

現実的な CAR T 細胞療法の 前臨床解析を実現する

著者：James Keck, Ph.D., Senior Director, Innovation and Product Development

Brian Soper, Ph.D., Senior Scientific Engagement Manager

翻訳：順天堂大学国際教養学部 久原 孝俊

緒言

2017年にCAR（キメラ抗原受容体）T細胞療法が初めてFDA（米国食品医薬品局）によって承認されて以来、この有望な免疫療法は躍進をつづけてきた。既存のCAR T細胞療法は、いくつかの血液のがんの治療において、大きな成功を収めてきた。研究者は、この療法をさらに固形腫瘍やその他のがんに応用する方法について研究をつづけている。CAR T細胞療法は、他の治療が奏功しない患者たちに希望を与えるものである。

しかし、CAR T細胞は生きた免疫細胞であり、患者に再移入される前に大きく修飾されているので、体内でどのような相互作用を及ぼすかをコントロールしたり予測したりすることはむずかしい。もし腫瘍細胞以外の正常な細胞が腫瘍関連抗原（オフターゲット）を発現している場合は、T細胞は、健康な組織を破壊する機構となり得る。さらに、これらの免疫細胞（T細胞）は、それ自体がサイトカインとよばれるシグナルタンパク質を大量に放出したり、あるいは他の細胞にそのようなサイトカインを大量に放出させたりすることができる。その結果、サイトカイン放出症候群（CRS）とよばれるカスケード効果をひき起こす可能性がある。CRSはコントロールすることがむずかしい場合があり、全身性の症状をひき起こすこともある。たとえば、発熱や炎症から臓器不全や死にいたるまでさまざまである。白血病患者の77～93%、リンパ腫患者の37～93%がCAR T細胞療法を受けた後にCRSを経験している。さらに、初期のCAR T細胞療法の治験を受けた患者の約50%は、ICUでの管理が必要であった¹。患者へのリスクに加えて、治験の失敗ならびにその結果生じる遅滞によって、時間、財源、ならびに薬剤開発会社への公共の善意に大きな損失がもたらされる。

このようなリスクや失敗を避けるためには、科学者には適切な前臨床研究のためのプラットフォームが必要になる。

すなわち、人間の患者にリスクを及ぼすことなく、迅速で再現性のある、実施可能な現実的な結果が必要なのである。ヒト化マウスモデルを用いて、CAR T 細胞のはたらきや効果を in vivo において研究することによって、研究者は、CAR T 細胞療法が細胞数および細胞ドナーとの関連において、全生物系とどのように相互作用するか総合的に理解することができるようになる。このような情報を得ることによって、臨床家および治療法開発者は、CAR T 細胞療法が、臨床試験を受ける患者のみならず、CAR T 細胞療法を受ける患者にとっても、安全かつ有効であるという大きな自信をもつことができるようになる。

他の CAR T 細胞前臨床研究の限界を克服する

CAR T 細胞に関する既存の研究方法では、人間の被験者を利用した研究を除けば、個体の多様性、全身性の相互作用、ならびに臨床においてみられる CAR T 細胞療法の毒性や効果に影響を及ぼすヒト細胞のユニークな特性を理解することはできない。本論文においては、それぞれの研究タイプに内在する制約および課題について調べ、免疫系をヒト化したマウスモデルを用いた in vivo の研究を利用して、それらの制約や課題を克服する方法について記載する。

In vitro の試験は行き詰まっている

In vitro での CAR T 細胞試験においては、一般的に、CAR T 細胞をがん細胞およびヒト末梢血単核細胞（PBMC）と共培養する。このようにして、科学者は、細胞毒性やサイトカイン産生のような安全性にかかわるアウトカムのみならず、CAR T 細胞が個々のがん細胞を殺滅する効果も調べることができる。

このような研究は、比較的、費用がかからず効率もよい。したがって、CAR T 細胞開発の初期段階においては、迅速なフィードバックを得るのに有用である。しかし、サイトカイン放出症候群のような毒性は、注射された CAR T 細胞が最初に相互作用する循環血液細胞以外の系に影響を及ぼすカスケード反応である。このような全身性の反応に関しては、科学者は、in vitro の系を利用してオフターゲット効果について研究したり、閉鎖系において臓器障害や神経毒性といったダウンストリーム効果をモデル化したりすることはできない。すなわち、in vitro の試験においては、CAR T 細胞療法がどのように生きている患者に影響を及ぼすかということに関する総合的な実態を得ることはできない。

