

目次	頁
1. はじめに	1
1.1. 養子免疫療法によるがん治療	1
1.2. B細胞腫瘍と第二世代 CD19-CAR	5
1.3. IL-21	8
1.4. CD19-CAR と IL-21 併用の意義	12
2. 目的	13
3. 方法	14
3.1. プラスミド	14
3.2. 細胞株	16
3.3. リン酸カルシウム法による 293 細胞への遺伝子導入	16
3.4. レトロネクチンを用いた浮遊系細胞への遺伝子導入	17
3.5. レトロウイルス上清の作成	17
3.6. ヒト末梢血単核球細胞の分離・培養と遺伝子導入	18
3.7. フローサイトメトリーによる T 細胞サブセット解析	19
3.8. 細胞内フローサイトメトリーによるリン酸化 STAT3 の解析	20
3.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	21
3.10. ウェスタンブロッティング	22
3.11. 細胞傷害性試験	23
3.12. ヒト B 細胞腫瘍患者臨床検体を用いた実験	24
3.13. マウス異種移植モデルによる動物実験	24
4. 結果	26
4.1. CD19-CAR 及び CD19-CAR-IL21 搭載 レトロウイルスベクターの作製	26
4.2. 293 細胞における導入遺伝子発現と IL-21 の機能	27
4.3. ヒト PBMC における導入遺伝子発現と機能解析	30
4.4. フローサイトメトリーによる 遺伝子導入ヒト T 細胞のサブセット解析	33
4.5. 遺伝子導入ヒト T 細胞の CD19 陽性細胞に対する細胞傷害活性	35
4.6. 遺伝子導入ヒト T 細胞の B 細胞腫瘍患者検体における細胞傷害活性	37
4.7. ヒト B 細胞リンパ腫マウス異種移植モデルにおける 遺伝子導入ヒト T 細胞の抗腫瘍効果	39
5. 考察	41
6. 結語	47
7. 参考文献	48
8. 謝辞	61

## 1. はじめに

### 1.1. 養子免疫療法によるがん治療

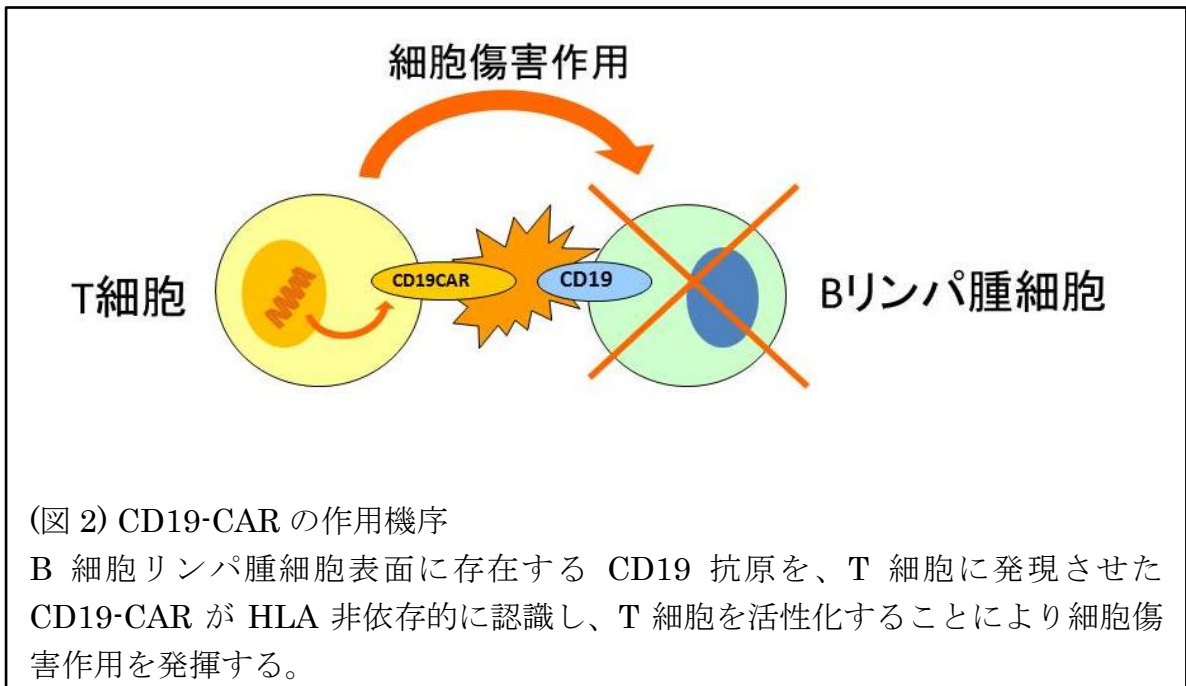
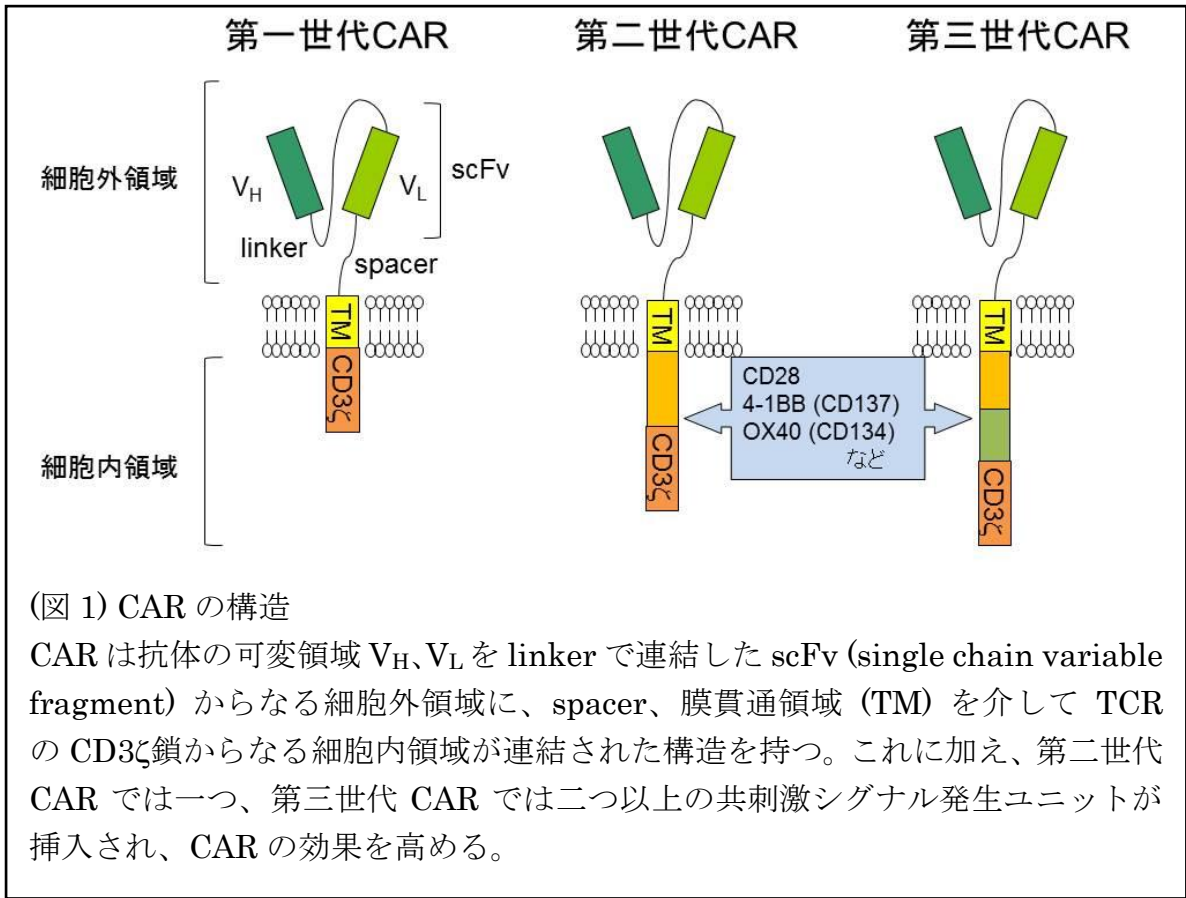
養子免疫療法とは、がん患者より免疫細胞を分離し、抗腫瘍活性を高めるためにサイトカイン、腫瘍抗原による刺激、遺伝子導入などの操作を加え拡大培養した後に患者体内に戻す治療であり、サイトカイン療法やワクチン療法と並んで腫瘍免疫療法の代表的な戦略の一つである。

初期の養子免疫療法としては、ヒトリンパ球を IL-2 等で刺激し培養した Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞による治療などが報告されているが、腫瘍特異的な免疫反応によるものではなく、その効果も限定的であった<sup>1</sup>。より特異性の高い方法として Rosenberg らは 1986 年にマウスの悪性黒色腫より腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor-infiltrating lymphocytes: TIL) を分離し、IL-2 で培養後輸注することにより、腫瘍が消退することを報告した<sup>2</sup>。TIL には腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞や活性化 NK 細胞が豊富に含まれるため、より特異的な腫瘍免疫が得られるというのがその理論的根拠であり、これらの結果をもとに悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験も行われている。またこの時、TIL 輸注前にシクロホスファミドや放射線照射などの前処置を加えることで TIL がより効率的に体内で増殖し、優れた治療効果が得られることが報告されている<sup>3</sup>。しかし、腫瘍生検検体を得るため外科的処置を必要とする点や、体外培養で目標の

細胞数を得られない場合があるなどの問題があり、標準化が困難な治療法であった。

養子免疫療法の特異性および汎用性をさらに高めるために開発されたのが、人工的な抗原受容体をリンパ球に遺伝子導入して行う養子免疫遺伝子療法である。リンパ球に遺伝子導入される受容体としては、主に T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) とキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) の 2 種類がある<sup>4</sup>。前者は、既知の腫瘍関連抗原を HLA 拘束性に認識する TCR 遺伝子を患者リンパ球に遺伝子導入するものであり、特定の HLA 型の患者に使用が限られる。また、TCR は $\alpha$ と $\beta$ 鎖からなるヘテロダイマーの構造を持つため、内因性 TCR と遺伝子導入された TCR の単鎖同士が会合 (ミスペアリング) した結果、目的の外因性 TCR が十分に発現しない場合や、自己反応性の T 細胞が出現し、自己免疫疾患様の病態を惹起する可能性がある<sup>5</sup>。しかし、TCR によるアプローチは細胞表面抗原のみならず、プロセッシングを受けた後 HLA によって提示されるような細胞内抗原も標的とすることができるという利点がある。これに対して CAR は抗体の可変領域からなる single chain variable fragment (scFv)、膜貫通領域、そして TCR のシグナル伝達に関与する CD3 $\zeta$ 鎖が連結された構造を持ち、HLA 非拘束性に抗原を認識することが可能である (図 1)。CAR の場合、標的とする抗原が細胞表面抗原でなければならないという制約はある

ものの、より汎用性が高く、適切な表面抗原を有する腫瘍に対しては極めて有効である。このような基本構造を持つものは第一世代 CAR と呼ばれるが、CAR 発現 T 細胞の効果をさらに高める試みとして、CAR の構造内に T 細胞共刺激シグナル発生ユニットを挿入した第二世代 CAR が開発された<sup>6</sup>。T 細胞の活性化には、HLA に提示された抗原との結合による TCR からのシグナル 1 と、抗原提示細胞などが発現している B7 (CD80) などの共刺激因子と CD28 の相互作用を介したシグナル 2 が必要であるが、第二世代 CAR が標的抗原を認識すると直ちにシグナル 1 および 2 が伝達され T 細胞が活性化される。このことにより T 細胞がアナジーに陥ることを防ぎ、十分に活性化して優れた抗腫瘍効果を発揮することができる。挿入される共刺激シグナル発生ユニットとしては他にも 4-1BB (CD137)、OX40 (CD134) などがあり<sup>4</sup>、2 種類のユニットをタンデムに挿入した第三世代 CAR も開発が進みつつある<sup>7</sup>。Morgan らは HER2 (ERBB2) を認識する第三世代 CAR を用いた転移性大腸がんに対する臨床試験にて、輸注 15 分後に呼吸不全をきたし、5 日後に死亡した例を報告しており、肺組織に弱く発現されている ERBB を CAR が認識したことによるサイトカイン症候群が機序として推定されている。このように第二、第三世代 CAR では効果が高まる一方で、強い有害事象も起こりうるため、CAR 遺伝子と同時に自殺遺伝子を導入するなどの方法により安全性を担保することも必要である<sup>8</sup>。



## 1.2. B細胞腫瘍と第二世代 CD19-CAR

CD19 は、様々な分化段階の B 細胞に広く発現されている表面抗原であり、これを標的とすることで、B 細胞白血病、B 細胞リンパ腫などの B 細胞腫瘍を広く治療の対象とすることが可能である。米国 Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) の Brentjens らは 2007 年に、CD19 を標的とした第二世代 CAR 遺伝子、1928z をレトロウイルスベクターによりヒト T 細胞に導入し、これらがヒト B 細胞リンパ腫の細胞株に対して強力な抗腫瘍効果を持つことをマウスモデルで実証した (図 2)<sup>9</sup>。この研究成果を受けて、1928z は再発 CD19 陽性慢性リンパ性白血病 (CLL) および急性リンパ性白血病 (ALL) 患者に対する臨床試験に使用され、後者では 5 例中 4 例で寛解 (CR) を得るなど優れた効果が得られている<sup>10,11</sup>。その他にも米国 Pennsylvania 大学<sup>12-14</sup>、National Cancer Institute<sup>15,16</sup> などにおいても第二世代 CD19-CAR の臨床試験が行われており、再発難治性の B 細胞腫瘍に対して一定の効果を挙げている (表 1)。重篤な副作用としては、サイトカイン症候群による血圧低下、呼吸不全などが報告されている。また、CD19 は正常 B 細胞にも広く発現されるため、長期にわたり正常 B 細胞が消失し、低ガンマグロブリン血症をきたす例もあり、ガンマグロブリンの補充療法などが行われている。

