

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)

研究開発課題名：(日本語) 新規多発性骨髄腫特異的抗原を標的とした CAR-T 細胞療法の開発
(英語) Development of CAR T cell therapy targeting a novel multiple myeloma-specific antigen

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科保健学専攻 寄附講座准教授
保仙 直毅

所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Associate Professor,
Naoki Hosen

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) 多発性骨髄腫に対する新規 CAR-T 細胞療法の最適化および医師主導治験の
準備

開発課題名：(英語) Optimization of the new CAR T cell therapy against multiple myeloma
and preparation for the physician-led clinical trial.

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科教授 熊ノ郷 淳

所属 役職 氏名：(英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor, Atsushi
Kumanogoh

分担研究 (日本語) 多発性骨髄腫に対する新規 CAR-T 細胞療法の最適化、薬事戦略相談および
医師主導治験の準備

開発課題名：(英語) Optimization of the new CAR T cell therapy against multiple myeloma,
regulatory affairs, and preparation for the physician-led clinical
trial.

研究開発分担者 (日本語) 自治医科大学内科学講座血液学部門 教授 神田 善伸 講師 大嶺 謙
所属 役職 氏名: (英語) Department of Hematology, Jichi Medical School, Professor Yoshinobu
Kanda, Assistant Professor Ken Ohmine

分担研究 (日本語) 多発性骨髄腫に対する新規 CAR-T 細胞療法の最適化、薬事戦略相談および
医師主導治験の準備

開発課題名: (英語) Optimization of the new CAR T cell therapy against multiple myeloma,
regulatory affairs, and preparation for the physician-led clinical
trial.

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医科学研究所 教授 小澤 敬也
所属 役職 氏名: (英語) The Institute of Medical Science, Tokyo University, Professor Kei-ya
Ozawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(1) CAR 発現ベクターの最適化

MMG49.CAR が認識するのと同じエピトープを認識する CAR の中に、MMG49.CAR と同様に骨髄腫特異性を持ち、かつより高い抗骨髄腫活性を T 細胞に賦与できるものがある可能性がある。そこで、そのエピトープ部位のみをヒトインテグリンβ7 由来の配列とし、それ以外をマウスインテグリンβ7 由来の配列としたキメラβ7 タンパクを発現させたマウス由来細胞を抗原としてマウスを免疫することにより、同じエピトープ部位に結合するモノクローナル抗体を網羅的に単離することを試みた。3000 クローン以上のハイブリドーマをスクリーニングしたにもかかわらず、そのような抗体を得ることはできなかった。このことは他者が同様のエピトープを認識する抗体を取得することは容易ではないことを示している。次に、MMG49CAR の scFv 部分の VH(重鎖)と VL(軽鎖)の順序を入れかえる、あるいは scFv 部分と CD28 の間に抗体の定常部由来の配列を挿入することによって標的細胞と CAR-T 細胞との距離を変えることにより、抗腫瘍活性の上昇が得られるかを検討した。その結果、最も強い細胞傷害活性を得たので、それを開発に用いることとした。さらに、副作用発現時に細胞を消去するための安全装置として自殺遺伝子 HSV-TK を組み込んだ CAR 発現ベクターを作製し、それが確かに機能することを確認した。

(2) CAR マスターセルバンクの作製

決定した CAR 発現ベクターをパッケージング細胞に導入し、高タイターのレトロウイルスを産生する細胞をクローニングすることにより、CAR 導入用ウイルスベクターを産生する CAR マスターセルバンクの作製を行った。さらに、その品質試験を行い、特に問題は指摘されなかった。以上は、タカラバイオへの外注により行った。

(3) 薬事戦略相談:

本 CAR-T 細胞療法は日本初の first in human の CAR-T 細胞療法となる可能性が考えられ、できるだけ早い時点から PMDA への相談が必要と考えられた。そこで、CD19-CAR-T 細胞療法の経験を蓄積

している東大医科研、自治医科大学のチームとの十分な discussion を行い、使用する CAR の構築が確定した上で、PMDA との事前面談 (H28/9/14) を行い、開発ロードマップの妥当性について相談した。

(英文)

(1) Optimization of the vector for CAR expression

We tried to isolate mAbs recognizing the same epitope as MMG49, but such a mAb were not obtained although we screened more than 3,000 hybridoma clones. This suggests that mAb similar to MMG49 cannot be easily isolated by other researchers. Thus, we decided to use MMG49 for generation of CAR. Next, we examined whether cytotoxic activity of MMG49CAR could be enhanced by changing the order of VH and VL or by inserting spacer sequences between scFV and CD28, and determined the final constructino of the CAR-expression vector. Finally, we put a suicide gene HSV-TK into the vector for safety, and confirmed the suicide system worked well.

(2) Establushment of CAR master cell bank (MCB)

GMP grade CAR master cell bank (MCB) was established by transducing CAR retroviral vector into packaging cells and cloning cells producing high titer of CAR retrovirus. Then, quality control tests of MCB were performed.

(3) 薬事戦略相談 :

Consultation to PMDA about regulatory affairs were done at 9/14/2016. We obtained several useful advises from PMDA.

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 件、国際誌 件)

本課題に直接関連する論文は H28 年度にはなし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Identification of multiple myeloma-specific antigens as immunotherapeutic targets, 口頭, Naoki Hosen, Kana Hasegawa, Yasutaka Aoyama, Ichihara, Atsuko Mugitani, Takafumi Nakao, Yamane, Manabe, Akihiro Tsuboi, Jun Nakata, Sumiyuki Nishida, Yoshihiro Oka, Yusuke Oji, Masayuki Hino, Atsushi Kumanogoh, Haruo Sugiyama, 日本血液学会総会 10/14/16 国内
2. Identification of new multiple myeloma-specific antigens as immunotherapeutic targets. 口頭, Naoki Hosen, Kana Hasegawa, Yasutaka Aoyama, Hiroyoshi Ichihara, Atsuko Mugitani, Takafumi Nakao, Masahiro Manabe, Masayuki Hino, Yusuke Oji, Atsushi Kumanogoh, Haruo Sugiyama, 日本癌学会総会 10/8/16 国内
3. Identification of new multiple myeloma-specific antigens as immunotherapeutic targets. Poster, Naoki Hosen, Kana Hasegawa, Yusuke Oji, Atsushi Kumanogoh, Haruo Sugiyama, 米国血液学会総会 12/4/16 米国

4. Identification of new multiple myeloma-specific antigens as immunotherapeutic targets. Poster, Naoki Hosen, Kana Hasegawa, Yusuke Oji, Atsushi Kumanogoh, Haruo Sugiyama, Keystone Meeting on Cancer Immunology and Immunotherapy, 3/21/16 カナダ

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
H28年度にはなし

(4) 特許出願
PCT/JP2016/72688