

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08369

研究課題名(和文) 不適合HLA-DP抗原認識抗体を用いた移植後再発に対するCAR-T細胞の開発

研究課題名(英文) Development of CAR-T cells to treat recurring leukemia post-HCT by targeting mismatched HLA-DP

研究代表者

赤塚 美樹 (AKATSUKA, YOSHIKI)

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：70333391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植後の再発の治療・予防を目的として頻りに不適合が起こりGVT効果を示すHLA-DP型に着目した。ハイブリドーマにFc受容体CD64を強制発現させ、産生された抗体を表面にトラップさせることでフローサイトメトリーを用いて抗原特異的にソーティングする技術を確立した。この方法にて日本人に多いHLA-DPB1*09:01を認識するハイブリドーマを2種類取得した。並行して抗HLA抗体を産生する複数のハイブリドーマからIgG遺伝子をクローン化後に一本鎖化し、抗原特異性が保持できることを確認出来たため、抗HLA-DP抗体を搭載したキメラ抗原受容体T細胞を作製する目処が立った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種造血細胞移植におけるドナー/患者間のHLA-DP不適合はGVT効果発現に重要である。不適合HLA-DPを認識するT細胞の樹立は容易ではなく、事前にHLA-DPを認識する抗体を樹立し、その遺伝子配列を元にキメラ抗原受容体T細胞調製に必要なベクターを作製しておけば直ちに養子免疫療法を実施することが可能となる。この抗HLA-DP抗体は殆ど報告がなく、我々はフローサイトメトリーを使った方法で狙った抗原に特異的な抗体を作るハイブリドーマ細胞を樹立する方法を確立した。この2つの技術を組み合わせることで将来的にさまざまなHLA-DP型不適合に対応するキメラ抗原受容体T細胞を提供できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In HLA-8/8-matched unrelated allogeneic transplantation for hematological malignancies, HLA-DP is often mismatched at a rate of 70%, which can be applied to treat or prevent post-transplant relapsed malignancy by graft-versus-tumor effect. We have established a technique to flow-sort hybridoma cells which produce antibodies of interest by introducing CD64 Fc receptor into the hybridoma cells in advance and allow the produced antibodies to bind to the self CD64. With this method, two hybridomas producing antibodies specific for HLA-DPB1*09:01 (common in Japanese) were isolated so far. In parallel, by using RT-PCR we cloned genes encoding IgG antibodies specific for several HLA subtypes and generated single-chain antibodies that retain the original antibodies' specificity. Thus, we currently working on generation of chimeric antigen receptor-gene modified T cells specific for HLA-DP of interest.

研究分野：血液免疫学

キーワード：移植片対白血病効果 キメラ抗原受容体T細胞 HLA-DP アロ抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性造血器腫瘍に対する根治的治療法は同種造血幹細胞移植であるが、移植後の死因の最大の原因は原病の再発であることから移植後造血器腫瘍の予防・治療法の開発を行う。

(2) HLA-DP の不適合は有用な GVT 効果を高めるが、不適合 HLA-DP を認識する T 細胞クローンを適宜樹立するのは容易ではないため、HLA-DP を認識する抗体を作製しキメラ抗原受容体遺伝子改変 T 細胞を開発する。

2. 研究の目的

(1) 日本人が持つ頻度の高い HLA-DP 型を認識する抗体を産生するハイブリドーマを作製する。その際に、従来のハイブリドーマ上清のスクリーニングではなく、フローサイトメトリーでソーティングする系を開発する。

(2) ハイブリドーマから RT-PCR で抗体遺伝子をクローニングして軽鎖と重鎖の可変領域を一本鎖化し、これを元にキメラ抗原受容体遺伝子改変 T 細胞を作製し機能を検討する。

3. 研究の方法

(1) ハイブリドーマおよび P3-X63 骨髄腫株へ CD64 遺伝子を導入し、分泌される抗体がそれぞれハイブリドーマ上でトラップされ、抗マウス IgG 抗体で検出される条件を決定した。

(2) 抗 HLA-DP アリル特異的抗体はマウスを免疫して作製する。目的とする HLA-DP 分子 (HLA-DPA1*02:01/DPB1*09:01、以降 HLA-DPB9A2) をマウス細胞で強制発現させたものを不活化後に免疫後、共同研究を通じて得た同型の精製分子で 1-2 回ブーストしたのち血清を採取して抗体の産生を確認した。抗体価が十分であればマウスより脾臓を取り出し、CD64 導入 P3-X63 骨髄腫株と融合した。短期間培養後に蛍光標識した HLA-DPB9A2 および別の蛍光で標識した標的以外の HLA クラス II 分子ヒトと反応させ、フローサイトメトリーで検討した。前者とのみ反応するハイブリドーマが確認された場合、フローサイトメーターでソーティングしてそれぞれフィーダー細胞上で培養した。

