

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム
セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 固形がんに対する次世代型キメラ抗原受容体発現 T 細胞療法の実臨床スケールでの細胞調製に関する開発研究
(英語) Development of clinical-scale manufacture method of next-generation CAR-T cells for the treatment of solid tumors

研究開発実施期間：2017年4月1日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 玉田耕治
(英語) Tamada Koji

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 山口大学 大学院医学系研究科 免疫学講座 教授
(英語) Professor, Department of Immunology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

和文：

キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR) を遺伝子導入した T 細胞を利用する CAR-T 細胞療法は造血器悪性腫瘍領域において著明な臨床効果を発揮しているが、固形がんに対して確実な有効性を示す技術は未だ確立していない。このような現状において、本課題の代表研究者である玉田らが開発したサイトカイン・ケモカイン産生型の新規 CAR-T 細胞技術は、前臨床研究において固形がんに対する著明な治療効果を示した。本技術は山口大学から特許出願され、山口大学発ベンチャーであるノイルイミュン・バイオテック株式会社により、積極的な臨床開発が進められている。現在、研究室レベルでの細胞調製においては、高い遺伝子導入効率と良好な細胞培養を実施できているが、臨床実用化を目指すにあたり、実際ががん患者に投与する臨床スケールでの細胞調製法の確立が重要である。また、多くのがん患者に安定した供給を可能とするための細胞調製自動化システムの構築も急務であり、本研究課題では新規技術の実用化においてボトルネックとなるこれらの課題の克服を目指す。

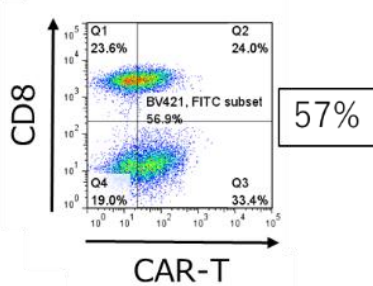
本研究開発を実施することにより、アカデミア (山口大学) の有する知的財産を速やかに事業化し、国際競争に打ち勝つべく臨床開発を加速化させ、日本発の次世代型がん免疫療法を発展させよう。また、現在の固形がんに対する治療法開発では免疫チェックポイント阻害剤の奏効率は 2~3 割程度であるが、その効果が期待できない 7~8 割の症例に対して新規 CAR-T 細胞療法を適応することにより、生存期間の延長、生存率の向上が期待される。また、本研究開発の成功により、将来的に CAR-T 細胞医薬品製造の簡略化と製造コスト削減が期待される。

このような背景と目的に基づき、本研究課題では、次世代型 CAR-T 細胞の実用化のために必要不可欠となる大量培養システムの確立、さらには、その効率化と自動化を目指して、X社の細胞用自動培養装置である

Y機器を用いた培養法の技術開発に取り組んだ。CAR-T細胞の誘導は、T細胞活性化のための初期刺激、遺伝子導入のための培養、遺伝子導入後の拡大培養の3ステップからなっており、それぞれにおいて刺激方法や培養方法、培養期間などの条件の最適化を行った。また、ウイルスベクターの遺伝子導入方法について、試薬Aを利用する従来法と、プレコーティングを必要としない試薬Bを利用する方法を比較検討した。その結果、試薬Bの方法において最終の全細胞収量が 1×10^9 細胞以上、CAR遺伝子導入効率が50-70%という結果が得られ、当初の目的である臨床スケールでの細胞調製を可能とする成果が認められた。また、本手法で製造したCAR-T細胞は、標的分子を発現するがん細胞に反応して有意に高いIFN- γ の産生を認めたことから、臨床スケールでの大量培養条件においてもがん細胞傷害活性が問題なく誘導されていることが確認された。

