

平成 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) 医療分野研究成果展開事業  
(英語) Acceleration of transformative research for medical innovation
- 研究開発課題名 : (日本語) 固形がんに対する次世代型キメラ抗原受容体発現 T細胞療法の  
実臨床スケールでの細胞調製に関する開発研究  
(英語) Development of clinical-grade cell processing technology for  
next-generation CAR-T cell therapy against solid cancers
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科免疫学講座 教授 玉田耕治  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Immunology, Yamaguchi University Graduate School of  
Medicine, Professor, KOJI TAMADA M.D., Ph.D.
- 実施期間 : 平成 28年 10月 14日 ~ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 実臨床スケールでの CAR-T 細胞培養法の確立、  
および CAR 遺伝子導入効率 50%以上の大量培養システムの確立  
開発課題名 : (英語) Development of clinical-grade, large-scale cell culture methods of  
CAR-T cells with high levels of gene-transduction efficacy
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科免疫学講座 講師 佐古田幸美  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Immunology, Yamaguchi University Graduate School of  
Medicine, Associate Professor, YUKIMI SAKODA M.D., Ph.D.

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

本研究事業は研究開発代表者である山口大学、玉田らが開発した新規 CAR-T 細胞療法を臨床応用することを目指し、そのために必要となる実臨床スケールでの CAR-T 細胞培養技術の開発および確立を到達目標としている。近年、がん細胞を認識する CAR（キメラ抗原受容体：Chimeric Antigen Receptor）を遺伝子導入した T 細胞は革新的ながん免疫療法となることが期待されており、世界中で開発競争が進んでいる。玉田らは CAR に加えて、サイトカインであるインターロイキン 7 (IL-7) とケモカインである CCL19 を同時に遺伝子導入して誘導される IL-7/CCL19 産生型 CAR-T 細胞（以下、7x19 CAR-T 細胞）を開発し、それらが固形がんに対して従来の CAR-T 細胞よりも大幅に強力な治療効果を示すことを見出した（特許出願済）。本事業は 7x19 CAR-T 細胞の実用化のために必要不可欠となる大量培養システムの開発、さらにはその効率化と自動化を目指す。具体的には、①実臨床スケールでの CAR-T 細胞培養技術の確立（ $>3 \times 10^8$  レベルの培養）、②CAR 遺伝子導入効率 50%以上の大量培養システムの確立、③細胞培養の自動化システムの基盤確立を目標としている。

これらの目標を達成するため、平成 28 年度は Miltenyi 社の細胞用自動培養装置である CliniMACS Prodigy を用いて培養法の技術開発に取り組んだ。CAR-T 細胞の誘導は、T 細胞活性化のための初期刺激、遺伝子導入のための培養、遺伝子導入後の拡大培養の 3 ステップからなっており、それぞれにおいて刺激方法や培養方法、培養期間などの条件の最適化を行った。また、ウイルスベクターの遺伝子導入方法について、組み換えフィブロネクチンを利用する従来法とプレコーディングを必要としない両親媒性ペプチドを利用する方法を比較検討した。条件の異なる 5 回の実験の結果、 $5.4-9.9 \times 10^7$  細胞の末梢血単核球から培養を開始し、最終の全細胞収量が  $1.6-9.3 \times 10^8$  細胞、CAR 遺伝子導入効率が 30-65%、CAR-T 細胞数としての最終収量が  $1.0-4.9 \times 10^8$  細胞というデータが得られた。最も優れた条件下では、CAR-T 細胞収量  $4.9 \times 10^8$ 、遺伝子導入効率 53%という結果が得られ、当初の目標を達成する成果が得られた。しかしながら、1) 異なるドナーの細胞においてもコンスタントにこのような細胞調製が可能か、2) 遺伝子導入操作を完全閉鎖系で実施できるか、3) 得られた CAR-T 細胞の機能は保たれているか、という点については今後の検討が必要と思われた。特に CAR-T 細胞の機能については、自動培養装置にて誘導した CAR-T 細胞は、研究室にて小スケールで誘導した CAR-T 細胞に比べて腫瘍に対する傷害活性が低い傾向が認められており、培養条件のさらなる改良が必要であることが示唆された。平成 29 年度以降、これらの課題に取り組む予定である。