(3) クローニングし増殖したハイブリドーマ上清と HLA-DPB9A2 導入細胞、標的以外の HLA クラス II 発現細胞で反応特異性を検討した。

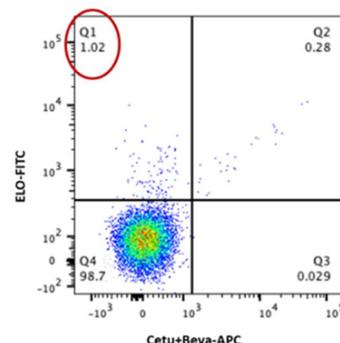
(4) 抗体遺伝子のクローニングにはハイブリドーマから抽出した RNA より cDNA を合成し、マウス軽鎖および重鎖の可変領域をカバーできる PCR プライマーセットで遺伝子合成し、陽性に出たサンプルを精製し、シーケンスを行った。得られた配列は IMGT/V-QUEST のウェブサイトで解析し、得られた配列から軽鎖と重鎖の可変領域を結合して一本化し、機能を解析した。

4. 研究成果

(1) フローソーティングによる抗原特異的ハイブリドーマの樹立法

CD64 発現を誘導できる融合用マウス骨髄腫株の作製。ヒト CD64 cDNA をテトラサイクリンで誘導可能な pRetro-TetONE に挿入し、puromycin で選択後、ドキシサイクリンで CD64 が誘導できることを確認した。これにより、CD64 分子に IgG が非特異的に結合することが防止できた。

モデル抗原に対するハイブリドーマの樹立。マウス免疫には大量の HLA-DP 分子が必要なため、条件設定は市販の医療用抗体の可変部位に対する抗体を産生するハイブリドーマの取得で行った。Elotuzumab を Freund のアジュバントと混合し Balb/c マウスの腹腔内に 3 回投与した後に脾臓を取り出し、CD64 導入 P3-X63 骨髄腫株と融合した。短期間培養後にドキシサイクリンを加えて分泌抗体を結合させ、次いで FITC 標識 Elotuzumab (縦軸) および APC 標識ヒト化抗体 Mix (横軸) で染色し、フローサイトメトリーで 1% 程度のハイブリドーマが Elotuzumab のみに反応した (右図、左上)。これをフィーダー細胞存在下でクローニング (480 ウェル) を行った。増殖を認めた 49 ウェルのうち 20 ウェルが全てのヒト化抗体と反応、5 ウェルが Elotuzumab に特異的 (約 10%) であった。ここでの課題として Plating 効率が 10% と低いことが挙げられた。



(2) HLA-DPB9A2 特異的なハイブリドーマ樹立の試み。

以上の条件設定に基づき、HLA-DPB9A2 でのマウス免疫を開始した。免疫条件として、(a)

DPB9A2 発現マウス NIH3T3 細胞のみで 3 回免疫法、(b) DPB9A2 発現細胞で 2 回 + DPB9A2 精製蛋白で 1 回の組み合わせ法、(c) DPB9A2 精製蛋白で 3 回法の 3 方法を試みた。その結果、(a) ではマウス血清には HLA-DP 分子のみならず、同じクラス II 型 HLA 分子である HLA-DR、-DQ に対する抗体も同等に産生、(c) では抗体価が著しく低く、免疫が不十分と判明した。(b) では HLA-DR、-DQ の各アリル型への反応もある程度認められるものの、より HLA-DP への反応が強くなった(右上図・右カラム)ため、以後の実験は (b) の組み合わせ法を用いた。モデル実験と同様に CD64 を強制発現できるようにしたハイブリドーマを作成して、免疫に用いた DPB9A2 蛋白に PE、HLA-DR/DQ ミックス蛋白に APC を標識しハイブリドーマの表現形質を解析したところ、44% が双方とも陰性、22% が双方とも陽性、32% が HLA-DR/DQ に陽性、1.3% が DP に陽性となった。この DP 陽性ハイブリドーマをソーティングして増殖させたところ 4 クローンが得られ、うち 2 つは HLA-DR/DQ ミックス蛋白よりも DPB9A2 に対して有意な反応性を示すことが確認出来た(右中段図)。しかし染色性は強くなく、抗体の affinity が十分 maturation していなかった可能性がある。このためさらにソーティングを試みたが、導入した CD64 の発現が経時的に低下する問題が生じた。外来遺伝子のため不活化されたか、融合後に染色体の消失に伴って CD64 が挿入された染色体が無くなった可能性があり、今後の課題となった。

