

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム  
(疾患・組織別実用化研究拠点(拠点C)) 事業  
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 次世代型ヒト人工染色体ベクターによる CAR 交換型高機能再生 T 細胞治療の開発拠点  
(英語) Center for exchangeable CAR expressing regenerated T cell therapy from  
human artificial chromosome modified universalized iPSC

研究開発実施期間: 令和2年9月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 金子 新  
(英語) Shin KANEKO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授  
(英語) Center for iPS cell Research and Application, Kyoto University. Professor.

## II 研究開発の概要

本研究開発では、がん免疫再生医療の社会実装の鍵となるヒト人工染色体(HAC)-iPS細胞プラットフォームとそこから効率よく製造される複数のiPS細胞由来キメラ抗原受容体(CAR)-T細胞(iCAR-T)の開発システムを提案した。具体的にはCARを簡便に交換可能かつT細胞の機能向上に必要な要素を備えたHACを搭載した臨床用iPS細胞プラットフォーム「CAR-exHAC-iPS細胞」の創出と有用性の実証である。

事業期間の約3年間に以下の研究開発を実施した。

### 研究開発項目1：exHAC搭載用のscFvの設計と評価

がん細胞に特異的な反応性を示すモノクローナル抗体の作製法を用いることにより、複数の膜タンパク質に対するがん特異的抗体(CasMab)を作製できる。我々は種々のCAR載せ替えが可能なexHACベクターに搭載する目的でCasMabを含む以下の各種抗体からscFvを作製し、まずはCARとしての評価を実施した。

- ・CD19CAR：既存の再生医療等製品(キムリア®)と同じscFvを持つCAR
- ・ポドプラニン(PDPN)CAR：ポドプラニンに対するCasMabとして、樹立済みの3種類のクローンを完全ヒト化抗体に改変し、scFvを得た。scFvとヒト抗体Fcドメインとの融合タンパク質(scFv-Fc)を作製し、結合活性の良好なクローンを選別した。CasMab由来のヒト化scFvをもつPDPN CAR(hLpMab23)はPDPN陽性腫瘍の増大を有意に抑制することが示された。
- ・ポドカリキシン(PODXL)CAR：CasMab法によって得られたPODXL抗体をヒト化し、ヒト化scFv搭載CARを作製しCAR-Tとして評価を行って良好なscFvクローンを選択した(hPCmab6)。hPCmab6のscFvを持つCAR-T細胞は免疫不全マウスに移植したPODXL陽性腫瘍の増大を有意に抑制することが示された。

### 研究開発項目2：exHAC搭載用高機能化因子の設計と評価

iCAR-T細胞の機能を向上させる因子の探索を行い(Ueda T et al, Nature Biomedical Engineering 2022, Ishikawa A et al., submitted)、exHACに搭載すべき遺伝子群(TCR, サイトカイン, 自殺遺伝子)を含むexHACベクターを構築し、CD19CARを搭載した後にCHO細胞を用いてベクター機能と効果の評価を行った。機能・効果が不足する場合に備えた追加因子(CARシグナル強化因子、抗原認識部位欠損型TCR)の基本機能もiPS-T細胞で評価した。exHAC上のCD19-CAR, サイトカインについて、発現誘導に応じた発現量の増加を認めたが、遺伝子発現とタンパク質産生の僅かなリークが認められた。発現制御構造を変更することで非特異的な遺伝子発現量を低下させることに成功した。また各発現ユニットの発現安定化を目的として、UBC遺伝子発現制御領域15kb中のエンハンサー領域(特許申請済み)の発現安定化能を検証した。同配列を活用して、各ユニットの遺伝子発現安定化デザインを進めた。

### 研究開発項目3：exHACの設計と評価、exHAC作製とiPS細胞への搭載

研究開発項目2で作製したCD19CAR搭載exHACについて、CHO細胞から研究用HLAホモ iPS細胞への染色体導入が行われた。同iPS細胞ならびに造血前駆細胞でのexHAC維持と遺伝子発現維持は確認できたもののリークによるT細胞分化不良を認めた。exHACの発現制御構造の変更が必要と判断し、研究開発項目2に戻ってその改良を行った結果、リークを減少させることができた。