In Vitro	In Vivo
✔ 分離した免疫細胞の反応を調べる	✔ 免疫細胞の反応を調べる
⊖ 全身性の免疫反応（血管内皮、組織常在免疫細胞）	✔ 全身性の免疫反応
⊖ オフターゲット作用が媒介する活性（交差反応性、予期せぬ標的の活性化）	✔ 臓器、肝臓、および神経系に対する毒性
⊖ 臓器障害 / 肝障害、神経毒性	✔ モノクローナル抗体、二重特異性抗体、CAR T 細胞の影響
	✔ 本ヒト化プラットフォームを用いた長期間の研究においても移植片対宿主病を避けることができる
	✔ あらかじめ特性のわかっている末梢血単核細胞ドナーを利用した、サイトカイン放出症候群の陽性対照

現行の in vivo モデルの限界

In vitro の研究とは異なり、in vivo のモデルを利用することにより、全身性の有害反応のダウンストリームのアウトカムを予測することができる。その結果、研究者は、臓器への影響について研究できるようになり、また体重の変化といった全般的な健康指標を測定することもできる。しかし、過去においては、マウス、ヒト以外の霊長類、その他の動物を用いた前臨床研究においては、危険なサイトカイン放出症候群（CRS）を予測することはできなかった。CRS は、前臨床研究の後の被験者において観察された。なぜなら、重篤な免疫反応は、ヒト免疫細胞上のユニークなレセプターの発現に関連していることがあるからだ²。

免疫不全マウスは、そのまま CAR T 細胞療法の研究に使用した場合は、全身性の免疫反応のモデルとはならない。なぜなら、免疫不全マウスは、鍵となる自然免疫系の（マウスおよびヒトの）構成要素をもっていないからである。したがって、免疫不全マウスにおいては、典型的なサイトカインの放出レベルやその他の臨床的に関連する表現型がみられない。

CD34⁺ マウスは、免疫療法の前臨床評価においてよく使われている。なぜなら、このマウスにおいては、リンパ系および骨髄細胞系の代表的なヒト免疫細胞が発達しており、有益な一次免疫応答を示すからである。しかし、このマウスモデルにおいては、T 細胞は、ヒトの胸腺上皮細胞上に発現している HLA（ヒト白血球抗原）ではなく、マウスの主要組織適合遺伝子複合体（MHC：H2 抗原）によって教育される。したがって、このマウスにおけるヒト T 細胞の反応は、いくつかの臨床的特性を欠いている。その結果、ひきつづいて起こる多くのダウンストリーム反応もみられない³。

歴史的には、ヒト以外の霊長類を用いた試験が薬剤の前臨床安全性試験および有効性試験の代表的なものであると考えられていた。なぜなら、ヒト以外の霊長類において、ヒトの生理機能ならびにヒト疾患の進展を最も忠実にモデル化することができるからである。しかし、ヒト以外の霊長類を用いた試験は多額の費用を要し、また時間もかかるものである。さらに、大きな倫理的懸念もひき起こす。霊長類を用いた試験を *in vitro* の試験と置き換えると、*in vivo* でしかみられない非自律的な細胞毒性反応（たとえば、サイトカイン放出症候群の基礎となるメカニズムなど）を見落とすリスクが生じる。他方、大部分の *in vivo* の前臨床モデル（たとえば、齧歯類、イヌ、ウサギなど）においては、ヒトに特異的な薬剤標的が存在しないので、トランスレーショナル研究としての価値はほとんどない。さらに、現在では、科学者はヒト化マウスにおいて再現性のある結果を得ることができるので、もはや霊長類は、ヒトの免疫機能の前臨床試験のための最もヒトに近いモデルではない。

