

平成 30 年 8 月 20 日

急性リンパ性白血病の免疫療法が更に進展！ —CAR-T 細胞療法の安全性評価のための新システム開発と 名大発の CAR-T 細胞療法の安全性評価—

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・門松 健治）小児科学の高橋 義行（たかはし よしゆき）教授、村松 秀城（むらまつ ひでき）講師、濱田 太立（はまだ もとはる）大学院生、同医学部附属病院先端医療開発部先端医療・臨床研究支援センターの奥野 友介（おくの ゆうすけ）特任講師、西尾 信博（にしお のぶひろ）特任講師、信州大学医学部小児科学教室の中沢 洋三（なかざわ ようぞう）教授らの研究グループは、人工的に遺伝子を導入した細胞（以下、遺伝子改変細胞^{※1}）の安全性を評価する新たな方法を開発し、これを用いて CD19 キメラ抗原受容体 T 細胞^{※2}（Chimeric Antigen Receptor T-cell: CAR-T 細胞）の安全性を検討しました。本研究成果は、学術出版社 Cell Press と Lancet から共同発行されている科学誌「EBioMedicine」（英国時間 2018 年 8 月 3 日付電子版）に掲載されました。

急性リンパ性白血病（acute lymphoblastic leukemia: ALL）に対して、人工的に遺伝子を組み込んだ（遺伝子を「導入する」）CAR-T 細胞療法の臨床応用が進み、再発・難治性の ALL に対する有効性が海外から報告されています。CAR-T 細胞療法は、体外で患者の T 細胞に CAR 遺伝子を導入することで、T 細胞が白血病細胞を集中的に攻撃するようにして患者の体内に戻す新規の治療方法です。海外では、レトロウイルス^{※3}やレンチウイルス^{※4}といったウイルスを用いた方法で CAR-T 細胞が作成されていますが、本院小児科では、製造コストや安全面を考慮してウイルスを用いず、酵素を利用した piggyBac トランスポゾン法^{※5}での CAR-T 細胞を開発しています。一方で、遺伝子改変細胞は、遺伝子が組み込まれる場所（以下、遺伝子挿入部位）によって、時には、その細胞自体が白血病化してしまうという危険性ははらんでいます。このため、細胞の白血病化に繋がり得る場所に遺伝子が組み込まれていないか、遺伝子の挿入部位を確認して、その安全性を評価することが必要です。本研究グループは、CAR-T 細胞の遺伝子挿入部位を解析する新たな方法（tagmentation-assisted PCR: tag-PCR 法）を開発しました。tag-PCR 法を用いて、ウイルスを用いて作成した CAR-T 細胞と、piggyBac トランスポゾン法で作成した CAR-T 細胞の安全性を評価しました。その結果、tag-PCR 法では、既存の方法よりも短時間で正確に CAR-T 細胞の安全性を評価することができました。また、tag-PCR 法での解析により、piggyBac トランスポゾン法で作成した CAR-T 細胞では、細胞の白血病化のリスクとなり得る場所への遺伝子挿入頻度が、ウイルスを用いて作成した CAR-T 細胞以下であることが分かりました。

本研究結果から、tag-PCR 法が遺伝子改変細胞の安全性評価において有用な方法であることが示され、今後の研究利用が期待されます。

また、piggyBac トランスポゾン法で作成した CAR-T 細胞の安全性は、ウイルスを用いて作成した CAR-T 細胞と同等以上であると考えられ、今後の臨床応用が期待されます。

急性リンパ性白血病の免疫療法が更に進展！ －CAR-T 細胞療法の安全性評価のための新システム開発と 名大発の CAR-T 細胞療法の安全性評価－

ポイント

- CAR-T 細胞の安全性を評価する新たな方法として、これまでの方法よりも短時間で正確に解析ができる tagmentation-assisted PCR (tag-PCR) 法を開発しました。
- ウイルスを使わず酵素を利用した名大発の piggyBac トランスポゾン法による CD19 キメラ抗原受容体 T (CAR-T) 細胞が、遺伝子挿入部位の点において安全であることを示しました。
- piggyBac トランスポゾン法で作成した CAR-T 細胞の今後の臨床応用と、臨床で使用される CAR-T 細胞の安全性評価における tag-PCR 法の応用が期待されます。