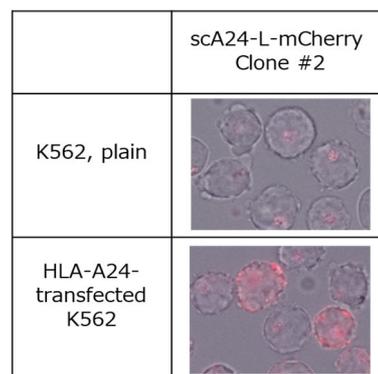
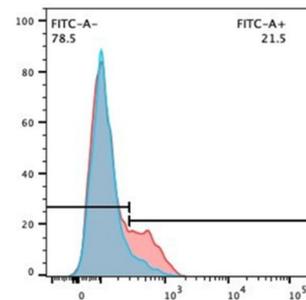
HLA-DP 蛋白の合成。本研究ではマウスの免疫および、調製したハイブリドーマのフローサイトメトリー解析・ソーティングには HLA-DP 蛋白が必須であり、供給量が研究進捗の律速因子となった。このため内製化を試みた。まず DP の鎖と鎖から膜貫通領域を除去してヘテロダイマーの分泌を試みたが、Native PAGE 解析でも乖離した状態でしか検出出来なかった。そこで既報の分泌型 HLA-DR 論文を参考にして C 末端にロイシンジッパーを結合したが、HLA-DP 分子は分泌されず、細胞内染色により細胞内でトラップされていることが判明した。現時点ではまだ解決出来ていない。

(3)ハイブリドーマの Ig 遺伝子解析と CAR 遺伝子の作製。抗 HLA 抗体の単鎖化。CAR-T 細胞を作製するには抗体 Fv 部分の単鎖化が必要である。ATCC から抗 HLA-A24 抗体産生ハイブリドーマ (HB-164) を入手し、RT-PCR で Ig 鎖の軽鎖・重鎖の構成成分を解析した。塩基配列を元に一本鎖化し、C 末に mCherry を結合したものを 293T 細胞で産生させて K562 および K562/HLA-A24 (HLA-A24 陽性細胞率 60%) と反応させたところ、後者のみが特異的に染色された(右下図)。

以上より、CD64 を導入した骨髄腫株と抗原で免疫したマウスの脾細胞を融合したハイブリドーマ細胞集団を蛍光標識した免疫抗原と反応させることで、CD64 にトラップされたハイブリドーマ分泌抗体との結合を介し、抗原特異的なハイブリドーマをソーティングすることが可能であることを示すことができた。また抗 HLA-A24 抗体を産生するハイブリドーマから IgG 遺伝子をクローニングし、特異性を維持した一本鎖抗体を作製できることも確認出来た。このことより、良好な抗 HLA-DP 抗体が樹立できれば CAR-T 細胞へ応用することが可能であると考えられた。

HLA-DR (11/34, 32%) HLA-DQ (8/29, 28%) HLA-DP (21/21, 100%)

HLA-DR (11/34, 32%)	HLA-DQ (8/29, 28%)	HLA-DP (21/21, 100%)
DRB1*01:01	DQA1*01:01/DQB1*06:01	DPA1*01:01/DPB1*02:01
DRB1*03:01	DQA1*01:02/DQB1*06:02	DPA1*01:03/DPB1*02:02
DRB1*04:01	DQA1*01:03/DQB1*06:01	DPA1*01:03/DPB1*03:01
DRB1*04:03	DQA1*01:03/DQB1*06:02	DPA1*01:03/DPB1*04:01
DRB1*04:04	DQA1*01:03/DQB1*06:04	DPA1*01:03/DPB1*04:02
DRB1*04:05	DQA1*01:03/DQB1*06:09	DPA1*01:03/DPB1*05:01
DRB1*04:06	DQA1*01:03/DQB1*06:01	DPA1*01:03/DPB1*06:01
DRB1*04:07	DQA1*01:03/DQB1*06:03	DPA1*01:03/DPB1*11:01
DRB1*04:10	DQA1*01:04/DQB1*06:02	DPA1*02:01/DPB1*05:01
DRB1*07:01	DQA1*01:04/DQB1*06:03	DPA1*02:01/DPB1*09:01
DRB1*08:02	DQA1*01:05/DQB1*06:01	DPA1*02:01/DPB1*13:01
DRB1*08:03	DQA1*02:01/DQB1*02:02	DPA1*02:01/DPB1*14:01
DRB1*09:01	DQA1*03:01/DQB1*03:02	DPA1*02:01/DPB1*17:01
DRB1*10:01	DQA1*03:01/DQB1*03:03	DPA1*02:02/DPB1*02:01
DRB1*11:01	DQA1*03:01/DQB1*04:01	DPA1*02:02/DPB1*02:02
DRB1*12:01	DQA1*03:02/DQB1*03:02	DPA1*02:02/DPB1*03:01
DRB1*12:02	DQA1*03:02/DQB1*03:03	DPA1*02:02/DPB1*04:01
DRB1*13:01	DQA1*03:02/DQB1*03:01	DPA1*02:02/DPB1*05:01
DRB1*13:02	DQA1*03:03/DQB1*04:01	DPA1*02:02/DPB1*14:01
DRB1*14:03	DQA1*03:03/DQB1*04:02	DPA1*02:02/DPB1*15:01
DRB1*14:05	DQA1*04:01/DQB1*03:02	DPA1*04:01/DPB1*13:01
DRB1*14:06	DQA1*04:01/DQB1*04:01	
DRB1*14:07	DQA1*04:01/DQB1*04:02	
DRB1*14:54	DQA1*05:01/DQB1*02:01	
DRB1*15:01	DQA1*05:01/DQB1*03:01	
DRB1*15:02	DQA1*05:05/DQB1*03:01	
DRB1*16:02	DQA1*05:05/DQB1*03:01	
DRB3*01:01	DQA1*05:09/DQB1*03:01	
DRB3*02:02	DQA1*06:01/DQB1*03:01	
DRB3*03:01		
DRB4*01:02		
DRB4*01:03		
DRB5*01:02		
DRB5*02:02		