自治医科大学遺伝子治療研究部では米国 MSKCC の Brentjens 博士らにより

B 細胞性白血病に対して臨床応用されている第二世代 CD19-CAR 遺伝子 (1928z) を搭載したレトロウイルスベクターである SFG-1928z の提供を受け、B 細胞リンパ腫に対する治療に応用するために基礎研究を行っている。B 細胞リンパ腫は難治性の血液悪性疾患であり、代表的な病型であるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B cell lymphoma; DLBCL) は非ホジキンリンパ腫の 35～50%を占めており、本邦では頻度が高い疾患である<sup>17</sup>。B 細胞の表面抗原 CD20 に対するキメラモノクローナル抗体である Rituximab と CHOP 療法の併用は長期生存率を改善したが、再発例も多い。救済化学療法感受性の再発に対しては自家移植併用大量化学療法が行われるが、化学療法抵抗性の症例の予後は不良である。若年例などでは同種移植などが試みられるが、治療関連死亡は 30%前後と極めて高いため<sup>18</sup>、治療関連毒性が低く効果の高い治療の出現が強く望まれる。第二世代 CD19-CAR による養子免疫遺伝子療法は従来の抗がん剤や抗体療法とは異なる機序で働き、薬剤耐性を克服できる可能性があることから、有望な新規治療として期待できる。

(表 1) 第二世代 CD19-CAR の臨床試験

施設	CAR構造	対象疾患	前処置	治療効果	備考（副作用など）
Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Anti-CD19 scFv +CD28	再発プリンアナログ抵抗性CLL 8	2例目までなし 3例目以降はCY	SD 3 PD 1 NR 3 評価不能 1	1例で血圧低下、腎不全による死亡 (治療との因果関係は不明)
		再発ALL 5 血液学的再発 2 MRD陽性 2 3rd CR 1	CY	5例中4例でMRD陰性化 1例でMRD陰性を維持	1例で長期に正常Bリンパ球が消失
Pennsylvania University	Anti-CD19 scFv +4-1BB	再発CLL 3	なし	CR 2 PR 1	腫瘍崩壊症候群1例をのぞき重篤な副作用なし 1例で低ガンマグロブリン血症
		再発ALL 2	なし	CR 2 (うち1例は2か月で再発)	1例でICU管理を要するサイトカイン症候群
National Cancer Institute	Anti-CD19 scFv +CD28	難治性Bリンパ腫 FL 3 CLL 4 SMZL 1	CY+Flu 輸注後にIL-2投与	CR 1 PR 6 評価不能 1	4例で長期に正常Bリンパ球が消失

CLL: chronic lymphocytic leukemia

SLL: small lymphocytic leukemia

ALL: acute lymphoblastic leukemia

FL: follicular lymphoma

SMZL: splenic marginal zone lymphoma

CR: complete remission

PR: partial remission

SD: stable disease

PD: progressive disease

NR: no response

MRD: minimal residual disease

CY: cyclophosphamide

Flu: fludarabine

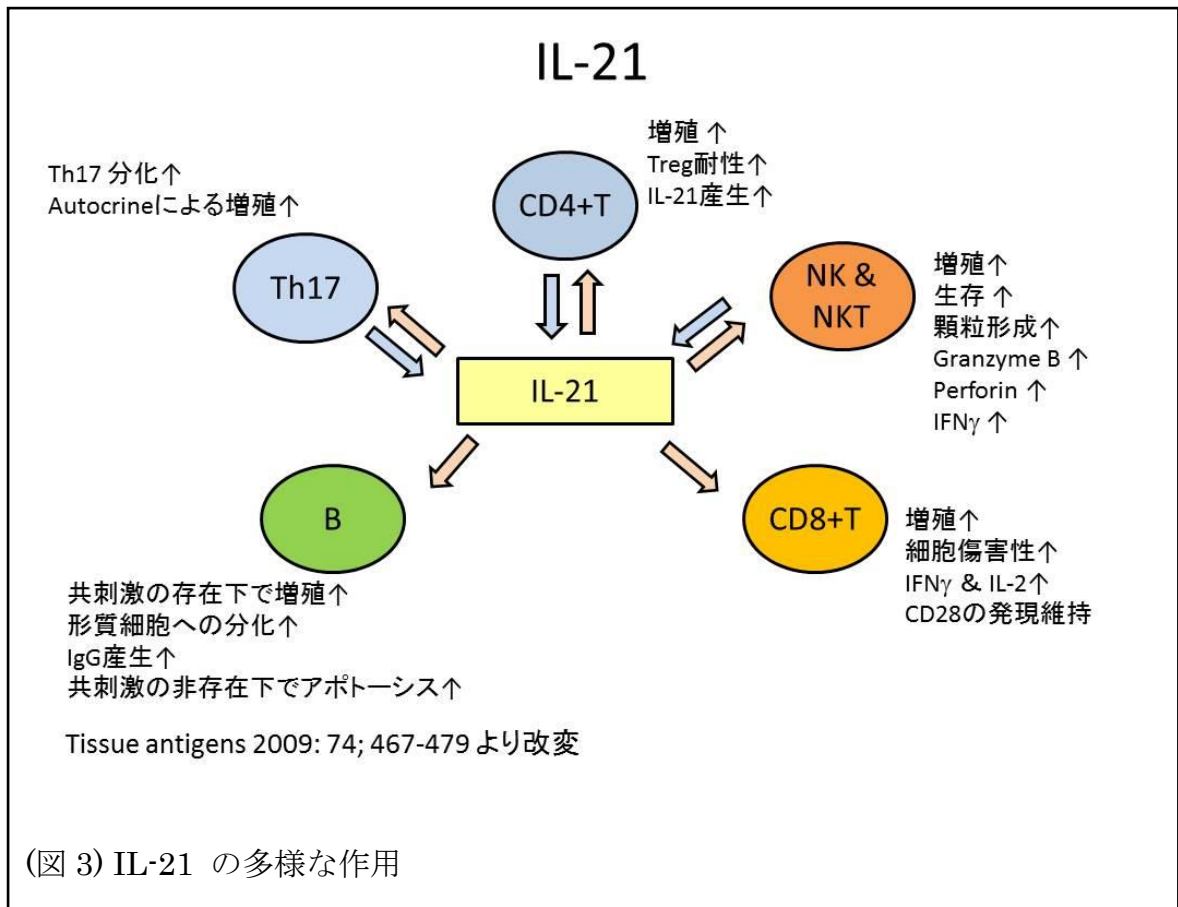


### 1.3. IL-21

近年同定された T 細胞サイトカインの一つである IL-21 は、IL-2、4、7、9、15 と同様に IL-2 受容体 $\gamma$ 鎖を共有する $\gamma$ 鎖サイトカインファミリーの一つである。NK、NKT、CD4<sup>+</sup>T 細胞により産生され、NK 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞傷害活性の増強と生存の延長、B 細胞においては分化の促進、また CD40 や B 細胞受容体などに対する共刺激の非存在下ではアポトーシスを惹起する。その他、Th17 細胞や DC などに対する作用も報告されており、その働きは多様である (図 3)<sup>19</sup>。その中でも IL-21 の NK 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞への作用は、腫瘍に対する免疫を強化するものとして、近年腫瘍免疫療法の領域における注目が高まっている。2003 年 Ugai らは、マウス大腸癌の同系移植において、大腸癌細胞に IL-21 を発現させたところ、NK 細胞、T 細胞依存性に腫瘍の拒絶が起こることを初めて報告した<sup>20,21</sup>。以来、さまざまな動物腫瘍モデルにおいて IL-21 発現プラスミドの遺伝子導入や組み換え IL-21 製剤の投与などの前臨床研究が行われ、腫瘍の拒絶や確立された腫瘍の縮小などの効果が得られている<sup>22-24</sup>。これらの結果を基に、主に悪性黒色腫、腎細胞癌などの腫瘍においてヒトを対象とした臨床試験も行われており、第一相、第二相試験において発熱・悪寒・皮疹などサイトカイン療法で一般的な副作用は認められるものの重篤な有害事象なく安全に施行できたことが報告されている (表 2)<sup>25-32</sup>。

また、IL-21 は B 細胞系に対しては形質細胞への分化成熟を促す一方で、アポトーシスを誘導する作用もある。B 細胞リンパ腫細胞株に対しても、前臨床試験において一部を除きほとんど増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>33-36</sup>。

Timmerman らは再発・難治性の B 細胞リンパ腫に対して Rituximab と IL-21 を併用する第一相試験を行った。IL-21 による T 細胞免疫の増強、NK 細胞と Rituximab による抗体依存性細胞傷害活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) の強化、さらには B 細胞に対する直接的なアポトーシスの誘導などによる抗腫瘍効果が期待された。対象患者は 1 例を除き全例 Rituximab の使用歴があったが、19 例中 8 例で部分寛解 (PR) 以上の効果があり、うち 4 例では過去の Rituximab 投与時より長い効果持続期間を得ることができた<sup>31</sup>。臨床での使用についてはさらなる検討を要するが、IL-21 は B 細胞リンパ腫の免疫療法において有望な薬剤の一つであると考えられる。



(表 2) 悪性腫瘍に対する IL-21 臨床試験の報告

著者名(出版年)	対象疾患	試験デザイン・症例数	治療効果
Davis (2007, 2009)	悪性黒色腫	Phase I, n=29 Phase IIa, n=24,	CR3%, SD31% CR+PR 8%, SD 37.5%
Thompson (2008)	悪性黒色腫、腎細胞癌	Phase I, n=43	悪性黒色腫: CR 4%, SD 45% 腎細胞癌: PR 21%, SD 68%
Schmidt (2010)	悪性黒色腫、腎細胞癌	Phase I, n=26	CR 4%, PR 8%
Grünwald (2011)	腎細胞癌	Phase I, n=9 Sunitinib併用	PR 1例, SD 1例, PD 1例 評価不能 6例
Steele (2012)	大腸癌	Phase I, n=15 Cetuximab併用	SD 60%
<b>Timmerman (2012)</b>	<b>再発非ホジキンリンパ腫</b> <b>CLL /SLL 11例</b> <b>FL 9例</b> <b>MZL 1例</b>	<b>Phase I, n=21</b> <b>Rituximab併用</b>	<b>CR 9%, uCR 4%, PR 23%</b> <b>SD 47%</b>
Petrella (2012)	悪性黒色腫	Phase II, n=40	PR 22.5 %, SD 40 % PD 35 %, 評価不能 2.5 %

CLL/SLL: Chronic lymphocytic leukemia/  
Small lymphocytic leukemia  
ALL: Acute lymphoblastic leukemia  
FL: Follicular lymphoma  
MZL: Marginal zone lymphoma  
CR: complete remission

uCR: uncertain complete remission  
PR: partial remission  
SD: stable disease  
PD: progressive disease

#### 1.4. CD19-CAR と IL-21 併用の意義

自治医科大学遺伝子治療研究部では CD19-CAR による B 細胞リンパ腫の養子免疫遺伝子療法 of 抗腫瘍効果を増強するための基礎研究を行っている。IL-21 は CD19-CAR 遺伝子導入 T 細胞の抗腫瘍活性を増強し *in vivo* での生存を延長する効果が期待できる。また、前述したように B 細胞リンパ腫へ直接的な殺細胞効果を発揮する可能性もあることから、CD19-CAR による B 細胞リンパ腫の治療効果を増強する有望な戦略と考えられる。さらに本研究では、CD19-CAR と IL-21 を共発現ベクターで T 細胞に同時に発現させることにより局所的な効果を発揮させかつ全身性の副作用を回避することを目指した。

