

遺伝子導入T細胞治療はどこまで進んだのか

—がん治療における成果と将来性



垣見 和宏 氏 (東京大学大学院医学系研究科免疫細胞治療学 (メディネット) 講座特任准教授)

Carl H. June 氏 (Professor of Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine)

国際細胞治療学会 (ISCT) の初のアジア太平洋地域会議が宮崎で開催され、3日間で多数のセミナーや演題が発表された。本学会中、ランチョンセミナー (本誌34~35ページ参照) の座長を務めた垣見和宏氏 [東京大学大学院医学系研究科免疫細胞治療学 (メディネット) 講座特任准教授] と演者である Carl H. June 氏 (ペンシルバニア大学教授) の対談が実施され、遺伝子導入T細胞治療になぜ大きな期待が寄せられているのか、その応用範囲はどこまで広がるのか、その効果判定基準は細胞傷害性抗がん剤とは異なるのかなど、免疫細胞治療においてキーとなる話題が論じられた。

がんの免疫細胞治療では腫瘍細胞に対する特異性を高める必要がある

垣見: がんに対する免疫療法で、近年のトピックスといえば、子宮頸がんを予防するワクチンの臨床導入が挙げられます。このワクチンは、パピローマウイルスの感染予防が目的となっていますね。

June: そうですね。同じようにワクチンが有効となる可能性があるのは、C型肝炎ウイルス (HCV) やB型肝炎ウイルス (HBV) などによる肝細胞がんがあります。抗原が既知であるウイルス感染に伴う発がんに対しては、予防ワクチンの開発が期待されます。しかし、ウイルス感染によって生じるがんは全体の約10%であり、残りの約90%は細胞内の遺伝子の変異の蓄積によって生じます。ウイルスの持続感染に対する治療ワクチン開発が容易ではないことと同様に、生体内に持続的に存在する腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導することは容易ではありません。したがって、これらのがんでは遺伝子導入T細胞を用いた免疫細胞治療の方が将来性は高いと考えています。

垣見: これまでも腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞 (CTL) の開発が数多く行われてきましたが、残念ながら腫瘍細胞に対する特異性が低く、抗腫瘍効果が十分に得られないことが問題でした。

June: 腫瘍細胞は異物ではなく、もともと自己の細胞ですからね。細菌やウイルスなどの異物が侵入して生じる感染症とは免疫応答は異なります。そこで我々は、腫瘍細胞との結合親和性を高めるために、受容体遺伝子を導入したT細胞を用いる治療法の開発を進めてきました。



CAR遺伝子導入T細胞はMHC非拘束性で、抗体治療より強力な抗腫瘍活性が期待できる

垣見: 腫瘍特異的なT細胞受容体 (TCR) 遺伝子導入治療ではなく、キメラ型抗原受容体 (CAR) 遺伝子をT細胞に導入する治療を選択された理由についてご説明ください。

June: ある患者のTCRは、その患者でしか機能しませんが、CARは誰に対しても有効です。

垣見: CARは主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の制約を受けないわけですね。

June: その通りです。通常、TCRはMHC拘束性となるため、同じMHCを持つ患者以外では効果が期待できませんが、CAR遺伝子なら、標的抗原が発現している患者であれば、MHCにかかわらず、どの患者に対しても治療が可能です。

垣見: 同じように患者を選ばない手法として、モノクローナル抗体治療もそうですが、CARを作成しなくても、モノクローナル抗体そのもので治療は可能だとする意見もあります。CARと抗体治療の違いは何かでしょうか。

June: モノクローナル抗体は、現時点では定期的な継続投与が必要であり、完治が期待できず、治療費も高額です。一方、CARを導入したT細胞は、長期間生存して作用します。また、患者個別の免疫系に沿ってカスタマイズすることも可能であり、さまざまな免疫担当細胞に腫瘍特異的なCARを導入することで、抗腫瘍効果を高め、治癒も期待できると思います。

垣見: ある種の抗体治療のメカニズムは、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 作用と考えられますが、CAR導入T細胞の抗腫瘍作用はどのようなものですか。

June: 同様の特質が認められます。抗体治療ではNK細胞によるADCC活性が主ですが、CAR遺伝子をキラーT細胞とよばれるCD8陽性T細胞に導入することで、サイトカイン産性や強い細胞傷害活性による抗腫瘍効果の増強が期待できると考えています。

