

綜 説

キメラ抗原受容体 (CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法

中 沢 洋 三

信州大学医学部小児医学講座

Gene-modified T-cell Therapy Using Chimeric Antigen Receptor

Yozo NAKAZAWA

Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine

Key words : chimeric antigen receptor, adoptive immunotherapy, cancer immunotherapy, gene therapy

キメラ抗原受容体, 養子免疫療法, がん免疫療法, 遺伝子治療

I はじめに

進行がんに対しては、手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた集学的治療が行われる。しかし、多発腫瘍や中枢神経腫瘍では、手術的全摘出は困難である。また、放射線治療や化学療法の繰り返しは、がん細胞の放射線抵抗性あるいは抗がん剤抵抗性を誘導し、がん再発の一因となる。さらに、これらの集学的治療は患者への侵襲性が高く、高齢者や合併症・併発症を有する患者においては、中断・中止されることが少なくない。

患者 T 細胞を体外で増幅してから患者に戻す T 細胞療法 (養子免疫療法) は、患者への侵襲性が低く¹⁾、放射線治療や化学療法とは異なる細胞傷害機序でがん細胞に作用し、摘出不能ながんも対象にできることから、第 4 のがん治療法として期待されてきた。しかしながら、がん細胞あるいはがん周囲組織が有する腫瘍免疫回避機構のため、従来の養子免疫療法では期待された臨床効果は得られていない。

それに対し、近年米国から腫瘍免疫回避機構に打ち勝つための遺伝子操作が加えられた T 細胞を用いた養子免疫療法の臨床試験が報告されている。本稿では、米国で開発されたキメラ抗原受容体 chimeric antigen receptor (CAR) 遺伝子改変 T 細胞療法について概説する。

II 腫瘍免疫回避機構

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) ががん細胞に対して免疫応答するためには、CTL が、(i) がん細胞の HLA クラス I 上に抗原提示された腫瘍抗原の一部を T 細胞受容体 (TCR) を介して認識する過程 (第 1 シグナル)、(ii) 共刺激分子 costimulatory molecules (T 細胞および抗原提示細胞表面上に発現し、4-1BB と 4-1BBL, CD28 と CD80/CD86, OX40 と OX40L のように対応する分子同士で結合する) を介してがん細胞と結合し TCR 刺激を増強する過程 (第 2 シグナル)、(iii) インターロイキン (IL)-2, IL-7, IL-15 などの T 細胞増殖因子の存在下で活性化・増殖する過程 (第 3 シグナル) が必要である。

しかし、がん細胞はその発生過程や治療経過中に、免疫担当細胞の監視や CTL の攻撃から逃れるための様々な腫瘍免疫回避機構を獲得していく (図 1)²⁾。

まず、CTL が標的とする腫瘍抗原は、自己抗原であるためウイルス抗原や非自己 (同種・異種) 抗原と比較して免疫原性が著しく低い。腫瘍抗原が胎生期に発現していた蛋白であれば、T 細胞に対して免疫寛容を獲得していることも多い。また、その腫瘍抗原ががん細胞の生存・増殖に必須の蛋白でなければ、がん細胞は腫瘍抗原の発現を低下・消失させることができる。これらの機構によって、がん細胞は CTL の認識から逃れられる (第 1 シグナルの阻害)。

