

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20777

研究課題名（和文）シスプラチン耐性分子メカニズムに着目した新規免疫療法

研究課題名（英文）Novel Immunotherapies Targeting Cisplatin Resistance Molecular Mechanisms.

研究代表者

水江 由佳（MIZUE, Yuka）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20464480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞のHLA-A2が提示するClaspinペプチド（HLA-A2/Claspinペプチド）を特異的に認識する組換え一本鎖可変フラグメント抗体（scFv）を作製した。このscFvを応用し、二重特異的 T 細胞結合抗体（BiTE）、scFvにヒトIgG1 Fc領域を連結した二価抗体（scFv-Fc）、およびCD3 活性化ドメインとCD28膜貫通ドメインを連結したキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を開発した。それらは、HLA-A2/Claspinペプチド発現細胞と結合および相互作用を示した。さらに、BiTE抗体は、シスプラチン耐性膀胱がんに対する強い細胞傷害能を誘導できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで承認された抗体医薬は、いずれも治療標的となるがん全般に発現する分子を標的としていた。しかし、遺伝学的、機能的に多様ながんの根治を目指す上で、機能的多様性に対応できる治療薬およびバイオマーカーの開発が重要になる。我々は、シスプラチン耐性がん細胞に発現する治療標的として HLA-A2が提示するClaspinペプチドを同定し、本研究において、これを標的とする特異的抗体を開発した。Claspin は膀胱癌のみならず、腎癌、前立腺癌など様々な癌種においても高発現し、プラチナ製剤耐性を示す悪性腫瘍全般が標的となる可能性がある。シスプラチン耐性癌に対する新規治療薬開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibody targeting the HLA-A2/Claspin peptide complex, whose presentation is enhanced in cisplatin-resistant cells. Next, using this scFv, we designed a bispecific T-cell engager antibody (BiTE Ab) that recognizes both the HLA-A2/Claspin peptide complex and CD3 molecules. Additionally, aiming for optimal formulation in terms of therapeutic efficacy and safety, we constructed a bivalent antibody (scFv-hIgG1 Fc) where the human IgG1 Fc region was fused to the scFv, and chimeric antigen receptor (CAR) T cells where the CD3 activation domain and CD28 transmembrane domain were fused. We evaluated their functionalities and confirmed their interaction with HLA-A2/Claspin peptide-expressing cells. Furthermore, we confirmed that the BiTE antibody could induce strong cytotoxic activity against its target cells, cisplatin-resistant bladder cancer, using WST-8 and LDH activity measurements.

研究分野：がん免疫

キーワード：抗体工学 シスプラチン耐性 癌抗原 抗体医薬

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本における膀胱がんは、泌尿器系悪性腫瘍の中でも致死率が高い疾患であり、部位別で13番目に多い罹患数で、男女ともに増加傾向にある(国立がんセンター, 2022)。全世界においても膀胱がんの新規診断者数は570,000人を超え、10番目に多い癌であり、毎年210,000人が死に至ると推定されている(Bladder Globocan Factsheet, 2020)。進行性膀胱がん治療の主軸を担ってきたのはシスプラチン(CDDP)を中心としたプラチナ製剤による化学療法であるが、再発や転移を起こす化学療法抵抗性が大きな問題となる。治療不応性となった膀胱がんには、より高い効果と副作用低減をもたらす次世代の生物学的製剤による新しい治療アプローチが世界各国で必要とされている。我々はこれまで、がん多様性の原因の一つであるがん幹細胞を標的とする様々な抗原ペプチドの解析を行い、また、多数のがん特異的抗体を開発してきた。

そこで、がんの機能的多様性に着眼し、CDDPを中心としたプラチナ製剤による化学療法に耐性を示すがん細胞を直接標的できる抗体医薬を開発しようと計画し、我々は、以下のことを明らかにしてきた。