1. 背景

急性リンパ性白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia: ALL) は、血液中の細胞ががん化して発症する病気です。小児から成人までで発症し得る血液がんですが、小児がんの中では最も多いがんの一つです。小児では、化学療法や造血幹細胞移植による治療によって 8 割以上の生存率が期待されますが、通常の治療で良好な効果がみられなかった場合や再発した場合の生存率は低いため、新たな治療法が模索されています。CD19 キメラ抗原受容体 T 細胞 (Chimeric Antigen Receptor T cell: CAR-T 細胞) 療法は、体外で患者の T 細胞に CAR 遺伝子を組み込む (遺伝子を「導入する」) ことで、T 細胞が白血病細胞を集中的に攻撃できるようにして患者の体内に戻す新規の治療方法です。化学療法で良好な効果がみられない患者、または、より強力な治療である骨髄移植や臍帯血移植を行ったにも関わらず再発してしまった患者を対象にした海外での臨床試験において、CAR-T 細胞療法は 70~90% の患者で白血病細胞を減少させることに成功しました。これらの報告は主に米国からのものであるため、日本国内での早期の CAR-T 細胞療法の実用化が望まれています。海外の臨床試験では、レトロウイルスやレンチウイルスといったウイルスを使って遺伝子を導入した CAR-T 細胞が用いられていますが、製造コストや安全面の観点から、本院小児科では、ウイルスを使わず酵素を利用して遺伝子を導入する piggyBac トランスポゾン法を用いた CAR-T 細胞を開発しています。一方で、このように人工的に遺伝子を導入した細胞 (以下、遺伝子改変細胞) では、遺伝子が組み込まれる場所 (以下、遺伝子挿入部位) によって、時には、その細胞自体が白血病化してしまうという危険性をはらんでいます (図 1)。このため、遺伝子の挿入部位を確認してその安全性を評価することが必要です。

遺伝子の挿入部位を解析するためのいくつかの方法がありますが、これまでの方法はどれも、正確性に欠けたり、解析までに時間が掛かるなどの課題がありました。そのため、短時間で正確に遺伝子の挿入部位を解析できるシンプルな方法が求められています。

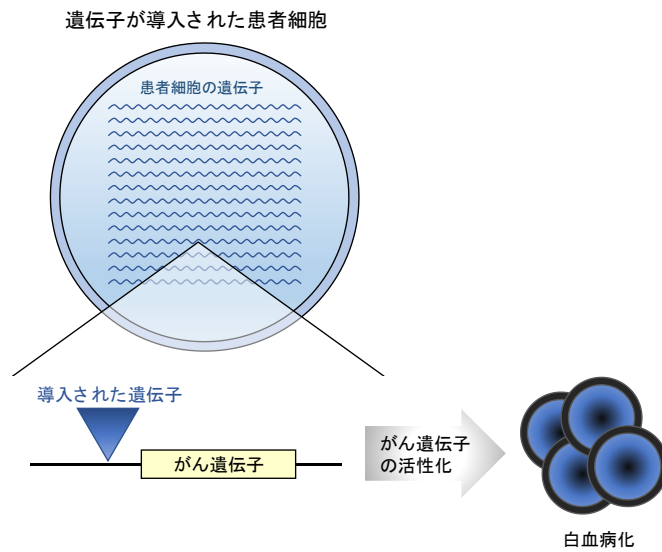


図 1. 遺伝子改変細胞が白血病化するメカニズム
治療のために導入された遺伝子のがん遺伝子内やその近くに
挿入されることで、その細胞が白血病化することがある

2. 研究成果

本研究グループは、CD19 CAR-T 細胞の安全性を評価するために、遺伝子挿入部位の解析方法として tagmentation-assisted PCR (以下、tag-PCR) 法を新たに開発しました。また、この tag-PCR 法を用いて、ウイルス（レトロウイルス、レンチウイルス）を使って遺伝子導入した CAR-T 細胞とウイルスを使わない piggyBac トランスポゾン法で遺伝子導入した CAR-T 細胞の安全性を比較検討しました。

CAR-T 細胞においては、治療のために導入されている CAR 遺伝子は患者 T 細胞の遺伝子の転写に関わる場所や細胞のがん化に関わるがん遺伝子の中に挿入されている頻度が低い方が、その安全性は高いと考えられます。Tag-PCR 法での解析によって、piggyBac トランスポゾン法はレトロウイルスベクター^{※6}と比較して、遺伝子の転写に関わる領域への挿入頻度は低く、がん遺伝子内への挿入頻度は同等でした。また、レンチウイルスベクターと比較すると、遺伝子の転写に関わる領域への挿入頻度は piggyBac トランスポゾン法の方が高かった一方で、がん遺伝子内へはレンチウイルスベクターの方が高い頻度で挿入されていました(図2)。このことから、piggyBac トランスポゾンで遺伝子導入した CAR-T 細胞の安全性はウイルスを用いて遺伝子導入した CAR-T 細胞と同等か、それ以上であると考えられました。また、Tag-PCR 法は、これまでの方法の半分以上の工程数と時間で CAR-T 細胞の遺伝子挿入部位を解析することができました(図3)。Tag-PCR 法での解析結果を正確に(ただし、時間がかかってコストも高い)解析できる既存の方法と比較したところ、両方で同様の結果を導くことができました。このことから、tag-PCR 法は短時間で正確に遺伝子挿入部位を解析することができるシンプルな方法であることが分かりました。この方法は、現在開発が進んでいる遺伝子治療で用いられる遺伝子改変細胞の安全性の評価にも応用することができるため、今後の幅広い利用が期待されます。