次に、がん細胞は HLA 分子や共刺激分子の発現を

別刷請求先: 中沢 洋三 〒390-8621
松本市旭 3-1-1 信州大学医学部小児医学講座
E-mail: yxnakaza@shinshu-u.ac.jp

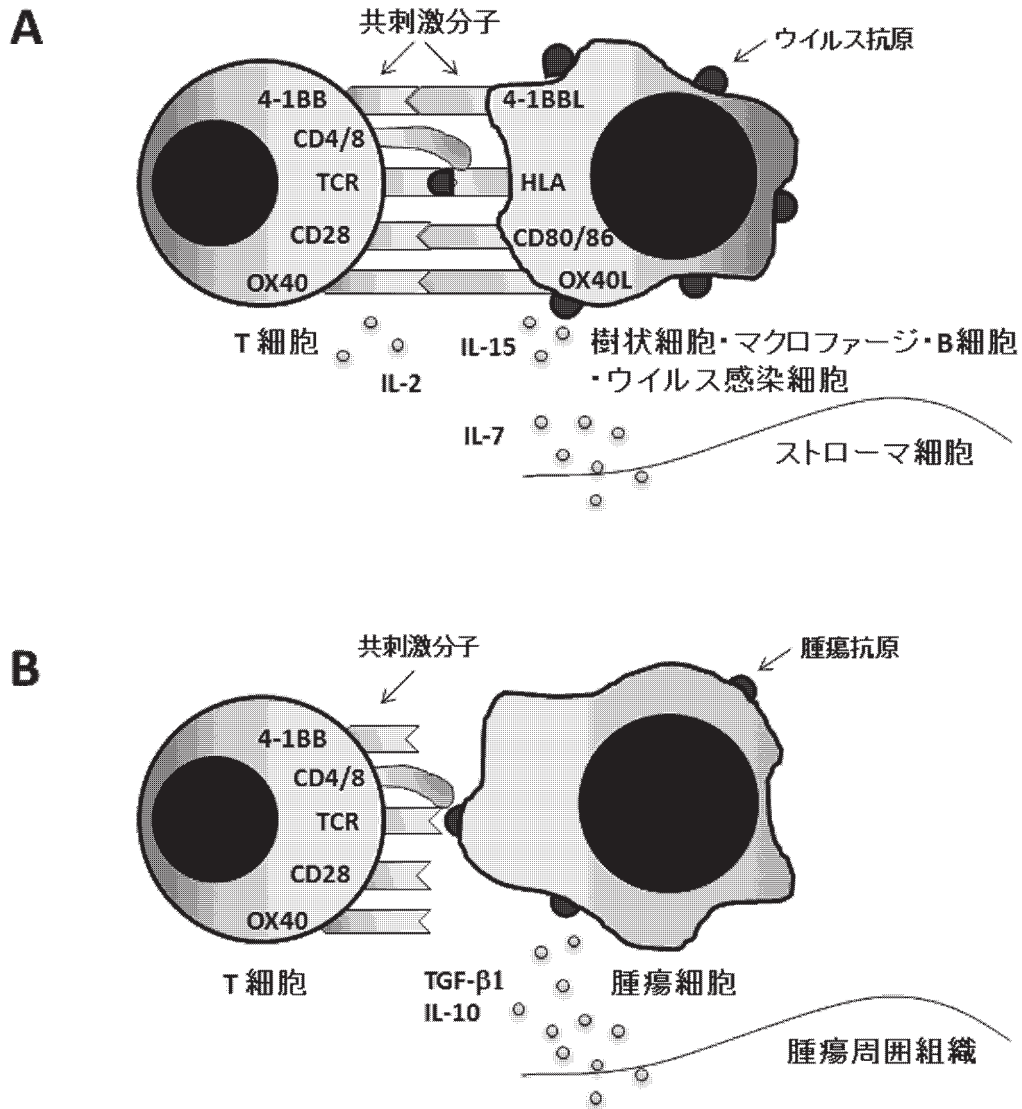


図1 腫瘍免疫回避機構

A：プロフェッショナル抗原提示細胞（樹状細胞，単球・マクロファージ，B細胞）やウイルス感染細胞に対するT細胞の免疫応答

T細胞は，T細胞受容体（TCR）を介して抗原提示細胞のHLA分子上に提示されたウイルス由来ペプチドを認識し（第1シグナル），対応する共刺激分子同士の結合（4-1BBと4-1BBL，CD28とCD80/CD86，OX40とOX40L等）によってTCR刺激を増強し（第2シグナル），さらに活性化T細胞自身が分泌するインターロイキン（IL）-2，胸腺，脾臓，骨髄のストローマ細胞から分泌されるIL-7，樹状細胞，マクロファージ，上皮細胞から分泌されるIL-15などのT細胞増殖因子によって活性化・増殖する（第3シグナル）。