垣見: 遺伝子導入T細胞が正常細胞を攻撃する可能性はどうか。

June: はい、自己免疫疾患の原因とも考えられています。したがって、CAR導入T細胞もちろん、適切に制御しなければなりません。何を標的にするかが非常に重要になります。

遺伝子導入の方法—ウイルスベクターとエレクトロポレーション法

垣見: T細胞へ遺伝子を導入する手法について、お話しください。

June: T細胞への遺伝子導入は比較的容易で、これまでにいくつかの方法が確立しています。ウイルスベクターでT細胞に遺伝子を導入すると、そのT細胞は導入された遺伝子産物 (蛋白質) を永続的に発現します。

垣見: ランチョンセミナー (本誌34~35ページ参照) でも報告がありましたが、末梢血中で長期間にわたり遺伝子導入T細胞の存続が確認されましたね。

June: 非常に興味深い結果でした。白血球は免疫記憶を非常に長期間保持する性質を持ち、たとえば小児期に水痘ウイルスに感染した記憶は50年後まで持続するといわれています。我々が行った検討で、遺伝子導入T細胞が10年以上も生存していたことには驚きました。いままで30例以上にT細胞治療を行いました。T細胞が消失したのはわずか2例です。遺伝子導入T細胞は非常に強力であり、スポーツに例えればステロイドで増強した選手のようなのです。

垣見: まるで幹細胞ですね。

June: そのとおりです。T細胞は高い自己再生能を持つだけでなく、ある状態では次々と腫瘍細胞を傷害する性質を持っており、我々はserial killerと呼んでいます。こうした特質が、CAR導入T細胞による抗腫瘍効果に大きく寄与していると考えられます。我々の検討では、 10^8 個のT細胞で 10^{12} 個の腫瘍細胞を傷害することが確認できました。

垣見: エレクトロポレーション (EP) 法はどうか。

June: EP法によるメッセンジャーRNA (m

RNA)の導入では、T細胞に目的の受容体を一定期間のみ発現させることができます。したがって、EP法では治療開始後に副作用が発現した場合、そこでT細胞の投与を中止すれば導入された受容体の発現は1週間程度で消失します。この方法を使えば、未知の副作用の有無を確認することができます。

垣見:では、EP法で安全性が確認されたら、レトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いて、T細胞に永続的に遺伝子導入するというわけですね。

June:その方向で考えています。また、腫瘍が肝臓などの特定の臓器に局限している場合はCAR mRNA導入T細胞を直接腫瘍内に繰り返し注入する方法を取り、リンパ腫や白血病のように全身性で腫瘍細胞が大量に存在する場合にはウイルスベクターで遺伝子導入したT細胞を用いるということも考えられます。

免疫療法直後に起こる腫瘍の増大が効果判定を難しいものに

垣見:先生はすでにCAR遺伝子導入T細胞治療の臨床試験を開始されていますが、近年のがん免疫療法では、臨床試験における効果判定が課題となっていますね。

June:はい。殺細胞性を有する抗がん剤の抗腫瘍効果は、腫瘍が縮小したかどうかで判定されますが、これをがんワクチン療法にそのまま適用するのは難しいのではないかという意見が多く出されています。というのも、抗がん剤と違って、例えば前立腺がんワクチンの臨床試験でも報告されていましたが、がん免疫療法では、治療直後は、腫瘍はむしろ肥大する傾向があるからです。

垣見:T細胞が腫瘍に浸潤して、炎症を引き起こしたためですね(図2)。

June:その通りです。ですから、がんワクチン療法後では一度腫瘍は肥大し、その後しばらく経ってから縮小することになります。したがって、がんワクチン療法の有効性は腫瘍の縮小率ではなく、全生存期間や無増悪生存期間で評価すべきでしょう。

垣見:がんの免疫療法では、腫瘍の縮小は必ずしも生存期間延長とは関連しないというわけですね。

June:腫瘍縮小を評価基準にすると、がんワクチン療法の有効性は適切に評価できません。そのため米国食品医薬品局(FDA)では、がんワクチン療法では腫瘍が肥大しても治療を継続することを認めました。そこで、我々にとっての大きな懸案事項は、遺伝子導入T細胞治療でもワクチン療法と同様の評価基準があてはまるのかどうかです。