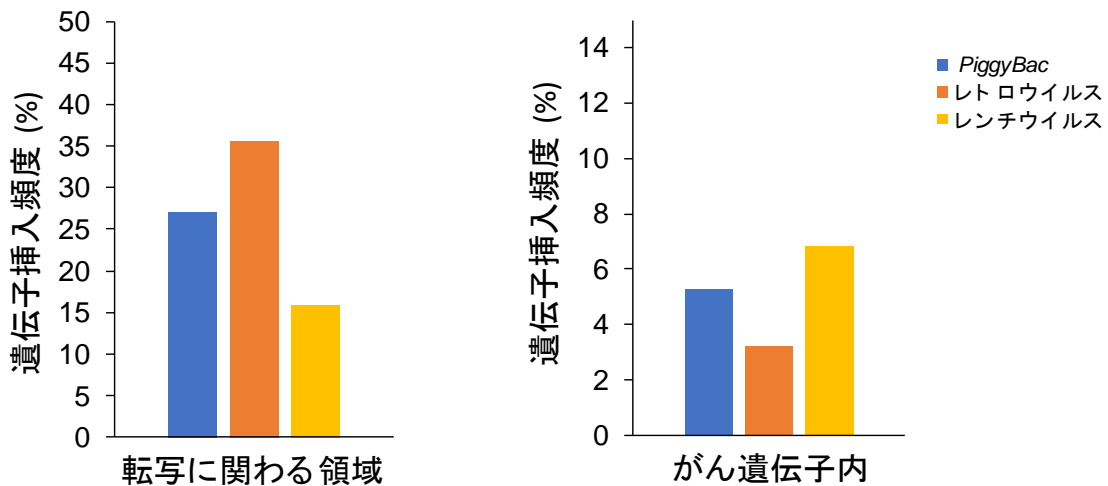


図2. CAR-T細胞における転写に関わる領域とがん遺伝子内へのCAR遺伝子の挿入部位
 PiggyBacトランスポゾン法はレトロウイルスと比較して、転写に関わる領域に遺伝子が挿入されている頻度は低く、がん遺伝子内に遺伝子が挿入されている頻度は同等
 PiggyBacトランスポゾン法はレンチウイルスと比較して転写に関わる領域への遺伝子挿入頻度は高いが、がん遺伝子内へはレンチウイルスの方が高い頻度で遺伝子が挿入されている