B：腫瘍細胞に対するT細胞の免疫応答

腫瘍抗原は発現が弱いあるいは免疫原性が低いことが多く，胎生期に発現していた腫瘍抗原においては，しばしば免疫寛容を獲得している（第1シグナルの阻害）。腫瘍細胞は，HLA class I分子や共刺激分子の発現を低下させていることが多い（第2シグナルの阻害）。腫瘍周囲環境（腫瘍細胞，腫瘍周囲組織，制御性T細胞）からは，T細胞増殖因子は分泌されず，TGF- β ，IL-10などのT細胞抑制因子が分泌される（第3シグナルの阻害）。

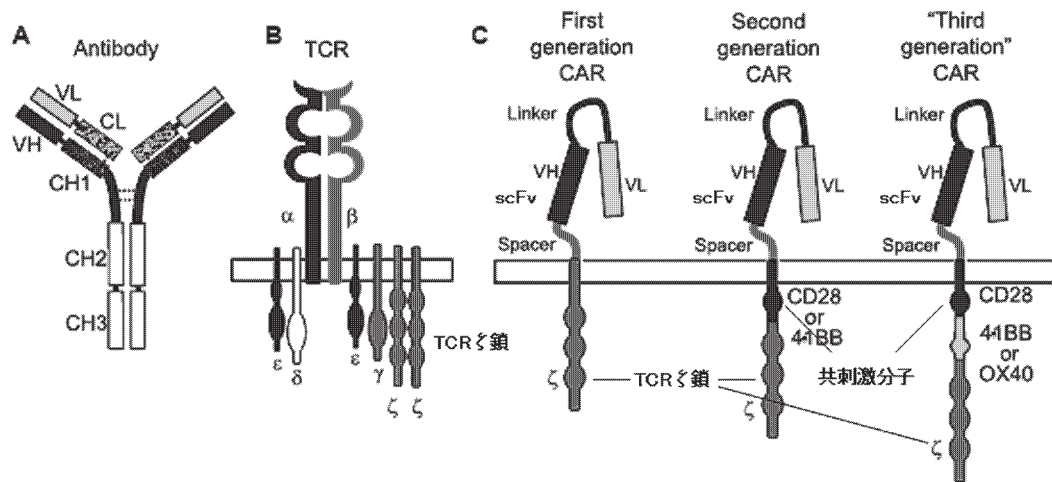


図2 キメラ抗原受容体

A：腫瘍抗原特異モノクローナル抗体，B：T細胞受容体，C：キメラ抗原受容体
 可変領域軽鎖；VL，可変領域重鎖；VH，定常領域軽鎖；CL，定常領域重鎖；CH，抗原特異単鎖抗体；scFv
 Dotti et al. Human Gene Ther, 2009から一部改編

低下・消失させることにより，CTLの活性化を阻止することができる（第2シグナルの阻害）。

さらに，がん細胞，がん周囲組織あるいは浸潤した制御性T細胞からIL-10やTGF- β などのT細胞抑制因子が分泌され，CTLの活性化や増殖が妨げられる（第3シグナルの阻害）。

Ⅲ キメラ抗原受容体 chimeric antigen receptor (CAR)

1993年にイスラエルのグループによって，腫瘍免疫回避機構に打ち勝つための遺伝子操作を加えた人工T細胞受容体を患者T細胞に遺伝子導入し，そのT細胞を体外で増幅培養した後に患者に輸注するという遺伝子・細胞治療法が考案された³⁾。この人工T細胞受容体は，後にキメラ抗原受容体 (CAR) と命名された。