答え：末梢血単核細胞（PBMC）ヒト化マウスモデル

前臨床研究を改善し、上述の問題を克服するために、ジャクソン研究所（JAX）の科学者たちは、治療によって引き起こされるサイトカイン放出症候群ならびにその他の反応を 16 日間で解析するための *in vivo* 試験を開発した。この *in vivo* 試験は、あらかじめ特性のわかっているヒト成人の末梢血単核細胞（PBMC）によってヒト化されたマウスを用いておこなわれる。このヒト化マウスプラットフォームは、CAR T 細胞を移入したときに、機能的なヒト免疫系がどのように反応するかを理解するための理想的なツールである。マウス MHC クラス I および II を欠損する免疫不全マウスである NSG マウス（NSG-MHC I/II KO）を遺伝的背景とする系統をヒト PBMC でヒト化することによって、異種動物における移植片対宿主病（GVHD）のリスクを最小限にすることが可能になった。その結果、科学者は、観察された毒性が他の複雑な要因によるものではなく、CAR T 細胞療法に起因することをより自信をもって言うことができるようになった⁴。すなわち、このマウスツールによって、科学者は、HLA によって教育されたヒト免疫細胞と CAR T 細胞の相互作用を観察することができるようになったのである。しかも、これらの細胞はすべて、循環しながら、正常な器官および生物系の細胞や組織と相互作用をする。

PBMC を注射した後、CAR T 細胞の投与または対照処置を施すことによって、研究者は、それぞれのマウスの健康状態をモニターすることができる。すなわち、経時的に体重や体温を測定したり、適切な時点におけるヒトサイトカインを定量したりすることができる。実験の終了時点においては、科学者は組織サンプルを採取し、器官における細胞浸潤、肝毒性、心臓毒性、神経毒性、ならびにその他のダウンストリーム効果についても調べることができる。また PBMC ヒト化マウスは、腫瘍移植片も受容する。したがって、腫瘍増殖抑制やその他のマーカーを測定することによって、毒性と有効性を同時に調べることができる。事実、サイトカイン媒介性の全身性の毒性を誘発するためには、通常、腫瘍および標的分子の存在が必要なのである。

PBMC ヒト化マウスを用いた研究は、他の *in vivo* 試験にくらべて、ヒトの生物機能により近似していることに加えて、*in vitro* 試験にくらべて、より高品質なデータを提供する。直接比較において、PBMC ヒト化マウスを用いた JAX の研究は、より再現性があり、またより臨床に関連のある結果を提供した⁵。次章以降においては、この強力なツール（PBMC ヒト化マウス）が切り開く研究の可能性について記載する。

最適な前臨床データ：単一のモデルにおいて有効性と総合的な毒性を予測する

単一の動物モデルを利用した研究によって多数の研究課題に答えることは、治療法開発のパイプラインの効率を増大させることにつながる。有効性試験において、PBMC ヒト化マウスは、投与用量に関する高品質のデータを迅速に提供し、さまざまな毒性の基礎となっている生物学的メカニズムを明らかにし、そして多様なポピュレーションにおける異なる臨床応答の原因となっている要素に関する洞察も提供することが示された。

用量依存性の有効性をモデル化する

ヒト化マウスモデルは、容易に腫瘍移植片を受容するので、研究者は、異なる CAR T 細胞療法の有効性と同一の CAR T 細胞療法における異なる用量の効果を比較することができる。有効性は、複数の測定値を利用することによって（たとえば、腫瘍の増殖を直接測定したり、体重減少といった健康指標を測定したりすることによって）定量化することができる。

