急性リンパ性白血病に対する CAR-T 細胞療法

平松英文¹, 加藤 格¹, 梅田雄嗣¹, 足立壯一², 滝田順子¹

¹京都大学大学院医学研究科発達小児科学

²京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

悪性腫瘍に対する免疫療法の歴史は古いが、ほとんどの場合その効果は限定的で治療の中心にはなり得なかった。chimeric antigen receptor-T (CAR-T) 細胞は、主として抗体の可変部位と T 細胞受容体の細胞内ドメインからなるキメラ抗原受容体を T 細胞に強制発現させた細胞で、抗原提示細胞の介在を必要とすることなく、抗体由来の抗原特異性で活性化される。初期の臨床試験では目立った効果が得られなかったものの、CD19 を標的とした第 2 世代 CAR-T 細胞療法は、再発/難治の急性リンパ性白血病に対して優れた効果を発揮することが示された。一方で重篤なサイトカイン放出症候群 (cytokine release syndrome, CRS) や神経症状の合併など、安全性に関して克服すべき問題点も多い。本稿では CAR-T 細胞の開発の経緯と臨床応用の現状、さらには今後について概説した。(日本造血細胞移植学会誌 9(4): 93-99, 2020.)

緒言

1960 年代、小児急性リンパ性白血病 (ALL) の生存率は 10% にも満たなかったが、中枢神経白血病に対する聖域療法、臨床症状や治療反応性、遺伝子異常などリスク分類に基づいた治療の層別化、さらには合併症対策などの支持療法の進歩などにより、この半世紀の間に長期生存率は 80~90% にも達し、最も治りやすいがんのひとつとなった¹⁻³。一方で再発/難治 ALL の成績は未だ満足できるものではなく、長期生存率は 40% 足らずにとどまり、なかでも早期再発などの高リスクグループでは、ほとんどが救命できないのが現状である^{4,5}。小児再発 ALL は、小児急性骨髄性白血病や横紋筋肉腫の初発患者と同程度の発生頻度があり、一般に予後良好な小児がんの中にあって予後不良の病型であることから、新規治療法の開発が強く望まれている。

がんと免疫の関連について

感染の合併により腫瘍の縮小が見られたという逸話的な記載が散見されるなど、がんと免疫の関連性は古くより経験的に推定されていた。1890 年代、米国の外科医であった William Coley は人為的に感染症をおこすことで腫瘍を縮小

させることができると考え、死菌の混合物 (*Streptococcus pyogenes* and *Serratia marcescens*)、いわゆる Coley's toxin を腫瘍患者に投与した⁶。有効性を主張する向きもあり、20 世紀後半まで Coley's toxin の投与は続けられたものの、効果は一定せず、最終的に有効性は確認されなかった。しかしながら、免疫応答による腫瘍縮小の可能性を最初に臨床で試みられた例となった。その後、基礎的研究が進むにつれ免疫と腫瘍の関連性が徐々に明らかにされた。1950 年代には免疫系ががん細胞を監視して制御しているとする cancer immunosurveillance theory が提唱された。1970 年代にハイブリドーマの技術が確立し、モノクローナル抗体が登場した。1980 年代になるとインターフェロン γ が Hairy cell leukemia に使用され、免疫を利用したがん治療への本格的な幕開けとなり、1990 年代には腎細胞がんに対する IL-2 の使用が行われた。また、T 細胞の抑制因子である CTLA-4 の機能もこの頃明らかにされた。2010 年代、転移性前立腺がんに対する樹状細胞ワクチン (sipuleucel-T) が登場し、続いて PD-1 阻害薬 (nivolumab) など免疫チェックポイント阻害剤が登場するに至って、がん治療に免疫を利用する試みが一気に進歩した。このような中、大きな期待をもって登場したのが CAR-T 細胞療法である (Figure 1)。

Submitted June 19, 2020; Accepted June 23, 2020; Published online, October 15, 2020. (Handling Editor: Yoshihiro Inamoto, National Cancer Center Hospital)

Key words: relapsed/refractory ALL, cancer immunotherapy, CAR-T

Correspondence: Hideo Hiramatsu, Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine Kyoto University, 54 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan. E-mail: hiramatsu@kuhp.kyoto-u.ac.jp

dx.doi.org/10.7889/hct-20-004 © The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.

