

ヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとした新規キメラ抗原レセプター（CAR）遺伝

子導入 T 細胞の作成と評価

研究代表者：寺倉 精太郎 名古屋大学医学部附属病院 血液内科医員

研究要旨：

ヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとした新規キメラ抗原レセプター（CAR）を開発し、これを遺伝子導入した T 細胞を用いてその評価を行った。CD20 を特異的に認識する CAR 遺伝子を開発し得た。現在臨床で用いられる抗 CD20 抗体は、連用することで腫瘍細胞表面上の CD20 発現が低下し、抗 CD20 抗体療法が不応になることが知られているが、CD20-CAR+ T 細胞はこうした CD20 低発現細胞株も有効に認識・傷害した。また、腫瘍細胞表面上の CD20 が低発現となった患者からの臨床分離株においても有効な認識・傷害を示した。

これまで用いてきた CD28 細胞内ドメインに加え、4-1BB および CD27 細胞内ドメインをもつ CAR を作成した。細胞内シグナルを詳細に検討するため、T 細胞が活性化すると蛍光を発するよう vector を遺伝子導入したが、刺激後にうまく発現しなかった。さらに抗体部分の affinity の異なる CAR を複数種類作成し、affinity と細胞内ドメインの最適な組み合わせについて検討した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における所属

村田誠・名古屋大学医学部附属病院 講師

A.研究目的

本研究ではヒト化 CD20 抗体を細胞外ドメインとして用いた CAR を作成・評価し前臨床試験までを行うことを目的とした。既に抗体の Affinity が報告されているヒト化 CD20 抗体の遺伝子情報を用いて開発に着手できる。ヒト化抗体を用いた CAR の開発はまだ報告が少ないが、導入した遺伝子産物に対する免疫反応が起こりにくいと考えられるヒト化抗体を用いて免疫反応を避ける必要性は高い。本研究で用いる CD20 抗体は Affinity が既知であ

るために、標的細胞側の抗原発現量がリガンド結合後の T 細胞機能に及ぼす影響を、異なる Affinity の CAR を用いて検討可能である。CD20 低発現細胞株や臨床分離細胞を用いて CD20 低発現の標的に対する CD20-CAR の作用について検討する。さらに Affinity/avidity を変化させたときに CD28/CD27/4-1BB の細胞内ドメインの違いが及ぼす影響について、とくに抗原刺激後の T 細胞の増殖・メモリー化に及ぼす影響について in vivo で検討する。

CD20 刺激後のサイトカイン分泌や細胞分裂能から最適な CAR の構造を決定し、これを用いた臨床試験の準備を行う。分担研究者において既に稼働している Cell processing center を用いて実際の患者から分離した T 細胞を用いた細胞調整の試験を数例程度行い、GMP 基

準に則った細胞調整が可能であることを確認する。

開発したCD20-CARを用いて臨床試験を行い、実際に臨床的有用性が示されれば、現在臨床で使用されている維持抗体療法・化学療法の代替としてより副作用が少なく、維持療法よりもむしろ安価な治療として認知されることが期待される。

B. 研究方法

これまで用いてきたCD28細胞内ドメインに替えて4-1BB/CD27の細胞内ドメインを組み込んだプラスミド・ベクターを作成した。上記同様にレトロウイルス・ベクターを作成した。CARがCD20に結合した後、伝達されるシグナルを比較検討するため、Jurkat細胞株にreporter vectorを組み込んだものを作成した。これにより、より定量的にシグナル伝達を評価できるものと考えた。

CARの細胞外ドメインとなる抗体のaffinityとCARの有効性との関連は詳細には検討されていない。5種類のaffinityの異なるCD20抗体を用いてCARを作成した。これをT細胞に遺伝子導入し、CAR-Tの細胞傷害活性などのT細胞活性に及ぼす影響を検討する。また、細胞内ドメインのaffinityの組み合わせの違いによってT細胞機能にどのような影響が出るのか検討する。

(倫理面への配慮)

患者あるいはドナーから細胞その他の材料を採取する場合には、当院 IRB で審査を受け、適切なインフォームド・コンセントのもと行う。研究遂行にあたって必要な倫理指針などを遵守して行う。