垣見:すでに検討を始められているのではありませんか。

June:はい。血液腫瘍で検討中です。遺伝子導入T細胞治療後にリンパ節の腫脹が生じるのか、初期の腫脹を伴わずに腫瘍細胞数の減少が起こるかどうかが検討しています。

垣見:血液腫瘍であれば末梢血中の腫瘍量を直接的に評価することもできますね。

June:その通りです。固形がんではCT所見からでも腫瘍量を正確に評価するのは容易ではありません。

垣見:どのような結果となるか、報告を楽しみにしています。

免疫細胞治療の応用範囲は広がりがつある

垣見:遺伝子導入を行う細胞については、いかがですか。T細胞だけではなく、NK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などのほかの細胞も可能でしょうか。

June:リンパ球は、想像以上に多くの種類や機能があります。例えば、リンパ球はある特定の組織への移行機能(トラフィック)や誘導(ホーミング)機能を持つことが知られています。したがって、腸に移行するようにプログラムされたリンパ球であれば大腸がんの治療に、皮膚に移行するようにプログラムされていれば皮膚がんにも有効ではないかと考えています。

垣見:先生は、自己免疫疾患の治療にも遺伝子導入T細胞を用いられていますね。

June:はい。新たにチャレンジしている領域



です。自己免疫疾患患者の多くは制御性T細胞(Treg)が欠損していますし、自己免疫疾患であるIPEXでは、Tregの欠損により免疫寛容が成立せず、早期に死亡します。そこで、Tregを用いた免疫細胞治療が可能かどうかを検討しています。この技術は、骨髄移植後の移植片対宿主病(GVHD)抑制にも応用できると考えています。実際に我々は、骨髄移植後にTregを移植し、GVHDが抑制できるかどうかを検討する臨床試験を実施しました。その結果は、もうすぐ論文として掲載される予定です。

垣見:免疫細胞治療の応用範囲は、がんだけでなくかなり広いものになりそうですね。

June:その通りです。リンパ球とベクター、標的分子を組み合わせることで、遺伝子導入T細胞治療の可能性は大きく広がっていくと思います。

垣見:遺伝子導入T細胞治療の将来展望については、どのようにお考えですか。

June:いまや免疫療法は、外科、化学療法、放射線療法ととものがん治療の4つめの柱になったと考えています。FDAに承認された前立腺がんワクチンはT細胞の活性化を介して作用しますし、転移性メラノーマの治療として承認間近の抗CTLA-4抗体の効果も間接的にT細胞の機能を高めるものです。そのため、腫瘍細胞に対して特異的に作用するT細胞の重要性はますます高まると考えています。

垣見:遺伝子導入T細胞治療は、多くの可能性を秘めているということですね。本日は、遺伝子導入T細胞治療の最新の知見と将来展望について、先生の御研究に基づく興味深いお話をありがとうございました。

図1 遺伝子導入T細胞を用いた主な研究(ペンシルバニア大学)

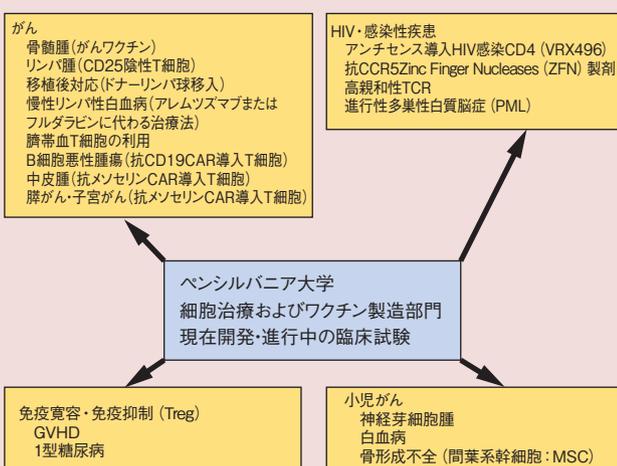
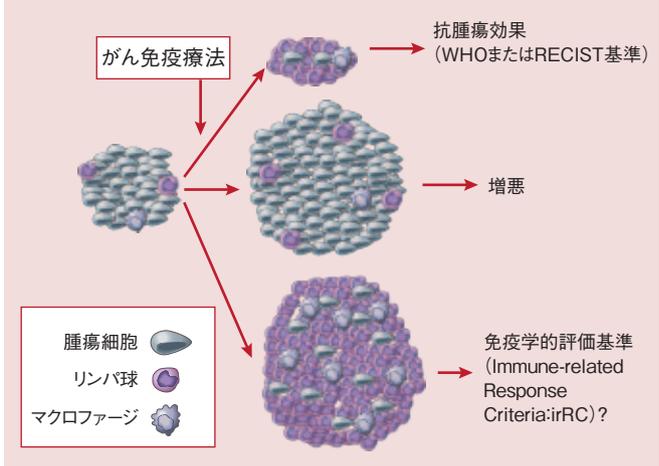