Figure 1. History of cancer immunotherapy

CAR-T 細胞の開発

近年開発された免疫療法が主として固形がんをその対象としていたが、2012年フィラデルフィア小児病院で、2回の治療中再発をきたした小児ALLの患者にCD19を標的としたCAR-T細胞療法が施行された⁷。同患者はその後も後治療を受けることなく長期にわたって寛解を維持したことがセンセーショナルに報道され、CAR-T細胞に対する期待が一気に高まった。

CAR-T細胞開発のコンセプトは今から30年以上前に遡る。通常のT細胞は抗原提示細胞により腫瘍組織適合性複合体 (major histocompatibility complex, MHC) 上に提示されたペプチドに対し、T細胞受容体 (T cell receptor, TCR) によりこれを認識するが、非自己と認識された場合、細胞内のTCR-CD3複合体を通じて細胞内に活性化シグナルが伝達され、サイトカイン産生や細胞障害性を発揮する。その際、抗原提示細胞からTCRによる刺激 (シグナル1) のほかにCD80/86-CD28に代表されるco-stimulation (シグナル2) を受け取ることで、T細胞に十分な活性化がおり、T細胞の増殖や長時間の活性化状態を維持することができる (Figure 2A)。この巧妙に制御された機構によって潜在的に強大な細胞障害性をもつT細胞は容易には活性化されず、かつ、高い特異性をもつT細胞クローンのみが活性化される。これは、T細胞が認識する抗原がわからない限り、がん細胞を標的として多くのT細胞クローンを活性化して治療に繋げることは簡単ではないことを意味する。1989年、Weizmann研究所のEshharらは抗TNP (2,

4, 6-trinitrophenyl) 抗体の可変部位とTCRの定常部位の遺伝子の断片を融合させ、マウスのT細胞に強制発現させたところ、このキメラ分子をもつT細胞は、TNPを有する標的細胞を傷害し、IL-2産生も見られたことから、MHC非依存的で抗原特異的なT細胞の活性化に成功したと報告した⁸。彼らは論文のディスカッションに「このアプローチは細胞傷害性T細胞を腫瘍やウイルス感染細胞をターゲットに仕向けることが可能であり、がん抗原をターゲットとすることでヒト腫瘍制圧に利用できる」と締めくくった。このコンセプトを利用して、実際、米国において臨床応用がなされた。

CAR-T 細胞の臨床応用

初期のCAR-T細胞療法は、第1世代CAR-Tとよばれる免疫グロブリンの可変部位とTCR-CD3複合体のうち鎖を結合させたキメラ遺伝子を用いて行われた (Figure 2B)。当初、腎細胞がん、卵巣がんなどの固形腫瘍に対して臨床試験が組まれたが、CAR-T細胞が腫瘍に集積していることが確認されたケースなどを認めたものの、臨床的に意義のある結果は得られなかった^{9,10}。輸注細胞数が少なかったことや、CAR-T細胞の体内での増幅が乏しかったこと、また、標的とする腫瘍抗原などの再考がなされ、前述のシグナル2を組み込んだ第2世代CAR-T細胞の開発が行われた。また、標的抗原を模索する中で、リンパ系腫瘍、特に慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) や非ホジキン悪性リンパ腫に第2世代CAR-T細胞療法が効

Figure 2. (A) T cell activation, (B) CAR constructs

果を示すことが徐々に示され、CD19 CAR-T 細胞を用いた B 細胞系悪性腫瘍に対する試験に期待が集まった。そのような中、フィラデルフィア小児病院のグループが小児 B 前駆細胞型 ALL の再発患者 2 名に、シグナル 2 として 4-1BB を用いた第 2 世代 CAR-T 細胞療法を施行し、長期寛解を得たことを報告した⁷。このグループはのちに全米で小児 25 人と成人 5 人の合わせて 30 人の再発/難治 B 前駆細胞型 ALL 患者に対し、同じく CD19 を標的とした第 2 世代 CAR-T 細胞療法試験を施行し、6 か月時点での生存率が 78% という成績を報告したが¹¹、対象患者のうち 60% が造血細胞移植後の再発で、70% 以上が 2 回以上の再発患者であることを考慮すると、驚異的な成績であり世界中の注目を集めた。同グループの CAR-T 細胞療法は、ノバルティス社によって 11 か国 25 施設を含むグローバル治験へと発展した。小児/若年成人の急性リンパ性白血病を対象とした同試験 (ELIANA 試験) に、日本からは我々の施設が参加した。このグローバル試験では CAR-T 細胞の製造は米国内の単一施設で行われたため、多数の施設からの製造タイミングの調整や、細胞は凍結して空輸されるため製造期間の長期化のリスクなどの懸念があったが、結果は北米での検討と遜色なく、60% の患者において長期にわたり寛解が維持されることが確認された¹¹。本治験の結果などから 2019 年 3 月、我が国においてノバルティス社の CAR-T 細胞 (Tisagenlecleucel) が保険収載された。