- (1) 治療抵抗性と強い関与が考えられるがん幹細胞を膀胱がん細胞株より樹立した。
- (2) 樹立した膀胱がん幹細胞からHLAを免疫沈降法で単離し、質量分析を行うHLAリガンドーム解析法により、HLA-A\*02:01が提示する新規がん抗原ペプチドClaspin「SLLNQPKAV」(HLA-A2/Claspin)を同定した(図1)。
- (3) Claspinは、DNA修復に重要な役割をもつ分子であり、かつ正常臓器での発現が極めて低いことから、がん特異的免疫原性が期待される。
- (4) Claspinは、CDDP長期添加培養で樹立したCDDP耐性(cisplatin resistance:CR)がん細胞に強発現し、一方、Claspin mRNAのノックダウンCR細胞ではCDDPに対する感受性の増強を示したことから、ClaspinのCDDP耐性への関与を明らかとした。
- (5) 我々が樹立したClaspinペプチド特異的細胞傷害性T細胞(CTL)は、膀胱がんCR細胞はじめHLA-A2/Claspinペプチド発現がん細胞との相互作用を認めた(図2)。

(Cancer Immunol Immunother. 2022 Miyata et al., 2023 Yamada et al.)

これらの結果から、本来、核内に局在し、抗体の標的となり得ないClaspin分子は、CDDP耐性がん細胞上ではHLA-A\*02:01に9-merのペプチドとして提示され、新規治療ターゲットとなり得る。すなわち、CDDP耐性膀胱がんに対する新規免疫治療法開発の可能性が示唆された。

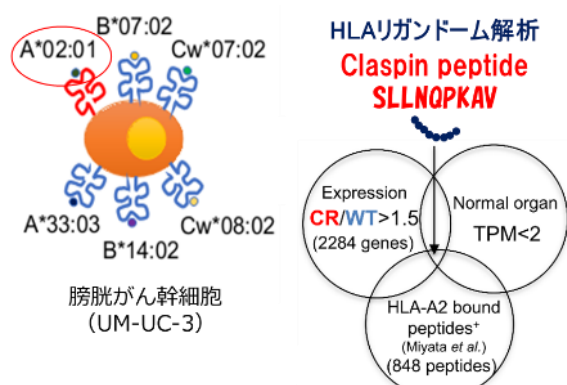
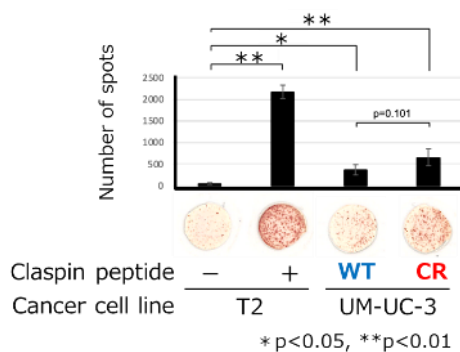


図1 膀胱がん幹細胞の新規がん抗原ペプチド同定



ELISPOTにより、Claspinペプチド特異的CTLは、CDDP耐性膀胱がん細胞株と相互反応を示した。

図2 Claspinペプチド特異的CTLクローン

### 2. 研究の目的

遺伝学的、機能的に多様ながんの根治を目指す上で、これからの抗体医薬は、機能的多様性に対応できる治療薬およびバイオマーカーの開発が重要になる。上述の通り、我々はClaspinペプチド特異的T細胞反応を誘導できることを確認した(図2)。しかしながら、生体内でT細胞を誘導するには生体の免疫環境などの因子に影響され、生体内でCTL誘導が不良のことが多い。これまでのペプチドワクチンの臨床試験に陰性結果が多かったということからもそれが示唆される。そこで、我々は、患者の免疫状態に左右されない治療薬を開発すべく、HLA-A2/Claspinペプチドに対する組換え一本鎖可変フラグメント(single-chain variable fragment: scFv)人工抗体の樹立を目指した。ファージディスプレイ法により、我々独自で作製したscFvファージディスプレイライブラリを用い、複数の候補scFvクローンを得た。これらの成果をもとに、本研究では、以下のscFv抗体の特異性解析および抗体医薬への応用を目的とした。

