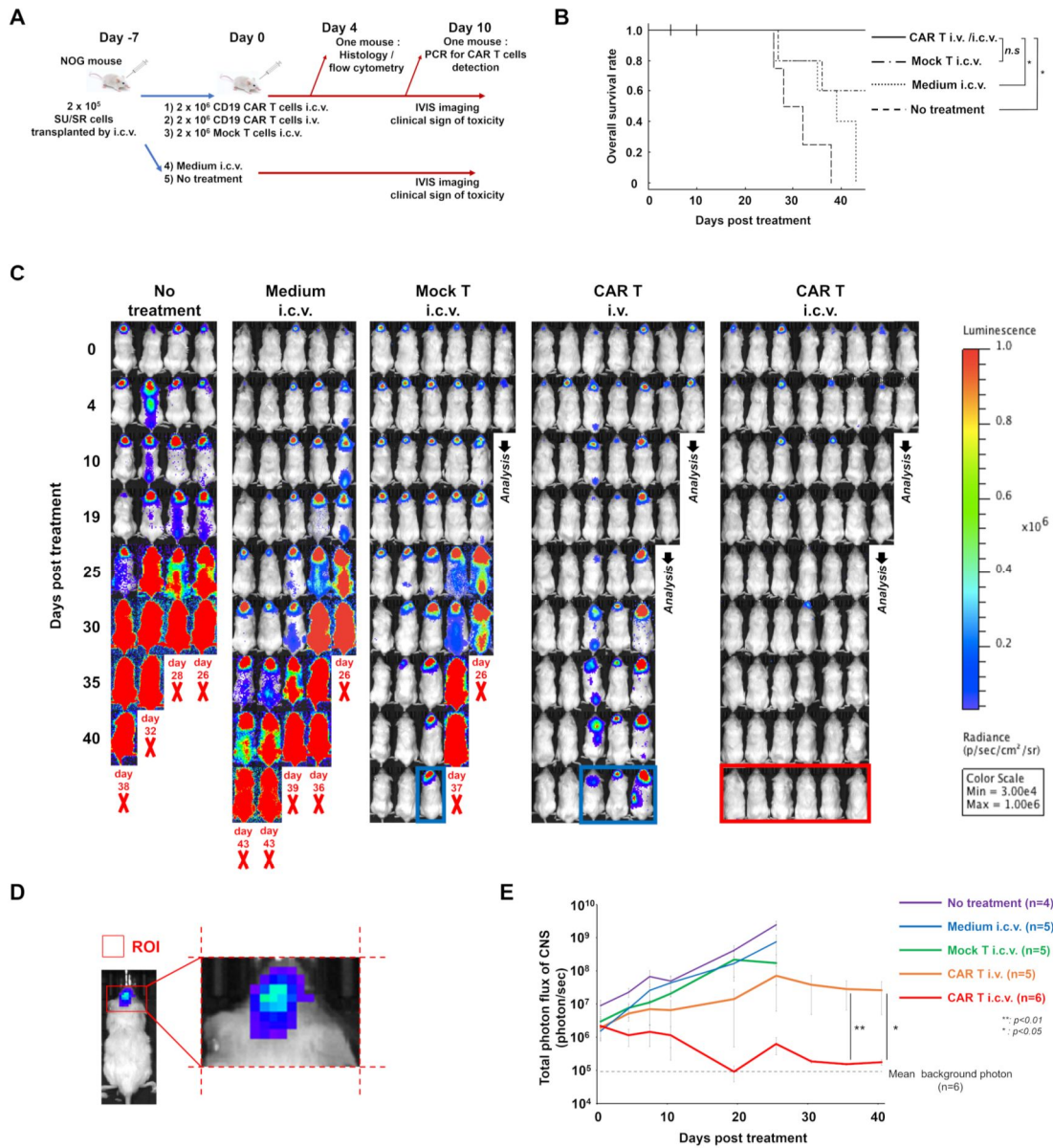
3 人の健常ドナーから CD7CAR.CD7KD-T 細胞の樹立を試みた。培養開始 2 週間後のいずれの細胞においても CD7 の発現抑制が確認された (ドナー 1 19%、ドナー 2 39%、ドナー 3 76%)。

最も CD7 の発現抑制が強かったドナー 3 の CD7CAR.CD7KD-T 細胞を T 細胞性 ALL 細胞株 Jurkat 細胞と様々な比率 (2:1、1:1、1:2、1:5) で共培養したところ、対照群の CD19CAR-T 細胞の共培養では Jurkat の増殖抑制率が 20%未満であるのに対し、CD7CAR.CD7KD-T 細胞の共培養ではいずれの混合比率においても 90%以上の増殖抑制率を示した。



Unpublished data

Ph-ALL細胞株を免疫不全マウスの髄腔内に移植し、中枢神経ALL再発マウスモデルを作製した。中枢神経ALLマウスへのCD19.CAR-T細胞の経静脈投与では、5匹中3匹で中枢神経内にALL細胞が残存 (2匹は全身播種) したのに対し、CD19.CAR-T細胞の髄腔内投与では完全な白血病細胞の消失が確認された。当該中枢神経ALL治療マウスモデルはT細胞性ALL再発の治療モデルにも応用可能である。



Tanaka K, et al. Mol Ther Oncolytics in press

本研究期間に、T細胞性ALLに有効なCD7CAR.CD7KD-T細胞と中枢神経ALL再発に対する最適なCAR-T細胞アプローチ方法を開発した。今後、両成果物を組み合わせることによって、きわめて難治なT細胞性ALLの中枢神経再発に対する有望かつ革新的な治療法の提案が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka K, Kato I, Tanaka M, Morita D, Matsuda K, Takahashi Y, Nakahata T, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Takita J, Nakazawa Y.	4. 巻 XXX
2. 論文標題 Direct delivery of piggyBac CD19 CAR T cells has potent anti-tumor activity against ALL cells in CNS in a xenograft mouse model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 XXX-XXX
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	中野 茂 (Nakano Shigeru) (30791313)	信州大学・医学部附属病院・特任研究員 (13601)	