CAR-T の副作用

従来の治療では治癒が難しい患者に対し高い有効性を示

す CAR-T 細胞治療であるが、その一方で様々な合併症が報告されている。なかでも注目すべきはサイトカイン放出症候群 (cytokine release syndrome, CRS) で、CAR-T 細胞が標的分子により活性化される結果、大量のサイトカインが放出されることで全身性の炎症に基づく様々な症状が引き起こされる¹²。特に、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 、などの炎症性サイトカインにより、高熱、低酸素血症、血圧低下、腎機能障害、消化器症状、肝機能障害、さらには骨髄抑制、凝固障害などその症状は多岐にわたる。前述の米国における 30 名に対する CAR-T 細胞療法試験¹³では、輸注を受けた 30 症例の全ての患者で CRS が観察され、うち 22 例は中等症であったが、8 例が重症となり、発症の中央値は前者で輸注後 4 日、後方で輸注後 1 日と早期発症と重症度の関連性が観察された。もうひとつの重要な合併症が神経症状である。神経症状は高用量 IL-2 投与の際にも合併しうることが知られており、免疫学的な背景が推察されている。CAR-T 細胞療法においては必ずしも CRS に合併するとは限らず、CRS がおさまってから発症する例が少なからずあることから、CRS とは異なった発症メカニズムの存在が推定されている¹⁴。主な症状は頭痛、意識レベルの変化、錯乱、幻覚、失語、失調、失行、麻痺、痙攣などで、前述の米国における試験では、30 例のうち 13 例がなんらかの神経症状を発症したが、いずれも self-limiting で重篤な後遺症はなかったと報告されている。一方で、133 人の成人 B 細胞系造血腫瘍に対して行われた、CD28 を使用した第 2 世代 CD19 CAR-T 細胞療法では、4 名の致死的神経症状 (脳浮腫) が経験され、試験が中止となった。原因は特定されなかったが、病理的に脳血管の内皮障害が確認され¹⁵、神経

症状は CAR-T 細胞治療において特に注意すべき合併症として認識されている。

CRS に対する治療

CRS に対する治療は活性化した CAR-T 細胞を抑制することを目的としていることから、当初は早期から積極的に介入することは避けられる傾向もあったが、極めて重篤になりうることから遅滞なく行う必要がある。研究グループによって若干の差異はあるものの、大まかには症状に応じて、全身の支持療法と抗サイトカイン療法として IL-6 受容体阻害薬であるトシリズマブ投与、さらにステロイド投与からなる¹⁶。以下に概要を示す。

Grade 1 生命を脅かすような症状ではなく、対症療法のみ要する

例：発熱、嘔気、倦怠感、頭痛、筋痛

Grade 2 中等度の治療介入に反応する

40% 未満の吸入酸素、輸液負荷もしくは低用量の昇圧剤に反応する低血圧

Grade 2 までの臓器障害

Grade 3 より強度の高い治療介入を要する

40% 以上の吸入酸素、高容量の、もしくは 2 種類以上の昇圧剤を要する

Grade 3 の臓器障害もしくは Grade 4 のトランスアミナーゼ上昇

Grade 4 生命を脅かす症状

人工呼吸管理を要する、もしくは Grade 4 の臓器障害

Grade 5 死亡

Grade 3 以上もしくは 2 でも急激な臨床症状の進行がある場合、トシリズマブを投与する。速やかな反応が得られない場合、ステロイドの投与、複数回のトシリズマブ投与と積極的な呼吸循環サポートを行う。

