

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K09949
 研究課題名(和文) 遺伝子改変同種リンパ球による移植後再発腫瘍治療モデル開発と安全性基盤の確立

 研究課題名(英文) Development of preclinical models of donor-derived gene-modified lymphocyte infusion for tumor-relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation and evaluation of efficacy and safety

 研究代表者
 俵 功 (TAWARA, Isao)

 三重大学・医学部附属病院・講師

 研究者番号：80378380
 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)：本研究ではマウスを用いて、主要組織適合複合体(MHC)一致および不一致同種造血細胞移植後腫瘍再発モデルを作製し、腫瘍特異的ドナー由来リンパ球輸注(DLI)を、移植2週間後あるいは8週間後に実施した。腫瘍特異的DLIによりすべての条件で抗腫瘍効果が確認され、移植2週間後のDLIでは両モデルにおいて移植片対宿主病(GVHD)の増悪が認められた。また移植8週間後のDLIでは、MHC一致モデルのみGVHDの増悪が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、同種造血細胞移植における臨床的課題である移植後腫瘍再発に対して、腫瘍特異的遺伝子改変ドナーリンパ球輸注療法(DLI)を実施することを念頭においた、前臨床研究である。研究成果は、腫瘍特異的DLIを実施する際に懸念されるGVHDへの影響が、レシピエントの状態、MHC適合度によって異なること示しており、より効果的で安全な腫瘍特異的DLIの臨床開発において、重要な基礎データになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated murine models of tumor relapse after major histocompatibility complex (MHC)-matched or mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) and performed tumor-specific donor lymphocyte infusion (DLI) 2 or 8 weeks after HCT. Anti-tumor effect was observed in each setting and GVHD was aggravated graft-vs-host disease (GVHD) in the animals when we performed tumor-specific DLI 2 weeks after HCT. GVHD aggravation was observed only in the recipients of MHC-matched HCT, not in those of MHC-mismatched HCT when we performed tumor-specific DLI 8 weeks after HCT. Our pre-clinical data suggest that GVHD aggravation caused by tumor-specific DLI is dependent on timing and MHC disparity. This study will contribute to clinical development of tumor-specific DLI for the tumor-relapsed patients after allogeneic HCT.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血細胞移植 移植後腫瘍再発 ドナーリンパ球輸注 腫瘍特異的リンパ球 移植片対宿主病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 同種造血幹細胞移植は、難治性血液疾患等に対する根治的治療法として実施され、腫瘍性疾患の治療(根治)原理は、移植前処置として実施される抗がん剤投与や放射線照射と、ドナー由来細胞による抗腫瘍免疫応答である。移植片対腫瘍(Graft-vs-Tumor, GVT)効果によるものと考えられている。移植患者には、ドナー免疫系の宿主(レシピエント)正常組織に対する同種免疫応答により起こる移植片対宿主病(Graft-vs-Host Disease, GVHD)の制御を目的として免疫抑制剤が投与されるが、それらは非特異的でありGVHDのみならず、GVT効果や感染免疫をも抑制するため、腫瘍や感染症の制御の観点からは不利な面がある。同種造血幹細胞移植後の免疫制御の目標は、GVHDを制御しつつ、GVT効果、感染免疫を保持することとなるが、現行の非特異的な免疫抑制療法では十分な結果が得られていない。GVHD、原疾患の再発、感染症、臓器機能障害(晩期合併症)など、移植患者の生存率および生活の質の向上における課題は多い。

これら課題の中で、移植後腫瘍再発は患者の生命予後を直接左右するものであり、同種造血幹細胞移植における最も重要な課題の一つである。移植後再発腫瘍は全般的に予後不良で、再発時には、免疫抑制療剤の減量によるGVT効果の増強(惹起)、ドナーリンパ球輸注(Donor Lymphocyte Infusion, DLI)によるGVT効果の発現、化学療法の実施、再移植などが考慮される。はGVHDの変化とGVT効果を事前に予測することは困難であり、は根治の可能性は低く、はドナー確保および患者状態によっては実施が困難であることも多い。移植後腫瘍再発に対しては、GVHDの増悪を伴わないGVT効果の増強法の開発が望まれているが、国内外で実用化には至ったものはない。