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 赤塚美樹	4. 巻 37(6)
2. 論文標題 不適合アロ抗原を認識するT細胞受容体を用いた移植後再発白血病に対する遺伝子改変T細胞の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 75-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuyama N, Kawase T, Barakat C, Mizuno S, Tomita A, Ozeki K, Nishio N, Sato Y, Kajiya R, Shiraishi K, akahashi Y, Ichinohe T, Nishikawa H, Akatsuka Y	4. 巻 85
2. 論文標題 T cell receptor-engineered T cells derived from target human leukocyte antigen-DPB1-specific T cell can be a potential tool for therapy against leukemia relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 779-796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18999/nagjms.85.4.779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 赤塚美樹	4. 巻 36
2. 論文標題 不適合アロ抗原認識抗体を用いた移植後再発白血病に対するCAR-T細胞の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 56-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Barakat C, Inagaki Y, Mizuno S, Nishio N, Katsuyama N, Sato Y, Kobayashi M, Ozeki K, Iida H, Tomita A, Sawa M, Demachi-Okamura A, Takahashi Y, Nishikawa H, Akatsuka Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Development of TCR-T cell therapy targeting mismatched HLA-DPB1 for relapsed leukemia after allogeneic transplantation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 252-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03621-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Carolyn Baraka, 勝山 直, 佐藤 由, 小林 美, 稲垣 裕, 尾関 和, 水野 昌, 富田 章, 赤塚 美樹
2. 発表標題 Establishment of T cell clones specific for mismatched HLA-DP molecules toward development of adoptive cell therapy for leukemia following allogeneic hematopoietic cell transplantation.
3. 学会等名 第5回 東海北陸HLA研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤塚 美樹, 勝山 直哉, 稲垣 裕一郎, 水野 昌平, 尾関 和貴, 富田 章裕, 澤 正史
2. 発表標題 非血縁者間移植患者からの不適合HLA-DP特異的クローンの樹立
3. 学会等名 第84回日本血液学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Carolyn Barakat, 勝山 直哉, 佐藤 由英, 小林 美希, 稲垣 裕一郎, 水野 昌平, 尾関 和貴, 富田 章裕, 澤 正史, 赤塚 美樹
2. 発表標題 不適合HLA-DPを同種標的とした白血病に対するTCR-T細胞療法の開発
3. 学会等名 第45回日本造血・免疫細胞療法学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Carolyn BARAKAT, Yuichiro INAGAKI, Shohei MIZUNO, Naoya KATSUYAMA, Yoshie SATO, Miki KOBAYASHI, Kazutaka OZEKI, Akihiro TOMITA, Hiroatsu Iida, Masashi SAWA, Yoshiki AKATSUKA.
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後の白血病再発に対するTCR-T細胞療法の開発
3. 学会等名 第15回日本血液疾患免疫療法学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陳 浩, 木村実茂, Carolyne Barakat, 西尾信博, 佐藤由英, 鈴木哲, 岡村文子, 高橋義行, 赤塚美樹.
2. 発表標題 トランスポゾンを用いたTCR-T細胞調整条件の検討
3. 学会等名 第27回日本がん免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Carolyne BARAKAT, Naoya KATSUYAMA, Yoshie SATO, Miki KOBAYASHI, Yuichiro INAGAKI, Kazutaka OZEKI, Shohei MIZUNO, Akihiro TOMITA, Masashi SAWA, Yoshiki AKATSUKA.
2. 発表標題 Development of TCR-T cell Adoptive immunotherapy targeting mismatched HLA-DPB1 for leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
3. 学会等名 2nd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------