- (1) 抗HLA-A2/Claspinペプチド抗体scFv候補となる11クローンの抗原特異性を評価する。
- (2) 抗HLA-A2/Claspinペプチド抗体のシスプラチン耐性株に対する認識の有無を確認する。
- (3) (1)、(2)の評価結果から、特異性の高いクローンを特定し、抗HLA-A2/Claspinペプチド抗体のCDDP耐性膀胱がん特異的細胞傷害性を有する高機能人工抗体をデザインする。
- (4) 研究の進捗状況に応じ、*in vivo*での抗腫瘍効果を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) フローサイトメトリー (FACS) 解析および ELISPOT 法により、候補抗体 scFv から Claspin ペプチドを高発現した細胞を特異的に認識するクローンの特定を行った。
- (2) 特定した特異的人工抗体 scFv が、CR 細胞を認識しうるか FACS 解析を行った。
- (3) 樹立した抗 HLA-A2/Claspin ペプチド特異的抗体 scFv を応用し、二重特異性 T 細胞誘導 (Bispecific T cell Engager: BiTE) 抗体、hIgG1 Fc 領域を連結した二価抗体 (scFv-Fc)、およびキメラ抗原受容体 T (Chimeric Antigen Receptor-Modified T: CAR-T) 細胞の作製へと進め、*in vitro*での FACS 解析および ELISPOT 法による特性評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) 本研究で使用する scFv 抗体は、抗原を認識する可変領域の断片である軽鎖可変領域と重鎖可変領域を柔軟なリンカー配列で連結し、C末端に His-tag を結合させた一本鎖抗体を基本構成とする。これまでに 11 種類の候補抗体クローンをファージディスプレイ法により獲得した。Claspin ペプチド (LLNQPKAV) および陰性コントロール (HIV, EBV, CMV) ペプチドを添加した T2 細胞 (HLA-A\*02:01 発現細胞) と各候補 scFv 抗体を反応後、FITC 標識抗 His-tag 抗体で検出し、FACS 解析を行った。これにより 11 クローンから T2 細胞上の HLA-A2 に過剰提示された Claspin ペプチドに対し最も結合能が高く、Claspin ペプチドの添加濃度依存的に反応を示すクローン#2 を特定した (図 3)。同様に FACS 解析により、scFv クローン#2 が膀胱がん細胞 (UM-UC-3) CR 細胞に対する結合を示し、シスプラチン耐性株を認識しうることを確認した。T2 細胞の過剰発現 HLA-A2/Claspin ペプチドに比べて低い反応ではあったが、本研究で作製した scFv クローン#2 が Claspin を高発現する CDDP 耐性膀胱がん細胞に反応する特異的抗体である可能性を示した。

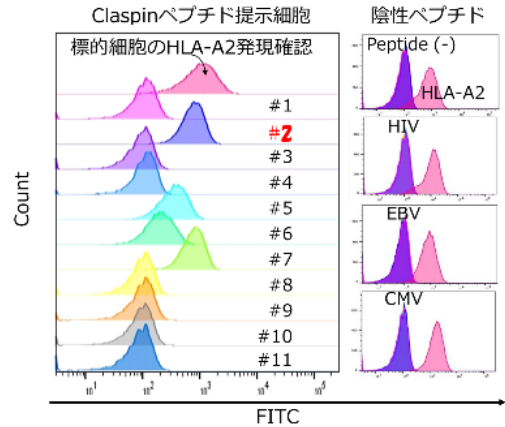


図3 抗HLA-A2/Claspinペプチド特異的scFvクローンの特定

(2) 本研究において、樹立した HLA-A2/Claspin ペプチドを特異的に認識する scFv を医療応用することを目指し、各デザイン抗体や細胞製剤の開発を進めた。

