

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略）
分担研究報告書

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においては、最近では HLA 半合致移植後の cyclophosphamide などの導入でドナーソースが増え適応患者が増えつつあるが、移植後再発と GVHD は依然として大きな問題である。我々は選択的抗腫瘍効果を誘導す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同定し、移植後再発の予防や治療への応用を検討してきた。能動免疫法は予防で特に有用であるが、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。昨年度は同種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 chimeric antigen receptor (CAR) を導入した T 細胞について初期の検討結果を報告した。本年度はこの CAR-T 細胞が認識する細胞あたりの HLA/ペプチド複合体数、サイトカイン産生能、また異なった K_D 値を持つ CAR を導入した T 細胞との機能比較について検討した。CAR-T 型にすることで、フローサイトメトリーでシフトが検出できる閾値レベル検出限界の 7 分の 1 以下の抗原量まで細胞傷害能が発現することが明らかになった他、30 分の 1 程度の K_D 値の CAR-T でも同レベルの細胞傷害性が見られるなど、 K_D 値だけでは予測できない T 細胞の認識機序があることが示され、更に検討を要すると考えられた。

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肢である。最近では HLA 適合ドナーが見つからない場合 HLA 半合致の血縁から移植を行う Post-cyclophosphamide 方法が報告され移植適応患者の増加が期待される。しかし、この HLA 不適合移植後でも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、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、B 細胞性腫瘍に対する CD19/CD20-chimeric antigen receptor (CAR)導

入 T 細胞療法を除き、効果は依然として限定的である。最近では米国に於いて HLA-A2 拘束性 WT-1 ペプチドを認識する T 細胞を用いた養子免疫療法がある程度の効果を挙げつつあり、エフェクター細胞を大量に輸注する治療法は、難度が高いものの有望と思われる。

我々は HLA 以外の同種抗原であるマイナー抗原に着目して、日本人移植患者において重要な役割をもっているものを複数種類新規同定し、報告してきた。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。その中で我々は、選択的 graft-versus-leukemia/lymphoma (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について集中的に検討してきた。昨年度は HA-1H マイナー抗原ペプチド + HLA-A2 複合体を認識する“TCR 様”抗体の樹立、単鎖抗体の性質、これに CD38-CD3 鎖を結合し T 細胞に導入した CAR-T 細胞の細胞傷害機能と問題点を報告した。今年度はさらに、単鎖抗体と CAR-T とした場合とで低密度抗原の認識に差があるか、特異性は同じながら異なる平衡乖離定数 (K_D) をもった CAR-T 細胞との比較、サイトカイン産生能などを検討したので報告する。

B. 研究方法

1) HLA-A2/HA-1H 複合体を認識する単鎖抗体の樹立と異なった親和性を持つ CAR を遺伝子導入した T 細胞との比較：

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-テトラマーは主任研究者の葛島らが作製した。HLA-A2/HA-1H-テトラマーを HLA-A2 遺伝子導入 B6 マウスに 3 回免疫した。1 週間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を複数樹立した。これの単鎖抗体のうち K_D 値が最も低いクローン#131 を直接 PE で標識し、HA-1H, HA-1R を含む HLA-A2 結合性のペプチドを HLA-A2 陽性 TAP 欠損 T2 細胞に添加後、抗 HLA 抗体 (W6/32)・抗 HLA-A2 抗体を用いて表面 HLA-A2 の安定化度を評価した。

引き続き CAR-T 細胞の作製を行った。まずクローン#131 の他、異なった K_D をもつ単鎖抗体 (クローン#4, #9) の cDNA の 3' 末部分に CD28 の細胞膜貫通領域、CD3 鎖の

ITAM ドメインを結合し、「第 2 世代」の CAR のレトロウイルスコンストラクトを作製した。

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 陽性 T 細胞に純化した。これを CD3-CD28 コーティングビーズを用いて刺激し、48, 72 時間後にウイルス上清で 2 回感染、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 日目に必要に応じて CD4、CD8 陽性細胞に分画してから機能解析を行った。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、他、HLA-A2 結合性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。

2) 単鎖抗体および CAR-T が認識に必要な細胞表面抗原 (HLA/ペプチド複合体) 密度の検討：

最も K_D 値の低いクローン#131 単鎖抗体を用いて、T2 細胞上に様々な濃度の HA-1H ペプチドを添加した場合、実際にどれくらいの HLA/ペプチド複合体が形成されているかを検討した。QIFI キット (DAKO) を用い、表面に結合した抗体分子数が既知の検量用ビーズと、様々な濃度の HA-1H をパルスした T2 を#131-scFV-PE および抗 PE 抗体で標識し、最後に共通の抗 IgG-FITC 抗体で蛍光強度を測り、比較検討した。検量線を作成後、HLA/ペプチド複合体数に対応する HA-1H ペプチド濃度を決定した。さらに、得られた濃度と#131-scFV CAR-T 細胞による認