## 2. 目的

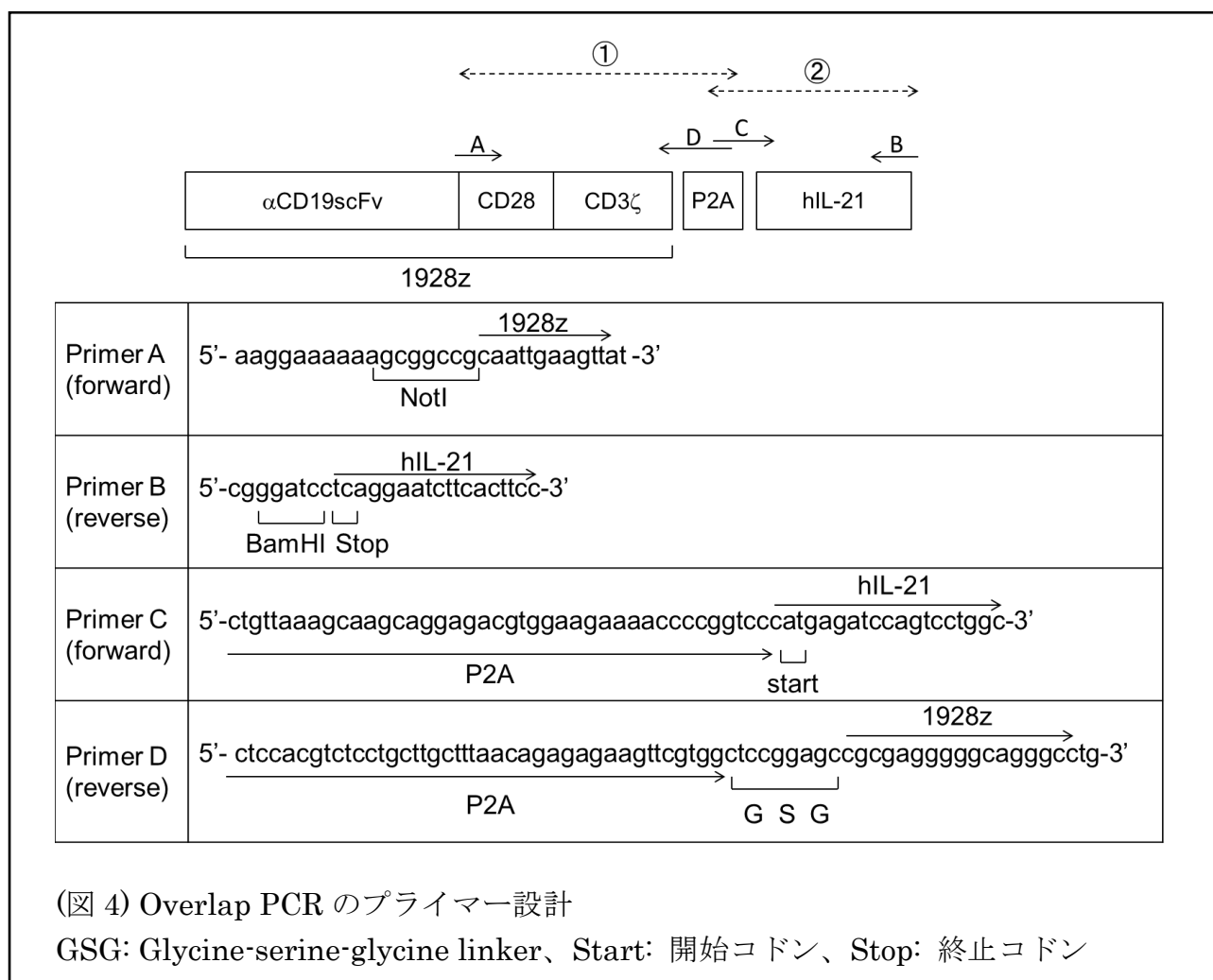
本研究では、CD19 特異的キメラ抗原受容体 Chimeric Antigen Receptor (CD19-CAR) 発現 T 細胞の抗腫瘍効果を増強するため、T 細胞サイトカインである IL-21 を共発現させ、免疫不全マウスを用いたヒト B 細胞リンパ腫の異種移植モデルにおいてその効果を検討する。

### 3. 方法

#### 3.1. プラスミド

CD28 を構造内に含む第二世代 CD19-CAR 遺伝子 (1928z) を搭載したレトロウイルスベクター-SFG-1928z は Brentjens 博士 (MSKCC) より提供された。IL-21 の cDNA は以下のように単離した。抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で活性化した健常人末梢血単核球細胞 (PBMC) から total RNA を TRIzol (Life technologies, Carlsbad, USA) を用いて抽出した。その後、ReverTraAce (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて cDNA を調整し、特異的なプライマーを用いた PCR により完全長のヒト IL-21 (hIL-21) cDNA を増幅した。得られた hIL-21 を pBluescript KS (+) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) にサブクローニングした (pB-hIL21)。SFG-1928z と pB-hIL21 を鋳型として、1928z と hIL-21 を P2A ペプチド配列で連結した共発現ベクター SFG-1928z-P2A-IL21 を overlap PCR 法により作成した<sup>37</sup>。使用したプライマーの位置と配列を図 4 に示す。SFG-1928z を鋳型として、NotI を含む 1928z 特異的な primer A と P2A ペプチド前半を含む primer D を用いて PCR を行い、PCR 産物①を得た。次に pB-hIL21 を鋳型として、P2A ペプチド後半を含む primer C と BamHI を含む IL-21 特異的な primer B を用いて PCR 反応を行い、PCR 産物②を得た。尚、primer C と D は互いの末尾がオーバーラップした相補配列となっている。最後に PCR 産物①と②を鋳型として primer A および B を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応には、KOD plus ver.2 (Toyobo) を使用した。PCR 産物を QIA quick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden,

Germany) にて精製した後、pBluescript KS (+) にサブクローニングし、全塩基配列を確認した (pB/ΔSFG-1928z-P2A-IL21)。pB/ΔSFG-1928z-P2A-IL21 を NotI と BamHI で制限酵素処理して得られたインサート DNA 断片を、同じく NotI と BamHI で切断した基本骨格の SFG-1928z に挿入し、SFG-1928z-P2A-IL21 を得た。



ルシフェラーゼ発現ベクターpEF-LucはpEF-PGKneoにルシフェラーゼcDNAを挿入し作成した<sup>38</sup>。ヒトCD19発現ベクターpMXs-CD19はpMXs-puroにヒトCD19cDNAを挿入し作成した<sup>39,40</sup>。



### 3.2. 細胞株

ヒトバーキットリンパ腫株 **Raji** はヒューマンサイエンス研究資源バンクより、ヒト赤芽球系白血病株 **K562**、マウス線維芽細胞株 **NIH3T3** は理研バイオリソースセンターより入手した。ルシフェラーゼ発現 **Raji** 細胞 (**Raji-Luc**) は **Raji** 細胞に **pEF-Luc** をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入後、**G418** (1 mg/ml) で選択的に培養して高発現クローンを得た<sup>40</sup>。ヒト **CD19** 発現 **K562** 細胞、**NIH3T3** 細胞 (**K562-CD19**、**NIH3T3-CD19**) はそれぞれ **K562** 細胞、**NIH3T3** 細胞に **pMX-CD19** を用いて遺伝子導入し、ピューロマイシン (1 µg/ml) で選択的に培養してクローンを得た<sup>40</sup>。**BaF-3-IL21R** 細胞は **pEF1α-IL21R-puro** をマウス pro-B 細胞株 **BaF-3** にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入後、ピューロマイシンにて選択的に培養し、高発現クローンを得た<sup>41</sup>。レトロウイルスのパッケージング細胞としては **PG13** を使用した<sup>42</sup>。接着細胞は 10% 牛胎児血清 (**FBS** ; **Sigma Aldrich**, **St. Louis**, **MO**) を添加した **Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, CA)** で、浮遊細胞は 10% **FBS** 添加 **RPMI1640 (Life technologies)** を用い、**37°C**、**5%CO<sub>2</sub>**にて培養した。

### 3.3 リン酸カルシウム法による 293 細胞への遺伝子導入

遺伝子導入前日に 1 ウェルあたり  $3 \times 10^5$  個の **293** 細胞を 6 穴細胞培養プレートに播いた。遺伝子導入当日、新しい **DMEM** 3 ml で培地交換した。プラスミド溶液 3 µg、**2 M CaCl<sub>2</sub>** 20.4 µl、滅菌蒸留水 128 µl を混合した後、**2 × HBS**

(pH 7.11) 150  $\mu$ l を加え攪拌した後、室温で 2 分間静置した。プラスミドを含む反応液の全量をウェルに滴下した。翌日、新しい DMEM 3 ml で培地交換を行い、トランスフェクションから 48~72 時間後に遺伝子発現確認などの実験に使用した。

### 3.4. レトロネクチンを用いた浮遊系細胞への遺伝子導入

24 穴ノントリートメントプレート (Corning) に 20  $\mu$ g/ml に調整したレトロネクチン (Takara bio, Shiga, Japan) を 1 ウェルあたり 500  $\mu$ l 加え、4°C で 12 時間静置した。2% 牛血清アルブミン (BSA ; Sigma-Aldrich) を含む Phosphate-buffered saline (PBS) 500  $\mu$ l をウェルに加え、30 分間室温でブロッキングを行った。PBS でウェルを洗浄後、レトロウイルス上清をレトロネクチン処理プレートに加え、2000  $\times$  g、32°C で 2 時間遠心した。PBS でウェルを洗浄後、遺伝子導入する細胞を  $1\sim 2 \times 10^6$ /ml の濃度となるように培地で懸濁し、1 ml ずつウェルに加え、1000  $\times$  g、32°C で 10 分間遠心し、細胞をウェルの底面に接着させた。細胞は 24 時間後以降に適宜培養フラスコ等に移し、拡大培養した。

### 3.5. レトロウイルス上清の作成

SFG-1928z または SFG-1928z-P2A-IL21 のいずれかと VSVg エンベロープ、gag-pol 発現ベクターを 293 細胞にリン酸カルシウム法で一過性に遺伝子導入し、VSVg シュードタイプしたレトロウイルス粒子を含む培養上清を得た。このウイ

ルス上清をポリブレン法にてパッケージング細胞 PG13 に感染させることにより安定的に遺伝子導入し、限界希釈法にてクローンを得ることによりウイルスプロデューサー細胞を樹立した。

ウイルス上清の調整は以下のように行った。まず 1 日目にプロデューサー細胞  $10^6$  個を 15 cm の培養シャーレに播き、 $37^{\circ}\text{C}$  で 12 時間培養した。2 日目に、DMEM 12 ml に培地交換し、 $32^{\circ}\text{C}$  のインキュベーターに移した。3 日目に酪酸ナトリウム (Sigma Aldrich) を最終濃度 5 mM になるように加え、5 日目に上清を回収した。上清中に含まれる組み換えレトロウイルスの力価は、Retrovirus Titer Set (Takara bio) を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

### 3.6. 健常人末梢血単核球細胞の分離・培養と遺伝子導入

健常人の検体を使用した実験は自治医科大学の倫理委員会にて承認され、提供者に対して書面にて同意を取得した。末梢血全血 20 ml より Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を用いて PBMC を分離した後、10% ヒト AB 型血清 (Nova Biologics, Oceanside, CA) および 1 nM の組み換えヒト IL-2 (Life technologies) を添加した X-vivo 15 (Takara bio) により培養した。PBMC を直ちに使用しない場合には、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存し、必要時解凍して使用した。遺伝子導入は以下のように行った。まず、24 穴ノントリートメントプレート (Corning) に 1 ウェルあたりそれぞれ 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗 CD3 抗体 (R&D systems, Minneapolis, MN) 200  $\mu\text{l}$  および 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のレトロネクチン 500  $\mu\text{l}$  を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ 、12 時間静置後、2% BSA を含む PBS にて室温 30 分間ブ

ロッキングを行い、前刺激用プレートを作成した。培養 1 日目に、1 ウェル当たり  $10^6$  個の PBMC を前刺激用プレートのウェルに加えた。4 日目、5 日目に、PG13 より得られたレトロウイルス上清を用いて、前述のプロトコールに従ってレトロネクチンを用いた遺伝子導入を行った。6 日目、13 日目に CD19 抗原発現フィーダー細胞を PBMC の 1/10 量加えた。フィーダー細胞としては、放射線照射 (50 Gy) あるいはマイトマイシン C (10  $\mu\text{g/ml}$ ) で 90 分間処理した NIH3T3-CD19 細胞または放射線照射 (100 Gy) した K562-CD19 細胞を使用した。

### 3.7. フローサイトメトリーによる T 細胞サブセット解析

細胞表面 CD19-CAR の評価はビオチン化抗マウス IgG ヤギ抗体 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) と FITC 標識ストレプトアビジンまたは PE 標識ストレプトアビジン (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて行った。T 細胞サブセットの解析は、FITC 標識抗ヒト CD3 抗体、APC 標識抗ヒト CD8 抗体、PE 標識抗ヒト CD62L 抗体、APC 標識抗ヒト CD45RO 抗体、APC 標識抗ヒト CD27 抗体 (Biolegend, San Diego, CA, USA)、FITC 標識抗ヒト CD4 抗体、PE 標識抗ヒト CD8 抗体、APC 標識抗ヒト CD45 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、PE 標識抗ヒト CCR7 抗体 (R & D systems)、PE 標識抗ヒト CD28 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いて行った。具体的な染色方法としては、まず、CD19-CAR の染色のため 1% FBS を含む PBS 50  $\mu\text{l}$  に  $10^6$  個相当の細胞を懸濁し、ビオチン化抗マウス IgG ヤギ抗体を 1  $\mu\text{l}$  加え、

遮光して 4°C、20 分間反応させた。細胞を PBS で洗浄後、再び 1% FBS を含む PBS 50  $\mu$ l に懸濁し、使用した抗体の組み合わせに応じて FITC または PE 標識 スレプトアビジン 1  $\mu$ l を加え、遮光して 4°C、20 分間反応させた。次に、再び 1% FBS を含む PBS 50  $\mu$ l に懸濁し、T 細胞サブセット関連の抗体を 5  $\mu$ l (二重染色の場合は各 5  $\mu$ l) 添加し、遮光して 4°C、20 分間反応させた。細胞を PBS で洗浄後、1% paraformaldehyde を含む PBS で固定し、測定を行った。サンプルの測定とデータの解析は BD LSR™ と Cell Quest™Pro software または BD LSR Fortessa™ と FACSDiva™ software (BD Biosciences) のいずれかの組み合わせで行い、CD19-CAR 陽性分画をゲーティング後、目的とする表面抗原の陽性率を算出した。

