

CAR-T 細胞の製造失敗に関与するアフェレーシスのリンパ球解析

降田 喜昭¹⁾ 中村 裕樹¹⁾ 石井 修平¹⁾ 鞠子 文香¹⁾ 山田 圭佑¹⁾
川上美由紀¹⁾ 真田 未来¹⁾ 安藤 美樹²⁾ 安藤 純¹⁾²⁾

キメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor : CAR) T 細胞の製造には、患者の単核球と CD3+T 細胞を採取するが、基準値以上の細胞数を採取した場合でも一定の割合で製造失敗となる。本研究は、製造失敗に関与する T 細胞の評価を目的に 2020 年 7 月～2022 年 9 月に Tisagenlecleucel 製造を目的に白血球アフェレーシスを実施した 32 件を対象とし、リンパ球の表面マーカーおよび疲弊マーカーについて解析した。測定サンプルは、細胞調製後に凍結保存した検体を用いて、解凍後生細胞率、表面マーカー (CD45, 3, 4, 8)、疲弊マーカー (PD-1, CTLA4, TIM3, LAG3) についてフローサイトメーターで測定した。製造状況は、成功 29 件 (90.6%)、失敗 3 件 (9.4%) であり、製造成功群と失敗群での比較は、表面マーカーの CD4+T 細胞数のみに有意差 ($p=0.02$) を認め、疲弊マーカーには有意差を認めなかった。本研究の解析結果から、製造失敗には CD4+T 細胞数が関係している可能性が示唆された。しかし、症例数が少ないため更なる検討が必要である。

キーワード : Tisagenlecleucel, CAR-T 細胞, CAR-T 細胞製造失敗, アフェレーシス, CD4+T 細胞

はじめに

造血器腫瘍において、化学療法後や移植後の再発による難治性の患者は予後が不良であるが、近年、新たな治療法として細胞免疫療法であるキメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor : CAR)-T 細胞療法が注目されている。CAR-T 細胞の作製は、患者からアフェレーシスにより T 細胞を採取し、ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入することで、CAR と呼ばれる特殊なたんぱく質を発現させる。

CD19 抗原を特異的に認識する CD19-CART である Tisagenlecleucel (tisa-cel) の国際多施設共同第 II 相試験では、小児・若年の再発、難治性 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (B-acute lymphoblastic leukemia : B-ALL) を対象とした ELIANA 試験¹⁾において、完全寛解 (CR) および血球数回復が不十分な完全寛解 (CRi) は、81.3% と報告された。再発、難治性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) を対象とした JULIET 試験²⁾においても、奏効率が 53.1% であり、B-ALL および DLBCL の共に高い奏効率が報告されている。

2017 年には、再発、難治性 B-ALL および DLBCL を対象疾患とした tisa-cel が米国食品医薬品局 (Food

and Drug Administration : FDA) の承認を得て米国での使用が開始された。国内においては、2019 年 3 月に米国同様の対象疾患に対し、tisa-cel が製造販売承認され、5 月には厚生労働省より「最適使用推進ガイドライン」が策定され対象患者や施設要件などが推奨されている³⁾。また、2022 年 8 月には再発、難治性濾胞性リンパ腫 (Follicular lymphoma : FL) が対象疾患に追加され使用されている。

tisa-cel 製造のためにアフェレーシス産物を製造所へ出荷する基準は、①総有核細胞数 2.0×10^9 cells 以上、② CD3+T 細胞数 1.0×10^9 cells 以上、③ CD3+T 細胞の割合が 3% 以上の 3 条件をすべて満たす必要がある⁴⁾。

医療施設では、出荷基準を満たす細胞を採取し、製造所へ出荷するが、CAR 遺伝子導入後の細胞増殖不良などにより、一定数で製造失敗が発生している。製造失敗となった場合には、治療の遅れや白血球の再アフェレーシスが必要な場合もあるため、患者にとっては負担となる。