我が国での経験

我々の施設では 2016 年より ELIANA 試験に参加し、2018 年 4 月の時点で 9 例の患者のスクリーニングを行った。白血病の進行のため、うち 8 例を登録し、6 例に関して輸注を行った。**Figure 3** に CAR-T 細胞療法の流れを示す。ポイントとして、患者末梢血からアフエレーシスによりリンパ球を得る必要があるため末梢血中のリンパ球数が一定数保たれること、芽球の急激な増加がなく化学療法を一定期間中止できる状態であることが必要である。また、CAR-T 細胞製造に 6~8 週間の期間が必要となるが、この期間、白血病を寛解に至らずともコントロールできている必要があ

る。我々の治験においても 1 例の患者では病状の進行のため、残念ながら輸注に至らなかった。また、製造段階においても、CAR-T 細胞が数的、機能的に不十分であるなど、いわゆる manufacturing failure に陥る事例があり、我々も残念ながら 1 例で経験したが、原因は特定されていない。輸注に至った 6 例のうち、4 例が寛解に至り、いずれもフローサイトメトリーによる微小残存病変陰性の寛解であった。一方、6 例全例で Grade 3~4 の有害事象を認めた。主なものは CRS 5 例 (Grade 3: 2 例, Grade 4: 3 例), 白血球減少 5 例 (Grade 3: 2 例, Grade 4: 3 例), 感染 5 例 (Grade 3: 2 例, Grade 4: 1 例), 腫瘍崩壊症候群 2 例 (Grade 3: 2 例) が挙げられるが、ほとんどの症例で ICU での治療を必要とした。幸い、CRS による死亡例は経験しなかったが、高度な骨髄抑制から感染症も重篤となりやすいなど、集中治療部、感染制御部など多診療科/診療部との連携が極めて重要であった。

CAR-T の問題点とこれから

CAR-T 細胞療法は極めて予後不良な患者に対して高い治療効果を発揮しうる新しい治療法ではあるが、一方で、重篤な合併症も少なからず経験し、その予防法など不明な点も多い。現状でのトピックスを幾つか列挙した。

1. 安全性の向上

CAR-T 細胞療法では、様々な合併症がおりうるが予測困難である。CRS は disease burden が多い患者でリスクが高いとされており^{13,17}、適切な病期での治療が CRS の予防に繋がる可能性がある。また、現状では抗サイトカイン療法としてトリシズマブとステロイド以外の薬剤の有効性は確立していないが、IL-1 をはじめとして他の炎症性サイトカインや免疫細胞を標的とした治療法の有効性が想定されている。また、活性化した CAR-T 細胞そのものを排除する目的で、薬剤による速やかな CAR-T 細胞の死滅を目的とした自殺遺伝子の導入を研究しているグループもある^{18,19}。

2. 再発

CAR-T 細胞療法後の再発は当初、CAR-T 細胞の十分な増殖が体内で見られなかったことが主な理由であると考えられていたが、CD19 CAR-T 細胞療法の経験では、CD19 陰性クローンの出現がむしろ主な原因であると考えられつつある。CD19 陰性再発では、白血病細胞の CD19 のエクソンに変異がみられ、細胞表面上に発現が見られないあるいは変異蛋白が発現しているため、CAR-T 細胞にもはや認識されなくなっていることが報告されている²⁰。このような例に対し、再発後も発現が保たれる CD22 に対する CAR-T 細胞

Figure 3. CAR-T work flow

治療が試みられ、有効性が報告されている²¹。しかしながら、CD22 発現が低下したクローンによる再発も経験され、CD19 と CD22 に対する dual CAR-T 細胞療法の試みなどが始まっている。

3. universal CAR-T

CAR-T 細胞の製造には患者由来のリンパ球が使用される。しかしながら、乳児や濃厚な治療を受けた患者ではブラッドアクセスの問題や末梢血中のリンパ球数が少ないことで、アフェレーシスが困難である。英国のグループは患者とは異なる健康成人のリンパ球を用いて CAR-T 細胞を製造し、GVHD の発症を防ぐ目的で遺伝子編集技術によって TCR α 鎖を破壊した上で、乳児白血病の患者の治療を行った²²。現在、国際的に治験が進行中であるが、現実的には GVHD が起こりうること、自家 CAR-T 細胞と異なり、患者体内での CAR-T 細胞の持続期間が短いことから、CAR-T 細胞治療後に造血幹細胞移植が必要となり、移植までの bridging therapy の位置づけとされている。しかしながら、患者からのアフェレーシスを必要とせず、細胞はいつでも使用可能な off-the-shelf 製品であることから輸注時期が自由に選択できるなど、大きな利点を有しており、今後の進展が待たれる。