識との関係を検討した。

さらに単鎖抗体染色による検出感度を上げることで、実際には低濃度の HA-1H パルスでも単鎖抗体が結合できていないかを検討した。FASER キット (Miltenyi) を用いて PE の蛍光を 10 倍以上増幅し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

3) CAR-T 細胞のサイトカイン産生パターンの検討：

昨年度の結果では#131-CAR-T 細胞が内在性に HA-1H エピトープを発現する細胞を傷害出来なかった。そこで、#131, #4scFV を導入した CAR-T 細胞と HLA-A*02:01 cDNA を導入した K562/A2 細胞に更に HA-1H または HA-1R (Allelic variant) をコードするミニ遺伝子を導入したものと一晩共培養し、上清中の IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 を測定した。

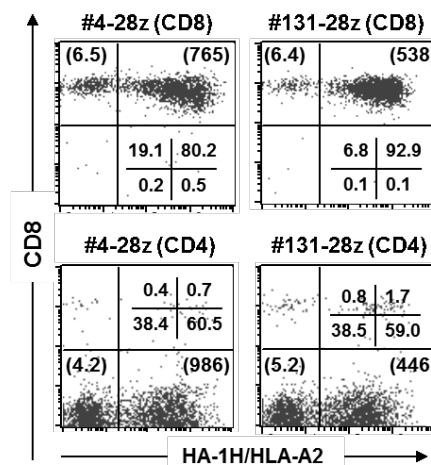
(倫理面への配慮)

本研究で行う HLA 型やマイナー抗原型に関するゲノム解析は、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なかったものとする。

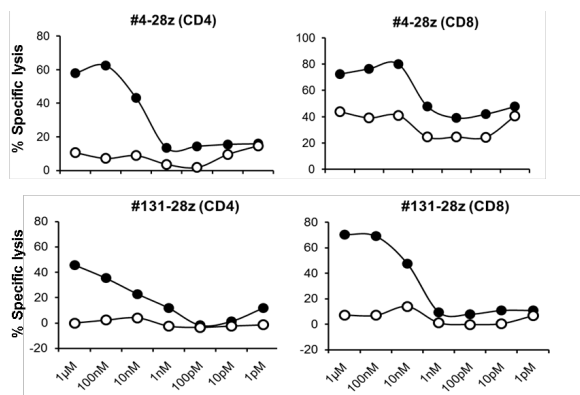
C. 研究結果

1) HLA-A2/HA-1H 複合体を認識する異なった親和性を持つ CAR を遺伝子導入した T 細胞との比較：

昨年度は最も K_D 値の低かった単鎖抗体 (クローン#131) を用いたが、これを T 細胞に導入した場合、scFV と HLA/ペプチド複合体が強固に結合し過ぎてしまい、マイナー抗原のような少ない細胞抗原量 (10 コピー程度/細胞) の場合、T 細胞が Rolling による連続的な刺激を得ることができないことが、細胞傷害性を発揮できない理由ではないかと考えた。そこで#131 より約 1/30 の K_D 値をもつクローン#4 で同様な CAR-T 細胞を作成して CAR の発現 (下図) と機能を検討した。



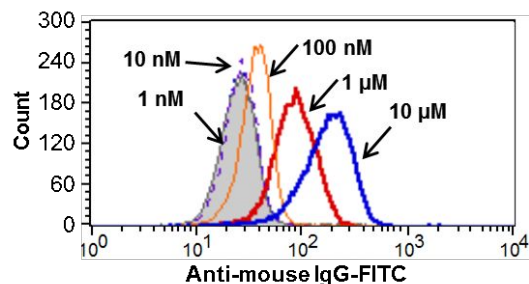
次いで、磁性ビーズを用いて CD4、CD8 に分離後に解析したところ、HLA-A2/HA-1H テトラマーによる染色性は K_D 値の低い #4 の方が若干良好であった。次に HA-1H ペプチドを添加した T2 細胞に対する傷害性を検討した。その結果 CD4 陽性の#4 CAR-T 細胞がより強い傷害性を示したものの、低濃度 HA-1H ペプチドパルスにおける認識性は#131、#4 とともに 1 nM 付近が検出限界であり、差を認めなかった (下図)。



このことは、少なくとも 30 倍程度 K_D が弱くなる程度では CAR-T 細胞としての細胞傷害性に影響を与えず、今後さらに TCR に近い K_D 値の scFv を導入した CAR-T 細胞で検討を要すると考えられた。