CARは，腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体可変領域の軽鎖 (VL) と重鎖 (VH) を直列に結合させた単鎖抗体 (scFv) をN末端側に，T細胞受容体 (TCR) ζ 鎖をC末端側に持つキメラ蛋白の総称である (図2)⁴⁾⁻⁶⁾。CARを発現させたT細胞は，scFv領域で腫瘍抗原を認識した後，その認識シグナルを引き続きの ζ 鎖を通じてT細胞内に伝達する（第一世代CAR，図2）。さらに，T細胞の活性化を増強するために，scFvと ζ 鎖の間に共刺激分子 (CD28, 4-1BBの一方，あるいはその両者) を組み込まれたCARは第二世代，第三世代CARと呼ばれ (図2)，CAR-T細胞の細胞傷害 (CTL) 活性と増殖能が高い。

米国の臨床試験では主に第二世代CARが使用されている。

CARの威力を示す興味深い研究として，抗HER2モノクローナル抗体 (ハーセプチン[®]) が無効のHER2低・中等度発現腫瘍株に対して，HER2特異的HER2CARが著明な抗腫瘍効果を発揮することが示されている⁷⁾。この研究から，CAR-T細胞療法が抗体療法以上に抗原認識感度が高い，あるいは抗腫瘍活性が高いことが示唆される。

他にも，T細胞増殖因子IL-15やTGF- β 阻害分子を同時発現させる試みや治療の安全性を高めるために自殺遺伝子を同時発現させる試みなどが行われている⁴⁾⁻⁶⁾。

Ⅳ 遺伝子導入/T細胞培養/患者投与

患者から採取された末梢血単核球は，抗CD3抗体とIL-2存在下で培養され，T細胞が十分活性化した後レトロウイルスベクターあるいはレンチウイルスベクターを用いてCAR遺伝子を導入される。遺伝子導入後のT細胞は，2-3週間培養された後に一旦凍結され，安全性試験を経てから，患者に点滴静注される。その際，予めシクロフォスファミドあるいはフルダラビンを投与し，患者体内のT細胞を減少させておくことが，CAR-T細胞の体内での増殖に重要である。

