

## 主論文の要旨

### A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration

〔 テトラサイクリンシステムを用いた  
CD19CAR の発現コントロール 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

酒村 玲央奈

## 【背景】

CD19 に対するキメラ抗原受容体 (CD19CAR) を用いた遺伝子導入 T 細胞療法はすでに欧米にて臨床応用されており、再発・難治の B 細胞性悪性疾患などに対して有望な結果が報告されている。一方で CAR-T 細胞は体内で標的抗原が消失するまで細胞傷害活性が持続し、増幅・生存し続ける。さらにこの CAR-T 細胞はその標的抗原の発現が低度でも標的細胞を認識し傷害する。これらの特徴により持続する B 細胞低形成、低  $\gamma$  グロブリン血症さらには高サイトカイン血症による血球貪食症候群などが問題となることがあり、実際に臨床試験において死亡例も一部に見られる。これらの問題を解決すべく、今回我々は Tet-On inducible vector を用いてドキシサイクリン (Dox) の投与下で CD19CAR の発現およびその機能をコントロールすることを試みた。

## 【方法】

Retro-X Tet-One vector に CD19CAR-T2A-tEGFR を組み込み、Tet-CD19CAR を作製した。これをレトロウイルス・パッケージング細胞である Phoenix-Ampho 細胞に遺伝子導入し Tet-CD19CAR をコードするレトロウイルスを作製した。実際に Dox の投与によって CAR が発現誘導できるかを検討するために、このレトロウイルスベクターを用いてヒト T 細胞性白血病腫瘍株である SUP-T1 に Tet-CD19CAR を遺伝子導入・純化し、発現誘導に必要な Dox 濃度および発現動態を検討した。また、健常ドナー末梢血 CD8 陽性細胞に遺伝子導入を行い、Tet-CD19CAR T 細胞の Dox 応答性および細胞傷害活性、サイトカイン産生能、細胞増殖能などの各種 T 細胞機能について検討を行った。さらに vivo において Tet-CD19CAR T 細胞の機能を制御できるかどうか検討した。Raji 細胞を移植した NOD/Shi scid IL-2R $\gamma$  knock-out (NSG) マウスに  $5.0 \times 10^6$ /kg の Tet-CD19CAR 細胞を尾静脈より投与し Dox 投与の有無で腫瘍の縮小効果に差がみられるか IVIS imaging system で評価した。生存に関しても検討した。

## 【結果】

SUPTI-Tet-CD19CAR における検討では 100 ng/ml 以上の Dox 濃度にて CD19CAR を発現誘導しえた。さらに Dox 投与 12 時間で CD19CAR の発現はピークに達し、Dox 除去 24 時間で CD19CAR は最低値に達した。次に Tet-CD19CAR を健常ドナーの CD8 陽性細胞に遺伝子導入し、その機能について検討した。細胞傷害活性に関してはクロム放出試験 (Figure 1A and 1B) および共培養試験 (Figure 1C) で検討を行った。いずれの検討においても Dox 非投与下では、Tet-CD19CAR T 細胞は CD19-K562 に対して細胞傷害活性はほとんど認めなかったのに対して Dox 投与下では従来の CD19CAR-T 細胞 (CD19CAR OR) と同等の細胞傷害活性を示した (Figure 1A and 1C)。次にサイトカイン産生能を Intracellular IFN- $\gamma$  アッセイおよび ELISA で検討した。いずれにおいても Dox 投与下では Tet-CD19CAR T 細胞を CD19-K562 細胞で刺激すると CD19CAR OR T 細胞と同等のサイトカイン産生を認めたが、Dox 非投与下では Tet-CD19CAR T 細胞はほとんどサイトカインを産生しなかった。さらに CAR-T 細胞の反応性増殖に

関して検討した。Dox 投与下では Tet-CD19CAR T 細胞を CD19-K562 細胞で刺激すると CD19CAR OR T 細胞と同等の反応性増殖を示す一方で Dox 非投与下では反応性増殖は認められなかった (Figure 2A)。Stimulator 細胞を Raji (Figure 2B) や SU-DHL-6 (Figure 2C) にかえても同様な結果が得られた。最後に vivo における検討を行った。Dox の投与を受けなかったマウスの腫瘍は Tet-CD19CAR T 細胞を投与しても増悪した。その反面、Dox 投与を受けたマウスの腫瘍は Tet-CD19CAR T 細胞の投与により Dox 非投与群と比較し有意に縮小した ( $P < 0.01$ , one-way ANOVA)。生存に関しても Dox 投与群は Dox 非投与群のマウスと比較し有意に延長した ( $P < 0.0001$ , log-rank test)。

### 【考察】

本研究では Tet-On inducible system を用いることで薬剤の投与により CD19CAR の発現および CD19CAR-T 細胞の機能をコントロールできることを示した。一方で Dox 非投与下でもごくわずかに CD19CAR の発現やわずかな細胞傷害活性を認めるなど、いわゆるバックグラウンドの発現が確認された。これはクロム放出試験など Tet-CD19CAR T 細胞と標的細胞が短期間で共培養される際に認められる傾向にあった。共培養試験のように 96 時間以上と長時間培養すると Dox 非投与下では Tet-CD19CAR T 細胞はほとんど標的細胞を傷害しなかった。これは長時間培養により T 細胞がサイトカイン産生能などの機能を失い細胞傷害活性がみられなくなると考えられた。CAR-T 細胞の主要な問題点は上記した On-target/Off-tumor 効果であり、新たな CAR-T を設計する際には適切な腫瘍関連抗原 (TAA) を標的にする必要がある。本システムを用いて自由に CAR の発現をコントロールすることが出来れば、これまで On-target/Off-tumor 効果のために設計困難と考えられていた TAA に対する CAR-T 作製の解決策の一つとなり得る可能性が示唆された。

### 【結論】

Dox の投与により Tet-CD19CAR T 細胞の機能を vitro および vivo のいずれの環境下でも制御できた。本システムは臨床における CAR-T 細胞療法の有害事象低減に寄与する可能性が示唆された。さらに本システムを用いることで他の悪性疾患に対する CAR-T 細胞療法の道も開ける可能性も示唆された。