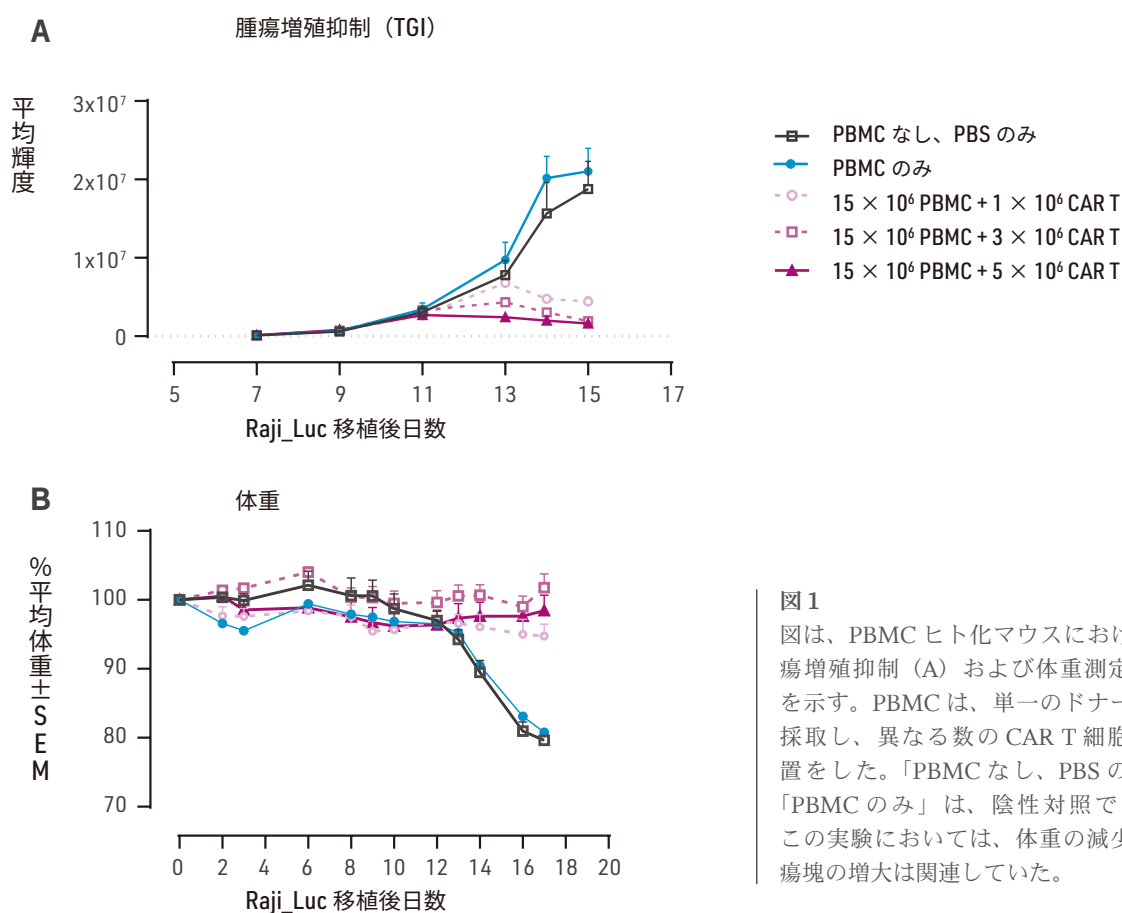


図 1
図は、PBMC ヒト化マウスにおける腫瘍増殖抑制 (A) および体重測定 (B) を示す。PBMC は、単一のドナーから採取し、異なる数の CAR T 細胞で処置をした。「PBMC なし、PBS のみ」、「PBMC のみ」は、陰性対照である。この実験においては、体重の減少と腫瘍塊の増大は関連していた。

図 1A は、CAR T 細胞の数が 1×10^6 個から 5×10^6 個に増加するにつれて、腫瘍の増殖抑制も増大することを示している。すなわち、CAR T 細胞の数と腫瘍増殖抑制のあいだに相関がみられた。同様の相関は、CAR T 細胞療法を臨床に応用したときにもみられた。したがって、このマウスは、臨床における直接的なアウトカムを正確にモデル化していた。健康指標に関しても、同様の結果が得られた。図 1B は、CAR T 細胞療法を受けなかったマウス (PBS または PBMC のみを注射されたマウス) においては、腫瘍の増大にともなう有意な体重減少がみられたことを示している。他方、3 群の CAR T 細胞治療群のマウスにおいては、ほとんどあるいはまったく体重減少はみられなかった。この結果は、上記の腫瘍増殖への影響と一致するものであった。総合すると、これらの結果は、PBMC ヒト化マウスにおいては、細胞数依存性の CAR T 細胞反応がみられることを示している。これは、臨床応用への期待に一致するものである。

強い毒性を調べる

PBMC ヒト化マウスプラットフォームに関するさらなる有効性試験において、研究者は、ヒト化するために用いる PBMC の数を増加させることによって、より強い毒性効果を誘導できることを見出した。PBMC の数を増加させると、循環している CD19⁺ B 細胞（本研究において、投与された自己 CAR T 細胞の標的）の数が増加していた。