### 英文

The goal of this project is to establish clinical-grade cell processing methods of novel CAR-T cells developed by Dr. Tamada at Yamaguchi University, a principal investigator of this study, and to facilitate clinical application. Recently, T cells expressing CAR (Chimeric Antigen Receptor) against tumor cells have been actively developed in the world, because of its potential as cutting-edge cancer immunotherapy. We have discovered that CAR-T cells expressing interleukin-7 (IL-7) and CCL19, immune-regulatory cytokine and chemokine, simultaneously (referred to as 7x19 CAR-T cells hereafter) induce potent therapeutic effects against solid tumors (the patent of this finding was already applied). In this project, large-scale cell culture methods required for clinical-grade production of 7x19 CAR-T cells will be explored, and then applied for automated cell

processing system. Specifically, we aim at following goals: 1) large-scale cell culture methods of CAR-T cells (final production level  $>3 \times 10^8$  cells), 2) transduction efficacy of CAR over 50%, 3) development of appropriate procedures using automated cell culture device.

To achieve these goals, we optimized cell culture conditions using CliniMACS Prodigy, an automated cell culture device manufactured by Miltenyi. Cell culture process to generate CAR-T cells consists of 3 steps, i.e. initial stimulation of T cells for their activation, culture for gene transduction, and expansion of gene-transduced T cells. Therefore, we optimized these steps individually by modifying the stimulation methods, culture conditions, and culture period. In addition, methods of gene transduction were compared between those using recombinant fibronectin with pre-coating and amphiphilic peptides without pre-coating. As a result of 5 experiments with various conditions,  $1.6-9.3 \times 10^8$  total culture cells, 30-65% transduction efficacy of CAR gene, and  $1.0-4.9 \times 10^8$  CAR-T cells were obtained as a final product when initially starting with  $5.4-9.9 \times 10^7$  PBMC. Under the best condition, we obtained  $4.9 \times 10^8$  CAR-T cells with 53% gene-transduction efficacy, thus fulfilling our goals at least in part. However, following points remain to be clarified; 1) whether similar efficacy of large-scale cell culture and gene transduction can be achieved in various donor PBMC, 2) whether procedures of gene transduction can be executed under completely closed GMP culture condition, 3) whether immunological functions of CAR-T cells induced by large-scale culture are intact and equivalent to those induced by the regular culture method. In particular, CAR-T cells induced by large-scale, automated culture method showed a tendency of impaired tumor killing activity compared to those induced by small-scale, non-automated methods. These results thus suggest a necessity of further modification and improvement of culture conditions. In the next year, we will perform further experiments to address these issues.

### 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 2件、国際誌 0件）

1. 奥山奈美子、玉田耕治、田村秀人、臨床血液、Recent advances and future challenges in cancer immunotherapy、2016年11月、Vol. 57 No. 11、2388-2395
2. 佐古田幸美、玉田耕治、キメラ発現受容体発現 T 細胞(CAR-T)療法、日本臨床、Vol75.No2、2017-2

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. がん免疫療法：古くて新しいがん 治療法に関する最新トピック、口頭、玉田耕治、第 17 回癌治療における椎茸菌糸体抽出物の有用性研究会（大阪市）、2016年10月15日、国内。
2. Augmentation of CAR-T cell Efficacy in Cancer Immunotherapy、口頭、玉田耕治、JSCO 54th Annual Meeting・International Session 10（横浜市）、October 20, 2016、国内。
3. がん免疫療法の現状と課題、将来展望、口頭、玉田耕治、福岡血液疾患フォーラム（福岡市）、2016年10月22日、国内。
4. A New Era of Cancer Treatment: Immune Checkpoint Blockade and Gene-Modified T Cell Therapy、口頭、玉田耕治、40th World Congress of the International・College of Surgeons（京

都市) , October 24, 2016, 国内.