投与されたCAR-T細胞は，患者体内で腫瘍細胞と遭遇した際に，scFv領域で標的抗原を認識し，引き続きの共刺激分子とTCR ζ 鎖からの活性化シグナ

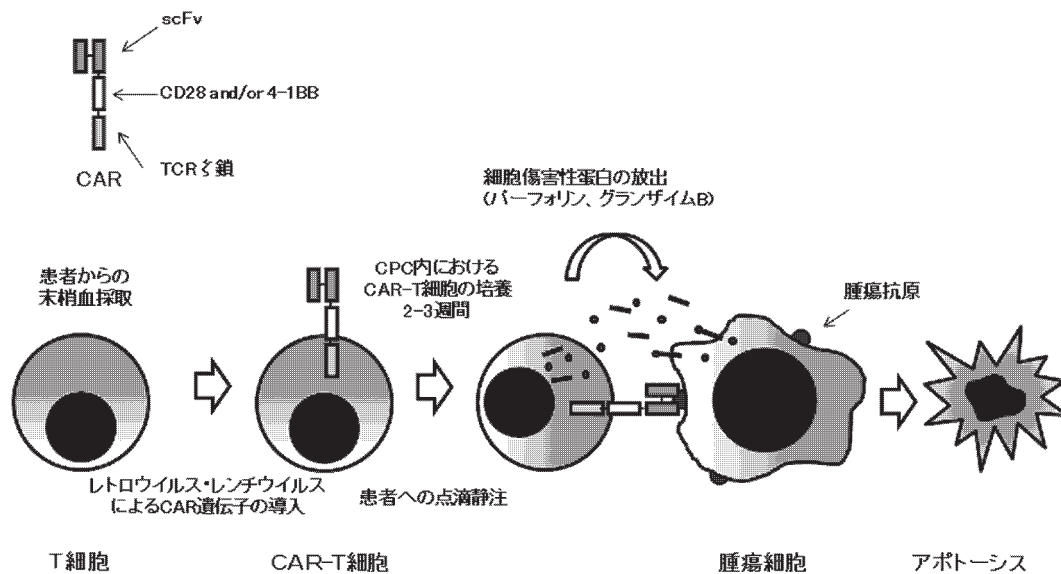


図3 CAR-T細胞療法

ルを受けて活性化する。活性化した CAR-T 細胞は、細胞質内に蓄えられていたパーフォリン・グランザイムなどの細胞傷害性蛋白を放出することによって、がん細胞にアポトーシスを誘導する (図3)。CAR 療法後に長期生存した患者の解析では、セントラルメモリー T 細胞の形質を有する CAR-T 細胞が長期にわたって患者末梢血中に検出されることが確認されており、CAR-T 細胞は CTL 活性を発揮した後も腫瘍細胞の監視を継続していると考えられている⁸⁾⁹⁾。

V 米国の臨床試験

現在、臨床試験が最も進んでいるのは、CD19特異的 CAR (CD19CAR) と GD2特異的 CAR (GD2CAR) を用いた CAR 療法である。

まず、2008年にベイラー医科大学から神経芽腫を有する小児患者に対する GD2CAR 療法の成果が報告された⁸⁾。GD2は胎生期の中枢神経組織に高発現するガングリオシド (糖脂質) の1つで、成熟中枢神経組織にはほとんど発現しないが、神経外胚葉由来の小児がんである神経芽腫には高発現するため、がん治療の標的として理想的な抗原と言える。しかし、生体内の T 細胞は糖脂質を含む糖鎖抗原にはほとんど免疫応答しないため、GD2は従来の T 細胞療法の標的にはなり難かった。それに対し、GD2特異抗体を鋳型にクローニングされた GD2CAR は、GD2と特異的かつ高親和性に結合し、下流のシグナル伝達分子を介して T 細胞を活性化することができる。

ベイラー医科大学の臨床試験では、治療不応/再発神経芽腫を有する小児19例に GD2CAR-T 細胞が投与され、最長4年9カ月 (中央値11カ月) の観察期間中6人に非再発生存が得られた⁹⁾。特に、これまで生存が期待できないとされてきた活動性病変残存例11例中3例に完全寛解をもたらしている。さらに特筆すべきは、一過性の発熱以外に重大な有害事象が認められなかったことと、中枢神経病変を有意に縮小させたことである。従来、中枢神経腫瘍は、脳-血液関門が存在するため化学療法の効果乏しいこと、手術や放射線治療が重篤な精神・神経症状や発達障害をもたらすことから、最も治療の難しい腫瘍の1つと考えられてきた。それに対し、GD2CAR-T 細胞療法は、中枢神経腫瘍に対し、低侵襲に抗腫瘍効果を発揮できる可能性が示唆された。GD2は、神経芽腫のみならず、脳腫瘍、網膜芽細胞腫、肺小細胞癌、メラノーマなど他の神経外胚葉に起源を有する悪性腫瘍にも広範囲に発現するため、今後の適応の拡大が期待される。

もう一方の CD19CAR 療法は、緩徐進行型 B 細胞性腫瘍である濾胞性リンパ腫と慢性リンパ性白血病に対して有効であることが2010年以降相次いで報告された¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。B 細胞性腫瘍は、CD19をほぼ100%発現しているため、CD19CAR 療法の良い適応と考えられる。さらに最近、再発急性リンパ性白血病 (ALL) の成人患者5例 (非寛解例2例、微少残存腫瘍陽性例2例、微少残存腫瘍消失例1例) に対し、CD19CAR-T 細胞が投与され、全例で骨髄の微少残存腫瘍が消失し、

移植不適格例の1例を除く4例が引き続きの造血幹細胞移植 (SCT) を受け、SCT 後も微少残存腫瘍陰性が維持されたと報告された¹⁵⁾。再発 ALL の非寛解例に対する SCT の予後は、20 %以下ときわめて低いことから、CD19CAR 療法を併用した SCT は、今後の ALL の治療戦略を劇的に変える可能性がある。