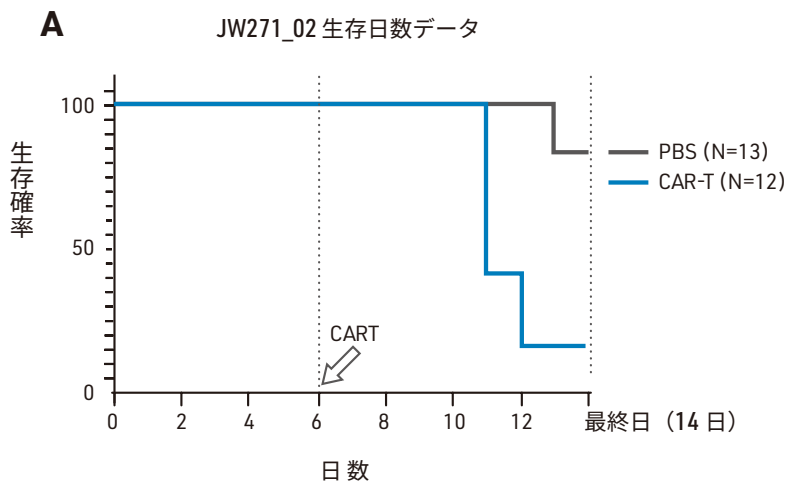


図 2

図は、PBMC ヒト化マウスにおける生存日数 (A) およびサイトカイン放出 (B) に関するデータを示す。マウスは、 5×10^6 個の自己 CAR T 細胞（他の有効性試験において使用された最小の CAR T 細胞数）で処置をする 6 日前に 17×10^6 個の PBMC を移入してヒト化された。PBS は、陰性対照である。