4. 他の悪性腫瘍への応用

CD19 CAR-T 細胞療法の大きな成功を踏まえ、欧米や中国を中心に数多くの CAR-T 細胞療法の試験が進行中である。2019 年 3 月の時点で ClinicalTrials.gov で chimeric antigen receptor で検索すると 357 件の臨床試験が検索され、造血器腫瘍に限らず、固形腫瘍に対する試験が数多く進行/計画中である。標的として検討されているものの一例を Figure 4 に示した。

- CD19
- BCMA (multiple myeloma)
- CD19/22
- HER2 (CNS tumor)
- CD7 (CAR-NK)
- GD2 (neuroblastoma)
- CD30
- EGFRvIII (Glioma)
- NKG2D ligand (AML)
- Glypican 3 (pediatric solid tumor)
- CD33 (AML)
- ⋮

Figure 4. Targets for CAR

おわりに

がんに対する免疫療法の観点から、CAR-T 細胞療法の開発について概説した。近年の B 細胞系造血器腫瘍に対する CAR-T 細胞療法の効果にはめざましいものがあるが、一方でサイトカイン放出症候群に代表される重篤な合併症のリスクや、CAR-T 細胞療法後の再発の問題、また、準備に時間がかかるため適応を見極めるのが難しいなど、解決すべき問題は多い。早急にこれらの課題を解決し、CAR-T 細胞による新たながん治療の時代が一刻も早く到来することを願っている。

著者役割

CAR-T 治験の遂行, 論文本文作成: HH。

CAR-T 治験の遂行, 論文作成支援: IK, KU, SA, JT。

利益相反の開示

本論文において開示すべき利益相反はありません。

文献

- Horibe K, Saito AM, Takimoto T, et al. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006–2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol*. 2013; **98**: 74–88.
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006; **354**: 166–178.
- Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015; **373**: 1541–1552.
- Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol*. 2005; **23**: 7942–7950.
- Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol*. 2010; **28**: 2339–2347.
- Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins. *Practitioner*. 1909; **83**: 589–613.
- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013; **368**: 1509–1518.
- Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; **86**: 10024–10028.
- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006; **12**: 6106–6115.
- Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol*. 2006; **24**: e20–e22.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018; **378**: 439–448.
- Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*. 2016; **127**: 3321–3330.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014; **371**: 1507–1517.
- Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*. 2018; **24**: 739–748.
- Gust J, Hay KA, Hanafi LA, et al. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov*. 2017; **7**: 1404–1419.
- Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014; **124**: 188–195.
- Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19–28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2014; **6**: 224ra25.
- Paszkiwicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest*. 2016; **126**: 4262–4272.
- Zhou X, Dotti G, Krance RA, et al. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*. 2015; **125**: 4103–4113.
- Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015; **5**: 1282–1295.
- Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. 2018; **24**: 20–28.
- Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017; **9**: eaaj2013. doi: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.

CAR-T cell therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia

Hidefumi Hiramatsu¹, Itaru Kato¹, Katsutsugu Umeda¹, Souichi Adachi², Junko Takita¹

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine Kyoto University

²Human Health Sciences, Graduate School of Medicine Kyoto University

Abstract

Although cancer immunotherapy has long been studied, its efficacy was largely unproven until recently. CAR-T cells are T cells transduced with a chimeric protein consisting of immunoglobulin variable regions and cytoplasmic domains of the T cell receptor. CAR-T cells can be activated without antigen-presenting cells, exhibit cytotoxicity, and produce cytokines. Although early clinical trials of these cells failed to show efficacy, second-generation CAR-T cells targeting CD19 are highly effective for treatment of refractory/relapsed acute lymphoblastic leukemia. However, safety issues such as severe cytokine release syndrome and neurological toxicities are major concerns. Here, the history of the development of CAR-T cells and clinical experiences with CD19-directed CAR-T cell therapy are reviewed, and the near future of this new therapy is discussed. (Journal of Hematopoietic Cell Transplantation 9(4): 93-99, 2020.)