2) 単鎖抗体および CAR-T が認識に必要な細胞表面抗原 (HLA/ペプチド複合体) 密度の検討:

B 細胞性腫瘍におけるリツキシマブの標的となる CD20 の発現量は 10 万コピー/細胞前後とされ、抗 CD20 抗体を搭載した CAR-T 細胞にとって標的抗原は十分あると考えられる。他方、HLA 上に提示されたマイナー抗原のコピー数については、過去の報告で HA-1H が 10 コピー/細胞程度とされる。HA-1H に特異的なキラー T 細胞 (CTL) はこのような条件下でも良好な傷害性を示す。#131 CAR-T 細胞では内在性に HA-1H を発現する細胞を傷害出来なかったが、他方 10nM のペプチドをパルスすることで T2 細胞を傷害した (上図)。そこでフローサイトメトリーの染色性 (平均蛍光強度) と細胞あたりの HLA-A2/HA-1H 複合体数の関係を検討した。フローサイトメトリーでシフトとして観察される添加ペプチド濃度下限は 100nM 程度であり、10nM ではほぼ検出されなかった (下図)。



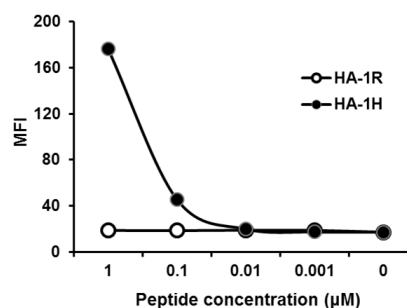
細胞傷害性試験の結果と比較すると、CAR-T とした場合、少なくとも傷害能で検出される感度はフローサイトメトリーの検出下限の 10 倍以上であった。

さらにコントロールピースの染色性との比較から、T2 細胞上の HLA/ペプチド複合体数を算出した (下表)。

HA-1H concentration on T2 cells (μM)	MFI	ABC	SABC
Irrelevant scFv	24.67	4104	0
1 nM	25.28	4213	109
10 nM	26.26	4388	284
100 nM	35.52	6067	1963
1 μM	84.46	15359	11255
10 μM	176.81	33919	29815

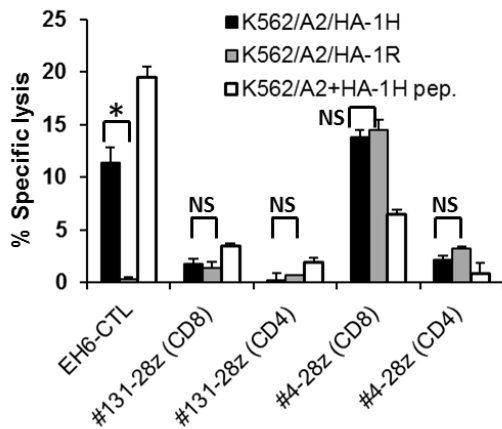
表で SABC が細胞あたりの抗原複合体の分子数を示す。100 nM で約 2000 分子、10 nM で 300 分子前後であった。すなわちフローサイトメトリーの検出下限は 2000 分子と高く、CTL では 300 分子前後であった。

また蛍光増幅を行うと、フローサイトメトリーによる検出限界は 100nM 以下となったが、10nM が限界であった (下図)。

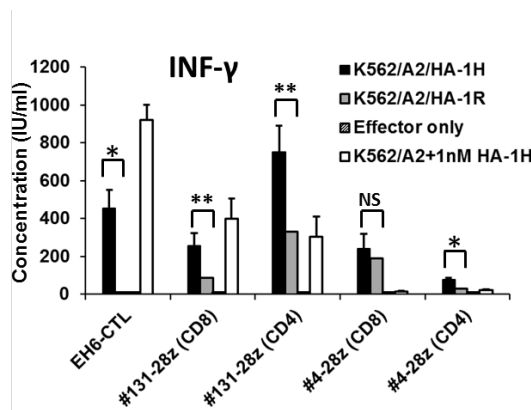


3) CAR-T 細胞のサイトカイン産生パターンの検討:

#131 scFv CAR-T 細胞による細胞傷害性は、エピトープを内在性に発現する HA-1H または HA-1R (Allelic variant) をコードするミニ遺伝子を導入した K562/A2 細胞では示されなかった (下図、ポジティブコントロールは 10nM HA-1H ペプチドをパルスした K562/A2)。



これは細胞表面上のコピー数が 300 個以下であるためと思われるが、もう一つの CTL の機能であるサイトカイン産生能についても検討した。代表的な IFN- γ 産生の結果を示す (下図)。