本研究では、出荷する T 細胞を含んだ白血球について、フローサイトメーター (Flow Cytometer : FCM) を用いて表面マーカーおよび疲弊マーカーを解析し、製造失敗との関連性を後方視的に検討したので報告する。

1) 順天堂大学医学部附属順天堂医院輸血・細胞療法室

2) 順天堂大学医学部内科学血液学講座

連絡責任者 : 降田 喜昭, E-mail : yfuruta@juntendo.ac.jp

[受付日 : 2023 年 11 月 22 日, 受理日 : 2024 年 2 月 11 日]

Table 1 FCMによるリンパ球表面マーカーの測定方法

手順	内容
1. 解凍	37℃の恒温槽でサンプルを急速解凍する。
2. 洗浄	サンプルと等量の洗浄液を加え、遠心洗浄する。
3. 細胞調製	10,000cells/ μ l程度になるようにPBSで調整を行う。
4. 試薬分注	スピッツを2本準備し、①CD45, 3, 4, 8, ②CD45, 3, PD-1, CTLA4, TIM3, LAG3を分注する。
5. サンプル分注	3.で調製したサンプルを100 μ lずつ分注し、暗所20分反応させる。
6. 溶血	溶血剤(塩化アンモニウム)を2mlずつ分注し、暗所10分反応させる。
7. 洗浄	サンプルを遠心洗浄し、PBSに浮遊させてFCMで測定する。

方 法

1. 対象患者および集計方法

2020年7月～2022年9月までに順天堂大学医学部附属順天堂医院において、tisa-cel製造のための白血球アフエレーシスを実施した患者で同意が得られた32件を対象にT細胞の評価を実施した。本研究は、医学部医学系研究等倫理委員会の承認(E21-0057)を受けて実施した。

白血球アフエレーシス産物は、細胞調製した後、凍結バッグおよびQuality Control (QC) 試験用バイアルに分注し、凍結保存する。本研究の測定サンプルは、出荷した残りのQC試験用バイアルを用いて解析した。

患者背景は、年齢、性別、疾患名、解凍後%Viability、出荷した調製細胞の有核細胞数およびCD3+T細胞数について、製造成功群および失敗群に分類して集計した。

2. FCMを用いた測定手順および解析方法

測定サンプルの準備は、液体窒素下で保存しているQC試験用バイアルを37℃の恒温槽で急速解凍し、直ちに遠心洗浄を行った。2回の洗浄後、白血球数を約10,000cells/ μ lに希釈調整して測定サンプルとし、測定値に希釈倍数を乗じた値を最終結果とした。測定サンプルは、抗体試薬と暗所で20分反応させた後、溶血剤を添加し、暗所10分反応させた。溶血後は遠心洗浄を行い、リン酸緩衝液(PBS)に浮遊させ測定した(Table 1)。測定機器は、2レーザー6カラーの測定が可能なFCM(Navios™, ベックマン・コールター株式会社, 米国)を使用し、絶対値測定用ビーズを用いたSingle platform (SP) 法による絶対数(cells/ μ l)で算出した。

3. FCMでの測定項目

測定は、抗体試薬(ベクトン・ディッキンソン株式会社, 米国)を用いたマルチカラー解析を実施した。測定したCD抗原(蛍光色素)は、白血球共通抗原であるCD45(PE-CF594)、成熟Tリンパ球抗原のCD3(PE-Cy™7)が共に陽性の細胞集団をゲーティングして解析した。

Tリンパ球表面マーカーとして、サブセットであるCD4(PE-Cy™5)およびCD8(FITC)を測定し、CD4/CD8比においても算出した。

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質であり、疲弊マーカーとして知られる①PD-1(FITC)②CTLA-4(PE)③TIM3(PerCP-Cy™5.5)④LAG3(Alexa Fluor 647)を測定した。疲弊マーカーは、免疫チェックポイント受容体であり、慢性的なウイルス感染症や長期の化学療法などにより発現量は増加し、細胞の活性化が低下することで免疫抑制状態となる。

4. 統計解析

T細胞評価を行った32件について、製造成功群と失敗群に分類して解析した。統計解析ソフトは、Graph-Pad Prism8を用いてStudentのt検定による有意差(p)を算出し、 p 値0.05未満を有意とした。また、細胞数の相関は、Pearsonの積率相関係数(r)を算出して評価した。

結 果

1. 製造成功群と失敗群の患者背景

T細胞評価を行えた32件の内、製造成功群29件(90.6%)、失敗群3件(9.4%)であり、失敗群のすべてがDLBCLであった。疾患別の状況は、B-ALL3件、DLBCL29件でありFLはなかった。

製造成功群と失敗群の患者背景は、性別において大きな偏りはなく、年齢(中央値)で製造成功群65歳と失敗群35歳で失敗群において若年傾向であったが、有意差を認める項目はなかった。サンプル解凍後の%Viabilityは、いずれも90%以上であり凍結保存状態に問題はなかった。製造所へ出荷した有核細胞数およびCD3+T細胞数は、製造成功群と失敗群で共に出荷基準を満たしており、細胞数も同程度であった(Table 2)。

2. FCMによる表面マーカーおよび疲弊マーカーの測定結果

表面マーカーの解析は、FCMを用いたSP法による絶対数(cells/ μ l)で比較解析した。製造出荷基準であるCD3+T細胞数は製造成功群と失敗群の比較において有意差($p=0.98$)は認めなかった。Tリンパ球サブセットであるCD4+T細胞数およびCD8+T細胞数における製造成功群と失敗群の比較では、CD4+T細胞数で有意差($p=0.02$)を認めたが、CD8+T細胞数では有意差($p=0.28$)を認めなかった。また、CD4/CD8

Table 2 白血球アフェレーシスを実施した患者背景

	製造成功	製造失敗	p 値
件数	29	3	
年齢 (範囲)	65 (6 ~ 78)	35 (35 ~ 44)	0.08
性別: 男/女	19/10	1/2	
疾患: ALL/DLBCL	3/26	0/3	
% viability	90.9	96.4	0.62
出荷有核細胞数 ($\times 10^9$ cells/ μ l)	5.6	5.0	0.70
出荷 CD3T 細胞数 ($\times 10^9$ cells/ μ l)	3.1	3.2	0.93

数値は中央値 (最小値~最大値) で表記

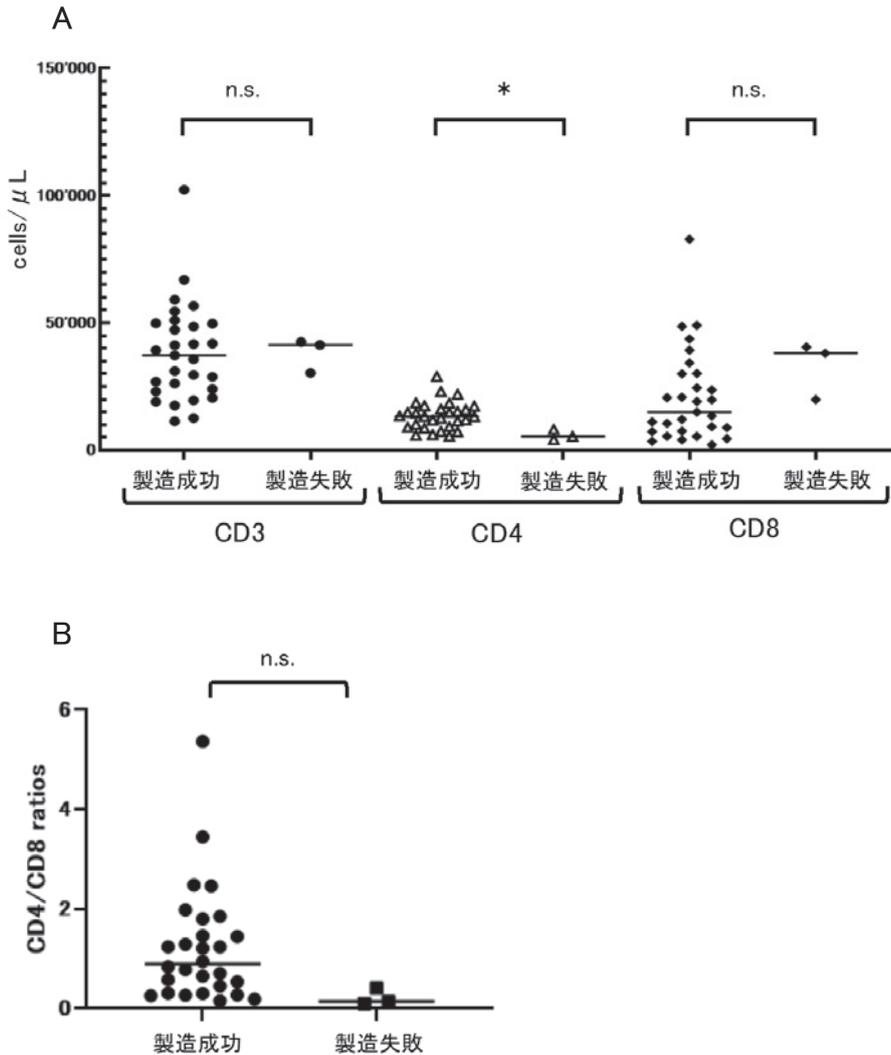


Fig. 1 製造成功群と製造失敗群におけるリンパ球表面マーカー比較
 グラフの横線は中央値を示す. * $p < 0.05$

比では有意差 ($p=0.14$) を認めなかった (Fig. 1). 原材料である T リンパ球の疲弊度を評価するため PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3 を測定したが, すべての疲弊マーカーで有意差を認めなかった (Fig. 2).

3. CD3+T 細胞数と CD4 および CD8+T 細胞数の相関

CD3+T 細胞数は製造出荷基準であるため, T 細胞サ

ブセットである CD4 および CD8+T 細胞数との相関関係を解析した (Fig. 3). CD4+T 細胞数では, 相関係数が $r=0.299$ であり, 弱い相関であった. CD8+T 細胞数では, 相関係数が $r=0.919$ であり, 強い相関を認めた.

4. CD4+T 細胞数と疲弊マーカーの相関

CD4+T 細胞数は, 製造成功群と失敗群の比較で有意差を認めた項目であったため, 疲弊マーカーとの相関

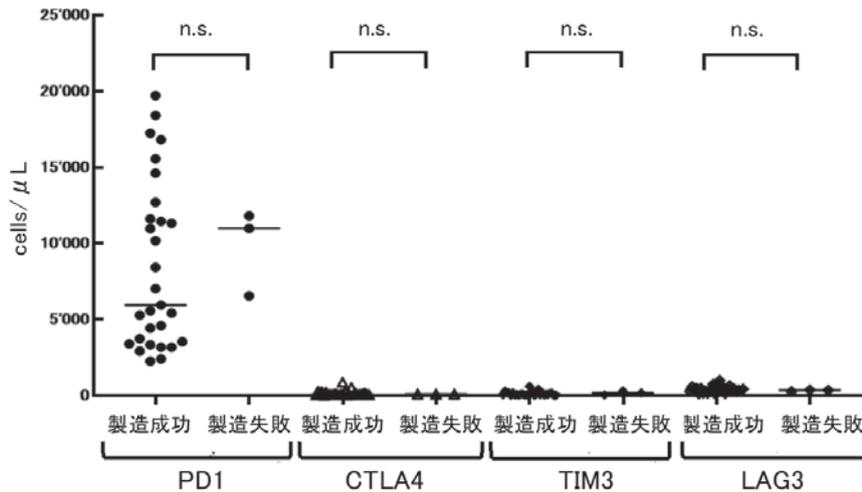


Fig. 2 製造成功群と製造失敗群におけるリンパ球疲弊マーカー比較
グラフの横線は中央値を示す。

PD1 : Programmed death receptor-1, CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4, TIM3 : T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3, LAG3 : lymphocyte activation gene-3

を解析したが、すべての疲弊マーカーで弱い相関であった (Fig. 4)。

考 察

患者自身の T 細胞を用いる CAR-T 細胞療法は、新たながん治療として注目されているが、白血球アフェレーシスから製造、輸注までには多額の費用がかかる⁵⁾。しかし、再発難治に対する造血器腫瘍への治療効果を期待し、複数の製品が臨床で使用されている。白血球アフェレーシスをスタートとする CAR-T 細胞療法は、化学療法を施行してからの期間が短く、患者の白血球数が少ない場合には、白血球アフェレーシス時間が長時間となり患者への負担が増加する。このため、効率的に目標細胞数を確保することが重要となる⁴⁾。

tisa-cel の製造開始には、基準値以上の有核細胞数および CD3+T 細胞数を患者からアフェレーシスする必要があるが、製造出荷基準以上の細胞数をアフェレーシスしても製造が失敗となる症例がある。

tisa-cel の製造に関する報告では、製造に用いる細胞中に単球の混入が多い場合、製造効率が低下したとの報告例⁶⁾がある。また、単球の混入を減少させた細胞群と CD3 でセレクションした細胞群での CAR-T 製造について、遺伝子導入や細胞増殖が同程度であった報告⁷⁾もある。tisa-cel では CD3/CD28 磁気ビーズを用いて単球除去を行った細胞群を使用して製造を行っているが、製造失敗例が 7~8% 発生した報告がある⁸⁾。しかし、製造成功および失敗に関連する報告例は少なく詳細な原因については、依然として不明な点がある。

本研究においても製造失敗は 3 件 (9.4%) あり、過

去の報告例と同程度発生していた。製造失敗例は、すべてが培養増殖不良であり、製造に用いる T 細胞の状態や組成が製造の可否に関与しているのではないかと考える。

tisa-cel の製造は、CD3+T 細胞へウイルスベクターを用いて CAR 遺伝子を導入した後の増殖が重要な工程である。ヘルパー T 細胞である CD4+T 細胞からは、細胞増殖因子である IL-2 が産生されるため、製造にはある程度の CD4+T 細胞数が必要と考える。本研究の解析結果からは、製造の可否に CD4+T 細胞数で有意差を認めしたが、CD4/CD8 比では有意差を認めず、先行研究と異なる結果となった。関連性は疑われるが、製造失敗例が 3 例と少ないため、追加症例が必要と思われる。T 細胞サブセットである CD4 および CD8+T 細胞数は、健常人に比較し、患者群では CD4+T 細胞数が減少することが報告⁹⁾されており、CD4+T 細胞数をモニタリングすることが CAR-T 細胞療法の指標に必要と考えられた。しかし、CD3+T 細胞数が製造出荷基準であるため、T 細胞サブセットである CD4 および CD8+T 細胞数との相関を把握する機会は臨床現場で少ないことが予測される。本研究では、CD8+T 細胞数には強い相関を認めしたが CD4+T 細胞数とは弱い相関であったことから、CD3+T 細胞数だけでは CD4+T 細胞数の予測ができない結果となった。

Tomoyasu ら¹⁰⁾は、再発・難治性 DLBCL の治療として用いられる、抗悪性腫瘍剤「ベンダムスチン」の繰り返し投与により、CD4/CD8 比の低下による製造失敗のリスクが増加する報告をしている。

CD4+T 細胞は、Th1, Th2, Th17, T_{FH} のサブクラ

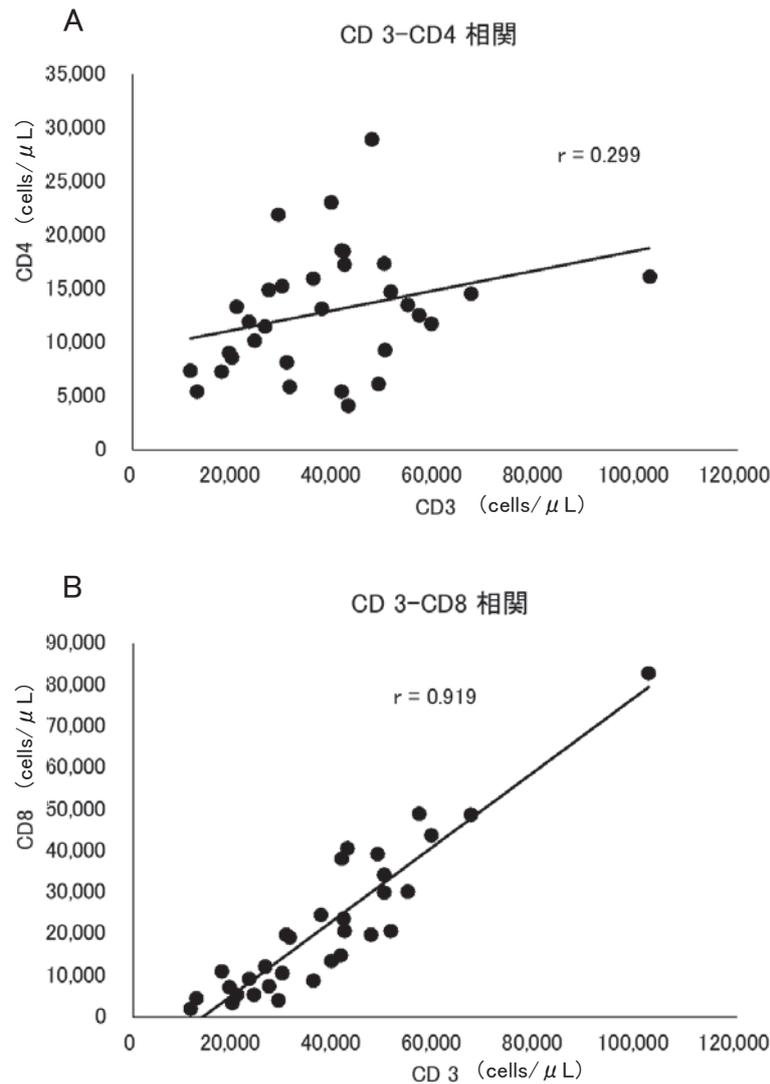


Fig. 3 CD3+T細胞数とCD4+およびCD8+T細胞数との相関図

スが存在し、Th1のIFN- γ やIL-2産生によるマクロファージや細胞障害性T細胞の活性化・増殖、Th2の液性免疫への関与、Th17の炎症性サイトカイン産生などさまざまな作用が知られている。濾胞性T細胞(T_{FH})が産生するIL-21は、細胞増殖に関する重要性も報告されており、CD4+T細胞は、免疫機能の活性・増殖や抑制をコントロールする司令塔と考えられている。培養細胞の増殖には、IL-2を添加した増殖方法が一般的となっているが、IL-2単独での培養増殖に比較し、IL-21との混合培養により、より強力な細胞増殖が確認できた報告¹¹⁾もあることから、1つのファクターだけではなく組み合わせることによる相乗効果が効率的な培養増殖に必要と考えられる。これには、様々な増殖のサイトカインを分泌するCD4+T細胞数の確保が必要であると思われる。

CD4+T細胞数が十分量確保できた場合でも、T細胞の疲弊が進行している場合には、遺伝子導入効率の低

下や増殖不良へ影響することを予測したが、解析結果からはすべての疲弊マーカーで有意差を認めず、CD4+T細胞との相関も弱いことから、T細胞の疲弊状態が製造の可否に有用な因子ではないと推測する。

本研究で解析した件数は少なく、更なるデータの蓄積が必要であると考えますが、今後の展望として白血球アフェレーシス産物におけるCD4+T細胞のサブセット解析を行うことで、より厳密な製造可否の予測に繋がることを期待される。

結 語

製造成功の可否は、CD3およびCD8+T細胞数や化学療法などによるリンパ球の疲弊ではなく、CD4+T細胞数が関与している可能性が示唆された。また、CD3+T細胞数とCD4+T細胞数に相関を認めないことから、CD3+T細胞数に加えてCD4+T細胞数を白血球アフェレーシス前に測定することで、製造の可否を推

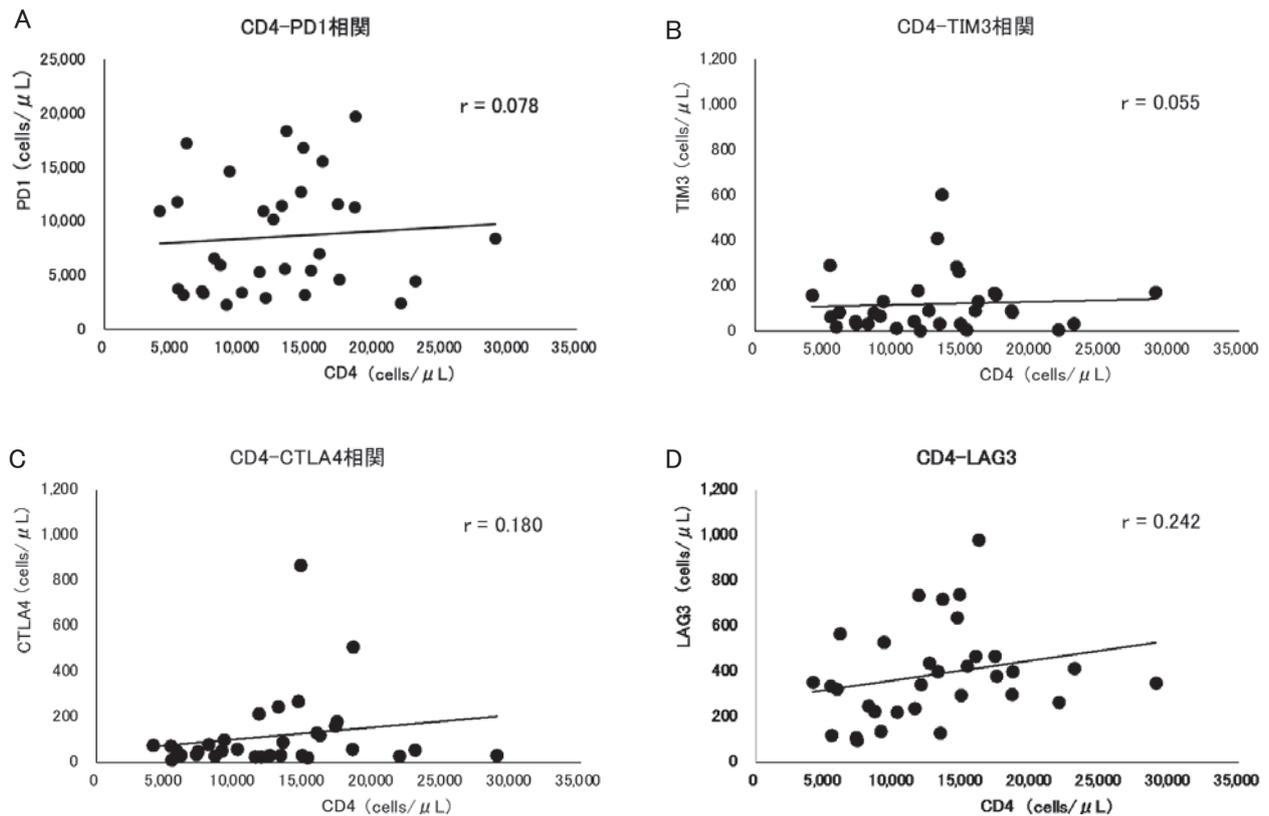


Fig. 4 CD4+T細胞数とリンパ球疲弊マーカー+細胞数との相関図

測する因子となり、tisa-celのための白血球アフェレシス実施の判断に有用と思われた。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

本論文の内容は第71回日本輸血・細胞治療学会学術総会(2023年 幕張メッセ)において発表した。

文 献

- 1) Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al: Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 378: 439—448, 2018.
- 2) Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al: Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 380: 45—56, 2019.
- 3) 「最適使用推進ガイドライン」令和元年5月(令和4年8月一部改訂), 厚生労働省, 2021.
- 4) Muna Qayed, Joseph P. McGuirk, G. Doug Myers, et al: Leukapheresis guidance and best practices for optimal chimeric antigen receptor T-cell manufacturing. *Cytotherapy*, 24: 869—878, 2022.
- 5) 赤塚美樹: CAR-T細胞療法の基礎と今後の臨床展開. *日本輸血・細胞治療学会誌*, 65: 851—857, 2019.
- 6) Nasha Elavia, Sandhya R. Panch, Andrew McManus, et al: Effects of starting cellular material composition on chimeric antigen receptor T-cell expansion and characteristics. *TRANSFUSION*, 59: 1755—1764, 2019.
- 7) Elsa Noaks, Carlotta Peticone, Ekaterini Kotsopoulou, et al: Enriching leukapheresis improves T cell activation and transduction efficiency during CAR T processing. *Molecular Therapy*, 20: 675—687, 2021.
- 8) Ilias Pessach, Arnon Nagler: Leukapheresis for CAR-T cell production and therapy. *Transfusion and Apheresis Science*, 62: 103828, 2023.
- 9) D Sommermeyer, M Hudecek, PL Kosasih, et al: Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*, 30: 492—500, 2016.
- 10) Tomoyasu Jo, Satoshi Yoshihara, Yoshiki Okuyama, et al: Risk factors for CAR-T cell manufacturing failure among DLBCL patients: A nationwide survey in Japan. *Br J Haematol*, 202: 256—266, 2023.
- 11) Norihiro Watanabe, Feiyan Mo, Mary Kathryn McKenna: Impact of Manufacturing Procedures on CAR T Cell Functionality. *Immunology*, 13: 876339, 2022.

LYMPHOCYTE ANALYSIS OF APHERESIS PRODUCTS INVOLVED IN CAR-T CELL MANUFACTURING FAILURE

Yoshiaki Furuta¹⁾, Yuki Nakamura¹⁾, Shuhei Ishii¹⁾, Fumika Mariko¹⁾, Keisuke Yamada¹⁾,
Miyuki Kawakami¹⁾, Miku Sanada¹⁾, Miki Ando²⁾ and Jun Ando¹⁾²⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Juntendo University Hospital, Juntendo University School of Medicine

²⁾Department of Hematology, Juntendo University School of Medicine

Abstract:

For manufacture of chimeric antigen receptor (CAR) T cells, mononuclear cells and CD3+ T cells are collected from the patient. Even with sufficient cell collection, however, manufacturing failure occurs at a constant rate. In this study, to evaluate characteristics of T cells that may lead to CAR-T cell manufacturing failure, 32 cases which underwent tisagenlecleucel production between July 2020 and September 2022 were selected and their lymphocytic surface markers and exhaustion markers were analyzed. The evaluated samples were cryopreserved as apheresis products and after defrosting, their cell viability, surface markers (CD45, 3, 4, 8) and exhaustion markers (PD-1, CTLA4, TIM3, LAG3) were analyzed by flow cytometry. Manufacturing was successful in 29 cases (90.6%) and failed in 3 (9.4%). The only significant difference between the 2 groups was in the number of CD4+ cells with surface markers ($p=0.02$). In contrast, no differences were seen with regard to exhaustion markers. These findings may suggest that CD4+ cell number is related to manufacturing failure. However, sample size in this study was small, and further investigation with increased case studies is required.

Keywords:

Tisagenlecleucel, CAR-T cells, CAR-T cell manufacturing failure, Apheresis, CD4+T cells

©2024 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>