(2) 現在、腫瘍に発現する抗原を認識するT細胞受容体(TCR)やキメラ抗原受容体(CAR)など、特異的受容体遺伝子改変細胞(Tリンパ球)輸注療法の開発が進んでいる。TCR遺伝子導入Tリンパ球(TCR-T)は、主要組織適合複合体(Major Histocompatibility Complex, MHC)に提示される細胞内在性抗原を認識し、CAR遺伝子導入Tリンパ球(CAR-T)は細胞表面抗原を認識し、ともにTリンパ球(T細胞)のもつ細胞傷害機構により抗腫瘍効果を発揮する。これら特異的受容体遺伝子改変T細胞を、移植後再発腫瘍に対するDLIに用いることにより、強力な抗腫瘍効果が期待される。その場合、細胞ソース(源)は移植ドナーであり、遺伝子改変T細胞に元来発現している内在性TCRによる同種免疫応答、すなわちGVHDの増悪(惹起)が懸念される。

(3) 我々はヒトTCR-T作製の際に内在性TCRの発現を抑制することにより、同種反応性を減弱できる可能性を示してきた(池田裕明 他、56th Annual Meeting of American Society of Hematology 2014、俵 功 他、第74回日本癌学会総会 2015)が、この技術によって作製されたTCR-T、あるいはCAR-Tを移植後腫瘍再発時のDLIに応用する際、遺伝子改変細胞および宿主におけるGVHD修飾因子を明らかにしておくことは、安全な腫瘍抗原特異的DLIの基盤作りにおいて重要である。

(4) 臨床病態メカニズムの解明、治療モデル開発において、ヒトと類似した病態を呈する動物モデルの有用性が示されてきた。本研究代表者はこれまでにマウスモデルを用いた造血幹細胞移植、腫瘍免疫研究に従事してきており、両分野の研究経験を遺伝子改変細胞によるDLI前臨床研究で活かすことを考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

マウス移植後腫瘍再発モデルを用いて、以下の目的を設定し本研究を実施した。

(1) 遺伝子改変同種リンパ球輸注療法における、輸注細胞および宿主側のGVHD修飾因子を探索する前臨床研究を実施し、移植後再発腫瘍に対して遺伝子改変細胞輸注療法を安全に実施するための基盤開発。

(2) 同種抗原と腫瘍抗原を発現する血液系腫瘍細胞株は存在しておらず、マウス(F1)に非致死量放射線反復照射により誘発した血液系腫瘍から細胞クローンを樹立し、移植後腫瘍再発モデルへ応用する。

(3) DLI後の輸注細胞の動態には不明な点が多いため、コンジェニックマウス由来リンパ球を用いたDLIモデルを作製し、腫瘍局所およびGVHD標的臓器内の輸注細胞の動態を可視化する。

3. 研究の方法

(1) 本研究代表者が所属する三重大学血液・腫瘍内科学講座ではBALB/cマウスをドナーとするMHC半合致造血幹細胞移植モデル(BALB/c CB6F1)が確立しており、同じくBALB/cマウスをドナーとする、MHC一致造血幹細胞移植モデル(BALB/c CD2F1)を作製した。

(2) ドナー由来腫瘍特異的DLIに用いるリンパ球(T細胞)は、BALB/c由来CMS5aの拒絶抗原であるmERK2由来ペプチド抗原9mを認識する、BALB/cバックグラウンドTCRトランスジェニックマウス・DUC18の脾臓より採取し、遺伝子改変(導入)時に準じて*in vitro*で抗CD3eおよび

抗 CD28 抗体による刺激の後、インターロイキン-2 により増幅した。上記移植マウスに、CMS5a 腫瘍 (1x10⁶ 個) を移植後 11 日目、53 日目に皮下接種し、移植後再発モデルとした。増幅した DUC18 リンパ球 (CD8 陽性細胞 4x10⁶ 個) によるドナー由来腫瘍特異的 DLI を腫瘍接種 3 日後の、同種移植後 2 週 (14 日) あるいは 8 週 (56 日) 後に実施し、腫瘍増殖および GVHD への影響を観察した。

(3) 三重大学で保有する BALB/c バックグラウンドの mERK2 を恒常的に発現するトランスジェニックマウス (mERK2-Tg) と、他系統のマウスとの交配で得られた F1 マウス (脾細胞は DUC18 の T 細胞を刺激できることを確認している) への非致死量 X 線の反復照射により、胸腺 (脾臓、骨髄) にリンパ系腫瘍を誘発し、同種抗原と共に腫瘍特異抗原を発現する血液系 (リンパ系) 腫瘍細胞株の樹立を試みた。

(4) またコンジェニックマーカー・CD90.1 発現 BALB/c マウス、CD90.1 発現 BALB/c マウスとの交配により得られた CD90.1 発現 DUC18 マウスより、上記と同じ方法で増幅し得られたリンパ球 (4x10⁶ 個) を用いて、移植後腫瘍再発・DLI モデルを構築し、GVHD 標的臓器および腫瘍局所において CD90.1 陽性細胞をモノクローナル抗体で識別し、輸注細胞の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) *In vitro* で抗 CD3e および抗 CD28 抗体を用いた活性化 DUC18 マウス T 細胞の作製法を確立し、MHC 半合致造血細胞移植 (BALB/c CB6F1)、MHC 一致造血細胞移植 (BALB/c CD2F1) モデルに既存の肉腫細胞株 (CMS5a) を用いて腫瘍特異的 DLI の条件確認の後、抗腫瘍効果および GVHD への影響を検討した。

DUC18 活性化 T 細胞輸注による抗腫瘍効果は、行った全ての DLI 実験条件で認められたが、GVHD については移植モデル、DLI 実験条件によって異なる結果が得られた。移植後早期 (2 週) の DLI では両モデルで GVHD 増強が認められ、移植 8 週後の DLI では BALB/c CD2F1 で認められたものの、BALB/c CB6F1 では認められなかった。この結果は、移植後早期では移植の様式を問わず特異的 DLI による GVHD 増悪のリスクが高く、MHC 一致移植後のレシピエントでは特異的 DLI による GVHD 増悪リスクが長期にわたることが示唆された。現在、輸注細胞の動態解析とサイトカイン測定を行い、メカニズムを解析中である。

(2) 臨床的には DLI が難治性造血器腫瘍の再発時に実施が検討されることに鑑み、同種抗原および腫瘍特異的抗原を発現する F1 マウス血液系腫瘍細胞株の樹立を試みた。本研究における腫瘍抗原モデルとなる mERK2 を恒常的に発現する BALB/c バックグラウンド・トランスジェニックマウス (mERK2-Tg) と、他系統 (C57BL/6 および DBA/2) マウスとの交配により CB6F1 (C57BL/6 x BALB/c) -mERK2 および CD2F1 (DBA/2 x BALB/c) -mERK2 マウスを得た。これら F1 マウスの脾細胞は、*in vitro* で DUC18 T 細胞を刺激できることを確認した。この結果は F1 マウスが片親由来の mERK2 を発現していることを意味している。さらにマウスへの非致死量 X 線の反復照射により、胸腺 (脾臓、骨髄) にリンパ系腫瘍を誘発し、長期培養可能な株が得られたため、限界希釈法によるクローニングを行い、いくつかのクローンが得られた。

それら腫瘍クローンを用いて、まず CMS5a と同様に皮下接種モデルを作製し、DUC18 から得た T 細胞を輸注したところ抗腫瘍効果が認められなかった。クローンの PCR 解析を行ったところ、導入された mERK2 が確認されなかったことより、反復する X 線照射中、*in vivo* における腫瘍化の過程、あるいは *in vitro* での培養・クローニング中に mERK2 遺伝子 (DNA) が破壊されたと考えられた。その中のひとつの腫瘍クローンを、BALB/c CB6F1 移植モデルで経静脈的に接種し、移植後 3 日目にシクロフォスファミドを投与し GVHD を抑制する実験 (PTCy モデル) に用いたところ、シクロフォスファミド抵抗性であることがわかった。そのクローンを移植時に経静脈的に接種しシクロフォスファミド未投与の移植マウスでは、GVHD とともに GVT 効果が発揮され 70 日間の生存率が約 40% であったのに対し、シクロフォスファミド投与群 (PTCy 群) では 0% であった。クローンは当初の目的であった、同種抗原および腫瘍特異的抗原を発現する腫瘍細胞株として、腫瘍特異的 DLI モデル研究には使用できなかったが、近年 HLA 半合致移植における効果的な GVHD 制御法として確立した PTCy のモデル研究において、シクロフォスファミド抵抗性腫瘍として利用できるものである。

(3) コンジェニックマーカー・CD90.1 発現 BALB/c マウスと DUC18 マウスとの交配により得られた CD90.1 発現 DUC18 マウスより、前記の方法で増幅し得られたリンパ球 (CD8 陽性細胞 4x10⁶ 個) を用いて、移植後腫瘍再発 (CMS5a)・DLI モデルを構築し、腫瘍局所における CD90.1 陽性細胞をモノクローナル抗体により検出したところ、腫瘍局所における CD90.1 陽性細胞の集積を認めた。増幅した CD90.1 発現 BALB/c マウスリンパ球 (CD8 陽性細胞 4x10⁶ 個) を輸注した群では腫瘍内の CD90.1 陽性細胞は少なく、DUC18 リンパ球による腫瘍特異的 DLI による抗腫瘍効果を裏付ける結果であった。

臨床的に移植後再発腫瘍に対する有効な手段がないのが現状である。健常ドナー細胞を用いた腫瘍特異的遺伝子改変細胞には、その同種反応性による GVHD の発症や増悪の懸念がある。前述のように我々が研究中の内在性 TCR の発現を抑制し同種反応性を減弱できる技術によって作

製された腫瘍特異的遺伝子改変細胞は、DLI に使用する際の GVHD リスクが低いと考えられる。DUC18 マウス由来 T リンパ球は同種反応性が減弱しており、DLI に使用する際 GVHD 発症リスクが低いと考えられたが、移植 2 週後の DLI では MHC 一致、不一致移植モデルともに GVHD の増悪が認められた。一方、移植 8 週後の DLI では MHC 一致モデルでのみ GVHD 増悪が認められた。現在そのメカニズムを解析中だが、輸注細胞の動態、輸注後のサイトカイン濃度の測定により、何らかの手掛かりが得られるものと考えられる。本研究はマウスを用いた前臨床研究であるが、研究成果は遺伝子改変腫瘍特異的 DLI の臨床開発において、有用な情報になるものと考えられる。

また本研究において、X 線反復照射により同種抗原および腫瘍特異的抗原を発現する腫瘍細胞株の作製を試みた際、得られたクローンは抗原欠失のため当初の腫瘍特異的 DLI モデル研究には使用できなかったが、PTCy モデルにおいてシクロフォスファミド抵抗性腫瘍として利用できた。F1 マウス由来のシクロフォスファミド抵抗性腫瘍株は世界でも報告がなく、今後クローンをを用いた PTCy による GVHD 制御と GVT 効果減弱のメカニズム解析に利用してゆく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Tawara Isao, Kageyama Shinichi, Miyahara Yoshihiro, et al	4. 巻 130
2. 論文標題 Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1985 ~ 1994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2017-06-791202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Isao Tawara
2. 発表標題 WT1-specific TCR gene-transduced Lymphocytes
3. 学会等名 2018 Korean Society of Experimental Hematology 5th Annual Meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 俵 功、伊野 和子、藤枝 敦史、坪井 順哉、西村 廣明、宮原 慶裕、大石 晃嗣、榎屋 正浩、珠玖 洋、片山 直之
2. 発表標題 新しい腫瘍細胞株を用いたマウスMHC半合致骨髓移植後シクロフォスファミド投与モデル
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tawara Isao, Okamori Kana, Shiku Hiroshi, Ikeda Hiroaki, Katayama Naoyuki
2. 発表標題 Tumor-specific TCR-engineered Donor Lymphocytes Infusion for Tumor Relapse after Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Mice.
3. 学会等名 The 8th JSH Internationalsymposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tawara Isao, Katayama Naoyuki, Shiku Hiroshi, Ikeda Hiroaki
2. 発表標題 Tumor-Specific Donor Lymphocyte Infusion after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tawara Isao, Okamori Kana, Shiku Hiroshi, Ikeda Hiroaki, Katayama Naoyuki
2. 発表標題 Tumor-specific Donor Lymphocyte Infusion for Tumor Relapse after Hematopoietic Cell Transplantation.
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 依功、西村廣明、坪井順哉、伊野和子、景山裕紀、大石晃嗣、榭屋正浩、片山直之
2. 発表標題 シクロフォスファミド抵抗性腫瘍細胞株を用いたマウスMHC半合致移植モデルの作製
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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	池田 裕明 (IKEDA Hiroaki) (40374673)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	