CD19CAR 療法では、CLL, ALL のいずれにおいても約半数例で、輸注後比較的早期 (CLL では2週間以内, ALL では1週間以内) に、高サイトカイン (IL-2, TNF α , インターフェロン γ) 血症に基づく発熱, capillary leak syndrome (肺水腫, 急性腎不全) が生じた。これらの合併症は、残存病変の多い患者で強く発現することから、CAR-T 細胞の過剰応答が原因と考えられている。CD19CAR 療法において認められた capillary leak syndrome はステロイドの投与によって制御されたが、肺転移を有する大腸癌に対する HER2特異的 CAR 療法では高サイトカイン血症を伴う肺合併症による死亡例が報告されており¹⁶⁾、肺病変を有する腫瘍や残存腫瘍の多い症例に対する CAR 療法では特に注意を要する。

VI 非ウイルス遺伝子導入法の開発

米国で行われた CAR 療法の臨床試験では、T細胞への遺伝子導入にレトロウイルスベクターあるいはレンチウイルスベクターが用いられている。しかし、両ウイルスベクターは癌原遺伝子近傍への挿入頻度が高いことが証明されており、その安全性が懸念される。

原発性免疫不全症患者に対するレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療では、特定の白血病関連遺伝子の活性化が起こり、高頻度に白血病/骨髄異形成症候群が発症した (重症複合型免疫不全症および Wiskott-Aldrich 症候群の遺伝子治療における LMO2遺伝子の活性化と T細胞性白血病の発症, 慢性肉芽腫症の遺伝子治療における MDS1/Evi1遺伝子の活性化と骨髄異形成症候群の発症)。

CAR 療法の臨床試験においては、これまで遺伝子導入T細胞に関連した白血病の発症は報告されておらず、成熟T細胞への遺伝子導入では白血化のリスクが低いと考えられている。しかし、免疫抑制下にある患

者の安全性については、より長期的な観察が必要であろう。また、遺伝子導入に当たる医療従事者の感染リスクも大きな問題となる。

これらの問題を解決するために、筆者らは非ウイルスベクターを用いた CAR 遺伝子の導入法の開発に取り組んできた。PiggyBac トランスポゾン法は、目的遺伝子発現ベクターと遺伝子転位酵素 (piggyBac) ベクターの2種類の DNA プラスミドを用いる非ウイルス遺伝子導入法で、その遺伝子導入効率は従来の DNA プラスミド法と比較して10倍以上高く、その遺伝子発現は安定かつ持続的である¹⁷⁾¹⁸⁾。癌原遺伝子内・近傍への遺伝子挿入頻度はほぼランダムで、レトロウイルスベクターのような特定の白血病関連遺伝子への親和性はないと考えられる¹⁹⁾。さらに、ウイルス遺伝子導入法と比較して、遺伝子導入操作が簡便で²⁰⁾、かつ感染リスクがないため、臨床応用した場合の安全性と費用対効果は高いと予想される。筆者らは、piggyBac トランスポゾン遺伝子改変法を用いても CAR-T 細胞の抗腫瘍効果が減弱しないことを *in vitro* 実験および *in vivo* マウスモデルで確認しており、今後の臨床応用が期待される^{21)–23)}。

VII まとめ

CAR-T 細胞は、がん細胞に対する感度、特異度が高く、がん細胞やその周囲環境が有する腫瘍免疫回避機構に屈しない。T細胞自体が有する CTL 活性は、抗体療法における抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性や補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性よりも高いため、CAR-T 細胞療法は抗体療法よりも抗腫瘍効果が強力である。また、CAR-T 細胞は抗体が届かない中枢神経領域に到達しうる点も大きな利点である。さらに、CAR 遺伝子を導入することによって、本来T細胞が免疫応答しない糖鎖抗原に対しても細胞性免疫が発揮されるため、がん糖鎖抗原を標的とした scFv の作製により、様々な難治性がんに対する新たな CAR 療法の提案が可能となる。