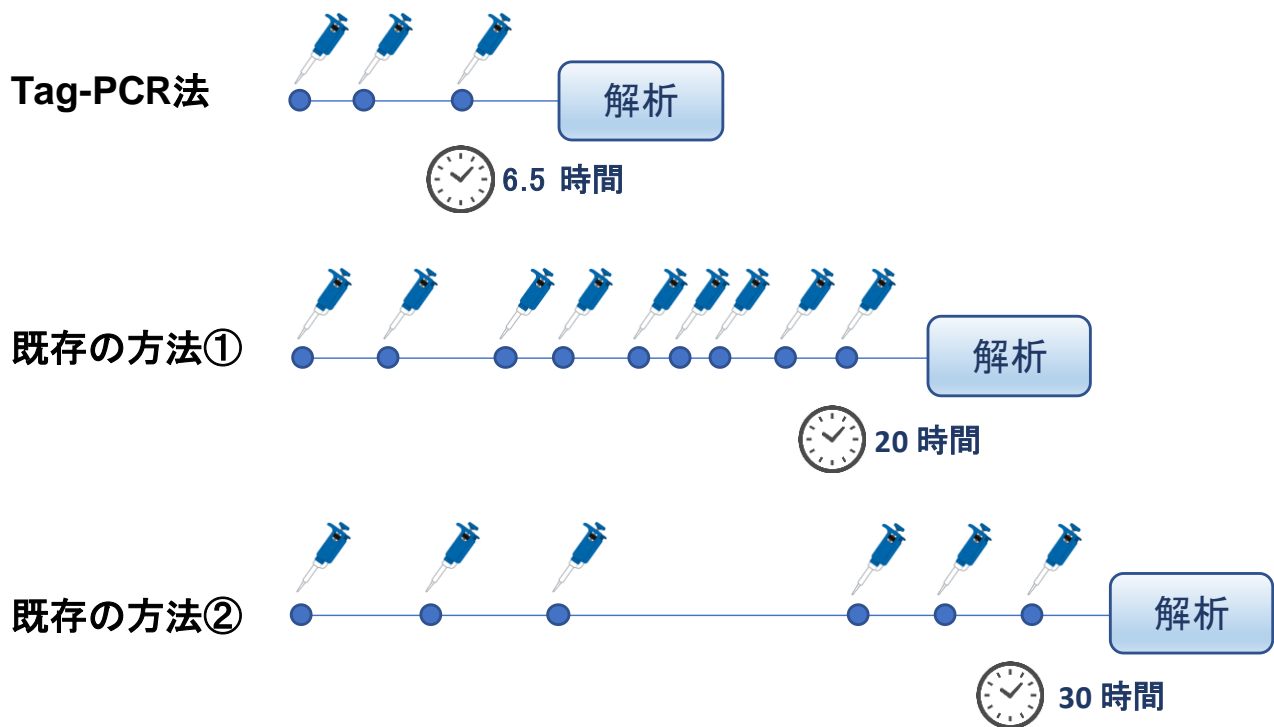


図3. tag-PCR法と既存の方法の比較

青い丸は実験工程を示しており、時間は解析までにかかる時間を示してる

Tag-PCR法は既存の方法と比較して、少ない工程数で短時間に遺伝子挿入部位の解析を行うことが可能

3. 今後の展開

本研究により、遺伝子改変細胞の安全性を評価する方法として、tag-PCR法が有用であることが分かり、今後の応用が期待されます。また、piggyBacで遺伝子導入したCAR-T細胞はウイルスを

用いて遺伝子を導入した CAR-T 細胞と同等かそれ以上であると考えられました。PiggyBac トランスポゾン法はウイルスベクターよりも安価に CAR-T 細胞の製造できる点からも、piggyBac トランスポゾン法で遺伝子導入した CAR-T 細胞療法が、今後、臨床応用されることが期待できます。

4. 用語説明

※1：遺伝子改変細胞：研究や治療を目的として、遺伝子を人工的に編集した細胞のことです。遺伝子編集技術や遺伝子の運び屋であるベクターを利用して、細胞の遺伝子を削ったり、別の遺伝子を追加することができます。

※2：キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor: CAR）：抗体の抗原認識部位と T 細胞受容体の細胞内シグナル伝達部位を繋いだ構造を持つ、人工的な蛋白です。CAR-T 細胞療法とはこの蛋白を T 細胞に持たせるための遺伝子を体外で T 細胞に導入して患者へ戻す治療です。

※3：レトロウイルス：レトロウイルス科のウイルスのうち、ガンマレトロウイルス属のことで、マウス白血病ウイルスがその代表です。細胞に感染して自身のゲノムを宿主のゲノム組むこむことができる性質を持っています。

※4：レンチウイルス：レトロウイルス科のウイルスのうち、レンチウイルス属のことで、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）がその代表です。ガンマレトロウイルスと同様に、自身のゲノムを宿主のゲノムに組み込むことができます。

※5：piggyBac トランスポゾン：酵素ベクター法の 1 つであり、ウイルスベクターを用いず、ある特異的な配列に挟まれた遺伝子を染色体に組み込むことのできる遺伝子導入法です。

※6：レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター：ガンマレトロウイルスやレンチウイルスウイルスの、ゲノムを宿主のゲノムに組み込むことができるという性質を利用して、ウイルスの病原性に関する部分を取り除き、さらに治療のための遺伝子を組み込んだもの。「ベクター」とは「運び屋」のことで、目的の遺伝子を別の細胞に組み込むことからウイルスベクターと呼ばれます。ガンマレトロウイルスにもとづいて開発されたものをレトロウイルスベクター、HIV ウイルスをもとに開発されたものをレンチウイルスベクターと呼びます。

5. 発表雑誌

著者：Motoharu Hamada, Nobuhiro Nishio, Yusuke Okuno, Satoshi Suzuki, Nozomu Kawashima, Hideki Muramatsu, Shoma Tsubota, Matthew H. Wilson, Daisuke Morita, Shinsuke Kataoka, Daisuke Ichikawa, Norihiro Murakami, Rieko Taniguchi, Kyogo Suzuki, Daiei Kojima, Yuko Sekiya, Eri Nishikawa, Atsushi Narita, Asahito Hama¹, Seiji Kojima, Yozo Nakazawa, and Yoshiyuki Takahashi

論文タイトル：Integration mapping of piggyBac-mediated CD19 chimeric antigen receptor T cells analyzed by novel tagmentation-assisted PCR

雑誌名：EBioMedicine（英国時間 2018 年 8 月 3 日付電子版に掲載）

DOI : [10.1016/j.ebiom.2018.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.07.008)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/EBioM_20180820en.pdf