

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08341

研究課題名(和文) 不適合HLA抗原を標的とした移植後再発に対するTCR導入T細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy against malignancies relapsed post-transplant using TCR-T cells specific for mismatched HLAs

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：健康人およびHLA-DP不適合移植を受けた患者末梢血より不適合HLA-DPに反応性のT細胞クローンの樹立を行った。健康人からはHLA-DPB1*09:01およびDPB1*02:01拘束性のクローンが、患者からはDPB1*09:01拘束性のクローンが複数種類樹立された。健康人から樹立したクローンは患者白血病芽球に対する反応が弱かったのに対し、患者由来クローンは強いIFN- γ 産生と細胞傷害活性を示した。DPB1*09:01拘束性クローンのT細胞受容体遺伝子をレトロベクターに組み込んで遺伝子改変T細胞を作成したところ、抗原特異性は維持され、標的に対しサイトカインを産生することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて樹立されたT細胞クローンが認識するHLA-DPB1*09:01およびDPB1*02:01は日本人間の同種造血細胞移植で不適合が起こりやすいHLA-DP型を認識するものであった。難治性白血病患者がこれらのHLA-DP座が不適合のドナーより移植を受けた後に再発してしまった場合、今回樹立したクローンやそのT細胞受容体遺伝子を導入されたT細胞を患者に投与することで、再発した白血病に対して抗原特異的な養子免疫細胞療法となると期待される。今後さらに日本人に多い3種類程度のHLA-DP型に特異的なT細胞クローンを樹立することで、約7割程度の患者に免疫療法をすることが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to generate T cell clones specific for mismatched HLA-DP molecules from peripheral blood T cells of healthy volunteers and patients who underwent HLA-DP-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation from their unrelated donor. Several clones specific for HLA-DPB1*09:01 and DPB1*02:01 were isolated from the volunteers' blood and those specific for DPB1*09:01 were isolated from the patients. The former clones showed weak reactivity against DPB1*09:01-positive primary leukemic blasts from various patients while the latter clones showed significant IFN- γ production and cytotoxicity toward the same targets. Healthy T cells that were gene-modified with a retrovirus encoding T cell receptor cDNA of the DPB1*09:01-specific T cell clone successfully demonstrated the identical specificity and cytokine production capacity against the cognate target cells.

研究分野：血液免疫学

キーワード：HLA-DP アロ抗原 同種造血幹細胞移植 移植後再発白血病 養子細胞免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性白血病に対する根治的治療法は同種造血幹細胞移植であるが、生存率を低下させる移植片対宿主病 (GVHD) を抑えつつ、有用な移植片対腫瘍 (GVT) 効果だけを得ることは依然として困難である。

(2) HLA-DP は非血縁者間移植でしばしば不適合が生じ、GVHD にも関わるが有用な GVT 効果を高めるという研究報告 (Blood. 2015;125:1189) があり、不適合 HLA-DP を認識する T 細胞クローンを用いた養子細胞免疫療法が移植後再発白血病の治療の開発に繋がる可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 健康人の末梢血 T 細胞を、非自己の HLA-DP 型分子を発現する人工抗原提示細胞で刺激し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を樹立する。また同種造血幹細胞移植を受けた末梢血のドナー由来 T 細胞から、患者の不適合 HLA-DP を認識する CTL を樹立する。得られた CTL の機能解析を行う他、HLA-DP 分子に提示されている抗原ペプチドを同定する。

(2) 白血病の治療に有用な CTL から T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子をクローン化して、ベクターを用いて T 細胞に導入し、遺伝子改変 TCR-T 細胞を作成、機能を評価する。

3. 研究の方法

(1) 説明と書面による同意取得後に健康人ボランティアおよび非血縁同種造血幹細胞移植後の患者より末梢血を採取、単核球を分離後に CD4 陽性 T 細胞を精製した。健康人由来 T 細胞は放射線で不活化した不適合 HLA-DP 発現 K562 細胞株で反復刺激した。患者から採取した移植ドナー由来 T 細胞は、移植前の患者末梢血細胞ないしは不適合 HLA-DP を導入したドナー細胞で反復刺激した。細胞増殖が認められた時点で、限界希釈法で T 細胞を 1 培養穴あたり 1 細胞以下の頻度で蒔いて、複数のクローン化細胞を樹立し、さらに拡大培養して以下の機能解析を行った。

