

同種移植後の再発白血病の治療法開発

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

同種造血細胞移植後に再発した造血器腫瘍の予後は極めて不良であるが、再発ハイリスク例における移植後再発率は 30% に及ぶ。GVHD を誘導することなく抗白血病（GVL）効果を得る方法として、血液系に限局して発現するマイナー抗原を標的とする免疫療法が検討されてきた。我々は、そのような性質をもったマイナー抗原を認識するキラー T 細胞受容体をドナー T 細胞に遺伝子導入して武装する方法を開発する傍ら、HLA に結合したマイナー抗原を認識する抗体を分離し、これを単鎖化し T 細胞に導入する CAR-T 細胞療法の可能性についても検討した。マイナー抗原 / HLA 複合体を接種し免疫したマウス脾細胞から B 細胞を分離、ファージディスプレイ法にて特異的なクローンを分離した。得られた抗体は、マイナー抗原の陰性アリルペプチドをパルスした細胞には結合せず、抗原陽性ペプチド濃度依存性に結合した。これを T 細胞に導入することで、CD19 抗体で行われたような CAR-T 細胞免疫療法にトランスレーションすることが今後の目標である。

A. 研究目的

我々はこれまでに 9 種類のマイナー抗原を同定してきたが、うち 4 種類が血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされており、選択的 GVL 効果誘導に有望と考えられた。マイナー組織適合抗原はドナー、患者間の遺伝子多型の差に由来するため、移植前に HLA タイピングとともにマイナー組織適合抗原遺伝子タイピングを行っておけば各症例に合ったマイナー抗原を選択できるという、テーラーメイド治療が可能である。現在マイナー抗原ペプチドワクチン療法の臨床試験では 8 例に投与がなされたが、移植後の極めて長期経過例で十分な免疫反応が得られない傾向がわかってきた。このため事前にマイナー抗原特異的 T 細胞を事前に用意しておき、再発早期や、再発予防のブースとして投与することを考慮する必要がある。本研究は、クローン化した T 細胞では十分な輸注細胞数を得られない反省から、マイナー抗原 T 細胞受容体（TCR）や、マイナー抗原 / HLA 複合体を認識する抗体で武装した T 細胞

を開発することに注力した。TCR 導入細胞については昨年度の ACC-1Y マイナー抗原を認識するものに加えて、ACC-1C 抗原を認識する TCR のクローン化を試みた。

B. 研究方法

ACC-1C 特異的 CTL の TCR を組み込んだレトロウイルスベクターの作成：

ACC-1C を認識する CTL クローン、1B9 の TCR α 鎖、 β 鎖を PCR 法にてクローン化した。配列確認後、それぞれの鎖は PGK promoter もしくは 2A ペプチドで結合し、必要に応じて下流に選択用の NGFR を結合した。レトロウイルスプラスミドには Stanford 大学から得た LZRSpBMN-Z を改変したものをを用いた。

レトロウイルスの産生：

パッケージング細胞として、GALV- Phoenix-GP 細胞を用いた。プラスミドの導入は XtreamGene9

を用いて行い、puromycin にて導入細胞を選択し、一過性プロデューサー細胞を得た。

ウイルスの感染：

ウイルス上清をレトロネクチンコーティングしたプレートに入れ、 32°C 、 $2,000\times\text{G}$ で 3~4 時間遠心後、Jurkat/MA 細胞、もしくは OKT3、CD3/CD28 ビーズで 2~3 日間活性化した T 細胞を入れて培養した。必要に応じ 2~3 回感染を反復し、感染 1 週間後より、マイナー抗原を $10\sim 100\text{nM}$ の濃度でパルスした自己 B-LCL で 2~3 度反復刺激した。TCR 遺伝子導入・発現効率は A24/ACC-1C-PE テトラマーと CD3、CD8 抗体のカウンター染色にて評価した。