#### ① 二重特異性 T 細胞誘導 (BiTE) 抗体 への応用

我々は、まず、次世代の生物学的製剤として国内外の製薬会社による開発が活発化している BiTE 抗体に着目した。BiTE は、T 細胞の表面受容体 CD3 と結合し、もう一方で特定のがん抗原と結合する、二種類の抗体を一本鎖に連結した二重特異性 T 細胞誘導技術であり、がん細胞特異的傷害活性を発揮する。我々は、この技術を用い、抗 CD3scFv 抗体と抗 HLA-A2/Claspin ペプチド scFv 抗体を柔軟なリンカーで融合させた抗 Claspin/CD3BiTE 抗体遺伝子を細胞株 (HCT116) に導入し、抗 HLA-A2-Claspin/CD3 BiTE 抗体を発現・産生する安定発現細胞株を樹立した (図 4)。樹立した細胞からの BiTE 抗体産生は、Tet-on system を導入し、培養上清より Ni Sepharose を用いて精製し、BiTE 抗体を作製した。続いて、FACS 解析および ELISPOT 法により精製 BiTE 抗体の反応性を確認した。BiTE 抗体は、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 中の T 細胞 (CD3 陽性)、ならびに Claspin ペプチドを添加した T2 細胞に対する特異的結合を示した。さらに、両細胞の共培養において、BiTE 抗体存在下では、T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を認め、T 細胞の活性化も可能であることを確認した。さらに、BiTE 抗体の膀胱がん CR 細胞に対する細胞傷害活性を WST-8 および LDH 活性により評価した。その結果、膀胱がん CR 細胞とヒト PBMC 中の T 細胞を架橋し、かつ T 細胞の活性化による CR 細胞に対する強い細胞傷害能を誘導することを確認した (図 5)。

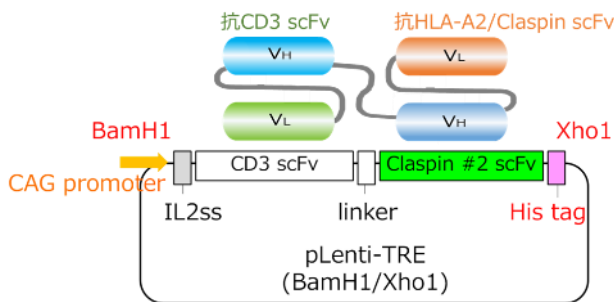


図4 抗HLA-A2/Claspin/CD3 BiTE抗体遺伝子コンストラクト

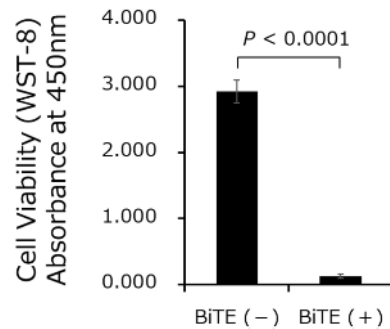


図5 BiTE抗体を介しCDDP耐性膀胱がん細胞株 (UM-UC-3 CR) に対する PBMC中のT細胞による細胞傷害活性

② ヒト IgG1 Fc 領域連結二価抗体(scFv-hman IgG1 Fc) への応用

新規抗体医薬技術は、予期せぬ毒性を認める事例もあり、治療の有効性、安全性において最適な製剤化を検証する必要がある。そこで、我々は、HLA-A2/Claspin ペプチドをターゲットとする抗体医薬の最適なデザインを見出すことを目的とし、scFv にヒト IgG1 Fc 領域を連結した二価抗体(scFv-hman IgG1 Fc)の開発を進めた。scFv 遺伝子を組込んだ pFUSE-hIgG1-Fc2 plasmid (InvivoGen)を一過性に遺伝子導入した 293T 細胞の培養上清より Protein G を用いた精製により、scFv-hman IgG1 Fc を作製した(図6)。scFv-hIgG1 Fc 二価抗体は、FACS 解析により、Claspin ペプチド を添加した T2 細胞に対して特異的な結合を示した(図7)。