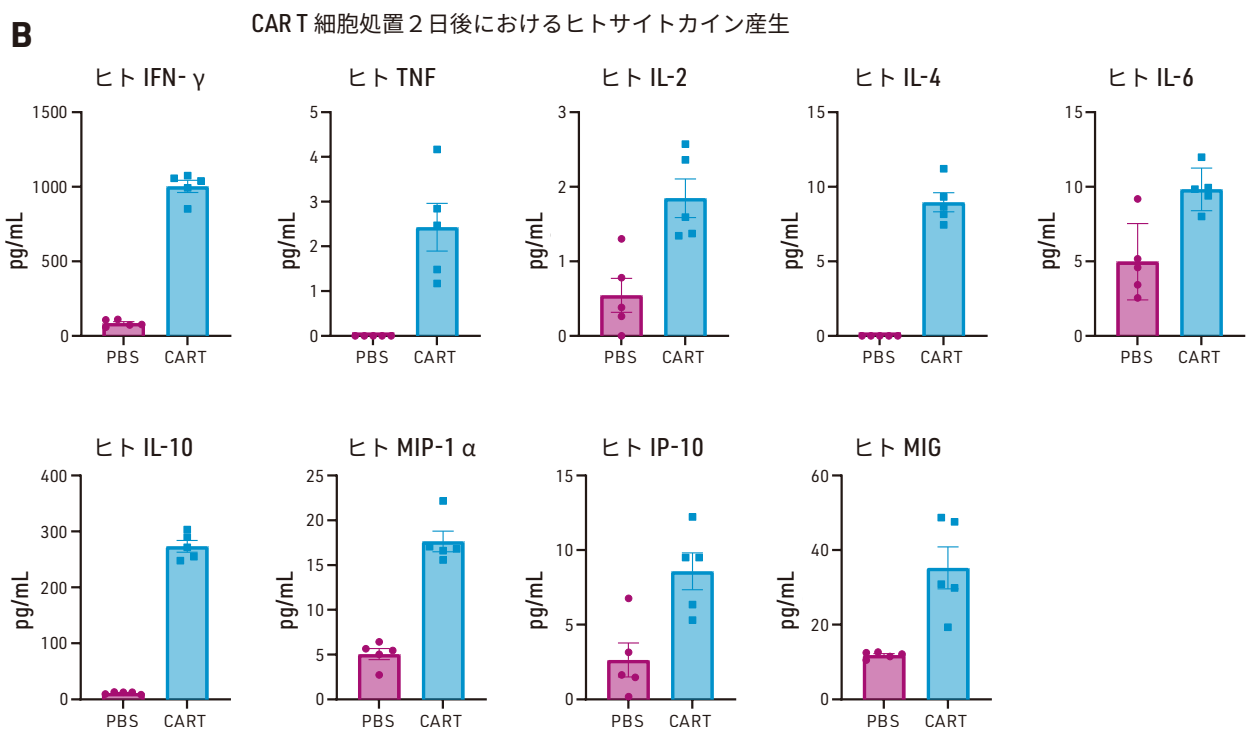


図 2A に示されているように、CAR T 細胞で処置されたマウスのうち 15% は、実験終了日の 14 日の前にエンドポイントに達した。また、CAR T 細胞で処置されたマウスにおいては、きわめて高いレベルのサイトカイン放出もみられた（図 2B）。これらの高いレベルのサイトカインによって、サイトカイン放出症候群やその他のダウンストリーム毒性が引き起こされた。

PBMC ヒト化マウスにおいて強い毒性反応を、再現性をもって、引き起こすことができるということは、研究者がサイトカイン放出症候群や CAR T 細胞関連のその他の毒性をさまざまな生物学的レベルにおいて研究するための信頼性のあるツールを利用できることを示している。すなわち、器官全体から分子レベルのメカニズムまで研究するこ

とができるのだ。そのような研究によって、臨床の現場において、どのタイミングでそのような毒性が引き起こされるのかに関して、可能性のある予防または治療戦略に光明を投じることができる。

ドナー特異的安全性プロファイルを決定する

研究者は、異なるドナーからの PBMC によってヒト化されたマウスにおいて、免疫刺激に対する反応性が再現性をもって変化することを観察してきた⁵。ドナー特異的なこのバラツキは、CAR T 細胞療法に対する多様な個体差のモデルとして利用することができる。異なる反応を調べることによって、科学者は、あらかじめ特性のわかっているドナーの生物学的プロファイルを比較することができる。その結果、毒性増大リスクの基礎となっている可能性のある要因を特定することができるようになる。このような研究は、CAR T 細胞療法を適用するか否かの基準を定めるための試験となるであろう。そして最終的には、臨床家がそれぞれの患者にとって CAR T 細胞療法が最善の選択肢であるか否かを初期に判断するためのガイダンスとなるであろう。