またクロム遊離試験によって、TCR 導入 T 細胞がどの程度細胞傷害性を有するか検討した。

CAR-T を作成するために、まずマウスに HLA-A*02:01/HA-1H (以下 A2/HA-1H) テトラマーを複数回 B6 系統のマウスに接種して免疫を行った。脾細胞 B 細胞を取り出し、その免疫グロブリン cDNA ライブラリから A2/HA-1H に反応性の抗体を A2/HA-1H モノマーと陰性コントロールの HLA-A*02:01/MAGEA3 モノマーでスクリーニングし、前者のみに反応するクローンを得た。次のステップとして HLA-A*02:01 に提示された HA-1H ペプチドには反応するが、HA-1R ペプチドには反応しない特異性の高いクローンを選択した。さらにこの単鎖抗体断片 (scFv) で作成したテトラマーが細胞上に発現した HLA-A*02:01 に提示された HA-1H に結合できるか検討した。

(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

ACC-1C 特異的 CTL の TCR を組み込んだレトロウイルスベクターの作成：

CTL-1B9 の TCR α 鎖と β 鎖を 2A 配列を利用してタンデムに結合して 1 つのベクター (TRBV7-9*03 BJ2.1) \rightarrow F2A \rightarrow α (AV24-AJ37) を Phoenix-Galv パッケージング細胞に導入し、産生されたウイルスを Jurkat/MA に感染させて、発現を評価した。特異的テトラマーは 陽性コントロールであるオリジナルの CTL-1B9 には良好な反応性を示したが、Jurkat/MA に TCR を感染させたものはほとんど染色されなかった。CTL-1B9 は PCR 解析でもう 1 種類の in-frame の TCR- α 鎖を弱く発現しており、これが bona fide の TCR である可能性がある。

A2/HA-1H を認識する抗体については 5×10^8 スケールのファージライブラリから出発し、3 回のパニングによる濃縮後にランダムにピックアップした 144 個のコロニーをスクリーニングした。この結果 7 種類、18 クローン (12.5%) が得られた。これ以外は HLA-AH2/MAGEA3 にも反応するもの、無反応のものであった。このうち最も結合力が強い単鎖の scFv をコードする cDNA (クローン#131) を 4 量体化した蛍光色素標識ファージ抗体ないしは、IgG4 抗体定常領域の前に組み込みテトラマー化して、HA-1H ペプチドをパルスした TAP 欠損 HLA-A*02:01 陽性の T2 細胞と反応させたところ、 10nM まで反応が得られたが、HA-1R ペプチドやそれ以

外の HLA-A*02:01 結合性ペプチド (MAGEA3、HIV、Influenza-A MP <以下 Inf-A>、EBV) とは非生理的な高濃度である 10 μ M でも反応しなかった。

次いで PCR 法にて、#131 scFv の C 末端に CD28 の膜貫通部位と CD3 ζ 鎖の ITAM 部分をタンデムに結合し、レトロウイルスベクター-LZRSpBMN-Z に組み込んだ。これを TCR 遺伝子導入の場合と同様に GALV- Phoenix-GP に導入し、puromycin でウイルス産生細胞を得た。この段階で GALV- Phoenix-GP は HLA-A2/HA-1H テトラマーによって染色されたため、scFV-CD28- ζ コンストラクトは正常に機能していることが確認できた。この上清を CD3/CD28 ビーズで活性化した健康人から得た CD8⁺ T 細胞に感染させ、CAR-T 細胞を得た。2 日連続の感染によりほぼ 95% の T 細胞に効率良く遺伝子導入されたことがテトラマー試薬で確認できた。

これらの CAR-T 細胞は 2 週間でおおよそ 100 倍以上に増殖した。2 週間後の時点でも HLA-A2/HA-1H テトラマーで CAR の発現は保たれていた。これらの細胞をエフェクター細胞とし、⁵¹Cr でアイソトープ標識した T2 細胞もしくは HA-1H 陰性・HLA-A*02:01 導入 K562 細胞標的細胞に HA-1H、HA-1R、Inf-A ペプチドをパルスして細胞傷害性試験を行ったところ、Inf-A パルス細胞は 10 μ M でも傷害されなかったのに対して、HA-1H パルス細胞は少なくとも 10nM まで傷害された。HA-1R パルスの場合、10 μ M では傷害活性が見られたが、1 μ M ではすでに消失した。

D. 考察

昨年度の報告で、マイナー抗原 ACC-1Y 特異的 1B3-CTL の TCR を導入された T 細胞の細胞傷害活性や avidity は充分ではなかったが、最大の理由は TCR の導入効率が 1~5% (増幅後) と低く、十分なエフェクター/標的 (E/T) 比が得られないことが考えられ、感染後の刺激・増幅が必要であった。今回作成した ACC-1C 特異的 1B9-CTL の TCR については、感染 T 細胞で特異的テトラマー HLA-

A24/ACC-1C での染色が得られなかった。この原因として 1B9-CTL が 2 つ TCR α 鎖を発現しており、今回半定量 PCR で強く発現していた α 鎖が内在性 β 鎖の本来のペアリング相手ではなかった可能性がある。このため、現在もう一つの α 鎖をクローニングして 2A を介して 1 本鎖化したベクターの構築を行っている。もう 1 つの可能性として、過去にライデン大学から報告があったように、導入した TCR α と β 鎖のペアリングが導入された T 細胞が endogenous に発現する T 細胞より CD3 コンプレックスを奪う力が弱いものであった可能性がある。この場合は S-S 結合を導入するなど、ペアリングの強化が必要と考えられた。

HLA-A*02:01 に提示された HA-1H ペプチドを認識する抗体と、この抗体を発現する CAR-T 細胞の作成は結果に示したごとく、抗体のスクリーニングの開始は 5 $\times 10^8$ クローンと大きなプールであったにもかかわらず、陰性コントロール HLA-A2/MAGEA3 モノマーを加えたパニングで 12.5% の効率で HLA-A2/HA-1H 特異的抗体を得ることが出来た。この効率は抗体スクリーニング結果として非常に高いと考えられた。

CAR-T 細胞の機能については解析途上であるが、少なくともさまざまな HLA-A*02:01 結合性ペプチドを用いたパルス実験では、単鎖抗体がわずかに 1 アミノ酸の違いを見分けているデータが得られた。しかし、もともと HA-1R (抗原陰性のペプチド) は HLA-A*02:01 への結合効率が HA-1H より 10 分の 1 ほど低いと報告されており、単純に同じペプチド濃度でのパルスの比較をするのはフェアではないと考えられる。しかし、#131 scFV テトラマー抗体や CAR-T 型が反応した 10 μ M 以上というのは、生理的には達しえない濃度 (生理的には高くても 0.1 μ M が上限と考えられる) であり、非常に特異性の高い抗体が得られたと考えている。

今後の課題として、CAR-T 型における詳細な特異性検討、介在補助分子の有無、細胞傷害活性を CTL 並みに改善する方法の開発などを考えている。

E. 結論

移植後の選択的 GVL 効果を用いた再発白血病の予防や治療は今後さらに主要な課題となると考えられる。能動免疫であるワクチンは我々のみならず、オランダ・ドイツグループが樹状細胞ベースで開発を開始しているが (Dr. Dolstra、私信)、効果の速さの点で養子免疫に勝るものはない。TCR の導入では発現効率や、内在性 TCR とのキメラ形成など問題があったが、CAR-T はこれらの問題は回避できる。今後さらに良質な抗体を作成することで、臨床にトランスレーション可能な治療系が開発できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

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: 5492-501, 2012. (PMID:22529286)
- 2) 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*. 32:5201-5119, 2012. (PMID: 23225417)
- 3) 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*. 710: e47126, 2012. (PMID: 22529286)

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

特記すべきことなし。

