

マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用

分担研究者 赤塚美樹

藤田保健衛生大学医学部・准教授

研究要旨

再発ハイリスク造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植は確立された治療法であるが、移植後再発および GVHD は依然として大きな問題である。我々は選択的 graft-versus-leukemia/lymphoma (GVL) 効果を誘導しうるような血液系分化抗原の SNP 部位を含むマイナー抗原エピトープを用いたペプチドワクチン臨床試験を開始実施している。平成 24 年度は 2 例の新規症例があり、合計 8 例に接種が終了、9 例目が第 3 コホートである 1 mg 用量の試験中である。

ワクチンは能動免疫であり、一般に効果発現にはある程度の時間を要する。これに対して養子免疫療法は輸注直後から効果が期待できる。本年度は昨年度開始した FLT3 に反応する抗体を細胞表面に発現させる chimeric antigen receptor(CAR) 導入 T 細胞研究に引き続き、移植例に適用できるモデル抗原として HLA-A2 拘束性に提示される HA-1H マイナー抗原を認識する単鎖抗体を作製し、この抗体分子にて CAR-T 細胞を作製し、その特異性、細胞傷害性について詳細に検討した。その結果、得られた抗体は 10^9 M レベルの K_D 値を発揮するものの、CAR-T 細胞の傷害性は標的抗原上の抗原量に依存し、通常の TCR を用いた認識と異なり CD8 を補助分子として使っていない可能性があることが判明した。

A. 研究目的

分子標的薬やその他の抗腫瘍剤が進歩する中で残されたハイリスク造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植は重要な治療の選択枝であるが、移植後再発は依然として主要な死因となっている。これに対して、前処置増強、HLA 部分不適合移植と NK 細胞の養子移入、腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の養子移入などが試みられているが、効果は限定的である。

我々は HLA 以外の同種 (アロ) 抗原であるマイナー抗原に着目して、ワクチン療法

および養子免疫療法についてトランスレーション研究を行っている。マイナー抗原はドナー・患者間の遺伝子多型に由来する非自己抗原であり、HLA によって T 細胞に提示され、日自己抗原ゆえ強い抗原性が期待されている。実際マウスモデルではわずか 1 つのマイナー抗原不適合で移植された腫瘍が完全に除去される。我々は、選択的 GVL 効果を得るために血液系細胞にのみ発現する分化抗原上の多形部位を含むマイナー抗原を複数同定し、これらペプチドをワクチンとして移植後再発例もしくは再発

ハイリスク例に治療・予防ワクチンとして投与する臨床試験を行っている。しかしマイナー抗原に反応する CTL 前駆体の体内寿命（テトラマーやクローン特異的 PCR で検出）は移植から 1 年半程度というデータを得ており、ワクチンのみならず養子細胞療法的なアプローチも並行して再検討を行っている。昨年度は FLT3 分子をモデル抗原とした Chimeric Antigen Receptor (CAR) 導入 T 細胞を誘導する系の予備実験を行ったが、抗体の親和性が不十分で FLT3 低発現腫瘍は傷害されなかった。

そこで本年度は別研究課題で得られた HA-1H マイナー抗原ペプチド + HLA-A2 複合体を認識する“TCR 様”抗体をもとに、これに CD38-CD3 鎖を結合し T 細胞に導入した CAR-T 細胞の機能を解析し、その臨床応用の可能性、問題点を検討した。

B. 研究方法

1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

昨年に引き続き、5 種類のエピトープペプチド（ACC-1Y、ACC-1C、HA-1H、ACC-2、ACC-6）をテラーメイドワクチンとして用いた。これらのマイナー抗原を提示できる HLA アリルをドナーと患者が共有し、マイナー抗原が成立する GVL 方向の不適格移植を受けた患者で適格基準を満たすものをリクルートして、説明と同意の後、5 回ワクチン接種することを目標とした。3 回以上ワクチンが接種できた症例を評価可能とした。マイナー抗原特異的 CTL の減衰を考え、なるべく移植早期症例をリクルートするように努めた。

2) HLA-A2/HA-1H 複合体を認識する単鎖抗体の樹立とこの Chimeric Antigen Receptor (CAR) を遺伝子導入した T 細胞の作製：

