

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：B 細胞性急性リンパ性白血病
2. 研究開発代表者：峰野 純一（タカラバイオ株式会社）
3. 研究開発の成果

B 細胞性急性リンパ性白血病（B-ALL）を対象に、CD19 特異的キメラ抗原受容体（CAR）遺伝子導入 T リンパ球（CD19 CAR-T 細胞）を用いた治療法の開発を行った。

本事業では、テーラーメイド型の再生医療等製品である CD19 CAR-T 細胞の開発において、再生医療等製品を安全に、確実に、迅速に患者に届けるための、品質の評価手法の開発ならびに原材料である細胞を保存した場合における製品品質の同等性の評価手法の開発を目指し 3 つの課題に取り組み、成果を得た。

1. 遺伝子導入 T リンパ球の potency 評価用細胞の開発

本評価法の開発においては、CD19 CAR-T 細胞の potency 評価用細胞の樹立に向けて、CD19 遺伝子安定発現細胞の作製と当該細胞を用いた CD19 CAR-T 細胞の potency 評価系の開発を行った。細胞表面に CD19 分子が発現していない K562 細胞を使用し、ヒト CD19 遺伝子を 3 種類のウイルスベクターで導入して安定株を取得し、CD19 遺伝子の安定発現について最適なベクターシステムを検証した。スクリーニングにより選定した CD19 発現クローンを使い、CD19 CAR-T 細胞への反応性の再現性・頑健性を確認した。選定したクローンについてマスターセルバンクを作製した。

2. 遺伝子導入 T リンパ球の造腫瘍性評価系の開発

本評価法の開発において、再生医療等製品を安全に、かつ迅速に患者に届けるための、新たなインビトロ造腫瘍性評価系の開発を行った。現行のトリパンブルー染色法による造腫瘍性評価系の検証を行い、従来の 30 日目での判定を 14 日目での判定（試験仮適合）に短縮することができた。さらに、検出感度を上げるため、カルセイン AM を用いた造腫瘍性評価系の開発を行った結果、培養 7 日目でも 0.01%（200 万個に 200 個）の割合でスパイクしたがん細胞（K562）の増殖の検出が可能になり、従来のトリパンブルー染色法に比べて感度が 10 倍上昇した。

3. 遺伝子導入 T リンパ球の原材料に関する評価系の開発

CD19 CAR-T 細胞の製造原材料である末梢血リンパ球（PBMC）を保存した場合における製品品質の同等性の確認方法の評価系の開発を行った。凍結保存によるリスク評価により、生存率、細胞増殖率及び遺伝子導入効率が、製品品質への影響が大きい項目とし全体の評価を行った。その結果、凍結保存剤の違いによる、PBMC 安定性の評価を 2 種の凍結保存温度設定により、細胞生存率による簡易評価ができた。凍結及び非凍結細胞の小スケール比較を行った結果、凍結保存により細胞増殖率が低下するものの遺伝子導入効率やその他の遺伝子導入 T リンパ球の反応性等に影響しないことが確認された。この検討は短期の凍結に加え 6 ヶ月保存した PBMC においても同様の結果が得られた。更に実スケール製造検討により、凍結 PBMC を用いた場合においても治験に必要な細胞数が得られることが確認された。以上より、凍結 PBMC を用いた場合のリスク評価方法及び実際に影響を受けると考えられる品質項目が明確となった。

機構相談として PMDA と以下二件の対面相談を実施した。

- (1) プロトコールに関する相談
- (2) 品質安全性に関する相談