上述の対応を行う間のバックアップとして、T-iPS細胞内に既に導入済みの基本HAC(bHAC)上にFMC63scFvを持つCARを組み込んで、CD19-CAR-bHAC T-iPS細胞を作製した。同T-iPS細胞内のbHAC上でさらにPDPN CARへの組み換えが可能であることを確認し、いずれのT-iPS細胞もT細胞への分化とHAC搭載CARの発現が維持されることを確認した(研究開発項目4参照)。以上よりexHACの最適化を行いつつもCAR導入bHAC活用を加速化して検討することとした。具体的には、臨床用のCHO株を入手してbHACを染色体導入し、そのbHACをHLAホモ iPS細胞株(FFI01s04)に染色体導入するプロトコルを確立した。

### 研究開発項目4：exHAC-iPSCのT細胞分化と薬効試験(in vitro, in vivo)

研究開発項目3で作製したCD19CAR搭載exHACを組み込んだ研究用HLAホモ iPS細胞について、同iPS細胞ならびに造血前駆細胞でのexHAC維持と遺伝子発現維持は確認できたものの遺伝子発現リークによるT細胞分化不良を認めた。exHACの改良を実施して再検討を行うまでの間に、バックアップとしてT-iPS細胞内に既に導入済みの基本HAC(bHAC)上にFMC63scFvを持つCARを組み込んで、CD19-CAR-bHAC T-iPS細胞を作製し、T細胞への分化誘導を実施した。分化誘導は問題なく実施され、bHACからCD19CARを発現するiCAR-T細胞を得ることが可能であった。In vitro機能試験として、CD19陽性白血病細胞株に対する細胞傷害性試験、活性化試

験、反応性増殖応答試験、サイトカイン産生試験等を行い、いずれも CAR 依存性の反応を示すこと、すなわち iPS 細胞に染色体導入された HAC から発現制御される CAR が機能することが確認された。また CD19 陽性白血病細胞株を免疫不全マウスに移植し T 細胞を静脈投与する in vivo 試験において、bHAC から CD19CAR を発現する iCAR-T 細胞はサイトカイン遺伝子による改変の下で健常人由来 CD19CAR-T 細胞と同様のマウス生存延長効果を示すことが明らかになった。以上の結果より、CAR 遺伝子発現用のベクターとして、HAC の安定性や機能性に問題が無いことが示された。研究開発項目 3 において、CD19-CAR-bHAC T-iPS 細胞上での CD19CAR と PDPN CAR の組み換えが実施され、得られた PDPN-CAR-bHAC T-iPS 細胞について分化誘導を実施した。HAC 上の CAR 遺伝子入れ替えの後でも、CD19CAR の場合同様に T 細胞への分化が確認された。

#### **研究開発項目 5：臨床用 exHAC-iPSC の MCB 製造と安全性の評価**

当初は臨床用 iPS 細胞にゲノム編集を施して HAC を作成する方針であった。iPS 細胞 (201B7) において長腕部位を部位特異的に削除した 21 Δq の作製に成功したものの短腕部位を部位特異的に削除した 21 Δp の候補クローンが取得できなかった。実施計画に遅れが出る可能性が出て来たため、生物由来原料基準に適合する臨床用 CHO 株を入手し、微小核細胞融合法による bHAC ベクター導入を実施するための培養条件を確立し、さらに微小核誘導条件を設定した。臨床用 bHAC 構築に向け、既存 HAC 上の EGFP および、薬剤選抜マーカータンパク等の外来遺伝子発現機構を除去した、bHAC (v2.2) の構築を完了した。本検討により、臨床用 HAC を構築できる体制が整った。bHAC (v2.2) を臨床 CHO 株に導入後、シードストックを作製した。シードストックにおける増殖能および HAC 保持率は MCB 化にあたり十分であることを確認した。さらに、basal HAC を臨床用 iPS 細胞株 (QHJI01s04) に導入するプロトコールと HAC への遺伝子導入プロトコールを確立した。

#### **研究開発項目 6：臨床用 exHAC-iPSC の MCB からの T 細胞分化と薬効試験**

研究開発項目 5 の期間内の進捗が bHAC-CHO シードストックの作製と特性評価にとどまったため、臨床用 exHAC-iPSC MCB からの T 細胞分化と薬効試験は実施に至らなかった。