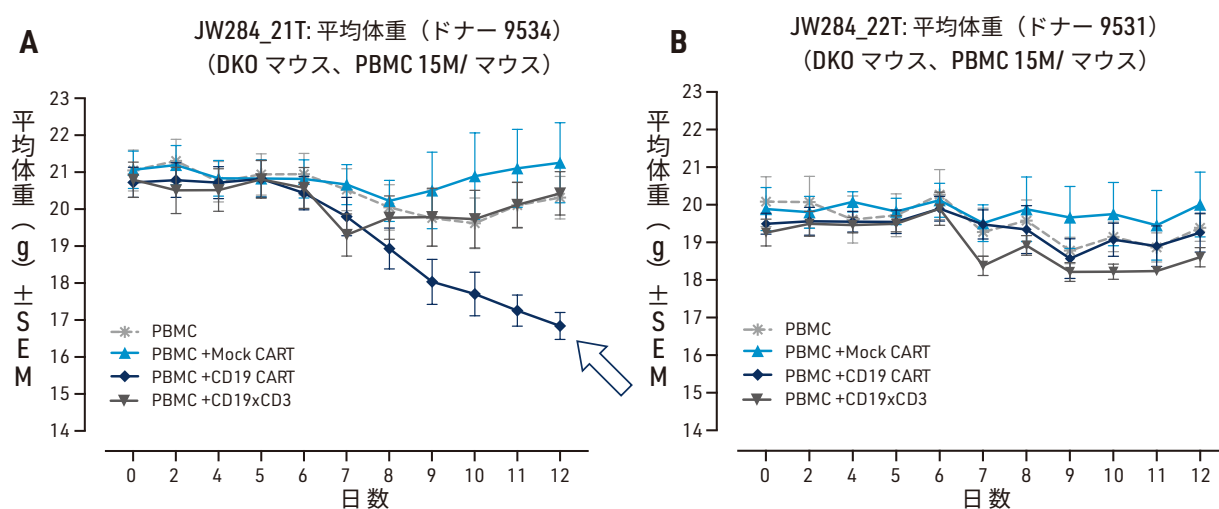


図 3

図は、ヒト化マウスにおける体重を示す。マウスは、異なるドナーから PBMC を移入した後、偽の CAR T 細胞、CD19 CAR T 細胞、または CD19xCD3 二重特異性 T 細胞で処置をした。この実験においては、ドナー 9534 は、CAR T 細胞で処置をすると、全身性の毒性サイトカイン反応をひき起こした。すなわち、重度の体重減少がみられた。

図 3 は、ふたりの異なるドナーから得られた PBMC によってヒト化されたマウスにおいてみられた健康状態のアウトカムの違いを示している。ドナー 9534 から得られた PBMC によってヒト化されたマウス (図 3A) は、自己 CAR T 細胞処置をした後、体重が急激に減少した。他方、ドナー 9531 から得られた PBMC によってヒト化されたマウス (図 3B) においては、そのような体重減少はみられなかった。この実験結果は、異なるドナーの PBMC によってヒト化されたマウスにおいては、全身性の効果をモデル化できることを示している。

このように、このマウスモデルにおいてヒトの多様性が反映されていることは、CAR T 細胞療法を臨床に応用する前に、研究者がより包括的なデータを得ることができることを示している。この *in vivo* のプラットフォームは、おそらく、がんやその他の疾患の治療法の選択のためのプレジジョンメディスンのアプローチをサポートするだろう。そして、いつの日か、CAR T 細胞を用いた治療が可能になるであろう。医師は、患者から得られた PBMC を用いてヒト化マウスを作製し、CAR T 細胞療法が当該患者にとって安全かつ有効であることを、臨床に応用する前に、個別に予測することができるようになるであろう。ヒト化マウスを用いた研究により、当該患者にとっては、CAR T 細胞療法がよい選択肢ではないことがわかった場合においては、医師は、当該患者に不必要なリスクを与えることを回避し、他の治療法に切り替えることによって、貴重な時間を浪費することを避けることができるのだ。

CAR T 細胞療法の裾野を広げる

PBMC ヒト化マウスは、治験に参加する人間を危険にさらすことなく、CAR T 細胞療法を開発したり試験をしたり、あるいは新たなタイプの療法を考案したりするための理想的なプラットフォームを提供する。

同種異系統 CAR T 細胞

今日、臨床において利用されているすべての CAR T 細胞療法において、自己 CAR T 細胞が使われている。すなわち、患者自身から T 細胞を採取し、遺伝子改変して CAR タンパク質を発現させ、それらの T 細胞を増殖させ、患者の体内に戻すというカスタムメイド（オーダーメイド）である。しかし、このような個別化治療は、きわめて長い時間ならびに高額のコストがかかることを意味する。そのため、誰でもが利用できる方法ではなく、治療の遅延につながることもある。

バイオ医薬品を研究している多くの人たちは、積極的に同種異系統 CAR T 細胞を開発しようとしている。これは、（オーダーメイドではなく）画一的な治療法であるので、迅速かつ低額で提供することができる。しかし、同種異系統 CAR T 細胞は、患者のからだにとっては異物であるので、破壊されて治療に役立たないことがあるし、あるいは重篤なサイトカイン放出症候群や移植片対宿主病（GVHD）をひき起こすリスクもある。その結果、同種異系統 CAR T 細胞の試験は、治験に参加する患者に許容することができないリスクをもたらすことがあるので、実施しがたい。

PBMC ヒト化マウスを用いることにより、科学者は、多様なポピュレーションにおける同種異系統 CAR T 細胞について調べることができるようになる。その結果、さまざまな患者が、臨床において、同種異系統 CAR T 細胞療法に対してどのように反応するかということに関するより総合的かつ正確なプロファイルを得ることができる。またこのプラットフォームを利用することにより、同種異系統 CAR T 細胞療法のデザインに関する情報も得ることができるので、きわめて広範囲にわたる、可能性のあるヒト免疫系への反応を最小限にすることができるようになる。