図2 免疫療法と腫瘍径の変化





がんに対する遺伝子導入T細胞治療

—これまでの知見と今後の可能性



Carl H. June, M.D.
Professor of Medicine,
University of Pennsylvania
School of Medicine

10月17日～20日、宮崎市のフェニックスシーガイアリゾートで開催された第1回国際細胞治療学会アジア太平洋地域会議では、米国における免疫細胞治療の第一人者であるCarl H. June氏（ペンシルバニア大学教授）がランチョンセミナー〔座長：垣見和宏氏（東京大学大学院医学系研究科免疫細胞治療学（メディネット）講座特任准教授）〕における講演と、垣見氏との対談（本誌36～37ページ参照）を行った。

遺伝子導入T細胞治療は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症やがんなどの領域で臨床導入が検討されている。ランチョンセミナーの講演“Adoptive T cell transfer therapy for HIV and Cancer”でJune氏は、キメラ型抗原受容体（chimeric antigen receptor: CAR）の遺伝子を導入したT細胞を用い、HIVによる後天性免疫不全症候群と、中皮腫、白血病、リンパ腫などのがんに対する免疫細胞治療の最新研究の成果を紹介した。

遺伝子導入によりMHC非拘束性のT細胞を作成

T細胞の表面には、腫瘍細胞上の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子と腫瘍抗原由来のペプチド複合体を認識するT細胞受容体（TCR）が発現している。しかし、腫瘍細胞ではMHCクラスI分子の発現が消失・低下することが確認されており、通常のTCRを持った細胞傷害性T細胞（CTL）では認識できない細胞が出現する。そこでMHCクラスI分子の有無にかかわらず腫瘍細胞の認識を可能にするために、我々は腫瘍細胞の表面に存在する抗原に直接結合することが可能な抗体由来のリガンド結合領域と、TCR中の細胞内シグナル伝達を担うシグナル伝達領域を融合させたキメラ型抗原受容体（chimeric antigen receptor: CAR）を作成した（図1）。CARを遺伝子導入されたT細胞は、MHC非拘束性に腫瘍抗原を認識することが可能である。さらに、ヒトT細胞の刺激活性化に関する我々の長年の基礎研究から得られた知見をもとに、CARのシグナル伝達領域にT細胞の活性化と分化に関わる重要な副刺激分子CD28（第2世代）や4-1BB（第3世代）由来のドメインを追加した（図2）。第3世代のCARによる抗原認識は、T細胞の増殖と生存に関わり、抗腫瘍エフェクター機能の獲得に効率よく結びつくことを証明した（図3）。

HIV感染例で実施された臨床試験では、長期間にわたりCAR遺伝子導入T細胞を確認

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染例に対する標準治療は、複数の抗ウイルス薬を併用するHighly Active Anti-Retroviral Therapy

（HAART）療法であるが、完治は難しく、新しい治療法として免疫細胞治療が注目されている。レトロウイルスを用いた遺伝子導入は、最初に重症複合免疫不全症（SCID）の一つである先天性アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症に対して実施されたが、我々は、同様にレトロウイルスを用いてCAR遺伝子を導入したT細胞による初の臨床試験をHIV感染患者に対して実施した¹⁾。HIV表面蛋白質gp120に結合するCD4と、TCRの ζ 鎖から作成したCD4 ζ CARを作成し、レトロウイルスベクターを用いてT細胞に遺伝子導入した。HIV感染患者の血中に存在するgp120が、遺伝子導入されたCD4⁺T細胞のCD4 ζ CARに結合すると、あたかもTCR ζ シグナルがONになったとみなされ、T細胞は活性化され増殖し、生体内でCD4⁺T細胞が維持される。このCAR遺伝子導入T細胞の投与を