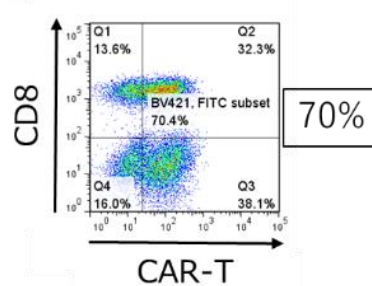
さらに、健常人ドナーから提供されたPBMCを用いて、Y機器によるCAR-T細胞の自動培養プロトコルの最適化を実施した。予備的検討も含め、全体で計10回の実験を行い、培養期間、攪拌の有無、培地交換のタイミングと量、遺伝子導入時のT細胞刺激法などについて様々な条件を検討した。その結果、特定の培養条件において最終の全細胞収量が 1.4×10^9 細胞、CAR遺伝子導入効率が57%、CAR-T細胞数としての最終収量が 7.9×10^8 細胞という結果が得られた(図1)。また、別のドナーのPBMCを用いて実施した再現性確認実験にて、最終の全細胞収量が 9.8×10^8 細胞、CAR遺伝子導入効率が70%、CAR-T細胞数としての最終収量が 6.9×10^8 細胞という結果が得られた(図2)。さらにこれらのCAR-T細胞の腫瘍反応性を検討するため、CARの標的分子を発現する陽性腫瘍株、発現しない陰性腫瘍株のそれぞれとCAR-T細胞を3日間共培養し、培養上清中に産生されるIFN- γ 濃度を測定したところ、標的分子陽性腫瘍株に反応して有意に高いIFN- γ の産生が認められた(図3)。これらの結果から、Y機器を用いた自動培養条件が最適化され、腫瘍反応性を有するCAR-T細胞を実臨床に応用可能なスケールにて製造可能であることが示された。

図 1



<ドナー A >
 全培養期間：9日間
 全細胞収量： 1.4×10^9 細胞
 CAR-T細胞収量： 8×10^8 細胞
 CAR遺伝子導入効率：57%

図 2



<ドナー B >
 全培養期間：8日間
 全細胞収量： 9.8×10^8 細胞
 CAR-T細胞収量： 6.9×10^8 細胞
 CAR遺伝子導入効率：70%

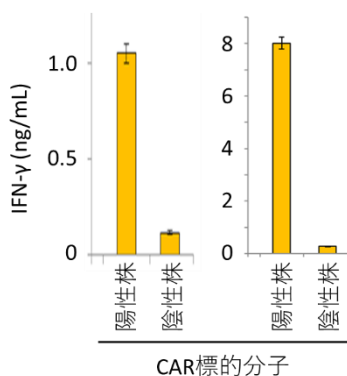


図 3

自動培養製造したCAR-T細胞をCAR標的分子陽性腫瘍株あるいは陰性腫瘍株と1:1にて共培養した。3日後の培養上清におけるIFN- γ の産生量をELISAにて測定した。ドナーA(左パネル)、ドナーB(右パネル)由来のCAR-T細胞でのデータを示す。

以上

のように、当初の研究開発目標はおおむね達成された。成功要因としては、1) 適切な自動培養装置の早期選択、2) 計画的な培養条件の検討、3) 機器製造業者の技術担当者

との綿密な連携と打ち合わせ、4) 国内外からの自動培養装置に関する情報収集、5) 自動培養装置を担当する専属研究者の配属と育成、が挙げられる。また、ノイルイミューン・バイオテック社は平成 29 年 9 月に CAR-T 細胞療法の一部のパイプラインにおいて、大手製薬企業である Z 社との事業提携を締結したため、今後は提携事業会社も含めて CAR-T 細胞療法の実用化に向けた取り組みが加速化されると期待される。

英文：

CAR-T cell therapy, which involves the use of T-cells transfected with a chimeric antigen receptor (CAR), exhibits remarkable clinical effects against malignant hematopoietic malignancies; however, a technology capable of demonstrating reliable effectiveness with respect to solid cancers is yet to be established. Against this backdrop, the novel cytokine/chemokine-producing CAR-T-cell technology developed by Tamada et al. has demonstrated a remarkable therapeutic effect on solid cancers in preclinical studies. Currently, high gene transfer efficiency and favorable cell culturing is possible in cell preparations produced at the laboratory level. However, it is important to work towards the practical use of this technology in the clinical environment and production of the required cells on a scale appropriate for administration to cancer patients. In addition, developing an automated cell preparation system capable of providing a stable supply of cells to numerous patients is of urgent need.