CAR の構造の改変

いくつかの研究によって、CAR T 細胞上の CAR の構造や分布がそのはたらき（そして、おそらく有効性）に影響を及ぼすことが示されてきた⁶。CAR タンパク質の発現が高くなると、抗原非依存性の活性化シグナルや活性化が誘導される。一方、個々のドメインの構造は、標的認識や機能の持続といった効果に影響を及ぼすことがある。研究者は、遺伝子工学技術を利用して、これらの構造特性を改変し、新たなかたちの CAR T 細胞を作製することができる。そのようにして、固形腫瘍のミクロ環境における浸潤といった現時点での課題を克服することができるようになるであろう。

PBMC ヒト化マウスは、前臨床試験のためのプラットフォームである。研究者は、このプラットフォームを使って、CAR の構造変化によって CAR T 細胞が全身性のはたらきにどのような影響（たとえば、有効性、他の免疫細胞との相互作用、その他）を及ぼすかについて調べることができる。

結論

PBMC ヒト化マウスは、CAR T 細胞療法に関する特性、安全性、および有効性試験における理想的なプラットフォームである。このプラットフォームを利用することによって、研究者は、CAR T 細胞療法に対するヒト免疫応答を包括的にモデル化することができる。このプラットフォームによって、他の試験における限界（たとえば、費用、スピード、倫理的懸念、ヒトに特異的な全身性反応を調べられないことなど）を克服することもできる。このマウスは腫瘍の移植を受容するので、毒性のみならず有効性についても調べることができる。また有効性試験における CAR T 細胞療法に対する反応において、広範囲にわたる応用研究（たとえば、新たなタイプの CAR T 細胞開発など）に関して、臨床に直結した結果が得られることも示唆された。

研究デザインからデータ解析に至るまで徹底したサポートを提供する経験豊富な研究パートナーとともに仕事をすることによって、バイオ医薬品の開発責任者は、このマウスモデルを利用して、免疫療法の新たな領域をより迅速に取り入れることができる。また、患者および治験参加者の安全も維持することができる。

参考文献

- ¹ Santomasso, B., Bachier, C., Westin, J., Rezvani, K., & Shpall, E. J. (2019, May 17). The other side of CAR T-cell therapy: Cytokine release syndrome, neurologic toxicity, and financial burden. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (39), 433–444.
https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/EDBK_238691
- ² Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., Burns, C., Thorpe, R., & Stebbings, R. (2010, October). Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *British Journal of Pharmacology*, 161(3), 512–526.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990151/>
- ³ Matas-Céspedes A, Brown L, Mahbubani KT, Bareham B, Higgins J, Curran M, de Haan L, Lapointe JM, Stebbings R, Saeb-Parsy K. Use of human splenocytes in an innovative humanised mouse model for prediction of immunotherapy-induced cytokine release syndrome. *Clin Transl Immunology*. 2020 Nov 4;9(11):e1202. doi: 10.1002/cti2.1202. PMID: 33173582; PMCID: PMC7641894.
- ⁴ Brehm, M. A., Kenney, L. L., Wiles, M. V., Low, B. E., Tisch, R. M., Burzenski, L., Mueller, C., Greiner, D. L., & Shultz, L. D. (2019). Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(3), 3137–3151. <https://doi.org/10.1096/fj.201800636R>
- ⁵ Ye, C., Yang, H., Cheng, M., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Brehm, M. A., & Keck, J. G. (2020, August 9). A rapid, sensitive, and reproducible in vivo PBMC humanized murine model for determining therapeutic related cytokine release syndrome. *The FASEB Journal*, 34(9), 12963–12975.
<https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202001203R>
- ⁶ Stoiber, S., Cadilha, B. L., Benmebarek, M. R., Lesch, S., Endres, S., & Kobold, S. (2019). Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells*, 8(5), 472.
<https://doi.org/10.3390/cells8050472>

JAX® Mice, Clinical & Research Services

The Jackson Laboratory

Maine | Connecticut | California | Japan | China

ask@jax.or.jp

www.jax.or.jp

WPJ22-02A