C. 研究結果

新規にヒト化抗 CD20 抗体を細胞外ドメインとして用いた CAR を作成し、細胞表面上に発現する CD20 の抗原量と CD20-CAR+ T 細胞の反応しうる限界について検討した。新たに作成した CD20-CAR を遺伝子導入した

CD20-CAR+ T細胞はCD20 特異的に標的細胞を認識・傷害した。この細胞を用いて様々な程度の CD20 を発現する CEM 細胞株群に対する細胞傷害活性を検討した。今回作成した CD20CAR-T 細胞は標的細胞あたり約 200 分子の CD20 を認識して傷害することが分かった。同様にして CD20CAR-T 細胞を活性化するために必要な CD20 分子密度を検討した。CD20CAR-T を活性化するために必要な CD20 抗原は標的細胞あたり約 2000 分子程度であることが分かった。さらに、CD20 低発現となり臨床的に抗 CD20 抗体療法に対して不応となった慢性リンパ性白血病患者から樹立された細胞株・臨床分離検体に対しても十分高い認識・細胞傷害活性を示した。

CD27 細胞内ドメインを用いた CAR を CD28 あるいは4-1BB の細胞内ドメインを用いた CAR と比較して有用性を検討することを目的として、これまで用いてきた CD28 細胞内ドメインに替えて、4-1BB/CD27 細胞内ドメインに入れ替えたものを作成した。これらのプラスミド・ベクターを用いてレトロウイルス・ベクターを作成した。細胞内シグナルを詳細に検討するため、Reporter vector を遺伝子導入した Jurkat 細胞にこれらの CD20-CAR を遺伝子導入し、CD20 刺激後に比較検討する系を樹立した。しかしながら、刺激後に蛍光は定量的に検討できなかった。これは Jurkat およびSUPT1 などの今回用いたT細胞腫瘍細胞株では、文献的には刺激後の活性化は見られることになっているが、実際に手持ちの細胞株では刺激後の再活性化が見られなかったためと考えている。ATCC から購入したSUPT1細胞を用いてみたが同様の結果であった。

最適と考えられるCD20-CARの構造が決定した後、これを用いた臨床試験の準備としてGMP基準に則った細胞調製が可能かどうかについて検討することにしていたが、cell processing center (CPC) での細胞調製は臨床試験開始後にしか認められておらず、断念し

た。そのため、Large scale 培養の検討は実験室にて行った。

D. 考察

CAR の標的抗原が腫瘍組織以外に発現していると、CAR がその抗原を標的として正常組織をも攻撃することが懸念される。そのため CAR の標的抗原は腫瘍組織以外に発現がないことが極めて厳密に求められてきた。そのためになかなか新しい CAR の標的抗原の同定はこれまで困難であった。一方で、これまで抗体療法の標的としての腫瘍特異抗原の探索は広く行われてきたが、その場合には腫瘍特異性と同時にその抗原が腫瘍において高発現していることが求められてきた。こちらも同様になかなか新規に良い標的抗原は出てこなかった。

本研究の結果から、CAR は標的抗原が細胞あたり 200 分子程度発現していれば、傷害活性を示すことが出来、また 2000 分子程度発現していれば抗原刺激によって分裂・増殖などの活性化を示すことが分かった。すなわち、抗体の認識しうる範囲よりも低発現の標的でも十分認識しうることを示され、腫瘍抗原の探索範囲をこれまでよりも低発現の範囲に広げることによって新たな腫瘍抗原が得られる可能性が考えられた。そのような新しい戦略によって比較的発現の低い腫瘍抗原を CAR の標的抗原として同定出来れば、CAR の臨床応用の可能性も高まることが期待される。

現在、CAR の affinity と細胞内ドメインの最適な組み合わせについて検討を行っており、今後 CD20-CAR の最適構造が決定されれば CPC における細胞調製試験を経て臨床試験の開始を目指していく。

E. 結論

新規 CD20-CAR を作成し、T 細胞に遺伝子導入を行った。これらの CD20-CAR+ T 細胞は CD20 を特異的に認識・傷害した。これらの細胞を用いて CD20 低発現細胞株・臨床分離