Based on this background and purpose, this project aims to establish a mass culturing system, which will be indispensable for the practical application of next-generation CAR-T cells. In addition, aiming for greater efficiency and automation, a technology for culturing methods using automated cell culturing equipment Y produced by Company X is examined. Induction of CAR-T cells consists of 3 steps: initial stimulation for T-cell activation, culturing for gene transfection, and expanded culturing after gene transfection. Each step includes a stimulation method, culturing method, and a culturing period; the conditions for each were optimized. In addition, with regards to the method of gene transfection via viral vectors, a comparison between the conventional method using reagent A and another method not requiring pre-coating using reagent B was performed. As a result, for the method using reagent B, the final total cell yield was 1×10^9 cells or more and the CAR gene transfer efficiency was 50–70%; additionally, results enabling cell preparation on par with the clinical scale, which was envisioned as the initial objective, were obtained. Moreover, CAR-T cells produced through this method exhibited significantly higher IFN- γ production in response to cancer cells expressing the target molecules, indicating that cytotoxic activity was induced without problems under mass culturing conditions on a clinical scale.

Further, optimization of the automatic culturing protocol for CAR-T cells using equipment Y was carried out using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) provided by healthy donors. A total of 10 studies including preliminary studies have been carried out till date, and various conditions were evaluated with respect to the culture period, application of stirring, timing, and quantity of medium exchange, and T-cell stimulation method used during gene introduction, among others. As a result, the final total cell yield was calculated to be 1.4×10^9 cells, the CAR gene transfer efficiency was 57%, and a final CAR-T cell yield of 7.9×10^8 cells was attained under specific culture conditions. Furthermore, in a reproducibility verification test conducted using PBMCs from another donor, the final total cell yield was 9.8×10^8 cells, the CAR gene transfer efficiency was 70%, and the final CAR-T cell yield was 6.9×10^8 cells. Additionally, to assess the tumor reactivity of these CAR-T cells, they were co-cultured with positive tumor cells expressing a target molecule of CAR and negative tumor cells not expressing CAR independently for 3 days; as a result, IFN- γ production was found to be significantly higher in response to the target molecule-positive tumor cells. Based on these results, the automatic culture condition using the equipment Y was optimized, and the feasible manufacturing of CAR-T cells exhibiting tumor reactivity on a scale applicable to clinical practice was confirmed.

In summary, the original R&D goal was largely achieved. The success factors include: 1) early selection of an

appropriate automated culturing device, 2) consideration of planned culture conditions, 3) close communication and cooperation with technical personnel at the equipment manufacturing centers, 4) collection of information concerning automated culturing equipment, and 5) assignment and training of dedicated researchers in charge of the automated culture equipment. As a result, it is expected that efforts towards the practical application of CAR-T cell therapies involving partner companies will be accelerated in the future.

[ここまでを総括報告としてAMEDのホームページに掲載](#)

公表資料（事後評価報告書）の作成にあたっての注意事項

研究成果の公表により、特許権を取得できない、ノウハウとして秘匿すべき事項（例えば、製造条件の詳細）が第三者に知られる、研究開発において第三者に先を越されるといった事態が起こり得ます。特に、創薬研究については、化合物情報(有効成分)、生物活性情報と治療対象疾患の情報から第三者が容易に研究内容を把握できてしまうため、下記のように、化合物情報と生物活性情報（治療対象疾患）のいずれかを公表しないと工夫をすることが必要です。公表資料に記載する事項については、各研究機関の知財担当者等と相談することをお勧めします。

例1. ある化合物の生物活性が新規である場合

× 課題名：A B 1 2（名称から化学構造式が明らか）のY Z キナーゼ阻害活性

○ 課題名：化合物XのY Z キナーゼ阻害活性

→ 公表資料においては、例えば、化合物情報の具体的な開示を避ける。

例2. 標的（Y Z キナーゼ）が抗がん剤のターゲットとして新規である場合

× 課題名：化合物Xを有効成分とするY Z キナーゼ阻害剤—新規機序による抗がん剤の開発

○ 課題名：化合物Xを有効成分とする新規抗がん剤の開発

→ 公表資料においては、Y Z キナーゼが抗がん剤の新規ターゲットとなることは、できる限り開示しない。化合物Xの具体的な開示も避ける。