### 3.8. 細胞内フローサイトメトリーによるリン酸化 STAT3 の解析

BaF-3-IL21R 細胞およびヒト PBMC はそれぞれサイトカインを含まない培地で 12 時間前培養した後、IL-2 (1 nM)、IL-21 (10 ng/ml) を含む培地あるいは所定のサンプルに  $10^6$ /ml の濃度で懸濁し、5 分間反応させた。細胞を phosphatase inhibitor (1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、5 mM NaF) を含む PBS で洗浄し、反応を停止させ、以下の解析に用いた。リン酸化 STAT3 の細胞内抗体染色は、以下のように行った。まず 1 サンプルあたり  $10^6$  個の細胞を 4% paraformaldehyde 溶液に懸濁し、37°C で 10 分間固定処理を行った。細胞を PBS で洗浄後、4°C に冷却した Perm buffer III (BD Biosciences) 1 ml に懸濁し、氷上で 30 分間膜透過処理を行った。細胞を 1% FBS を含む PBS 200  $\mu$ l に懸濁し、PE 標識抗ヒ

トリン酸化 STAT3 抗体 20  $\mu$ l を加え、室温遮光で 1 時間反応させ抗体染色した。サンプルの測定とデータの解析は BD LSR™と Cell Quest™ Pro software または BD LSR Fortessa™と FACSDiva™ software (BD Biosciences) のいずれかの組み合わせで行った。

### 3.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

PBMC の培養上清中の hIL-21 の測定は以下のように行った。PBMC を PBS で洗浄後、サイトカインを含まない X-vivo15 に  $10^7$ /ml の濃度で懸濁し、37°C で 12 時間培養した。細胞を遠心して上清を回収し、human IL-21 ELISA ready-set-go kit (eBioscience) を用いて測定した。PBMC 上清の IFN- $\gamma$  の測定は以下のように行った。抗原刺激群 (Ag+) では  $10^5$  個の PBMC と NIH3T3-CD19 細胞  $10^5$  個を PBS で洗浄後、サイトカインを含まない X-vivo 15 200  $\mu$ l に懸濁し、96 穴丸底プレート (Corning) にて 72 時間培養した。非抗原刺激群 (Ag-) では、PBMC  $10^5$  個のみを培養した。細胞を遠心して上清を回収し、IFN- $\gamma$  ELISA ready-set-go kit (eBioscience) を用いて測定した。サンドイッチ法による ELISA は所定のプロトコールに従い以下のように行った。まず捕捉抗体でコーティングされた 96 穴プレートに測定サンプルと標準曲線作成用の既知の濃度の溶液を加え、室温 2 時間または 4°C、12 時間反応させた。ウェルを 0.05% TWEEN20 を含む PBS で洗浄後、検出抗体 (ビオチン化抗体) を加え 1 時間反応させた。ウェルを洗浄後、アビジン化 horse radish peroxidase (HRP) 溶液を加え 30 分間反応させた。ウェルを洗浄後、tetramethylbenzidine 基質を

加え 15 分間発色反応させたのち、1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  で反応を停止させた。その後 Spectramax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて波長 570nm-470nm で吸光度を測定した。

### 3.10. ウェスタンブロッティング

蛋白抽出液 20  $\mu\text{g}$  を 2-mercaptoethanol を還元剤として加えた NuPAGE® LDS Sample buffer (Life technologies) に溶解し、98°C、5 分間加熱処理した後氷冷した。反応液を NuPAGE® MES running buffer と Bis-Tris 4%-12% ポリアクリルアミドゲル (Life technologies) にて、100 V、80 分間泳動した後、NuPAGE® transfer buffer を用いて 30 V、60 分間で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Life technologies) に転写した。PVDF 膜を PVDF blocking reagent for Can Get Signal (Toyobo) を用いて室温 30 分間ブロッキングを行った。Wash buffer (0.5 % TWEEN20 を含む TBS) で洗浄後、CD19-CAR の検出には抗ヒト CD3 $\zeta$ 抗体、IL-21 の検出には抗ヒト IL-21 抗体 (biolegend)、STAT3、pSTAT3 の検出には抗ヒト STAT3 抗体、抗ヒト pSTAT3 抗体 (Cell signaling technology, Danvers, MA, USA) をそれぞれ一次抗体として用い、Can get signal solution 1 (Toyobo) で 1000 倍希釈した溶液にて室温振盪 1 時間または 4°C、12 時間で染色した。二次抗体による染色は、転写膜を wash buffer で洗浄後、HRP 標識二次抗体 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を Can get signal solution 2 (Toyobo) で 5000 倍希釈した溶液で、室温振盪 1 時間染色した。転写膜を wash buffer にて洗浄後、enhanced chemiluminescence systems

(GE Healthcare) を用いて処理し、化学発光を X 線フィルムで検出してシグナルの可視化を行った。

### 3.11 細胞傷害性試験

Calcein-acetoxymethyl (Calcein AM; Dojin, Kumamoto, Japan) を用いた細胞傷害性試験は参考文献のプロトコールに従って行った<sup>43</sup>。Calcein AM を最終濃度 15  $\mu\text{M}$  になるように加えた RPMI1640 にターゲット細胞を  $10^6/\text{ml}$  の濃度で懸濁し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間染色した。ターゲット細胞を RPMI1640 で 2 回洗浄した後、 $2 \times 10^5/\text{ml}$  の濃度となるように RPMI1640 で懸濁した。次にエフェクター細胞を所定の E:T 比となるよう RPMI1640 に懸濁し、96 穴 V 底プレート (WATSON, Tokyo, Japan) に 1 ウェルあたり 100  $\mu\text{l}$  で播き、Calcein AM で染色されたターゲット細胞の懸濁液を 1 ウェルあたり 50  $\mu\text{l}$  加えた。なお、エフェクター細胞の細胞数はフローサイトメトリーで測定した CAR 陽性率で補正し、CAR 陽性細胞数として所定の比になるように計算した。バックグラウンドの蛍光 (spontaneous release) を測定するため、エフェクターを加えないウェルを作成した。また全細胞溶解時の蛍光 (maximum release) を測定するため、2% Triton X を添加した RPMI1640 100  $\mu\text{l}$  をウェルに加えてターゲット細胞を溶解させたウェルを作成した。 $37^\circ\text{C}$  4 時間培養した後、細胞を遠心して上清 75  $\mu\text{l}$  を回収し、蛍光測定用の 96 穴フルオロヌンクプレート (Thermo scientific, Waltham, MA) に移した。Fluoroskan Ascent FL (Thermo scientific) を用いて、励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm にて各ウェルの蛍光 (test release)



を測定した。ターゲット細胞の溶解率 (%) を以下の計算式により計算した。

$$[(\text{test release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})] \times 100$$

### 3.12 ヒト B 細胞腫瘍患者臨床検体を用いた実験

患者検体を使用した実験は自治医科大学の倫理委員会にて承認された。B 細胞腫瘍の診断あるいは疑いの患者に対して書面で同意書を取得した。末梢血検体の場合には、全血 20 ml を採取し、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を用いてリンパ球分画を得た。リンパ節検体の場合には検体の一部を無菌的に 70  $\mu\text{m}$  のナイロンセルストレイナー (BD biosciences) に通し、単一細胞を分離した。細胞の CD19 陽性率は、PE 標識抗ヒト CD19 抗体 (Bay bioscience, Burlingame, CA, USA) を用いて前述のフローサイトメトリーの方法に従って算出した。検体を細胞傷害性試験のターゲット細胞として用いる場合には、Dead cell removal kit (Miltenyl biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて死細胞を除去した後に実験に使用した。

### 3.13. マウス異種移植モデルによる動物実験

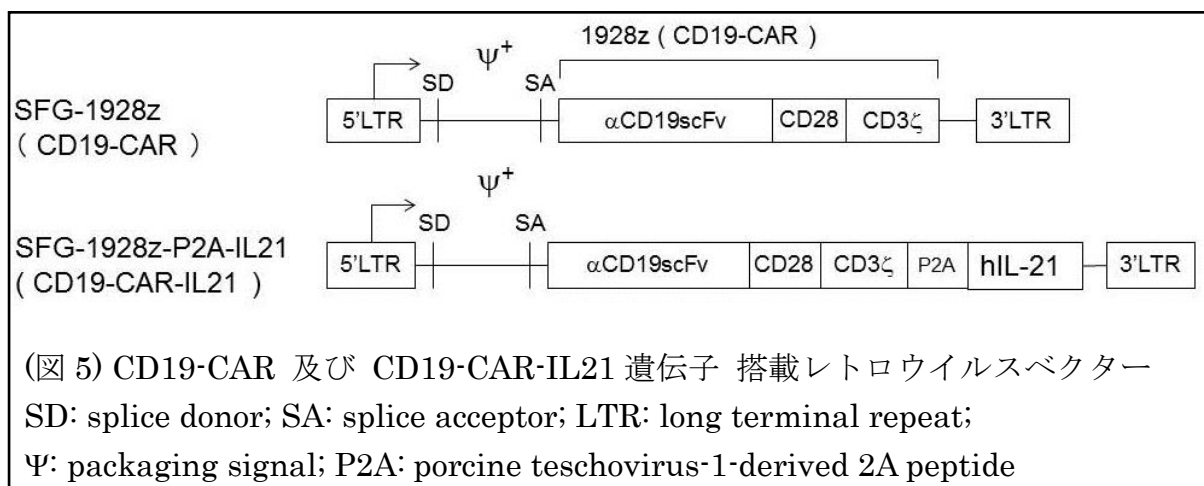
8~12 週齢の Balb/c Rag 2<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{c}^{-/-}$  マウスは伊藤守先生 (実験動物中央研究所) より提供された。実験開始日に、 $5 \times 10^4$  個の Raji-Luc 細胞を PBS 300  $\mu\text{l}$  に懸濁し、マウス尾静脈より静脈内投与した。4 日後、治療群のマウスに対しては CAR 陽性細胞として  $7 \times 10^6$  個となるように調整したヒト T 細胞を同じく

PBS 300  $\mu$ l に懸濁して静脈内投与し、コントロール群のマウスには投与を行わなかった。実験開始後 14 日目より 7 日毎に以下の方法によりバイオイメージングによる腫瘍量の評価を行った。まずマウスにルシフェリン (75 mg/kg) (Ieda, Tokyo, Japan) を腹腔内注射にて投与し、10 分後に IVIS imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA) と living image software (PerkinElmer) でルシフェリンの発光を測定した。マウスの尾を除く体全体を Region of Interest として設定して発光 (photons/second) を定量化し、腫瘍量の評価とした。全ての動物実験は自治医科大学動物実験委員会の承認を得て、動物福祉及び動物実験倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めた、自治医科大学動物実験指針規定に従って行われた。

## 4. 結果

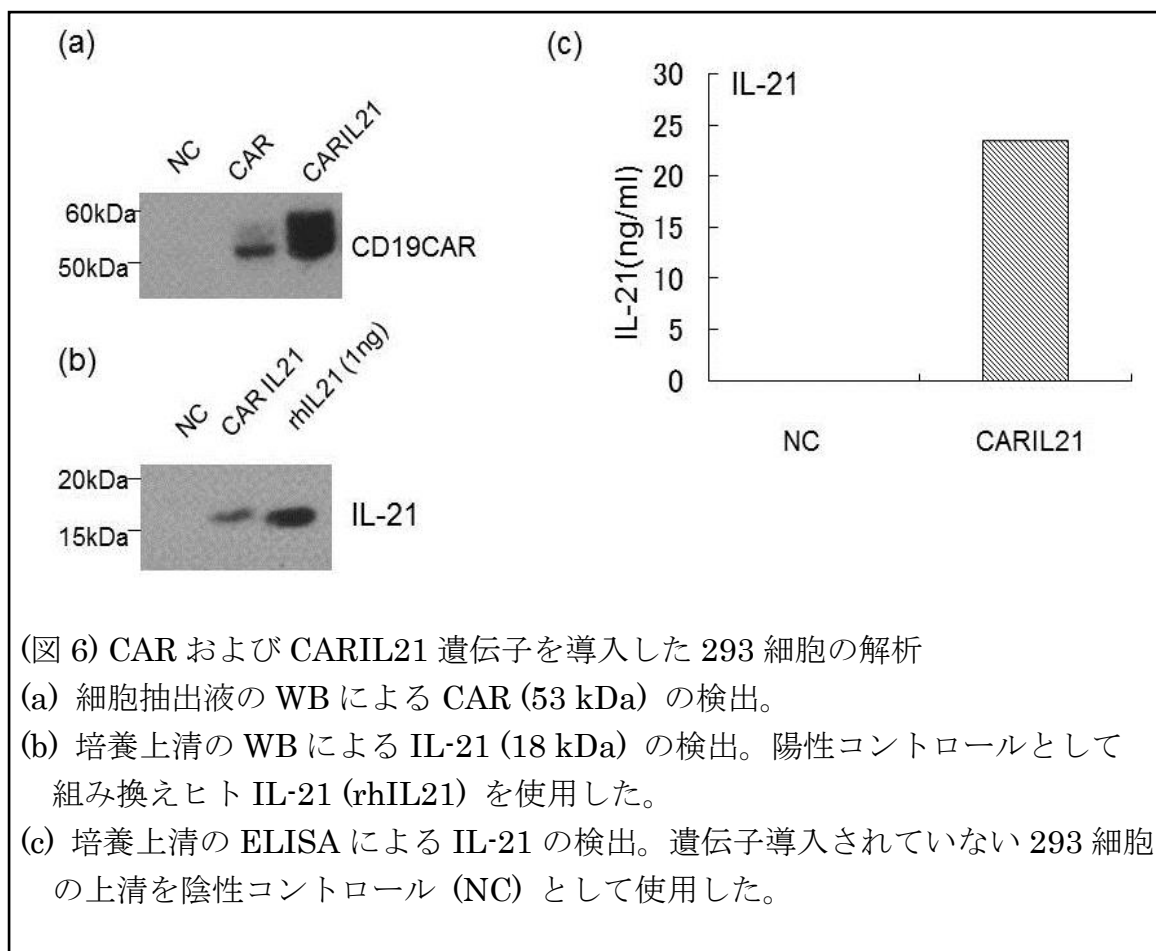
### 4.1. CD19-CAR 及び CD19-CAR-IL21 遺伝子搭載レトロウイルスベクターの作製