検体に対する反応を検討した。極めて低発現の細胞株や臨床分離検体でも認識・傷害しうることがわかった。CAR のこういった特性を生かして、低発現であるが腫瘍特異性の極めて高い標的抗原の探索という新しい戦略が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

< 英文 >

- 1) Terakura S, Nishida T, Inamoto Y, Ohashi H, Naoe T, Murata M. Successful unrelated cord blood transplantation for adult acquired aplastic anemia using reduced intensity conditioning without ATG. *Immunol Lett.* 2014 Jan 29. pii: S0165-2478(14)00017-0. doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.013. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24487060.
- 2) Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+ T-cell epitope for adoptive immunotherapy. *Mol Immunol.* 2013 Dec; 56(4):399-405.
- 3) Yasuda T, Suzuki R, Ishikawa Y, Terakura S, Inamoto Y, Yanada M, Nagai H, Ozawa Y, Ozeki K, Atsuta Y, Emi N, Naoe T. Randomized controlled trial comparing ciprofloxacin and cefepime in febrile neutropenic patients with hematological malignancies. *Int J Infect Dis.* 2013 Jun; 17(6): e385-390.

< 和文 >

- 1) 血液疾患最新の治療 2014-2016 . 寺倉精太郎、編者：直江知樹、小澤敬也、中尾眞二 . 総頁 380 . うち 42-46

2. 学会発表

- 1) 渡邊慶介、寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹. 新規 CD20 キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞の樹立と CD20 低発現標的に対する効果の検討 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会, 名古屋, 2013
- 2) Ryo Hanajiri, Makoto Murata, Kyoko Sugimoto, Miho Murase, Haruhiko Ohashi, Tatsunori Goto, Keisuke Watanabe, Nobuhiko Imahashi, Seitaro Terakura, Tetsuya Nishida, Tomoki Naoe. Cord blood allograft rejection mediated by coordination of cellular and humoral immunity. 第 75 回日本血液学会, 札幌, 2013
- 3) Keisuke Watanabe, Seitaro Terakura, Tatsunori Goto, Ryo Hanajiri, Nobuhiko Imahashi, Kazuyuki Shimada, Tetsuya Nishida, Akihiro Tomita, Makoto Murata, Tomoki Naoe. Anti-CD20 chimeric antigen receptor transduced T cells can recognize very low antigen expression: Determination of the lower threshold required to activate the CAR-Tcells. 第 55 回米国血液学会総会, New Orleans, USA, 2013
- 4) Ryo Hanajiri, Makoto Murata, Kyoko Sugimoto, Miho Murase, Haruhiko Ohashi, Tatsunori Goto, Keisuke Watanabe, Nobuhiko Imahashi, Seitaro Terakura, Tetsuya Nishida, Tomoki Naoe. Cord blood allograft rejection mediated by coordinated donor-specific cellular and humoral immune processes. 第 55 回米国血液学会総会, New Orleans, USA, 2013
- 5) 寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、渡邊慶介、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹. 同種臍帯血移植を行い良好な生着・生存を得た成人再生不良性貧血の 3 例 第 36 回日本造血細胞移植学会, 那覇, 2013
- 6) 渡邊慶介、寺倉精太郎、後藤辰徳、葉名尻良、今橋伸彦、西田徹也、村田誠、直江知樹. 新規 CD20 キメラ抗原レセプター遺伝子導入 T 細胞の樹立と CD20 低発現標的に対する効果の検討 第 36 回日本造血細胞移植学会, 那覇, 2013
- 7) 葉名尻良、村田誠、杉本恭子、村瀬未帆、大橋春彦、後藤辰徳、渡邊慶介、今橋伸彦、寺倉精太郎、西田徹也、直江知樹. 臍帯血移植片拒絶症例によるドナーHLA 特異的抗体とドナーHLA 特異的細胞傷害性 T 細胞の協働作用 第 36 回日本造血細胞移植学会, 那覇, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得出願

ヒト化抗 CD20 キメラ抗原レセプター
発明者：寺倉精太郎、渡邊慶介 権利者：名古屋大学 産業財産権の種類、番号：特願 2013-234784、出願年月日：2013 年 11 月 13 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし