

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Establishment of Chimeric Antigen Receptor T cell therapy for Acute
Lymphoblastic Leukemia using Non-Virus Vector system

研究開発担当者 (日本語) 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授 高橋 義行
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School
of Medicine
Professor and Chairman・Yoshiyuki Takahashi

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 臨床研究実施支援
開発課題名： (英語) Support for Clinical Trial

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学医学部附属病院 病院教授 水野正明
所属 役職 氏名： (英語) Nagoya University Hospital、 Professor Masaaki MIZUNO

分担研究 (日本語) 医師主導治験実施支援 (プロジェクトマネージャー)
開発課題名： (英語) the supports of investigator-initiated clinical trial (Project management)

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター
講師 加藤勝義
所属 役職 氏名： (英語) Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University
Hospital, Lecturer, Katsuyoshi Kato

分担研究 (日本語) 薬事的観点からの開発支援
開発課題名 : (英語) **Development support on pharmaceutical affairs**

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学医学部附属病院先端医療 臨床研究支援センター
病院講師 清水忍
所属 役職 氏名 : (英語) **Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, Clinical Lecturer, Shinobu Shimizu**

分担研究 (日本語) 安全性の高い CD19 特異的 CAR-T 細胞療法の開発
開発課題名 : (英語) **Development of safety CD19 CAR-T cell therapy**

研究開発分担者 (日本語) 信州大学学術研究院医学系 教授 中沢 洋三
所属 役職 氏名 : (英語) **Shinshu University School of Medicine, Professor, Yozo Nakazawa**

分担研究 (日本語) CAR-T 細胞作製
開発課題名 : (英語) **Production of CAR-T**

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター
特任助教 西尾信博
所属 役職 氏名 : (英語) **Nobuhiro Nishio, Designate Assistant Professor, Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital**

分担研究 (日本語) 骨髄微小残存腫瘍の検出
開発課題名 : (英語) **Detection of minimal residual disease**

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 名古屋大学 医学部附属病院 特任講師 奥野友介
所属 役職 氏名 : (英語) **Yusuke OKUNO, Designated Lecturer, Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital**

分担研究 (日本語) CAR-T 細胞の改変
開発課題名 : (英語) **Modification of CAR-T cells**

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 助教 寺倉 精太郎
所属 役職 氏名 : (英語) **Nagoya University Hospital Department of Hematology, Research Associate, Seitaro Terakura**

II. 成果の概要（総括研究報告）

欧米を中心に、化学療法抵抗性 ALL 患者に対して、ALL 細胞表面に発現する CD19 抗原に対するキメラ抗原受容体を、患者から採取した末梢血 T 細胞に遺伝子導入し、大量に培養して輸注する CD19.CAR-T 療法の臨床試験が行われ根治例を含む良好な成績が報告されている。しかし、遺伝子導入にウイルスベクターを使用しているため白血病を惹起する危険性があり、特に小児においては長期安全性に懸念がある。また、培養系に、白血病細胞株、牛胎仔血清などの異種・腫瘍材料が用いられることが多く、培養設備の高コスト化や安全性への問題点となっている。非ウイルス（DNA プラスミド）ベクターによる遺伝子導入法である PiggyBac トランスポゾン法での CAR-T 療法を開発し、より安全で安価な CD19.CAR-T 療法の開発を行い以下の成果を達成できた。

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：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がそれまでの 5-10% から約 50% と向上し、非ウイルスベクターとして世界最高水準であり、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 細胞に最適な培養方法を確立し、規格を確定し、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、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。臨床プロトコールを作成した。

薬事戦略相談：PMDA との薬事戦略相談を、平成 28 年 6 月 13 日に行い、将来実施するための治験について、細胞加工の工程、非臨床試験結果による安全性について事前面談を行い、第 I 相臨床研究の開始について、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に定められた特定認定再生医療等委員会等において判断のうえ、開始することを確認できた。本年度中の臨床研究第 I 相試験の開始が可能である。

PiggyBac トランスポゾン法によるキメラ遺伝子導入 T 細胞療法に関する複数の知財について、特許出願を行った。これらは、我が国発の特許技術を用いた CAR-T 細胞療法開発をさらに強化する知財である。

次世代シーケンサーを用いた骨髄微小残存腫瘍検出法の開発：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ケンサーで解析し、 10^{-5} ～ 10^{-6} の微小残存白血病細胞を検出する測定系を確立した。これは CD19-CAR-T 細胞療法の適応及び効果測定に必要なものである。

Clinical studies of CD19.CAR-T therapy have been conducted in Europe and the US in recent years for chemotherapy resistant ALL patients. Chimeric antigen receptor (CAR) against CD19-antigen expressed on the surface of tumor cells is transferred into T cells collected from ALL patients, cultured and transfused. 80-90% of complete remission rate have been reported in these studies (NEJM 2013, NEJM 2014, Lancet 2014).

