

氏名	山本 千裕
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 466 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	CD19 特異的キメラ抗原受容体発現 T 細胞と IL-21 の併用による B 細胞リンパ腫の治療
論文審査委員	(委員長) 教授 大槻 マミ太郎 (委員) 教授 花園 豊 講師 木村 博 昭

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

第二世代 CD19 特異的キメラ抗原受容体 (CD19-specific chimeric antigen receptor: CD19-CAR) 発現 T 細胞を用いた養子免疫遺伝子療法は、難治性 B 細胞性腫瘍に対する有望な新規治療法である。本研究では、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。

### 2 研究方法

CD28 を構造内を含む第二世代 CD19-CAR 遺伝子である 1928z を搭載したレトロウイルスベクター (SFG-1928z) は Dr. Renier Brentjens (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) より提供された。これを基に 1928z 配列に 2A peptide を介してヒト IL-21 を連結した共発現ベクター (SFG-1928z-P2A-IL21) を作製した。両ベクターを用いて健常人由来末梢血単核細胞に遺伝子導入を行い、CD19-CAR 単独発現 (CAR+) T 細胞と CD19-CAR および IL-21 発現 (CARIL21+) T 細胞を作製した。機能解析として、フローサイトメトリーによる T 細胞サブセット解析、CD19 陽性 B 細胞リンパ腫株に対する細胞傷害性試験などを行った。また、Rag2<sup>-/-</sup> c<sup>-/-</sup> 免疫不全マウスとルシフェラーゼ発現 B 細胞リンパ腫株を用いた異種移植モデルにおいてバイオイメーキングによる抗腫瘍効果の評価を行った。

### 3 研究成果

CAR+ および CARIL21+ T 細胞はともに、CD19 抗原特異的に ex vivo で良好な増殖を示し、主に CD8 陽性の表現型を示した。CARIL21+ T 細胞のみにおいて IL-21 産生能が認められ、その機能は STAT3 リン酸化の亢進により確認された。いずれの細胞も B 細胞リンパ腫細胞株やヒト B 細胞腫瘍検体を用いた in vitro 実験およびヒト B 細胞リンパ腫のマウス異種移植モデルを用いた動物実験において CD19 陽性 B 細胞腫瘍に対する抗腫瘍効果を示したが、CAR+ T 細胞と比較して CARIL21+ T 細胞の明らかな優位性は認められなかった。

#### 4 考察

IL-21 遺伝子導入は T 細胞において STAT3 のリン酸化を惹起したが、CD19-CAR の抗腫瘍効果を増強しなかった。その理由として、第一世代と異なり、CD28 を構造内に含む第二世代 CD19-CAR は T 細胞を十分に活性化できるため、サイトカインによる追加シグナルを必要としない可能性が挙げられる。また、IL-21 の発現量が不十分であった可能性や、IL-21 の応答細胞である NK 細胞および CAR 非発現 T 細胞が存在しない免疫不全マウスを使用したことなどが考えられる。

#### 5 結論

免疫不全マウスによる異種移植モデルを用いた今回の実験系では、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。

### 論文審査の結果の要旨

第二世代 CD19 特異的キメラ抗原受容体 (CD19 CAR) 発現 T 細胞を用いた養子免疫遺伝子療法は、難治性 B 細胞性腫瘍に対する有望な新規治療法である。本論文では、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 細胞リンパ腫異種移植モデルにおいて、IL-21 の併用による B 細胞リンパ腫治療の可能性について検討した。

結果として、IL-21 遺伝子導入が CD19-CAR の抗腫瘍効果を増強するという当初期待された結果は得られず、negative result に終わったが、実験そのものは流れに従って的確にかつ精力的になされた。成果は自治医大紀要ではあるが論文としてまとめられており、研究目的を遂行するために十分な努力がなされたものとする。

ただ、免疫不全マウスを用いた本研究の実験系では、CAR 発現 T 細胞以外の免疫細胞の動態を見ることができないため、IL-21 が NK 細胞、NKT 細胞、CAR を発現していない T 細胞に与える影響や、B 細胞欠失などの副作用を評価することができず、実験そのものに限界があることも示唆された。今後の研究の方向性については、実験系についての再考も必要と考えられる。

### 最終試験の結果の要旨

1. ウイルスの力価を記述する必要がある
2. IL-21 の機能的評価として、STAT3 のリン酸化のみならず、その下流にある perforin、Granzyme B などの細胞外放出を測定する必要はないか

3. 免疫不全マウスを用いた実験の限界（CAR 発現 T 細胞以外の免疫細胞の機能を評価できない、B 細胞欠失などの副作用の評価ができない、など）と、それを踏まえた今後の方向性について、考察で述べる必要がある

以上すべての試問に対し、的確な回答が示され、必要な事項が本文、考察、文献などに追記された。申請者は本研究分野における十分な知識を有すると示され、またその真摯な態度も評価された結果、審査員全員一致で合格と判断された。