#### **研究開発項目 7：PMDA 相談**

exHAC-iPSC の作製に関する材料適合性、exHAC-iPSC の作製に関する製造管理品質管理の戦略について、再生医療の実現化支援課題 (松山先生) とオンライン会議を行い、PMDA 対面助言に向けた準備を進めた。その後、PMDA コンサルタントとの協議に基づき、最短での臨床用 exHAC-iPSC 樹立戦略を固め、2022 年 2 月 7 日に事前面談 (RS 戦略相談) を行った。生物由来原料基準における HAC ベクターの位置づけについては、申請者の考え方で差し支えないとの見解を得た。品質管理については exHAC-iPS 細胞が多様な製品のプラットフォームとなるセルバンクなのか単一製品用のセルバンクなのかによって製造品質管理方針が異なること、ならびにそれぞれの方針について必要な対応について助言を受けた。また新規性の高さや工程の複雑さから生物由来基準、製造品質管理とも慎重に検討したいとの見解であった。CAR 搭載 exHAC-iPS 細胞由来 T 細胞の臨床開発に至るまでの方針、特に段階的な技術検証を目的とした CAR 搭載 bHAC-iPS-T 細胞の臨床開発について PMDA コンサルタントと協議して見解をまとめた。

本研究開発では、ヒト人工染色体 (HAC)-iPS 細胞プラットフォームとそこから効率よく製造される複数の iPS 細胞由来キメラ抗原受容体 (CAR)-T 細胞 (iCAR-T) の開発に取り組んだ。HAC の臨床使用における考え方を整理し、当初の方針を修正しながらも生物由来原料基準に適合する方法で HAC 搭載 iPS 細胞を樹立する方法論を確立し、関連文書を整備した。また基本構造を持つ HAC-iPS 細胞に CAR を搭載し、T 細胞への分化における HAC 保持や CAR 発現の維持を明らかにした。さらには得られた CAR-HAC-iPS-T 細胞が in vitro において十分な抗腫瘍特性を示し、in vivo 白血病モデルで健常人由来 CAR-T と同様の治療効果を持つことを示した。加えて、iPS 細胞内の HAC 上で CAR の組み換えが可能であることとそこから T 細胞を分化誘導できることも明らかになった。これらの知見に基づき、より巧緻かつ正確な遺伝子発現制御が可能な HAC 開発と臨床応用可能な材料を用いた臨床用 HAC-iPS 細胞の樹立が進むことが期待される。

### **Item 1: Design and evaluation of scFv for exHAC**

Cancer-specific antibodies (CasMab) against multiple membrane proteins can be generated by using a method for producing monoclonal antibodies that specifically react with cancer cells. We generated scFvs from the following antibodies, including CasMab, for use in exHAC vectors that can carry various CARs.

- CD19CAR: CAR with the same scFv as existing regenerative medicine products (Kymriah®)
- Podoplanin (PDPN) CAR: Three clones of CasMab against podoplanin were modified into fully humanized antibody and those scFv were obtained. scFv-Fc fusion protein (scFv-Fc) was generated and clones with good binding activity were selected. PDPN CAR (hLpMab23) with humanized scFv derived from CasMab was shown to significantly suppress the growth of PDPN-positive tumors.
- Podocalyxin (PODXL) CAR: PODXL antibodies obtained by the CasMab method were humanized to generate humanized scFv-loaded CARs and evaluated as CAR-T to select good scFv clones (hPCmab6). hPCmab6 scFv-bearing CAR-T cells were used in immunodeficient mice and showed to significantly suppress the growth of PODXL-positive tumors transplanted into the immunodeficient mice.

### **Item 2: Design and Evaluation of transduced genes on exHAC for armoring of CAR-T**

We searched for factors that enhance the function of iCAR-T cells (Ueda T et al, Nature Biomedical Engineering 2022, Ishikawa A et al, submitted), constructed exHAC vectors containing a group of genes (TCR, cytokines, suicide genes) that should be loaded onto exHAC. We constructed exHAC vectors and evaluated vector function and efficacy using CHO cells after loading CD19CAR. The basic functions of additional factors (CAR signaling enhancers and antigen recognition site-deficient TCRs) were also evaluated in iPS-T cells in case of lack of function or efficacy. However, a slight leak on gene expression and protein production was observed. We succeeded in decreasing the nonspecific gene expression levels by modifying the expression regulatory structure. In order to stabilize the expression of each expression unit, the expression stabilizing ability of the enhancer region (patent pending) in the 15kb UBC gene expression control region was verified. Utilizing the same sequence, we proceeded with the design of gene for each unit.