HLA-A2/HA-1H-テトラマーと陰性コント

ロールである HLA-A2/HA-1H-テトラマーは研究協力者の葛島らが作製した。HLA-A2/HA-1H-テトラマーは Montanide アジュバントとエマルジョンを形成後、B6 マウス皮下に投与した。3 回免疫後に脾細胞を取り出し、研究協力者の赤堀らが phage display システムを用いて HLA-A2/HA-1H 複合体に特異的な単鎖抗体として樹立した。この抗体をビオチン化し、ストレプトアビジン-PE を用いてテトラマーとした。HLA-A2 陽性、TAP 欠損 T2 B-LCL に HA-1H、その抗原陰性カウンターパートの HA-1R、その他のペプチドを添加し、抗体との反応性を評価した。

反応性が 10nM 程度であったため、CAR-T 細胞を作製した。まずこの単鎖部分の cDNA に CD28 の細胞膜貫通領域、CD3 鎖の ITAM ドメインを結合し、CAR のコンストラクトを作製した。ベクターは LZRSpBMNZ を基本骨格に用いた。パッケージ細胞として FHCRC の Topp らが作製した Phoenix-Galv を用いた。

Primary な T 細胞は健常人よりインフォームドコンセント後に採取した末梢血より、磁性ビーズを用いて CD3 ないしは CD8 に純化した。これを当初は CD3 抗体単独、ついで CD3-CD28 コーティングビーズを用いて刺激した。ウイルスベクターの感染は刺激後 48、72 時間後の 2 回を基本に行い、IL-2 および IL-7 をサイトカインとして添加した。培養は 3-4 日おきにヒト血清メEDIUM でパッセージを行い、CAR 導入細胞の割合、増殖率を測定した。

培養開始 14~21 日目に機能解析を行った。標的として HLA-A2 陽性の T2 細胞、HLA-A*02:01 導入 K562 細胞、マウス B6 由来の EL4 に HLA-A*02:01 を導入した細胞を用いた。標的細胞は ^{51}Cr で標識し、通常の 4 時

間細胞傷害性試験をおこなった。この際に HA-1H、HA-1R、Flu-A（インフルエンザ A 由来）、HA-1Q（マウスの HA-1 カウンターパート）ペプチドをさまざまな濃度で添加しタイトレーションを行った。

（倫理面への配慮）

本研究で行うゲノム解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等に従って作成した研究計画書を作成し、倫理委員会の審査・承認を得た後に、担当医による人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明を実施後書面にて同意を得られた場合のみに実施された。以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものとする。

C. 研究結果

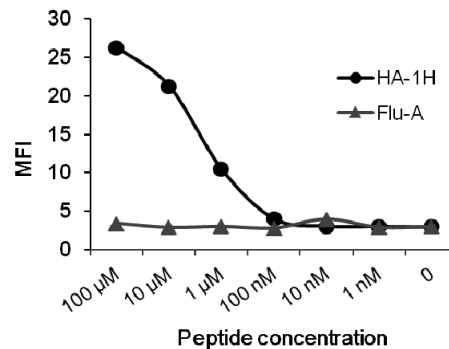
1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

マイナー抗原ペプチドを用いた移植後再発造血器腫瘍に対するワクチン療法臨床研究については、平成25年3月末の時点で90症例のリクルートを終え、本年度は2例においてマイナー抗原ミスマッチがあり、ワクチン適応であった。2例とも試験にエントリーしているが、まだ *in vitro* 解析途上であるため、次年度にまとめて報告したい。

2) HLA-A2/HA-1H 特異的単鎖抗体の取得と CAR-T 細胞作製の試み：

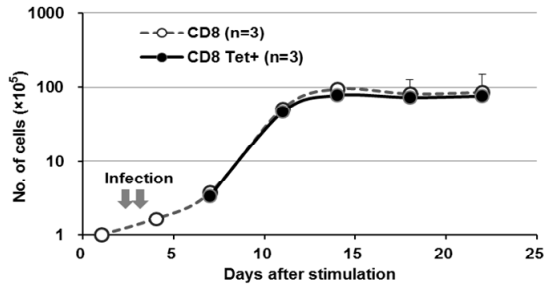
単鎖抗体（クローン#131）をビオチン化

した後 streptavidin-PE を用いてテトラマー抗体化した。T2 細胞に HA-1H、陰性コントロールとして Flu-A を 10 倍希釈しつつ添加し、抗体での染色性を目安に Mean fluorescence intensity（MFI）で検討した（下図）。