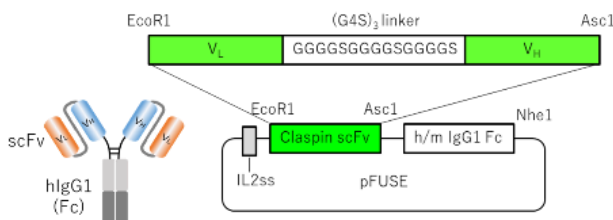


図6 ヒトIgG1 Fc領域連結二価抗体遺伝子コンストラクト

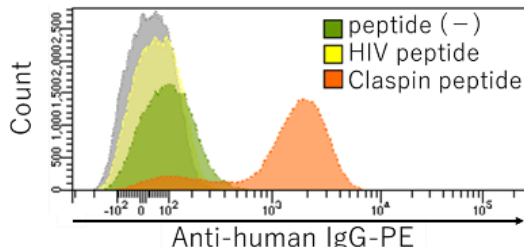


図7 FACSによる抗HLA-A2/Claspin二価抗体の特異性確認

③ Chimeric Antigen Receptor 発現 T (CAR-T) 細胞への応用

さらに、HLA-A2/Claspin を標的とした細胞製剤への応用を考えた。抗 HLA-A2/Claspin scFv および CD3ζ 活性化ドメインと CD28 膜貫通ドメインを連結したキメラ抗原受容体(CAR) 遺伝子を導入した pMXs Retroviral Vector (図8)をデザインした。健常人由来 T 細胞へ CAR 遺伝子を導入し、CAR-T 細胞を作製し、特性評価を行った。CAR-T 細胞および CAR 遺伝子導入を行っていない同一ドナー由来の T 細胞(untransduced T cells)と膀胱がん細胞株 UM-UC-3 の野生株 (WT) と CR 細胞を各々共培養し、ELISPOT 法により各 T 細胞産生 IFN-γ の産生量を比較した。その結果、CAR-T 細胞と UM-UC-3 CR 細胞間で強い相互作用を示した(図9)。

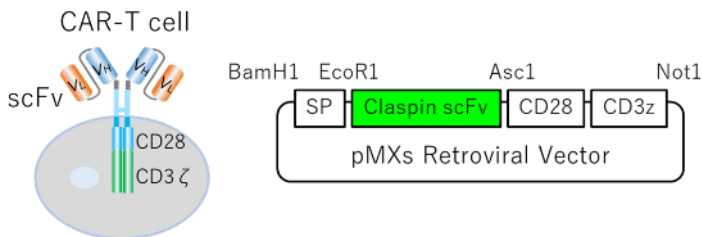
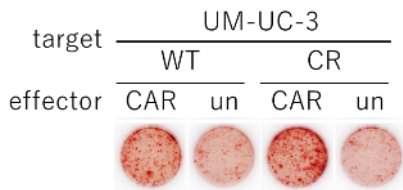


図8 Chimeric Antigen Receptor (CAR) 遺伝子コンストラクト



Target cells :  $5 \times 10^4$  cells/well  
 T cells :  $5 \times 10^4$  cells/well  
 CAR : CAR-T, un : untransduced T cells

図9 ELISPOTによるCAR-Tの特異性確認

以上の結果から、さらに *in vivo* での抗腫瘍効果など詳細な薬効効果や副作用の評価を行う必要があるが、本研究において作製した HLA-A2/Claspin ペプチド特異的人工抗体 scFv を応用した BiTE 抗体、二価抗体(scFv-Fc)、および CAR-T は、プラチナ製剤に耐性を示すがん細胞を特異的に標的できる新規免疫療法剤となりうることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水江 由佳
2. 発表標題 プラチナ製剤耐性がん細胞を標的とする抗HLA-A2/Claspinペプチド特異的人工抗体の開発
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水江 由佳
2. 発表標題 プラチナ製剤耐性がん幹細胞を標的とするバイスペシフィック抗体開発
3. 学会等名 第127回北海道癌談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水江 由佳
2. 発表標題 プラチナ製剤耐性がん細胞を標的とする抗HLA-A2/Claspinペプチド特異的人工抗体の開発
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024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
---------	---------