IFN- γ は #131 scFV を導入した CAR-T 細胞から産生され、その産生は CD4 陽性分画の方が多かった。また #4 は IFN- γ 産生能では #131 に劣るか (CD4 分画) 産生出来なかった (CD8 分画)。図には示さないが、#4 scFv CAR-T 細胞は TNF- α および IL-2 産生能では #131 より良好であった。

D. 考察

本年度は K_D 値が高すぎるのが CAR-T とした場合に細胞傷害活性がでない原因なのか、またどの程度の細胞表面抗原量が今回作成した HLA-A*02:01 拘束性 HA-1H を認識する TCR-like 抗体の検出限度か、そして細胞傷害活性に加えサイトカイン産生能について検討を加えた。

K_D 値の検討では、30 倍 K_D 値の弱い (TCR では最大の K_D 値 $10^{-7}M$ に相当) #4 scFv を用いて検討したが、HA-1H 特異的 CTL としてクローニングされた EH6 という CTL のような活性は見られなかった。以上のことより、高すぎる K_D 値のために T 細胞に連続的な刺激が入らないためという仮説は否定的となった。CAR-T は細胞内シグナルドメインは 鎖の ITAM だけであり、また HLA/ペプチド複合体と scFv 結合部分に TCR で形成されるような免疫シナプスが形成されるかも不明であり、今後の検討課題と考えられた。

今回の CAR-T 細胞が細胞傷害性を発揮するには細胞あたり 300 分子程度の抗原が必要と判明した。サイトカイン産生能で評価した場合は更に 1 桁以上低い抗原量で反応が出ていたので、CAR-T 細胞のエフェクター相では抗原量に応じサイトカイン産生 > 細胞傷害活性が発現すると考えられた。フローサイトメトリーで検出される下限でも CAR-T とすることにより細胞傷害活性が出ることより、これまで親和性が低いとして断念していた抗体や、抗原量が少ないとして効果が期待できないと想像された腫瘍でも CAR-T とすることで治療効果が期待できると考えられた。

本研究はモデル抗原として HA-1H を用いたが、これは HLA-A2 トランスジェニック

マウスが入手できたことが主な理由である。今後は日本人の 6 割以上が有する HLA-A24 に拘束される抗原エピートープペプチド複合体を認識する抗体・CAR-T 細胞を開発し、対象を広げる必要があると考えられた。

E. 結論

HLA に結合したマイナー抗原ペプチドを認識する TCR-like 抗体と CAR-T を作製し、その機能、抗体の KD 値や抗原量との関係、エフェクター機能について詳細に解析し、TCR-like 抗体を組み込んだ CAR-T が HLA/ペプチド複合体を認識することを示した。今後は実際の抗腫瘍効果や off-target 効果の有無を検討し、トランスレーションが可能かを見極める必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Yasuharu Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N, Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. Gene Ther. 2014 (In press).
- 2) Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirotsawa T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules. Hum Immunol. 74:1103-10, 2013. (PMID: 23806269)

- 3) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. J Hematol Oncol. 7:3. 2014. (PMID: 24393438)

2. 学会発表

- 1) 赤塚美樹, 赤堀泰, 稲熊容子, 村山裕子, 辻川朱里, 平松可帆, 西村泰治, 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 を認識する抗体の単離と CAR-T の機能. 第 17 回日本がん免疫学会総会. 宇部, 2013 年 7 月 5 日. (口演 OS6-1) プログラム・抄録集 pp117.
- 2) 稲熊容子, 赤塚美樹, 赤堀泰, 村山裕子, 辻川朱里, 平松可帆, 西村泰治, 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 を認識する抗体の単離と CAR-T の機能 (口演 S3-4). 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会, 名古屋. 2013 年 8 月 24 日. 造血器腫瘍免疫療法研究会総会プログラム・抄録集 pp76.
- 3) Akatsuka A, Demachi-Okamura A, Yamamoto Y, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and molecular characterization of a single chain antibody specific for HA-1 minor H antigen. (ポスター P-1247). 第 72 回日本癌学会総会, 横浜. 2013 年 10 月 3 日. 日本癌学会総会プログラム・抄録集 pp119.
- 4) Inaguma Y, Akahori Y, Akatsuka Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y,

Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and Molecular Characterization Of a T-Cell Receptor-Like Antibody and CAR-T Cells Specific For Minor Histocompatibility Antigen HA-1H. The 55th ASH Annual

Meeting, New Orleans, 米国. 2013 年 12 月 9 日 . (Poster, Abstract 4490). 抄録集 Blood 2013;122:

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。