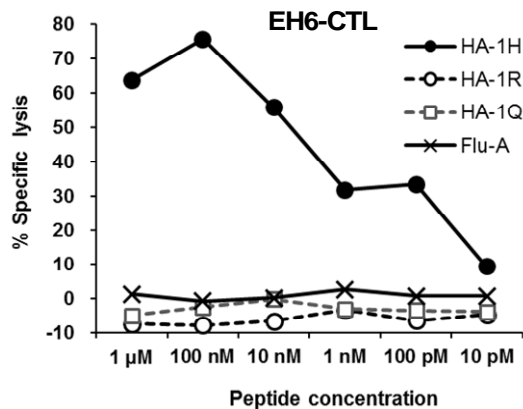
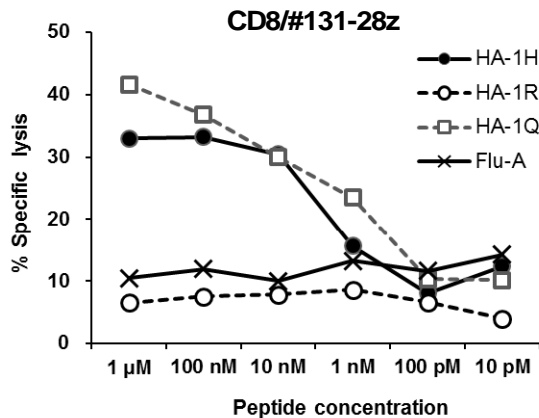


HA-1H はペプチド濃度 100nM 以上で濃度依存性に検出されたが、Flu-A は 1,000 倍の 100μM でも全く染色されなかった。図には示さないが、HA-1R ペプチドの場合も 100μM での若干の染色以外、Flu-A と同様な結果であった。以上より、#131 抗体は HLA-A2 に反応するのではなく、HLA-A2 に結合したペプチドとの複合体に反応していると考えられた。

#131 の C 末端の IgG4 定常領域を除去し、CD28 膜貫通領域と CD3- の ITAM 領域を PCR 法にて合成し、構築したレトロベクターに組み込んだ。レトロベクターは Phoenix-GP パッケージング細胞に導入し、puromycin で選択後、その上清を CD3/28 で刺激した primary CD8⁺ T 細胞に感染し、さらに増殖させた（CD8/#131-28z と命名）。2 週間に約 90 倍増幅した。並行して HLA-A2/HA-1H-テトラマーで染色される遺伝子導入細胞の割合を測定したが、導入効率はほぼ 95%以上、感染細胞の増幅は下図のように非導入細胞と差はなかった。



ついで T2 にペプチドを各パルスして、細胞傷害性試験を行った。エフェクター/ターゲット比は 10 前後であった。陽性コントロール CTL として、HA-1H 陰性健常人から過去に樹立した EH6-CTL を用いた。



EH6-CTL は HA-1H を 10pM まで認識したが、CD8/#131-28z は 1nM 以下では細胞傷害性が検出されなくなり、100 倍程度の avidity の差があった。面白いことに CD8/#131-28z は HA-1Q に対して HA-1H よりも強く反応した。しかし、B6 由来 EL4

に HLA-A2 を導入した細胞には傷害性を与えなかった (データ示さず)。

D. 考察

マイナー抗原ワクチン臨床試験については、毎年約 10 例程度が検査を受け、20 程度が何らかのマイナー抗原について試験適格となり、着実に症例を積み重ねている。当初は 3mg までの 4 コーホートを予定していたが、他のペプチドワクチンでは概ね 1mg を上限としており、本臨床試験も 1mg のコーホートで試験を終了する予定であり、残すところあと 2 例となった。ただし、HLA-B44 拘束性の ACC-6 は適格例がなく、現状ではデータを得られていない。次年度に 10 例以上の検査対症症例を得るようにしたい。

HLA-A*02:01 に提示された HA-1H を認識する抗体は、Biacore データは示さなかったが 10^{-9} M オーダーの K_D 値を示し、抗体として非常に良好な Affinity を得た。この 10^{-9} M は TCR の平均 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ M に比較して 100 倍以上高く、CAR-T での良好な細胞傷害性の発揮が期待された。データは示さなかったが、少なくとも HLA-A2/HA-1H-テトラマーでの染色性は EH6-CTL と遜色のないものであった。にもかかわらず T2 細胞を用いたペプチドタイトレーションで 10~100 分の 1 程度の Avidity しか示されなかった理由として、通常の CTL のように CD8 を Co-receptor として使用できないような立体構造が抗体：抗原シナプス部分に存在する可能性がある。この部分については抗体を用いたブロック試験を実施し原因を究明中である。

CD8/#131-28z が予想外にマウス由来の HA-1Q (VLQDDLLEA) をより強く認識した理由は不明である。Q 部分が多型であるが、(1) HA-1R が T2 細胞に結合しづらいの

に対して、HA-1Q は HA-1H よりも結合しやすい可能性、(2) HA-1H と HA-1Q は同様に HLA-A2 と結合するが、Q の方が#131 抗体のエピトープ認識部位に高い親和性があった可能性が上げられる。しかし、EL4 に HLA-A2 を強制発現させた細胞は傷害されなかったことより、もともと HA-1Q ペプチドは細胞内で存在しない（プロテアゾームで破壊される）か、Endoplasmic reticulum 内で HLA-A2 と会合できないのかもしれない。これらも今後の検討課題である。さらに HA-1H を Endogenous に発現する細胞に対する傷害活性は、今後 HLA-A2 陽性、HA-1H 陰性（HA-1R/R 型）の健常者から末梢血を得て検討する予定である。

E. 結論

移植後の造血器腫瘍の再発予防・治療のための選択的 GVL 効果をもたらすマイナー抗原についてワクチンの臨床試験を継続し、投与量は最終コホートに至ったので、次年度内に第 1 相試験の結果を評価しうると考えられる。

HLA に結合したペプチドを認識する抗体はマウスへの HLA テトラマー免疫により可能であった。この抗体で CAR-T 細胞を作製し、抗原特異的な細胞傷害性を得ることに成功した。今後はこの CAR-T 細胞を CTL と同等な機能を発揮できるように、どのような Form で CAR-T 細胞にするのがよいかを検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, [Akatsuka Y](#), Weissman IL, Greenberg

PD.Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen., *Blood*. 119: 5492-5501, 2012. (PMID: 22529286)

- 2) Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, [Akatsuka Y](#). HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens*. 80: 119-125, 2012 (PMID: 22568758)
- 3) Machino T, Okoshi Y, Miyake Y, [Akatsuka Y](#), Chiba S. HLA-C matching status does not affect rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by allogeneic natural killer Cells. *Immunol Invest*. 41: 831-846, 2012. (PMID: 22676066)
- 4) Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin YH, Tachino S, [Akatsuka Y](#), Kuzushima K, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor. *Anticancer Res*. 32: 5201-5209, 2012. (PMID: 23225417)
- 5) Demachi-Okamura A, Torikai H, [Akatsuka Y](#), Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. *PLoS One*. 7(10):e47126, 2012.

2. 学会発表

- 1) 赤堀 泰, 赤塚美樹, 葛島清隆, 恵美宣彦: HLA-A*02:01 拘束性に提示されたマ

イナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離．第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会．金沢、H24 年 8 月 18 日．プログラム抄録集抄録集 pp64.

- 2) 赤堀 泰, 稲熊容子, 赤塚美樹, 山本幸也, 村山裕子, 伊庭佐知子, 遠藤明美, 平松可帆, 葛島清隆, 恵美宣彦. HLA-A2 拘束性に提示されたマイナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離とその臨床応用に向けての検討 (口演 11-3). 第 35 回日本造血細胞移植学会、金沢． 2013 年 3 月 8 日．日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp202.
- 3) Yoshiki Akatsuka, Hirofumi Taji, Yasuo Morishima, Koichi Miyamura, Yoshihisa Kodera, Nobuhiko Emi, Toshitada Takahashi,

Tomohiro Kinoshita, Kiyotaka Kuzushima. Vaccination With Minor Histocompatibility Antigen-Derived Peptides In Post-Transplant Patients With Hematological Malignancies - Preliminary Results. 2nd International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2012 年 11 月 6 日, NIH Bethesda, MD, USA. Abstract P-11 (pp34).

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。