

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 小児急性リンパ性白血病に対する非ウイルスベクターを用いた
キメラ抗原受容体 T 細胞療法の開発

2. 研究開発代表者： 高橋 義行 (名古屋大学大学院医学系研究科)

3. 研究開発の成果

<非ウイルスベクターによる CD19 キメラ遺伝子導入 T 細胞療法>

・ GMP 準拠の大量キメラ遺伝子 T 細胞培養法確定、規格の決定、安定性の検討： CD19-CAR の規格及び製造方法の適切性を確認したところ、MTA を結んだ米国ベイラー医科大学より、CD19-CAR のデザイン変更が必要との連絡があったため、米国 National Cancer Institutes が公開している CD19-CAR に変更 (知財部により公知確認済) することになった。技術革新により、PiggyBac トランスポゾン法による遺伝子導入効率の向上が認められたため、知財戦略に関し、特許の出願を行った。

GMP グレードで入手が可能である細胞培養液、サイトカイン、培養容器、抗体、プラスミドを使用して CAR-T 細胞を作製した。CAR-T 細胞に最適な培養方法を確立し、規格を確定した。GMP グレードの物品試薬を用いた CAR-T 細胞が可能となった。作製した CAR-T 製剤について、凍結融解の実験により溶解時の安定性を確かめた。さらに溶解時の無菌試験を行い、安全性を確認できた。

・ 非臨床試験：メディリッジ社へ GMP 製造に準じたグレードのプラスミドを製造委託した。そのプラスミドを用いて作成した CAR-T 細胞を用い、マウスを用いた非臨床試験および CAR-T 細胞測定方法の PCR バリデーションの実施を外注委託した。単回投与毒性試験を行ったところ、臨床推定用量を超える用量においても、特段問題となる事象は認められなかった。

・ 臨床試験：臨床試験計画立案、規制当局との相談・対応、関連文書作成

知財の侵害を受けないプラスミドの構造を再検討した上で、GMP グレードでのプラスミド製造に向け、予備製剤製造を行い、手順書を整備した。臨床試験に向け、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(平成 25 年法律第 85 号) に従い、細胞調製を行うバイオマテリアル調製ユニットの衛生管理基準書、製造管理基準書、品質管理基準書等必要な手順書の整備を行った。臨床プロトコルの作成開始し、準備中である。

・ 薬事戦略相談：MTA を結んだ米国ベイラー医科大学からの情報により、CD19-CAR のデザイン変更が必要があったために、PMDA との薬事戦略相談が遅れたが、平成 28 年 6 月 13 日に事前面談を予約している。

<CD19・CAR-T 療法関連技術開発 および CD19 以外の CAR 開発>

・ 次世代シークエンサーを用いた骨髄微小残存腫瘍検出法の開発：CD19-CAR-T 細胞療法の適応及び効果測定に必要な、微小残存腫瘍の検出システムを確立できた。免疫グロブリン重鎖及び T 細胞受容体 γ 鎖の相補性決定領域 3 における塩基配列の多様性を次世代シークエンサーで解析し、 10^{-5} ~ 10^{-6} の微小残存腫瘍を検出する測定系を確立した。

・ ベクター改変：1) CD19 CAR-T 細胞療法におけるサイトカイン放出症候群を制御するために、RNAi 技術を用いてサイトカイン遺伝子の発現を抑制できる CAR ベクターを開発した。(特許出願中)

2) 第三者ドナーからの CAR-T 細胞療法において生じる重症 GVHD を予防するために、ウイルス特異的 CAR-T 細胞の樹立法を開発した。ウイルス特異的 CAR-T 細胞は、従来の CAR-T 細胞よりも、CAR の発現が高くなることを明らかにした。(特許出願中)

3) CD19-CAR の発現を薬剤投与によって自由にコントロールするためのベクター開発を行った。T リンパ球に遺伝導入を行い、薬剤投与後の CAR 機能を検討した。薬剤投与によって発現を誘導可能であり、発現誘導時のみ CAR-T として機能することが確認できた。(特許出願中)

4. その他