基本骨格である第二世代 CD19-CAR 遺伝子搭載レトロウイルスベクター SFG-1928z と hIL-21 の cDNA を鋳型として、1928z と IL-21 を 2A ペプチド配列 P2A で連結した共発現ベクター-SFG-1928z-P2A-IL21 を作製した (図 5)。



#### 4.2. 293 細胞における導入遺伝子発現と IL-21 の機能

CD19-CAR と IL-21 の遺伝子の発現を確認するため、SFG-1928z (CAR) および SFG-1928z-P2A-IL21 (CARIL21) を 293 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した。CAR および CARIL21 遺伝子導入 293 細胞抽出液のウェスタンブロッティングではともに CD19-CAR の発現が確認された。また、CARIL21 遺伝子導入 293 細胞培養上清のウェスタンブロッティング (WB) および ELISA にて IL-21 の発現が確認された (図 6)。IL-21 の機能は STAT3 のリン酸化を指標に評価した。IL-21 の特異的なシグナルを調べるために、 $\gamma$  鎖を発現する IL-3 依存性 pro-B 細胞株 BaF-3 にヒト IL-21 受容体 (IL21R) を強制発現させた BaF-3-IL21R 細胞を使用した<sup>41</sup>。CARIL21 遺伝子導入 293 細胞の上清で刺激した BaF-3-IL21R 細胞抽出液の WB では STAT3 のリン酸化が確認された。また、CARIL21 遺伝子導入 293 細胞の培養上清を用いて BaF-3-IL21R 細胞を培養すると、細胞は rhIL-21 添加時と同等の良好な増殖を示した (図 7)。以上により、新たに構築したベクター-SFG-1928z-P2A-IL21 由来の IL-21 が機能的であることが示された。

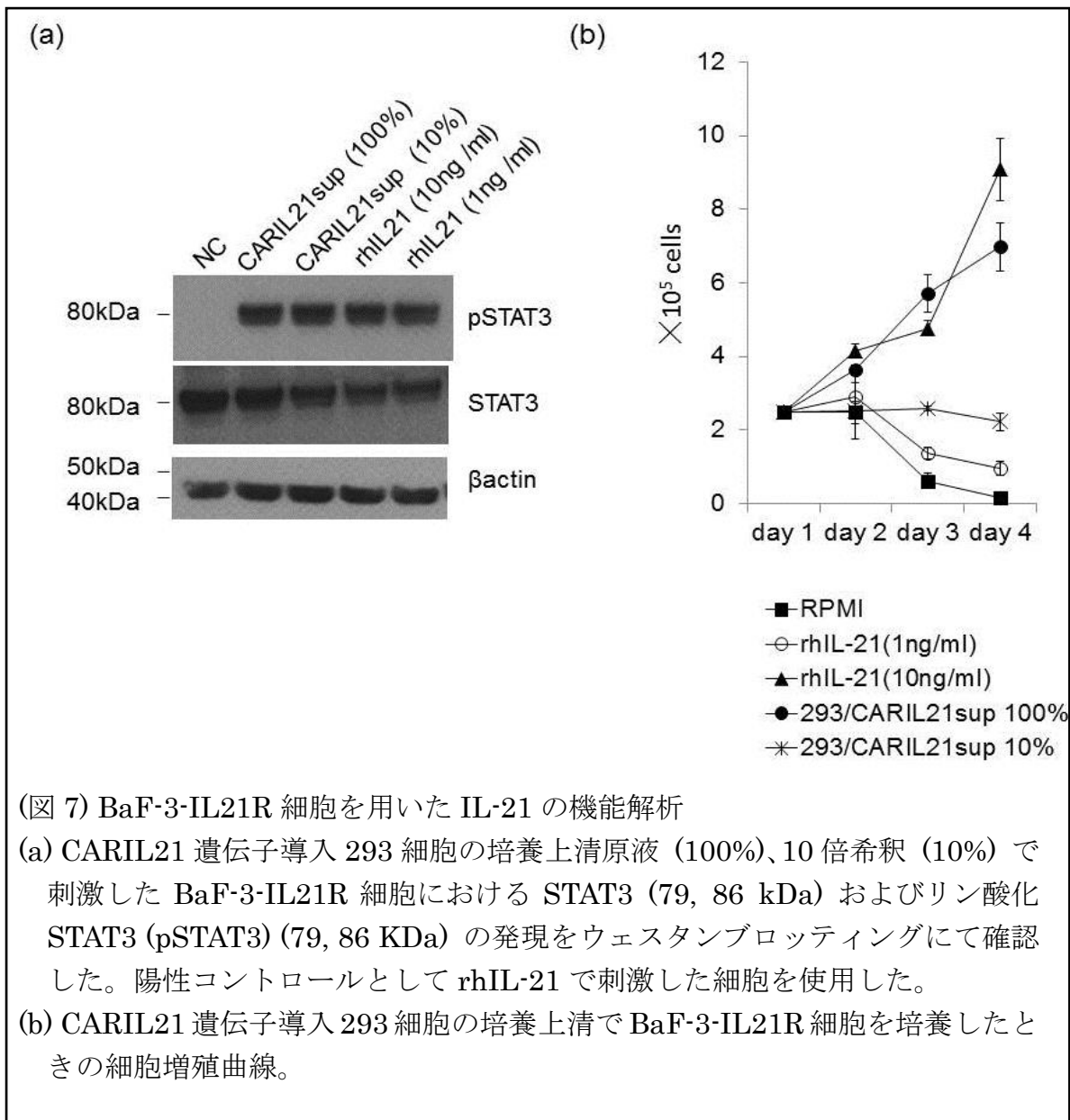


(図 6) CAR および CARIL21 遺伝子を導入した 293 細胞の解析

(a) 細胞抽出液の WB による CAR (53 kDa) の検出。

(b) 培養上清の WB による IL-21 (18 kDa) の検出。陽性コントロールとして組み換えヒト IL-21 (rhIL21) を使用した。

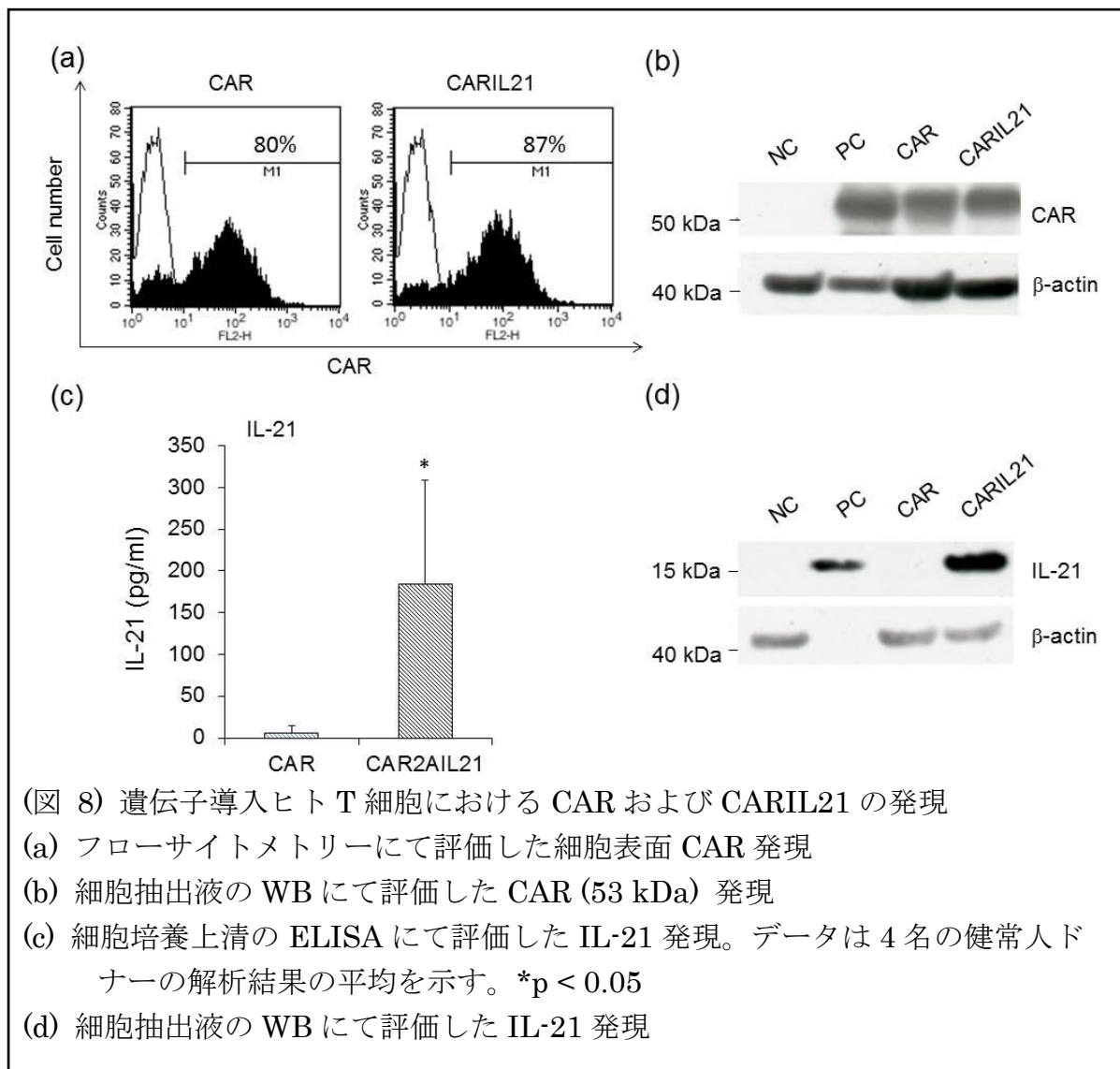
(c) 培養上清の ELISA による IL-21 の検出。遺伝子導入されていない 293 細胞の上清を陰性コントロール (NC) として使用した。



#### 4.3. ヒト PBMC における導入遺伝子発現と機能解析

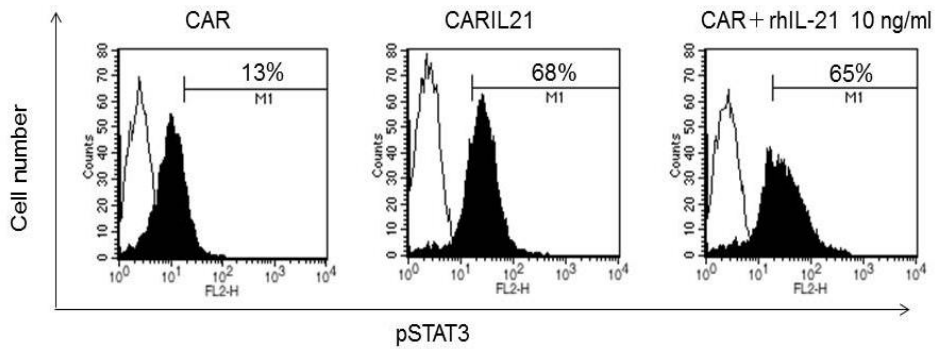
CAR および CARIL21 遺伝子搭載レトロウイルスベクターをパッケージング細胞 PG13 に安定的に遺伝子導入してプロデューサー細胞を作製し、ウイルス粒子を含む細胞上清を得た。組み換えレトロウイルスの力価は CAR では  $2.3 \times 10^7$  copies/ $\mu$ l、CARIL21 では  $4.2 \times 10^7$  copies/ $\mu$ l であった。これらをレトロネクチン法によりヒト PBMC に遺伝子導入し、遺伝子発現を解析した。フローサイトメトリー解析における CAR 陽性率は CAR<sup>+</sup>T 細胞で 80%、CARIL21<sup>+</sup>T 細胞で 87%といずれも発現は良好であり、細胞抽出液の WB でもそれぞれ CAR の発現が確認された。また、CARIL21<sup>+</sup>T 細胞のみにおいて細胞抽出液および培養上清における IL-21 の発現が確認された (図 8)。細胞内フローサイトメトリーを用いた STAT3 リン酸化解析において、CARIL21<sup>+</sup>T 細胞は CAR<sup>+</sup>T 細胞より高いリン酸化レベルを示し、これは rhIL-21 で刺激した CAR<sup>+</sup>T 細胞と同等であった。また、STAT3 のリン酸化が導入遺伝子由来の IL-21 による特異的なシグナルによるものであることを確認するため、遺伝子導入 T 細胞の培養上清で BaF-3-IL21R を刺激し、同様の実験を行った (図 9)。CARIL21<sup>+</sup>T 細胞の培養上清は rhIL-21 と同様に BaF-3-IL21R 細胞の STAT3 リン酸化を惹起した。これに対し、CAR<sup>+</sup>T 細胞の培養上清で刺激した場合には STAT3 リン酸化は認められなかった。以上より、ヒト T 細胞においても導入遺伝子の発現は良好であ