5. 新しいがん治療法の潮流：免疫療法の将来展望, 口頭, 玉田耕治, 第 4 回 Osaka Lung Cancer Cutting Edge (大阪市) , 2016 年 10 月 27 日, 国内.
6. がん免疫療法の潮流と展望, 口頭, 玉田耕治, 第 24 回日本消化器関連学会週間 JDDW2016・ランチョンセミナー (神戸市) , 2016 年 11 月 4 日, 国内.
7. がん免疫療法の進歩 泌尿器がんにもパラダイムシフトの波が迫る, 口頭, 玉田耕治, 第 68 回西日本泌尿器科学会総会 (下関市) , 教育講演, 2016 年 11 月 25 日, 国内.
8. 次世代型 CAR-T 細胞技術の開発：固形がんに対する治療効果を目指して, 口頭, 玉田耕治, 第 35 回細胞治療研究会 (久手市) , 2016 年 11 月 29 日, 国内.
9. がん治療新時代：免疫チェックポイント阻害薬と次世代免疫療法の展望, 口頭, 玉田耕治, 日本赤十字社和歌山医療センター がん免疫療法セミナー (和歌山市) , 2016 年 12 月 8 日, 国内.
10. 免疫チェックポイント阻害療法と最新のがん免疫細胞療法, 口頭, 玉田耕治, 第 32 回前立腺シンポジウム 教育セミナー 1 (東京) , 2016 年 12 月 10 日, 国内.
11. CAR-T 細胞を利用した革新的がん免疫療法の進展, 口頭, 玉田耕治, 第 58 回日本小児血液・がん学会 特別講演 (東京) , 2016 年 12 月 15 日, 国内.
12. がん免疫療法最前線チェックポイント阻害剤から最新情報まで, 口頭, 玉田耕治, 第 57 回日本肺癌学会 ランチョンセミナー (福岡市) , 2016 年 12 月 21 日, 国内.
13. がん治療新時代：免疫チェックポイント阻害薬と次世代免疫療法の展望, 口頭, 玉田耕治, 第 36 回近畿がん治療合同カンファレンス (大阪市) , 2017 年 1 月 20 日, 国内.
14. Novel strategy of CAR-T cells aiming at treatment of solid tumors, 口頭, 玉田耕治, 31st Transfusion Medicine Conference (神奈川県) , 2017 年 1 月 27 日, 国内.
15. がん免疫療法新時代：免疫チェックポイント阻害剤と遺伝子改変 T 細胞療法, 口頭, 玉田耕治, 第 27 回神戸臨床腫瘍研究会 (神戸市) , 2017 年 2 月 4 日, 国内.
16. がん免疫療法の潮流：免疫チェックポイント阻害剤と遺伝子改変細胞療法, 口頭, 玉田耕治, 第 45 回本郷呼吸器研究会 (東京) , 2017 年 2 月 21 日, 国内.
17. 次世代型 CAR-T 細胞の開発とがん免疫療法への応用, 口頭, 玉田耕治, 第 16 回日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー (仙台市) , 2017 年 3 月 8 日, 国内.
18. がん免疫療法の発展における基礎研究の役割, 口頭, 玉田耕治, 第 89 回日本胃癌学会 シンポジウム (広島市) , 2017 年 3 月 9 日, 国内.
19. 固形がんに対する次世代 CAR-T 遺伝子治療の研究開発, 口頭, 玉田耕治, 第 3 回 IMSUT-CGCT シンポジウム (東京) , 2017 年 3 月 13 日, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 複合的がん免疫療法推進のためにーいま世界で, 日本でー, 口頭, 玉田耕治, シンポジウム がん免疫療法 2017 年ー複合化と個別化の科学基盤とレギュレーションー (東京) , 2017 年 2 月 23 日, 国内.

### (4) 特許出願

なし