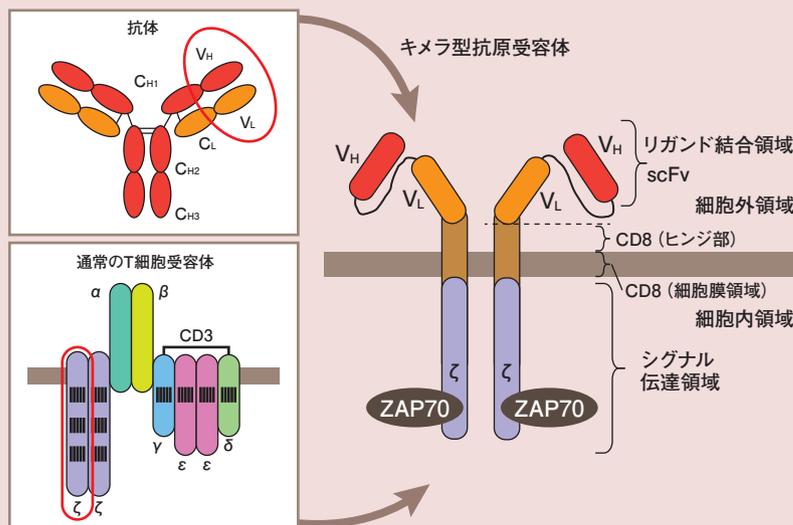
実施した臨床研究から我々が学んだことは、現在までの10年間の観察で、CAR遺伝子導入T細胞の白血病化といった有害事象を認めなかったことである。また、末梢血単核球（PBMC）中には、0.1%超のCAR発現T細胞数を認めたことから²⁾、CAR遺伝子を発現するT細胞が長期間にわたって生体内で維持されていたことが確認された。

ウイルスベクターとエレクトロポレーション法

—遺伝子導入の手法により遺伝子発現期間も相違

がんに対する免疫細胞治療として、我々は中皮腫に対するCAR遺伝子導入T細胞治療の可能性について検討した。中皮腫はメソセリンを高発現していることに着目し、抗メソセリン抗体由来のリガンド結合領域を用い

図1 通常のT細胞受容体とキメラ型抗原受容体（CAR）



||||| : 免疫受容体チロシン活性化体モチーフ (ITAM)

たCARを作成し、コードする遺伝子をレンチウイルスベクターを用いてヒトT細胞に導入した。NOGマウスの皮下に中皮腫細胞を移植して担がんマウスを作成し、抗メソセリンCAR遺伝子導入T細胞を投与して、その抗腫瘍効果を動物モデルで検討した。その結果、CARの細胞内シグナル伝達領域がCD3ζのみの場合、一時的に腫瘍の進行は遅延したが、最終的に増悪した。一方、CD28およびCD137 (4-1BB) 分子由来のシグナル伝達領域を付加した第3世代のCAR遺伝子導入T細胞の投与を受けたマウスでは、非常に強い抗腫瘍効果が認められた³⁾。

メソセリンは中皮腫、卵巣がん、膵がんなどの癌細胞に発現しており、免疫細胞治療の標的分子として期待されているが、同時に、胸膜や心膜、腹膜などの正常組織にも発現が確認されており、完全に腫瘍特異的ではないことから、投与したT細胞による正常組織の傷害の可能性が否定できず、臨床応用するためには慎重な対応が必要と考えられた。そこで、ヒトへの臨床応用に当たり、導入遺伝子の発現を恒常的に可能にするウイルスベクターを用いるよりも、一過性の遺伝子発現しか得られないメッセンジャーRNA (mRNA) のエレクトロポレーション (EP) 法をあえて選択し、抗メソセリンCARのmRNAをT細胞に導入した。抗メソセリンCAR mRNA導入ヒトT細胞を用いた免疫細胞治療を再度担がんマウスモデルで検討したところ、T細胞上のCARの発現は一過性に強い発現を認めたが、1週間程度で減弱した。中皮腫細胞移植マウスに

CAR mRNA導入T細胞を14回投与したところ、ウイルスベクターによるCAR遺伝子導入T細胞治療に比べるとやや弱いものの、抗腫瘍効果も確認された (図3)⁴⁾。これらの結果から、EP法によるCAR mRNA導入T細胞治療では導入遺伝子の発現期間は限られているが、繰り返し投与することで腫瘍の進行を遅らせて生存期間の延長に寄与することが認められた。ヒトの臨床試験では、まず発現期間が限られるCAR mRNA導入T細胞を用いて安全性を確認した後、レンチウイルスベクターを用いたCAR遺伝子導入T細胞を用いてより強い抗腫瘍効果を目指す戦略が合理的であると考えられる (本誌36~37ページ参照)。

