

論文内容の要旨

論文提出者氏名 末松 正也

論文題目

PiggyBac Transposon-mediated CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Derived from CD45RA-positive Peripheral Blood Mononuclear Cells Possess Potent and Sustained Antileukemic Function

論文内容の要旨

【緒言】

近年、難治性腫瘍の新規細胞免疫療法として遺伝子改変キメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T 細胞) 療法が開発されており、本邦でも CD19 CAR-T 細胞療法が実施可能となっている。CD19 CAR-T 細胞療法は、再発・難治 CD19 陽性 B 細胞系腫瘍に対し非常に高い寛解導入率を認めるが、一定の割合で再発は生じてしまい、CAR-T 細胞の分化が進み疲弊することで CAR-T 細胞が体内で早期に枯渇してしまうことが再発の大きな要因の一つである。現在実臨床で使用されているウイルス遺伝子改変 CAR-T 細胞では、その製造過程で CD3/CD28 抗体による刺激を要するため、CAR-T 細胞完成時には分化が進み疲弊してしまう問題点がある。一方、我々が開発した PiggyBac transposon (PB) 法では、製造過程で CD3/CD28 抗体による刺激を必要としないため、疲弊が少なく未分化な Naïve T 細胞優位の CAR-T 細胞の作成が可能である。また、CAR-T 細胞作成において、最初の末梢血単核球 (PBMC) の分画が最終的な CAR-T 細胞の特徴や機能に影響を与えることが知られている。そこで、我々はより質の高い PB 法による CAR-T 細胞を作成すべく、T 細胞分化マーカーの一つである CD45RA に着目して検討を行った。

【方法】

PBMC を CD45RA ビーズを用いて、CD45RA 陽性 PBMC、陰性 PBMC に選別し、各々の PBMC から PB 法で CD19 CAR-T 細胞を作成した (RA⁺CAR-T 細胞、RA⁻CAR-T 細胞)。RA⁺CAR-T 細胞と RA⁻CAR-T 細胞各々の遺伝子導入効率、培養における細胞増多、フェノタイプ、免疫逃避マーカーを Flow cytometry (FCM) で比較した。また、両者の遺伝子発現をトランスクリプトーム解析で比較した。さらに、B 細胞性急性リンパ性白血病腫瘍株である REH と RA⁺CAR-T 細胞、RA⁻CAR-T 細胞各々の連続共培養を行い、両者の抗腫瘍効果を FCM で比較し、免疫逃避マーカーやサイトカイン分泌についても比較を行った。また、REH を免疫不全マウスに接種後、RA⁺CAR-T 細胞または RA⁻CAR-T 細胞を尾静脈投与し、腫瘍の拡がりを生体イメージングシステムで評価した。さらに、CD45RA で選別しない、トータルの PBMC から作成した CD19 CAR-T 細胞 (unsorted CAR-T 細胞) も作成し、RA⁺CAR-T 細胞との抗腫瘍効果を担がんマウ

スを用いて比較検討を行った。

【結果】

RA⁺CAR-T 細胞と比較して、RA⁻CAR-T 細胞は、CAR 遺伝子の導入効率が良く (RA⁺CAR-T: 77.5 ± 9.8% vs RA⁻CAR-T: 39.7 ± 3.8%)、細胞増殖が良好で (RA⁺CAR-T: 32.5 ± 9.3 倍 vs RA⁻CAR-T: 11.1 ± 5.4 倍)、CD8 発現優位で (RA⁺CAR-T: 84.0 ± 3.4% vs RA⁻CAR-T: 34.1 ± 10.6%)、疲弊マーカーである PD-1 発現が低く (RA⁺CAR-T: 3.1 ± 2.5% vs RA⁻CAR-T: 19.2 ± 6.4%)、Naïve/stem cell memory 分画が非常に多かった (CAR+/CD45RA+CCR7+ 分画; RA⁺CAR-T: 71.9 ± 9.7% vs RA⁻CAR-T: 8.0 ± 5.3%)。トランスクリプトーム解析では、RA⁺CAR-T 細胞は RA⁻CAR-T 細胞より Naïve/memory 発現が優位で、PD-1 を含む疲弊マーカーの発現が低く、FCM 解析の結果を支持するものであり、またこれらの特徴は腫瘍抗原刺激を受けた後の CAR-T 細胞でも同様に保たれていた。REH と 3 回の連続共培養試験で、RA⁺CAR-T 細胞、RA⁻CAR-T 細胞ともに REH を完全殺傷したが、PD-1 発現は RA⁺CAR-T 細胞の方が抑えられており、さらに殺細胞サイトカインである IFN- γ の分泌は RA⁺CAR-T 細胞の方が RA⁻CAR-T 細胞よりも優れていた。担がんマウスを用いた検討でも RA⁺CAR-T 細胞投与群は、RA⁻CAR-T 細胞投与群と比較し腫瘍の拡がりを有意に抑えられており、有意な生存曲線の延長を認めた。さらに、最も長期生存の得られた RA⁺CAR-T 細胞投与群の 2 匹の経時的な骨髄検査において、CAR-T 細胞投与 50 日後においても十分な CAR-T 細胞の骨髄内での増加を認めており、長期間にわたる CAR-T 細胞の増殖と抗腫瘍効果を裏付ける結果であった。また、担がんマウスによる RA⁺CAR-T 細胞と unsorted CAR-T 細胞の検討でも、RA⁺CAR-T 細胞投与群は unsorted CAR-T 細胞投与群と比較し腫瘍の拡がりを有意に抑え、また有意な生存曲線の延長を認めた。

【考察】

RA⁺CAR-T 細胞は Naïve/memory 発現優位で疲弊が少ない特徴を有し、RA⁻CAR-T 細胞や、また unsorted CAR-T 細胞と比較しても抗腫瘍効果が優れていることを示した。最初に PMBC を CD45RA で選別し、CD45RA 陽性 PBMC から CD19 CAR-T 細胞を作成する方法は、PB 法における優れた CAR-T 細胞製造法であると考えられた。