Concerns of the CAR-T cell preparation methods in clinical studies reported in US and EU are as follows. 1) Potential risk of gene transfer near proto-oncogenes, 2) Requirement of Standard for Biological Ingredients, 3) Risk of contamination with replication-competent viruses, 4) Large and strictly controlled facility. A transposon is a short gene sequences that cause rearrangement of genes that are conserved during evolution. A transposon causes gene rearrangement in a pair of gene enzyme (transposase) and its specific recognition sequence. Dr. Nakazawa reported the CAR-T therapy using piggyBac transposon system (non-virus vector system), when he was in Baylor College of Medicine (Nakazawa et al. Mol Ther, 2011Dec; 19(12):2133-43). Our team improved the serum-free large-scale T cell culture technology of Nagoya University and achieved the highest transduction efficiency in the non-viral system; over 50%. We applied three patents including Achieved the highest transduction efficiency in the non-viral system (over 50%) (PCT/JP2016/079989).

Luciferase gene-transfected CD19 positive leukemia cells were intravenously injected into immunodeficient mice (NSG mice), and CD19CAR-T cells or control T cells were intravenously injected 3 days later. Significant therapeutic effects were observed in mice receiving CD19. CAR-T cells. Single intravenous toxicity study in NOG mice revealed that no death was observed in any of the groups and the effect of administration of the test substance on general condition, body weight, food consumption, hematological examination, blood biochemical examination, urinalysis, autopsy, organ weight and histopathological examination was not observed. From the test results, the nontoxic level of CD19.CAR-T was judged to be 1.0×10^8 cells/kg in both males and females. We prepared for starting the phase 1 clinical trial of CD19.CAR-T therapy for chemotherapy resistant ALL patients using non-virus vector system.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5 件、国際誌 6 件)

1. Sekiya Y, Xu Y, Muramatsu H, Okuno Y, Narita A, Suzuki K, Wang X, Kawashima N, Sakaguchi H, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Kato K, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing-based minimal residual disease in paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2017, 176(2), 248-257.

2. Terakura S, Wake A, Inamoto Y, Murata M, Sakai R, Yamaguchi T, Takahashi S, Uchida N, Onishi Y, Ohashi K, Ozawa Y, Kanamori H, Yamaguchi H, Fukuda T, Ichinohe T, Takanashi M, Atsuta Y, Teshima T. Exploratory research for optimal GvHD prophylaxis after single unit CBT in adults: short-term methotrexate reduced the incidence of severe GvHD more than mycophenolate mofetil. *Bone Marrow Transplant*. 2017, 52(3), 423-430.
3. Kanda J, Morishima Y, Terakura S, Wake A, Uchida N, Takahashi S, Ono Y, Onishi Y, Kanamori H, Aotsuka N, Ozawa Y, Ogawa H, Sakura T, Ohashi K, Ichinohe T, Kato K, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia*. 2017, 31(3), 663-668.
4. 寺倉精太郎 同種移植における CAR-T 細胞療法. *日本造血細胞移植学会雑誌*. 2017, 6(1), 1-7.
5. 中沢洋三, 鈴木 哲, 西尾信博. 養子免疫療法における細胞プロセッシングのレギュレーション. *臨床血液*, 2016, 57, 2373-80.
6. 中沢洋三. 小児血液腫瘍に対するキメラ抗原受容体を用いた遺伝子改変 T 細胞療法の開発. *臨床血液*, 2016, 57, 701-8.
7. 松田和之, 中沢洋三. ゲノム編集技術を用いたキメラ抗原受容体 T 細胞療法. *血液フロンティア*, 2016, 26, 1570-1573.
8. 中沢洋三. CD19 に対するキメラ抗原受容体発現 T 細胞療法の長期予後への効果. 金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸 (編). *EBM 血液疾患の治療 2017-2018*, 530-535, 2016.
9. Nakazawa Y, Suzuki S, Nishio N. Regulation of adoptive immunotherapy. *Rinsho Ketsueki*, 2016, 57, 2373-2380.
10. Sakemura R, Terakura S (corresponding author), Watanabe K, Julamanee J, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Goto T, Hanajiri R, Nishida T, Murata M, Kiyoi H. A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration. *Cancer Immunol Res*. 2016, 4(8), 658-668.
11. Goto T, Nishida T, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Sakemura R, Hanajiri R, Watanabe K, Imahashi N, Terakura S, Murata M, Kiyoi H. Programmed Death-Ligand 1 on Antigen-presenting Cells Facilitates the Induction of Antigen-specific Cytotoxic T Lymphocytes: Application to Adoptive T-Cell Immunotherapy. *J Immunother*. 2016, 39(8), 306-315.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. PiggyBac mediated T cells expressing CD19 chimeric antigen receptor for a “first in human” clinical trial. 口頭, Nishio N, Precision Oncology 2017, 2017/3/2, 国外.
2. PiggyBac mediated T cells expressing CD19 chimeric antigen receptor for a “first in human” clinical trial. 口頭, 西尾信博, 中沢洋三, 濱田太立, 鈴木哲, 田中美幸, 盛田大介, 奥野友介, 川島 希, 成田 敦, 村松秀城, 濱 麻人, Wilson H. Matthew, Cliona M. Rooney, Gianpietro Dotti, 小島勢二, 高橋義行. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 (東京都港区), 2016/12/17, 国内.
3. Improvement of antigen-specific CTL persistence by transduction of novel artificial adopter molecule. ポスター, 宮尾康太郎, 寺倉精太郎, 渡邊慶介, 酒村玲央奈, Jakrawadee Julamane, 奥野真吾, 鴨下園子, 高木えり奈, 小山大輔, 後藤辰徳, 葉名尻良, 西田徹也, 村田 誠, 清井 仁. 58th ASH Annual Meeting and Exposition, 2016/12/4, 国外.
4. Gene modification by adapter molecule improves the expansion of antigen-specific CTL. 口頭, 宮尾康太郎, 寺倉精太郎, 渡邊慶介, 高木えり奈, Jakrawadee Julamane, 小山大輔, 酒村玲央奈, 後藤辰徳, 葉名尻良, 西田徹也, 村田 誠, 清井 仁. 第 78 回日本血液学会学術集会 (横浜市), 2016/10/15, 国内.
5. PiggyBac mediated CD19 chimeric antigen receptor modified T cells for a first in human clinical trial. 口頭, 西尾信博, 中沢洋三, 濱田太立, 鈴木 哲, 田中美幸, 盛田大介, 奥野友介, 川島 希, 成田 敦, 村松秀城, 濱 麻人, Wilson H. Matthew, Cliona M. Rooney, Gianpietro Dotti, 小島勢二, 高橋義行, 第 78 回日本血液学会学術集会 (横浜市), 2016/10/14, 国内.
6. 血液腫瘍に対する CAR-T 療法の現状と今後の展開. 口頭, 中沢洋三, 第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会 (札幌市), 2016/9/3, 国内.
7. 人工アダプター分子の遺伝子導入による抗原特異的 CTL 療法の改良. 口頭, 宮尾康太郎, 寺倉精太郎, 渡邊慶介, 酒村玲央奈, 奥野真吾, 鴨下園子, 高木えり奈, Jakrawadee Julamane, 小山大輔, 後藤辰徳, 葉名尻良, 西田徹也, 村田 誠, 清井 仁. 第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会 (札幌市), 2016/9/3, 国内.
8. A new strategy to control CD19 CAR; regulation under tetracycline-inducible system allows on-demand CD19 CAR expression and disappearance. ポスター, 酒村玲央奈, 寺倉精太郎, Jakrawadee Julamane, 宮尾康太郎, 西田徹也, 村田 誠, 清井 仁. 第 7 回日本血液学会国際シンポジウム (淡路市), 2016/5/13, 国内.