血液腫瘍では抗CD19 CAR導入T細胞治療による臨床試験を開始

CD19は幹細胞には発現していないため、免疫細胞治療の標的として安全性が高い。そこで、治療不能のB細胞白血病・リンパ腫に対し、抗CD19 CAR遺伝子導入T細胞治療の検討も行われている。前臨床試験として前B細胞性急性リンパ性白血病細胞株を移植したNOGマウスを用いた実験において、CARの細胞内領域の種類の違いが抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討したところ、中皮腫での検討と同様に、副刺激因子である

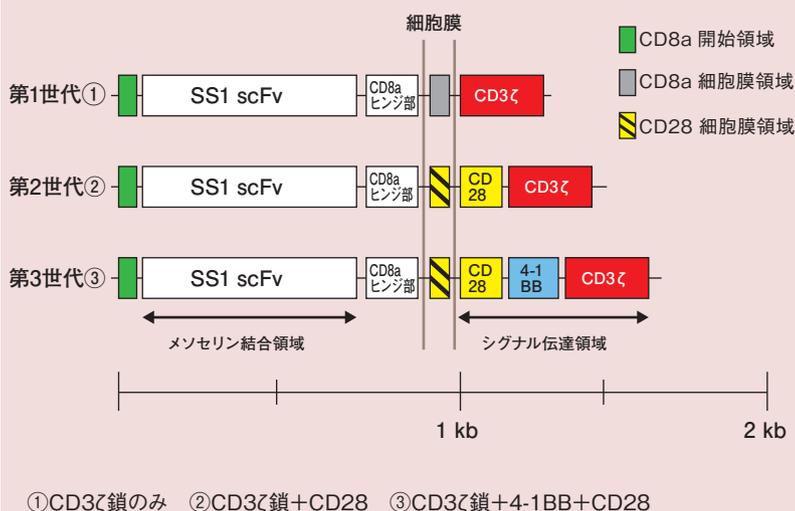
CD28と4-1BBが追加されている第三世代のCARの抗腫瘍効果が最も優れていた^{3,5)}。また、レンチウイルスベクターを用いた第3世代のCAR導入T細胞治療は、3件の前臨床試験において、同種T細胞移植よりも有効性が高いことが明らかにされている。

そこで現在、治療抵抗性のCD19陽性B細胞白血病あるいはリンパ腫患者を対象に、抗CD19 CAR導入T細胞治療が同種骨髄移植の代替療法となるかどうかを検討する臨床試験 (CART-19 Trial) を実施中である⁶⁾。講演時点までに、化学療法に抵抗性の慢性リンパ性白血病 (CLL) 患者3例が登録され、投与を受けた3例中2例の患者において、体内でのCAR遺伝子導入T細胞の増幅を確認した。CR 2例、PR 1例の非常に有望な成績を得ている。今後、症例数を増やすとともに、その作用機序についても検討する予定である。

T細胞に遺伝子を導入し、改変する試みは、1996年から開始した。遺伝子治療を実施した場合、その後15年間の観察がアメリカ食品医薬品局 (FDA) から義務付けられており、HIV感染に対する治療例は現在でも観察中であるが、この検討で長期の安全性が確認された点は非常に意義深い。今後も手法に工夫を重ね、より安全で効果的な治療法として確立するよう開発を続けていきたいと考えている。

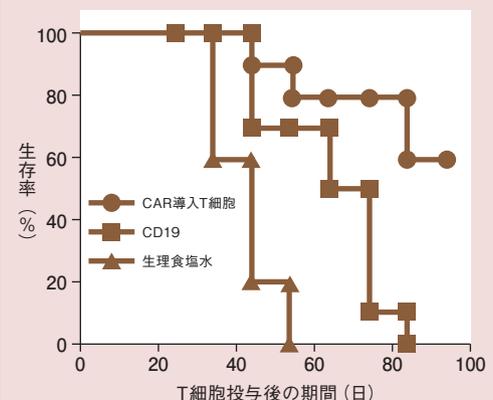
- 1) Mitsuyasu RT, et al. Blood 2000; 96: 785-93
- 2) Deeks SG, et al. Mol Ther 2002; 5: 788-97
- 3) Carpenito C, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 3360-5
- 4) Zhao Y, et al. Cancer Res 2010; 70: 9053-61
- 5) Milone MC, et al. Mol Ther 2009; 17: 1453-64
- 6) NCT01029366

図2 細胞内領域 (世代) 別CAR



Carpenito C, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 3360-5より改変

図3 中皮腫に対するEP法によるCAR導入T細胞の抗腫瘍効果 (マウス)



Zhao Y, et al. Cancer Res 2010; 70: 9053-61