米国では CAR 療法が次世代のがん治療の中核を担う治療として位置づけられており、本邦での臨床実施が待たれる。

文 献

- 1) Cruz CR, Hanley PJ, Liu H, Torrano V, Lin YF, Arce JA, Gottschalk S, Savoldo B, Dotti G, Louis CU, Leen AM, Gee AP, Rooney CM, Brenner MK, Bollard CM, Heslop HE: Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy* 12: 743-749, 2010

- 2) Leen AM, Rooney CM, Foster AE : Improving T cell therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 25 : 243-265, 2007
- 3) Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG : Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 720-724, 1993
- 4) Rossig C, Brenner MK : Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy. *Mol Ther* 10 : 5-18, 2004
- 5) Dotti G, Savoldo B, Brenner M : Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors : “are we nearly there yet?”. *Hum Gene Ther* 20 : 1229-1239, 2009
- 6) Ngo MC, Rooney CM, Howard JM, Heslop HE : Ex vivo gene transfer for improved adoptive immunotherapy of cancer. *Hum Mol Genet* 20 (R1) : R93-99, 2011
- 7) Ahmed N, Salsman VS, Yvon E, Louis CU, Perlaky L, Wels WS, Dishop MK, Kleinerman EE, Pule M, Rooney CM, Heslop HE, Gottschalk S : Immunotherapy for osteosarcoma : genetic modification of T cells overcomes low levels of tumor antigen expression. *Mol Ther* 17 : 1779-1787, 2009
- 8) Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, Yvon E, Weiss HL, Liu H, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK : Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors : persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14 : 1264-1270, 2008
- 9) Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, Liu H, Wu MF, Gee AP, Mei Z, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK : Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 118 : 6050-6056, 2011
- 10) Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, Maric I, Raffeld M, Nathan DA, Lanier BJ, Morgan RA, Rosenberg SA : Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116 : 4099-4102, 2010
- 11) Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan DA, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA : B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 119 : 2709-2720, 2012
- 12) Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH : Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365 : 725-733, 2011
- 13) Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH : T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3 : 95ra73, 2011
- 14) Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M : Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118 : 4817-4828, 2011
- 15) Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M : CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med* 5 : 177 ra38, 2013
- 16) Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA : Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 18 : 843-851, 2010

- 17) Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, Foster AE, Vera JF, Manuri PR, June CH, Rooney CM, Wilson MH : Optimization of the PiggyBac transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes. *J Immunother* 32 : 826-836, 2009
- 18) Nakazawa Y, Saha S, Galvan DL, Huye L, Rollins L, Rooney CM, Wilson MH : Evaluation of long-term transgene expression in piggyBac-modified human T lymphocytes. *J Immunother* 6 : 3-10, 2013
- 19) Galvan DL, Nakazawa Y, Kaja A, Kettlun C, Cooper LJ, Rooney CM, Wilson MH : Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells. *J Immunother* 32 : 837-844, 2009
- 20) Saha S, Nakazawa Y, Huye LE, Doherty JE, Galvan DL, Rooney CM, Wilson MH : piggyBac transposon system modification of primary human T cells. *J Vis Exp* 69 : e4235, 2012
- 21) Manuri PV, Wilson MH, Maiti SN, Mi T, Singh H, Olivares S, Dawson MJ, Huls H, Lee DA, Rao PH, Kaminski JM, Nakazawa Y, Gottschalk S, Kebriaei P, Shpall EJ, Champlin RE, Cooper LJ : piggyBac transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum Gene Ther* 21 : 427-437, 2010
- 22) Nakazawa Y, Huye LE, Salsman VS, Leen AM, Ahmed N, Rollins L, Dotti G, Gottschalk SM, Wilson MH, Rooney CM : PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther* 19 : 2133-2143, 2011
- 23) Huye LE, Nakazawa Y, Patel MP, Yvon E, Sun J, Savoldo B, Wilson MH, Dotti G, Rooney CM : Combining mTor inhibitors with rapamycin-resistant T cells : a two-pronged approach to tumor elimination. *Mol Ther* 19 : 2239-2248, 2011

(H 25. 4. 16 受稿)