

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	師川 紘一
論文審査担当者	主 査 柴 祐司 副 査 清水 公裕・米倉 真一・犬飼 岳史
論文題目	Autologous non-human primate model for safety assessment of piggyBac transposon-mediated chimeric antigen receptor T cells on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (ピギーバック・トランスポゾン法を用いて作製した GMR CAR-T 細胞の安全性評価のための自家霊長類モデル)
(論文の内容の要旨)	<p>〔背景と目的〕 キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR)-T 細胞療法は、人工的な抗原受容体遺伝子を患者の T 細胞に導入することにより、腫瘍関連抗原特異的に抗腫瘍効果を発揮させる次世代がん治療法である。再発・難治性腫瘍の治療の切り札として期待されている。現在、血液・固形腫瘍に対する多様な新規 CAR-T 細胞の開発が進められている。急性リンパ性白血病に対する CD19 CAR-T 細胞は優れた抗腫瘍効果を認める反面、重篤な有害事象が問題となっている。サイトカイン放出症候群 (CRS: cytokine releasing syndrome) や中枢神経合併症 (ICANS: immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome) のような炎症性サイトカインに関わるものや、on-target/off-tumor や off-target 毒性のような、CAR-T 細胞の正常組織への反応による有害事象も認められる。新規 CAR-T 細胞の開発において、腫瘍組織のみに発現している抗原を標的とすることが理想ではあるが、実際には正常組織にも発現していることが多く、極わずかな量の発現であっても、生命を脅かすような重篤な有害事象を認めたという報告がある。したがって、臨床試験の前に、非臨床安全性試験の中で on-target/off-tumor や off-target 毒性について慎重に評価されなければならない。CAR-T 細胞の開発においては、従来の医薬品の毒性試験では評価・設定されていないこれら CAR-T 細胞独自の重要項目が多く、開発の妨げとなっている。CAR-T 細胞の開発に広く利用されている免疫不全マウスへのヒト CAR-T 細胞の投与モデルでは、薬効・薬理評価は可能であっても、毒性の評価は困難である。このため本研究では、ヒトとの抗原同一性が高く、体格に近いことから用量設定試験が可能な霊長類モデルを使い、GVHD の影響をなくすためドナーとレシピエントの種が一致した自家モデルとして、新規安全性試験モデルの樹立を試みた。非ウイルスベクター (piggyBac) 法による CAR-T 細胞の霊長類での安全性試験は、これまで報告がない。今回、独自の骨髄系腫瘍に対する GM-CSF 受容体(GMR)を標的とした CAR-T 細胞を用いて安全性試験を実施した。GMR は単球や造血幹細胞、血管内皮細胞などの正常細胞に発現しているため、on-target/off-tumor 毒性を認めるか、更に交差反応による off-target 毒性を引き起こすのかを評価した。</p> <p>〔方法〕 GM-CSF 受容体 (GMR) CAR トランスポゾン・piggyBac ベクターを用いて、カニクイザル末梢血から GMR CAR-T 細胞を作製した。抗腫瘍効果を評価するために、GMR を発現する急性骨髄性白血病細胞株(MV4-11)やカニクイザルの単球やマクロファージを用いて in vitro で共培養を行った。そして、ドナーとなった 3 匹の非担癌カニクイザルへ各々 3×10^5/kg 個の自家 GMR CAR-T 細胞を投与し、全身状態、食餌量、体重を 2 週間観察した。その間、経時的に血液・生化学・凝固検査、サイトカイン測定、CAR-T 細胞動態検査を行い、投与 2 週間後には病理組織学的検査を施行した。</p> <p>〔結果〕 カニクイザル由来 GMR CAR-T 細胞は、$11 \pm 3\%$の抗ヒト GMR CAR を発現し、in vitro 共培養においてヒト急性骨髄性白血病細胞株をほぼ完全に死滅させ、カニクイザルの単球やマクロファージも殺傷した。自家 GMR CAR-T 細胞を投与されたカニクイザル 3 匹のすべての末梢血から GMR CAR-T 細胞が検出され、逸脱酵素と炎症反応の一過性の上昇を認めた。</p>

1匹において day 2 をピークとする一過性の interleukin(IL)-6 の軽度上昇がみられたが、他のサイトカインに変動はみられなかった。カニクイザルの全身状態は良好で、on-target/off-tumor 毒性として推定された、単球減少、骨髄抑制、血管炎や凝固障害などは認めず、その他明らかな有害事象は認めなかった。

〔結論〕 霊長類モデルを用いて、GMR CAR-T 細胞の予備毒性試験を実施し、安全性を確認した。非担癌モデルであることから、評価項目は限られるが、on-target/off-tumor や off-target 毒性をヒトでの臨床試験前に評価し、最低限の安全性を確認するための手段として、有用であることを示した。