り、ベクター由来の IL-21 が機能していることが示された。

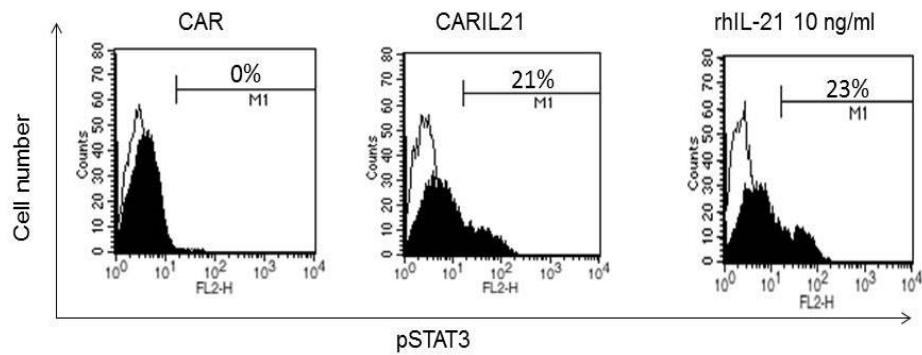




(a) T cells



(b) BaF-3-IL-21R cells



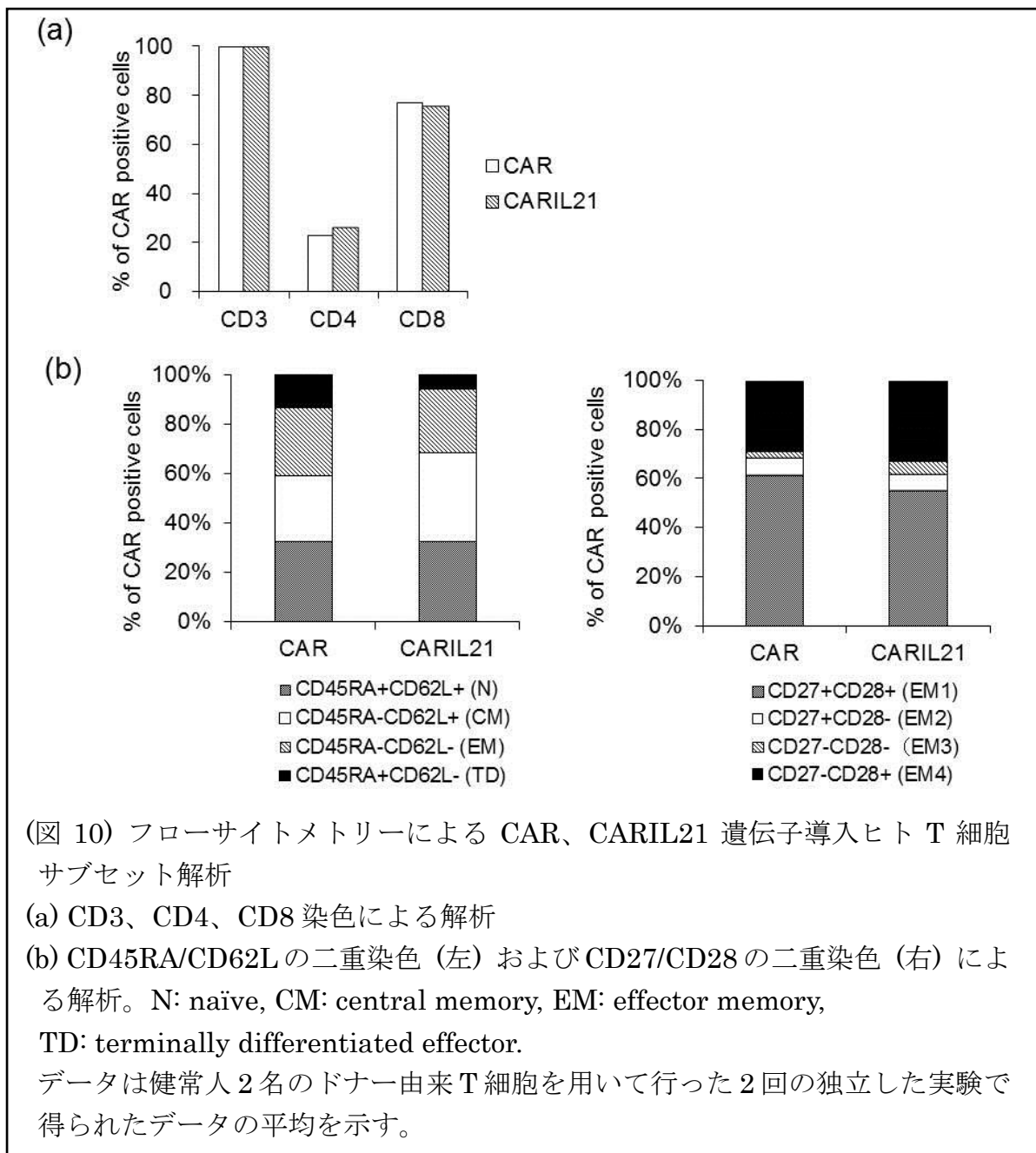
(図 9) リン酸化 STAT3 (pSTAT3) フローサイトメトリーによる IL-21 機能解析

(a) CAR<sup>+</sup>、CARIL21<sup>+</sup>ヒト T 細胞および rhIL-21 (10 ng/ml) で刺激した CAR<sup>+</sup>ヒト T 細胞における pSTAT3

(b) CAR<sup>+</sup>、CARIL21<sup>+</sup>ヒト T 細胞の培養上清および rhIL-21 (10 ng/ml) で刺激した BaF-3-IL21R 細胞における pSTAT3

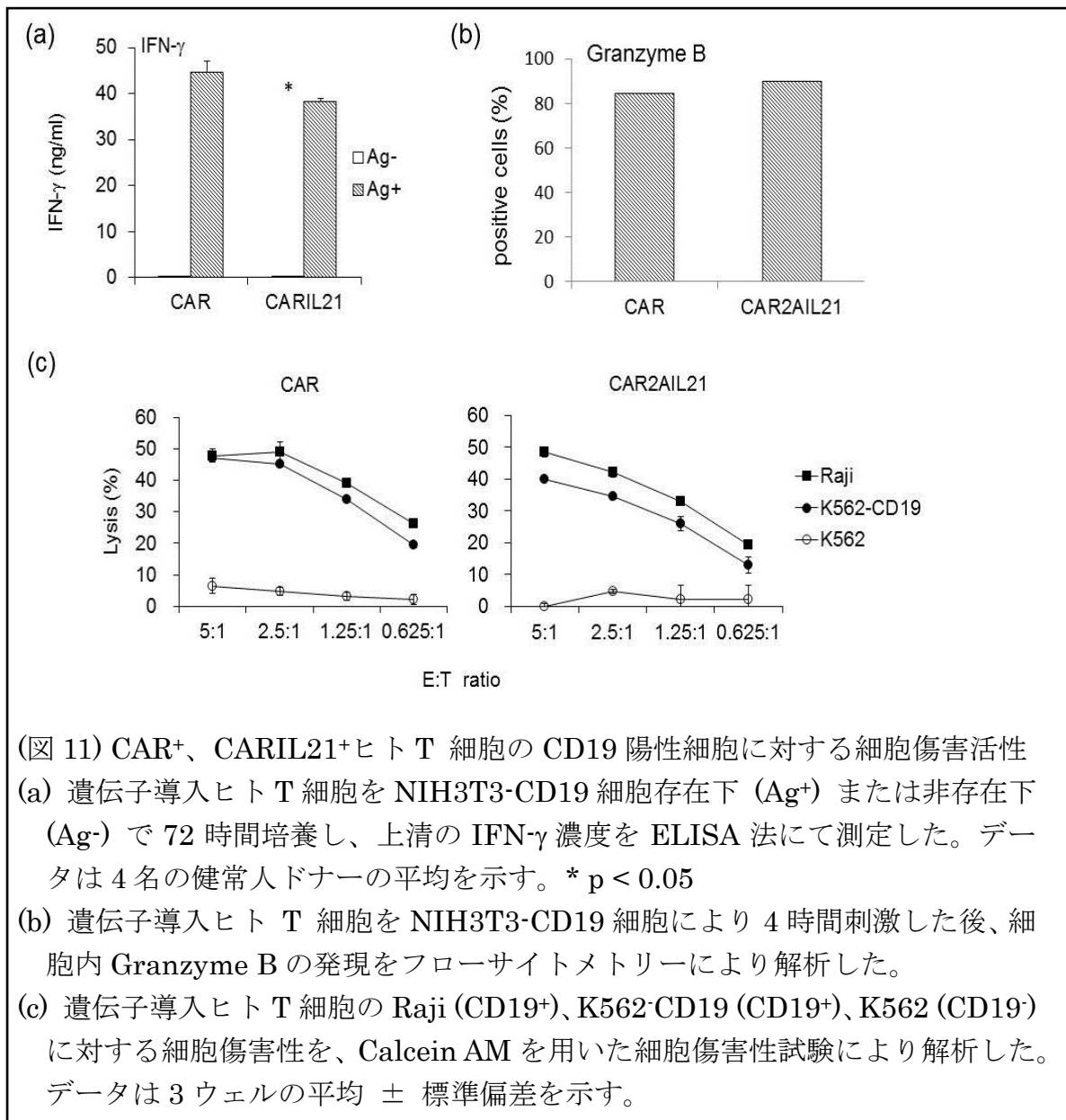
#### 4.4. フローサイトメトリーによる遺伝子導入ヒト T 細胞のサブセット解析

培養開始後 17 日目において、CAR<sup>+</sup>T 細胞と CARIL21<sup>+</sup>T 細胞は 99%以上で CD3 陽性を示し、かつ大部分の細胞は CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>であった。また大部分の細胞は CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>のセントラルメモリーT細胞 (Central memory T:CM) あるいは CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>のエフェクターメモリーT細胞 (Effector memory T:EM) の形質を示した。Romero らは CD27 と CD28 を用いた二重染色にてエフェクターメモリーT細胞を EM1~EM4 の 4 種類に分類することを提唱しており、未成熟な順に EM1 および EM4 は memory-like、EM2 は intermediate effector、EM3 は late effector の形質を示すことを報告している<sup>44</sup>。本研究では両細胞は主に CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>の EM1 と CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>の EM4 の形質を示した (図 10)。また、制御性 T 細胞の表面マーカーである CTLA-4 や疲弊マーカーの PD-1 はほとんどの細胞において陰性であった (data not shown)。全体として、CAR<sup>+</sup>T 細胞と CARIL21<sup>+</sup>T 細胞はそのサブセットにおいて明らかな相違は認められなかった。



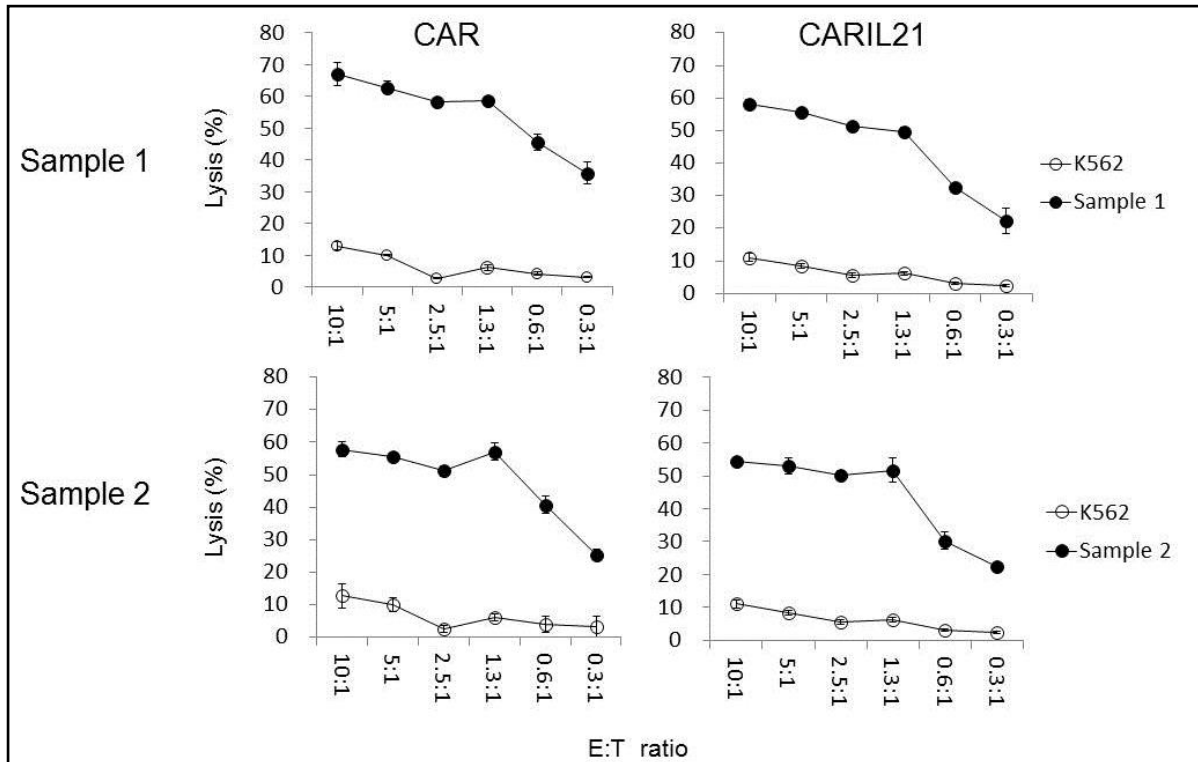
#### 4.5. 遺伝子導入ヒト T 細胞の CD19 陽性細胞に対する細胞傷害活性

CAR<sup>+</sup>T 細胞、CARIL21<sup>+</sup>T 細胞の CD19 陽性細胞に対する特異的な細胞傷害活性の評価を行った (図 11)。まず両細胞を NIH3T3-CD19 細胞で刺激し、上清の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法で測定した。CARIL21<sup>+</sup>T 細胞では CAR<sup>+</sup>T 細胞と比較してわずかに濃度が低い傾向にあった。また、Granzyme B の細胞内フローサイトメトリーでは、両細胞ともに 80%以上が陽性となった。Calcein AM を用いた細胞傷害性試験では、CAR<sup>+</sup>T 細胞、CARIL21<sup>+</sup>T 細胞はともに CD19 陽性 B 細胞リンパ腫株 Raji、CD19 強制発現赤芽球白血病株 K562 細胞に対して良好な細胞傷害活性を示し、両細胞では明らかな差は認められなかった。



#### 4.6. 遺伝子導入ヒト T 細胞の B 細胞腫瘍患者検体に対する細胞傷害活性

ヒト B 細胞腫瘍患者 2 例 (Sample 1: びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、Sample 2: B 細胞性急性リンパ性白血病) 由来の初代培養細胞をターゲット細胞として Calcein AM による細胞傷害性試験を行った。なお、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析では、Sample 1 では 78%、Sample 2 では 99 % の細胞が CD19 陽性を示した。CAR<sup>+</sup>および CARIL21<sup>+</sup>T 細胞はともにヒト B 細胞腫瘍患者由来の細胞に対して良好な細胞傷害活性を示したが、両細胞で有意な差は認められなかった (図 12)。



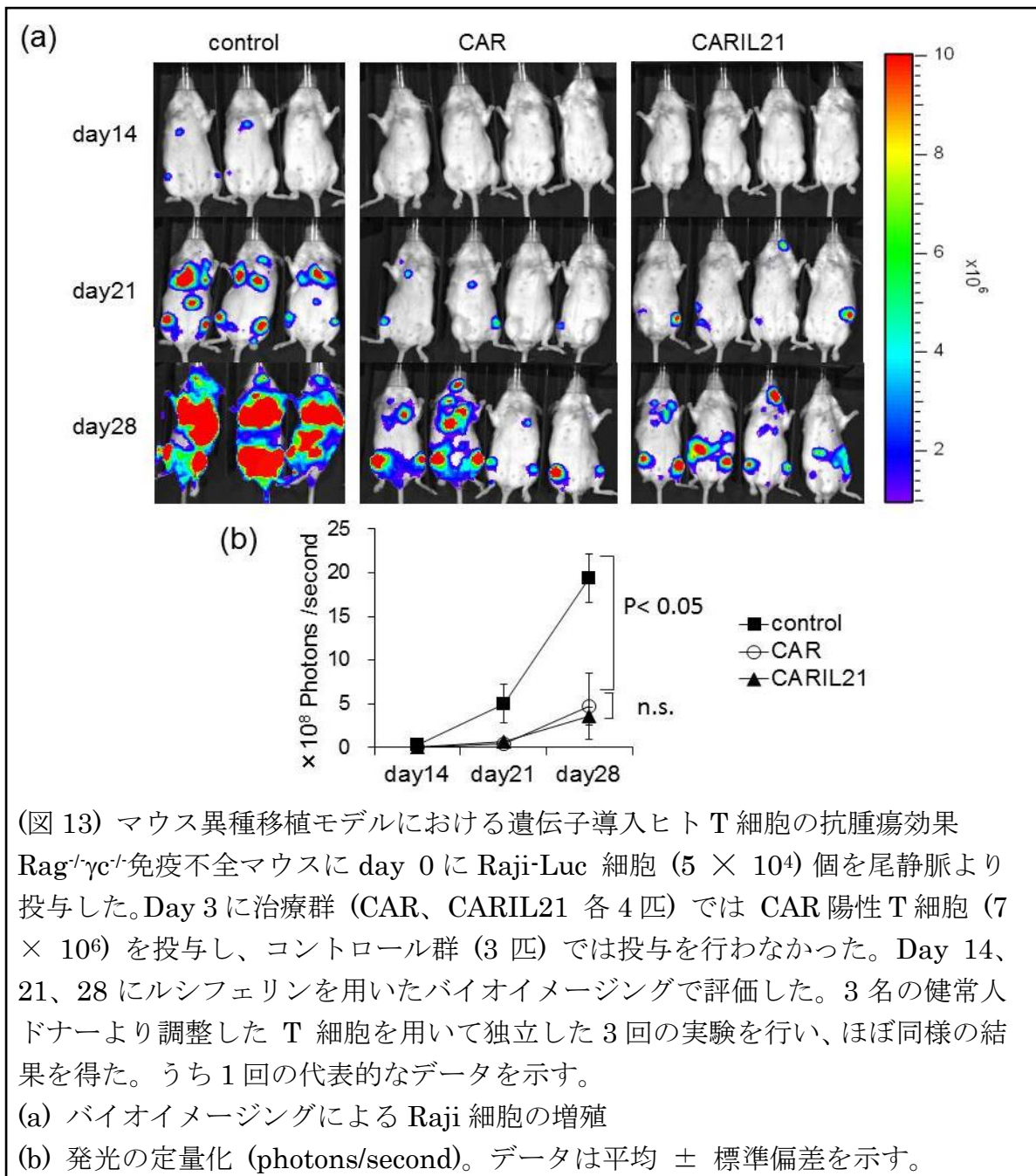
(図 12) CAR<sup>+</sup>、CARIL21<sup>+</sup>ヒト T 細胞の B 細胞腫瘍患者検体に対する細胞傷害活性

遺伝子導入ヒト T 細胞の細胞傷害活性を CD19 陽性 B 細胞腫瘍患者由来の初代培養細胞 (Sample 1: びまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫患者リンパ節、Sample 2: B 細胞性急性リンパ性白血病患者末梢血)、Calcein AM を用いた細胞傷害性試験により解析した。データは 3 ウェルの平均 ± 標準偏差を示す。

#### 4.7. ヒト B 細胞リンパ腫マウス異種移植モデルにおける遺伝子導入ヒト T 細胞の抗腫瘍効果

遺伝子導入 T 細胞の *in vivo* における B 細胞リンパ腫への抗腫瘍効果を確認するため、ヒト B 細胞リンパ腫マウス異種移植モデルによる動物実験を行った。腫瘍増殖の評価はルシフェラーゼ発現 Raji 細胞 (Raji-Luc) 移植系でのバイオイメージングにて行った。CAR<sup>+</sup>および CARIL21<sup>+</sup>T 細胞はいずれもコントロール群に比して、マウス生体内における Raji 細胞の増殖を有意に抑制し (図 13)、マウスの生存も延長したが (data not shown)、両群間で有意差は認められなかった。なお、遺伝子非導入リンパ球の投与は Raji の増殖を抑制しなかった (data not shown)。





## 5. 考察

CD28 を構造内に含む第二世代 CD19-CAR 遺伝子を発現させた T 細胞による養子免疫遺伝子療法は、難治性 B 細胞腫瘍に対する有望な新規治療の一つである。第二世代 CAR では、CD3 $\zeta$  鎖と CD28 により供給されるシグナル 1 と 2 により自己 T 細胞が活性化され抗腫瘍効果を発揮する。私は本研究において、第二世代 CAR の抗腫瘍効果をさらに増強するため、T 細胞の機能を高める $\gamma$ 鎖サイトカインの一つである IL-21 から供給されるシグナル 3 を導入することを試みた。また、IL-21 の全身的な副作用を回避し腫瘍局所で効果を発揮させる目的で、2A ペプチドを用いた共発現ベクターを併用の手段として用いた。共発現ベクターにより遺伝子導入されたヒト T 細胞において CD19-CAR と IL-21 の発現が確認され、産生された IL-21 の機能は STAT3 リン酸化アッセイにより確認された。

私は最初に、CAR 導入ヒトリンパ球の T 細胞サブセット解析を行った。CAR 発現 T 細胞による養子免疫遺伝子療法においては、輸注した細胞が生体内で長期間残存することが優れた抗腫瘍効果につながると考えられている。T 細胞の中でもナイーブ、セントラルメモリーなどのサブセットは、エフェクターメモリー、ターミナルエフェクターなどと比べて *in vitro* での細胞傷害活性は劣るものの、生体内での存続期間が長く、T 細胞治療において望ましいサブセットとされ

ている<sup>45,46</sup>。T細胞の表面に存在する接着因子 CD62L の発現は T細胞がセントラルメモリーからエフェクターメモリーに分化するにつれて失われるが、Hinrichらはマウス悪性黒色腫の T細胞療法において IL-2 および IL-21 の併用の効果を検討し、IL-21 は CD62L の発現を維持させる方向に働き、*in vitro* におけるエフェクター活性増強効果では IL-2 に劣るものの、*in vivo* において優れた抗腫瘍効果を示したことを報告している<sup>47</sup>。また Markleyらは、ヒト B細胞リンパ腫のマウス異種移植モデルにおいて、IL-21 がエフェクターメモリーのサブセットの中でもより未分化な EM1 (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) を増加させ、第一世代 CD19-CAR の *in vivo* における抗腫瘍効果を増強したことを報告している<sup>48</sup>。しかし、本研究では、CAR<sup>+</sup>および CARIL21<sup>+</sup>T細胞は共にセントラルメモリーあるいはエフェクターメモリーの形質を示し、IL-21 の併用は T細胞サブセットに影響を与えなかった。

次に私は、IL-21 が CAR 発現 T細胞の細胞傷害活性に与える影響について検討した。Singhらは、IL-21 により T細胞の IFN- $\gamma$  産生、Granzyme B の発現が高まると報告しているが<sup>49</sup>、Hinrichらは両者が抑制され *in vitro* での細胞傷害活性は低下すると報告しており<sup>47</sup>、実験系の違いなどにより結果は異なる。本研究では、CAR<sup>+</sup>および CARIL21<sup>+</sup>T細胞は CD19 陽性細胞株および CD19 陽性 B細胞腫瘍患者由来初代培養細胞に対して良好な細胞傷害活性を示したが、

IL-21 は CAR 発現 T 細胞の Granzyme B、IFN- $\gamma$ 、細胞傷害活性試験などの結果に大きな影響を与えなかった。

最後に私は、CAR<sup>+</sup>および CARIL21<sup>+</sup>T 細胞の *in vivo* での抗腫瘍効果を評価した。両細胞はともに CD19 陽性 B 細胞リンパ腫細胞の *in vivo* における増殖を有意に抑制したものの、IL-21 による増強効果は認められなかった。

本研究では、共発現ベクターを用いた CAR と IL-21 の併用は CAR 発現 T 細胞において STAT3 のリン酸化を惹起したものの、抗腫瘍効果は増強されなかった。Kaka らは MART-1 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の培養において、サイトメガロウイルスのプロモーター制御下に IL-21 を発現させることにより高いレベルの IL-21 発現に成功し、CD62L の発現維持と *in vivo* での抗腫瘍効果増強という結果を得ており<sup>50</sup>、本研究における IL-21 の発現レベルが不十分であった可能性も考えられる。しかし、第一世代 CD19-CAR と IL-21 を共発現ベクターにより併用した Markley らの報告では極めて低濃度の IL-21 でも優れた抗腫瘍効果が得られている<sup>48</sup>。本研究で使用した第二世代 CAR は第一世代と異なり T 細胞を十分に活性化させるため、IL-21 を組み合わせても上乘せ効果が得られなかった可能性が考えられる。

第二世代 CD19-CAR と IL-21 の報告としては、Singh らが、トランスポゾンを用いて第二世代 CD19-CAR を T 細胞に発現させ、培養の段階で抗原刺激のた

めのフィーダー細胞として用いる CD19 発現 K562 細胞に膜結合型 IL-21 を発現させることで抗腫瘍効果の増強が得られたことを報告している<sup>49</sup>。トランスポゾンによる遺伝子導入ではより長い培養期間を必要とするため、T 細胞の疲弊を防ぐ IL-21 の効果がより強く影響した可能性も考えられる。

また、本研究で使用した Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>免疫不全マウスでは、IL-21 の応答細胞である NK 細胞、NKT 細胞などが欠損しているが、免疫能の正常な動物ではそれらの細胞がメディエーターとして働き、CAR 発現 T 細胞の抗腫瘍効果を増強する可能性も考えられる。B 細胞リンパ腫では Rituximab がキードラッグの一つであり、その主たる作用機序は NK 細胞を介した ADCC であるため、IL-21 が NK 細胞に与える影響は無視できない。実際に、Timmerman らの再発難治性 B 細胞リンパ腫に対する IL-21 の臨床試験でも Rituximab が併用されている<sup>31</sup>。また、免疫能の正常な動物では CAR 発現 T 細胞の他に、CAR を発現していない T 細胞も多く存在しており、そのような状況下では IL-21 が効果的に働き、上乘せ効果が得られる可能性もある。また、CD19-CAR 発現 T 細胞の投与では、B 細胞腫瘍に対して強力な抗腫瘍効果が期待されるが、一方、その重大な副作用として、長期にわたり正常 B 細胞が欠失し、低ガンマグロブリン血症をきたすことが知られている。特に本研究は CD19-CAR 発現 T 細胞が生体内で長期に残存することを目的としており、このような状況下では B 細胞の欠失が

さらに遷延化する可能性があるが、本研究の実験系ではこれを評価することは不可能である。正常免疫マウスの B 細胞性白血病モデルとマウス CD19-CAR を用いた前臨床研究では、一時的に正常 B 細胞が消失してもその後回復するケース<sup>51</sup>、および回復しないケース<sup>52</sup>が報告されており、MSKCC の Davila らは、正常 B 細胞が長期に消失するものの骨髄や脾臓の progenitor B 細胞は僅かながら残存することを報告している<sup>53</sup>。

以上のように、CD19-CAR の前臨床試験として免疫不全マウスを用いることには一定の限界がある。抗腫瘍効果および副作用を正しく評価するためには、正常な免疫担当細胞が存在するような実験系での評価が必要である。一つの手段として、マウス B 細胞リンパ腫の同系移植モデルにおいてマウス CD19 をターゲットとした CAR を発現したマウス T 細胞を輸注し、マウス IL-21 の併用効果を検討する方法が考えられるが、マウスの免疫細胞やサイトカインがヒトとは異なる動態を示す可能性もある。これを解決する手段として、免疫不全マウスに CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植し、ヒトの免疫系を再構築して得られるヒト化マウスにヒト B 細胞リンパ腫を移植した腫瘍モデルを用いて本研究と同様にヒト CD19-CAR、ヒト IL-21 の治療効果を評価する方法は有用であると考えられる。

本研究では、IL-21 の共発現は CAR 導入 T 細胞の *in vitro* および *in vivo* で

の B 細胞リンパ腫に対する抗腫瘍効果を増強しなかった。第一世代と異なり、CD28 を構造内に含む第二世代 CAR は十分に T 細胞の効果を増強するため、サイトカインによる追加刺激を必要としない可能性が考えられた。ただし、CAR の効果が不十分な場合や免疫能の正常な動物の場合には IL-21 の上乘せ効果が得られる可能性もあり、評価系の構築を含めた検討が今後の課題である。

## 6. 結語

免疫不全マウスによる異種移植モデルを用いた私の実験系では、IL-21 の共発現は CD28 を構造内に含む第二世代 CD19-CAR を発現する T 細胞の B 細胞リンパ腫に対する抗腫瘍効果を増強しなかった。第二世代 CAR はサイトカインによる補助刺激を必要とすることなく十分に T 細胞を活性化するという点で第一世代 CAR より優れていることが示された。しかし、実際の臨床においては CAR の効果は個体により様々であり、生体内には IL-21 の主たる応答細胞である NK、NKT 細胞を始めとする多様な免疫担当細胞が存在するため、養子免疫遺伝子療法における IL-21 の役割に関しては評価系の見直しも含め今後のさらなる検討が必要である。



## 7. 参考文献

1. Phillips JH, Gemlo BT, Myers WW, Rayner AA, Lanier LL. In vivo and in vitro activation of natural killer cells in advanced cancer patients undergoing combined recombinant interleukin-2 and LAK cell therapy. *J Clin Oncol.* 5: 1933-1941, 1987.
2. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 233: 1318-1321, 1986.
3. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 319: 1676-1680, 1988.
4. Pule M, Finney H, Lawson A. Artificial T-cell receptors. *Cytotherapy.* 5: 211-226, 2003.
5. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, Kaiser AD, Pouw N, Debets R, Kieback E, Uckert W, Song JY,

Haanen JB, Schumacher TN. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med.* 16: 565-570, 561p following 570, 2010.

6. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, King PD, Larson S, Weiss M, Riviere I, Sadelain M. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.* 9: 279-286, 2003.

7. Zhao Y, Wang QJ, Yang S, Kochenderfer JN, Zheng Z, Zhong X, Sadelain M, Eshhar Z, Rosenberg SA, Morgan RA. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol.* 183: 5563-5574, 2009.

8. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* 18: 843-851, 2010.

9. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, Yeh R, Matsushita M, La Perle

K, Quintas-Cardama A, Larson SM, Sadelain M. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res.* 13: 5426-5435, 2007.

10. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood.* 118: 4817-4828, 2011.

11. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblatt T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 5: 177ra138, 2013.

12. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 368: 1509-1518, 2013.
13. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 3: 95ra73, 2011.
14. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 365: 725-733, 2011.
15. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, Maric I, Raffeld M, Nathan DA, Lanier BJ, Morgan RA, Rosenberg SA. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood.* 116: 4099-4102, 2010.
16. Kochenderfer JN, Yu Z, Frasheri D, Restifo NP, Rosenberg SA.

Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood*. 116: 3875-3886, 2010.

17. The world health organization classification of malignant lymphomas in japan: incidence of recently recognized entities. Lymphoma Study Group of Japanese Pathologists. *Pathol Int*. 50: 696-702, 2000.

18. Chakraverty R, Mackinnon S. Allogeneic transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol*. 29: 1855-1863, 2011.

19. Sondergaard H, Skak K. IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy. *Tissue Antigens*. 74: 467-479, 2009.

20. Ugai S, Shimozato O, Kawamura K, Wang YQ, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. *Cancer Gene Ther*. 10: 187-192, 2003.

21. Ugai S, Shimozato O, Yu L, Wang YQ, Kawamura K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Transduction of the IL-21

and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects. *Cancer Gene Ther.* 10: 771-778, 2003.

22. Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ, Hwu P. In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res.* 63: 9016-9022, 2003.

23. Moroz A, Eppolito C, Li Q, Tao J, Clegg CH, Shrikant PA. IL-21 enhances and sustains CD8<sup>+</sup> T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol.* 173: 900-909, 2004.

24. Sondergaard H, Frederiksen KS, Thygesen P, Galsgaard ED, Skak K, Kristjansen PE, Odum N, Kragh M. Interleukin 21 therapy increases the density of tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and inhibits the growth of syngeneic tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 56: 1417-1428, 2007.

25. Davis ID, Skrumsager BK, Cebon J, Nicholaou T, Barlow JW, Moller NP, Skak K, Lundsgaard D, Frederiksen KS, Thygesen P, McArthur GA. An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in

patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 13: 3630-3636, 2007.

26. Davis ID, Brady B, Kefford RF, Millward M, Cebon J, Skrumsager BK, Mouritzen U, Hansen LT, Skak K, Lundsgaard D, Frederiksen KS, Kristjansen PE, McArthur G. Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial. *Clin Cancer Res.* 15: 2123-2129, 2009.

27. Thompson JA, Curti BD, Redman BG, Bhatia S, Weber JS, Agarwala SS, Sievers EL, Hughes SD, DeVries TA, Hausman DF. Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 26: 2034-2039, 2008.

28. Schmidt H, Brown J, Mouritzen U, Selby P, Fode K, Svane IM, Cook GP, Mollerup DH, Geertsen PF. Safety and clinical effect of subcutaneous human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma: a phase I trial. *Clin Cancer Res.* 16: 5312-5319, 2010.

29. Grunwald V, Desar IM, Haanen J, Fiedler W, Mouritzen U, Olsen MW, van Herpen CM. A phase I study of recombinant human interleukin-21

(rIL-21) in combination with sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Acta Oncol.* 50: 121-126, 2011.

30. Steele N, Anthony A, Saunders M, Esmarck B, Ehrnrooth E, Kristjansen PE, Nihlen A, Hansen LT, Cassidy J. A phase 1 trial of recombinant human IL-21 in combination with cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 106: 793-798, 2012.

31. Timmerman JM, Byrd JC, Andorsky DJ, Yamada RE, Kramer J, Muthusamy N, Hunder N, Pagel JM. A phase I dose-finding trial of recombinant interleukin-21 and rituximab in relapsed and refractory low grade B-cell lymphoproliferative disorders. *Clin Cancer Res.* 18: 5752-5760, 2012.

32. Petrella TM, Tozer R, Belanger K, Savage KJ, Wong R, Smylie M, Kamel-Reid S, Tron V, Chen BE, Hunder NN, Hagerman L, Walsh W, Eisenhauer EA. Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol.* 30: 3396-3401, 2012.

33. Akamatsu N, Yamada Y, Hasegawa H, Makabe K, Asano R, Kumagai I, Murata K, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Tsuruda K, Sugahara K, Atogami S,



- Yanagihara K, Kamihira S. High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma. *Cancer Lett.* 256: 196-206, 2007.
34. Ma J, Ma D, Ji C. The role of IL-21 in hematological malignancies. *Cytokine.* 56: 133-139, 2011.
35. Sarosiek KA, Malumbres R, Nechushtan H, Gentles AJ, Avisar E, Lossos IS. Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 115: 570-580, 2010.
36. Gelebart P, Zak Z, Anand M, Dien-Bard J, Amin HM, Lai R. Interleukin-21 effectively induces apoptosis in mantle cell lymphoma through a STAT1-dependent mechanism. *Leukemia.* 23: 1836-1846, 2009.
37. Holst J, Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Burton AR, Workman CJ, Vignali DA. Generation of T-cell receptor retrogenic mice. *Nat Protoc.* 1: 406-417, 2006.
38. Zhen L, King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH, Dinanuer MC. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant

gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 9832-9836, 1993.

39. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*. 31: 1007-1014, 2003.

40. Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, Uchibori R, Ido H, Teruya T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J, Takesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K. CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*. 438: 84-89, 2013.

41. Rahman M, Nara H, Onoda T, Araki A, Li J, Hoshino T, Asao H. Cloning and characterization of an isoform of interleukin-21. *FEBS Lett*. 581: 4001-4009, 2007.

42. Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol*. 65: 2220-2224, 1991.

43. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A.

Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants.

*Clin Diagn Lab Immunol.* 8: 1131-1135, 2001.

44. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, Corthesy P, Devedre E, Speiser DE, Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol.* 178: 4112-4119, 2007.

45. Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, Sanchez-Perez L, Muranski P, Kern SJ, Logun C, Palmer DC, Ji Y, Reger RN, Leonard WJ, Danner RL, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8<sup>+</sup> T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 17469-17474, 2009.

46. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, Klebanoff CA, Johnson LA, Kerkar SP, Yang S, Muranski P, Palmer DC, Scott CD, Morgan RA, Robbins PF, Rosenberg SA, Restifo NP. Human effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from naive rather than memory subsets possess

superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*. 117: 808-814, 2011.

47. Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, Gattinoni L, Kerstann KW, Palmer DC, Klebanoff CA, Rosenberg SA, Leonard WJ, Restifo NP. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*. 111: 5326-5333, 2008.

48. Markley JC, Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood*. 115: 3508-3519, 2010.

49. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, Switzer K, Maiti S, Kebriaei P, Lee DA, Champlin RE, Cooper LJ. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res*. 71: 3516-3527, 2011.

50. Kaka AS, Shaffer DR, Hartmaier R, Leen AM, Lu A, Bear A, Rooney CM, Foster AE. Genetic modification of T cells with IL-21 enhances antigen presentation and generation of central memory tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes. *J Immunother*. 32: 726-736, 2009.

51. Kochenderfer JN, Yu Z, Frasheri D, Restifo NP, Rosenberg SA.

Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood*. 116: 3875-3886, 2010.

52. Cheadle EJ, Hawkins RE, Batha H, O'Neill AL, Dovedi SJ, Gilham DE. Natural Expression of the CD19 Antigen Impacts the Long-Term Engraftment but Not Antitumor Activity of CD19-Specific Engineered T Cells. *J Immunol*. 184:1885-1896, 2010.

53. Davila, ML, Kloss CC, Gunset G, Sadelein M. CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 8(4): e61338, 2013.

## 8. 謝辞

本研究の遂行と論文の執筆にあたり、温かいご指導ご鞭撻を頂きました内科学講座血液学部門の小澤敬也教授、常に丁寧なご指導により全面的にご支援くださった遺伝子治療研究部の塚原智典助教に心より御礼申し上げます。また、遺伝子治療研究部の久米晃啓准教授、水上浩明准教授、卜部匡司講師、免疫遺伝子細胞治療学講座の内堀亮介助教、照屋武志研究員、井戸寛之研究員、内科学講座血液学部門の大嶺謙講師、産科婦人科学の嵯峨泰准教授におかれましては、日々の実験をご指導頂きますとともに、カンファランスなどにおいても常に示唆に富むご指摘を頂きましたことに深く御礼申し上げます。レトロウイルスベクターSFG-1928zを提供下さった、米国メモリアル・スローン・ケタリング癌センターの Brentjens 博士、Riviere 博士、Sadelain 博士、また動物実験に使用した Balb/c Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>マウスをご提供下さった実験動物中央研究所の伊藤守先生に深い感謝の意を表します。また、自治医科大学共同実験機器センターの早川裕子博士にはフローサイトメトリー解析にあたり多大なるご助力を頂きましたことを御礼申し上げます。

研究の一部は、自治医科大学大学院医学研究科若手スタートアップ研究費の助成によって行われた。