### **Item 3: Design and evaluation of exHACs, exHAC production, and their integration into iPS cells**

The CD19CAR-loaded exHACs generated in R&D item 2 were transfected from CHO cells into HLA homozygous iPS cells. Although the maintenance of exHAC and gene expression in the iPS cells and hematopoietic progenitor cells were confirmed, T-cell differentiation failure due to gene-expression leakage was observed. As a backup for the above measures, we generated CD19-CAR-bHAC T-iPS cells by incorporating CAR with FMC63 scFv on the basic HAC (bHAC) that had already been introduced into T-iPS cells. We confirmed that further recombination to PDPN CAR was possible on bHAC in the same T-iPS cells, and that both T-iPS cells maintained differentiation into T cells and expression of HAC-loaded CAR (see R&D item 4). Based on the above, we decided to accelerate and examine the utilization of CAR-loaded bHACs while optimizing exHACs. Specifically, we obtained a clinical CHO line and established a protocol for chromosomal transfection of bHACs into an HLA homologous iPS cell line.

### **Item 4: T-cell differentiation of exHAC-iPSC and drug efficacy testing (in vitro, in vivo)**

In the HLA homozygous iPSC cells with CD19CAR-loaded exHACs generated in R&D item 3, we confirmed that exHACs were maintained and gene expression was maintained in the iPSCs and hematopoietic progenitor cells, but T cell differentiation was defective due to gene expression leakage. As a backup, we generated CD19-CAR-bHAC T-iPS cells by incorporating CAR with FMC63 scFv on the basic HAC (bHAC) that had already been introduced into T-iPS cells and induced differentiation into T cells. In vitro functional tests were performed including cytotoxicity, activation, proliferative response, and cytokine production against CD19-positive leukemia cell lines, all of which showed CAR dependent responses, i.e., CARs regulated by HACs transfected into iPS cells were confirmed to be functional. In an in vivo study, iCAR-T cells expressing CD19CAR from bHACs showed the same survival of mice as CD19CAR-T cells derived from healthy individuals

These results indicate that there are no problems with the stability and functionality of HAC as a vector for CAR gene expression.

**Item 5: MCB production and safety evaluation of exHAC-iPSC for clinical use**

**Item 6: T-cell differentiation of clinical exHAC-iPSC from MCBs and drug efficacy testing**

The initial plan was to create HACs by genome editing of clinical iPS cells. 21 $\Delta$ q with site-specific deletion of the long arm site in iPS cells (201B7) was successfully generated, but a candidate clone of 21 $\Delta$ p with site-specific deletion of the short arm site could not be obtained. Since there was a possible delay in the initial plan, we obtained a clinical CHO strain that met the criteria for biological raw materials, established culture conditions for introducing bHAC vectors by the MMCT method, and set the induction conditions. In order to construct bHAC for clinical use, we completed the construction of bHAC (v2.2) by removing EGFP and foreign gene expression mechanisms such as drug selection marker proteins on the existing HAC. After introducing bHAC(v2.2) into clinical CHO strains, seed stocks were prepared. Proliferation capacity and HAC retention in the seed stock were confirmed to be sufficient for MCB. Furthermore, we established a protocol for introducing basal HACs into a clinical iPS cell line (QHJI01s04) and a protocol for gene transfer into HACs.

T-cell differentiation from clinical exHAC-iPSC MCBs and drug efficacy studies were not conducted because progress during R&D item 5 was limited to the generation and characterization of bHAC-CHO seed stock.

**Item 7: PMDA Consultation**

We held an online meeting with Dr. Matsuyama on material compatibility for exHAC-iPSC quality control strategy, and prepared for PMDA advice. Subsequently, based on discussions with PMDA consultants, we finalized the strategy for establishing clinical exHAC-iPSC in the shortest possible time and held a preliminary meeting (RS strategy consultation) on February 7, 2022. The applicant's position on the status of HAC vectors in the criteria for biological raw materials is acceptable. Regarding quality control, we were advised that the manufacturing quality control policy differs depending on whether the exHAC-iPS cell line is a cell bank that serves as a platform for various products or a cell bank for a single product, and the necessary measures for each policy.