9. Enhancement of CAR expression of piggyBac transposon-engineered T cells by stimulation with viral antigens. 口頭, Morita D, Tanaka M, Nishio N, Kawashima N, Okuno Y, Matthew H. Wilson, Cliona M. Rooney, Takahashi Y, Nakazawa Y. ASGCT 19th Annual meeting, 2016/5/4-7, 国外.
10. Detection of integration sites of CD19 chimeric antigen receptor gene in a non-viral gene transfer system. ポスター, Hamada M, Okuno Y, Nishio N, Matthew H. Wilson, Kojima S, Nakazawa Y, and Takahashi Y. American Society of Gene and Cell Therapy, 2016/5/4, 国外.
11. A new strategy to control CD19 CAR expression; regulation under tetracycline-inducible system allows on-demand CD19 CAR expression and disappearance. 口頭, 酒村玲央奈, 寺倉精太郎, 渡邊慶介, Jakrawadee Julamane, 高木えり奈, 宮尾康太郎, 小山大輔, 後藤辰徳, 葉名尻良, 西田徹也, 村田 誠, 清井 仁. 42nd Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, 2016/4/6, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 2016年5月22日、名古屋大学野依記念学术交流館にて、名古屋小児がん基金記念講演会（一般人向け対象200名）において、非ウイルスベクター遺伝子導入法を用いた CAR-T 細胞療法の開発状況について、研究活動の内容、成果を発信した。

(4) 特許出願

特許出願 1

出願番号・公開番号	特願 2015-099592
発明の名称	キメラ抗原レセプター遺伝子発現システム
出願日（優先日）	2015年5月15日
出願人（特許権者）	国立大学法人名古屋大学
出願国	日本
登録日	
登録番号	

特許出願 2

出願番号・公開番号	JP2015-200458
発明の名称	キメラ抗原受容体を発現する遺伝子改変 T 細胞の調整方法
出願日（優先日）	2015 年 10 月 8 日
出願人（特許権者）	国立大学法人名古屋大学、国立大学法人信州大学
出願国	日本
登録日	
登録番号	

特許出願 3

出願番号・公開番号	JP2015-255539
発明の名称	インターロイキン 6 ノックダウンキメラ抗原受容体ベクターの発明
出願日（優先日）	2015 年 10 月 8 日
出願人（特許権者）	国立大学法人名古屋大学、国立大学法人信州大学
出願国	日本
登録日	
登録番号	

特許出願 4

出願番号・公開番号	2016-122958
発明の名称	
出願日（優先日）	
出願人（特許権者）	
出願国	
登録日	
登録番号	