(2) 各クローンは種々の白血病細胞株 (MEG01, Raji, U937 など) に不適合 HLA-DP を強制発現したもの、初発時白血病細胞のうち、対応する HLA-DP 型を有するもの等と共培養を行い、培養上清中のサイトカイン、細胞傷害活性を検討した。

(3) 良好な機能を発揮したクローンより逆転写反応で cDNA を合成し、各 TCR サブタイプに特異的なプライマーを用いて TCR 遺伝子を増幅し、シーケンスで配列決定を行った。また配列を元に人工合成で TCR の発現ベクターを調製し、健康人 T 細胞に遺伝子導入し、遺伝子改変 TCR-T 細胞を作成、機能解析を行った。

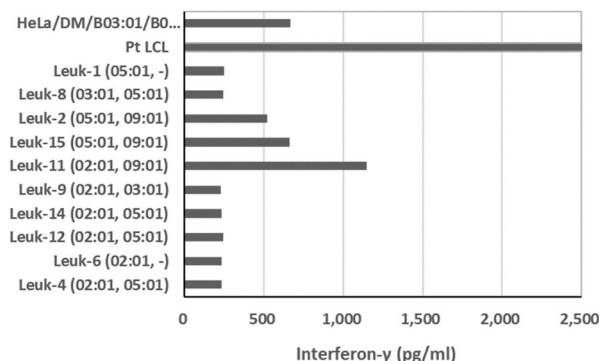
4. 研究成果

(1) 不適合 HLA-DP 特異的 T 細胞誘導条件の検討

まず健康人から非自己 (同種) HLA-DP 型分子に対する T 細胞誘導条件について、欧米と比較して日本人に多い HLA-DPB1*09:01 型をモデルとしての検討を行った。HLA-DPB1*09:01 陰性の健康ボランティアより採血を行い、CD4+CD45RA+ ナイーブ T 細胞および CD4+CD45RA- メモリー T 細胞に分離し、HLA-DPB1*09:01 遺伝子を導入した K562/CD86 細胞株 (以下 K86) を刺激細胞として 2~3 回刺激し、増殖が認められたところでクローニングを実施した。2 回の誘導実験とも、メモリー T 細胞よりもナイーブ T 細胞の方が増殖反応を示すことが分かった。限界希釈法培養の結果 11 種類の T 細胞クローンを得た。DPB1*09:01 導入 K86 への反応性を再確認したところ、うち 3 クローンで特異的なインターフェロン (IFN-) 産生が確認された。さらに 3 クローンについてボランティアの自己 B 細胞株、2 種類の HLA-DPB1*09:01 陽性白血病細胞株、2 種類の HLA-DPB1*09:01 導入非血液細胞株との反応性を比較したところ、自己 B 細胞株は認識せず、HLA-DPB1*09:01 拘束性に単球系白血病細胞株を認識する 1 クローンを得ることが出来た。

次いで実際に非血縁者間同種造血幹細胞移植を受けた患者のドナー由来末梢血から、ドナー・患者間で不適合となった HLA-DP 型に反応する T 細胞クローンの誘導を試みた。具体的には HLA-DPB1*04:02 不適合移植を受けた 30 日、100 日後に採取された末梢血を移植前の患者末梢血単核球にて 2 回刺激し、得られた T 細胞株 (99% が CD3 陽性) から限界希釈法で 40 クローンを樹立、さらに拡大培養して特異性試験を行った。患者の B-LCL が樹立できなかったため代用として K86/DPB1*04:02, HeLa/DPB1*04:02 に対する反応性を検討したが全て陰性であった。この結果の解釈として、増殖したクローンが不適合 HLA-DP ではなく、マイナー組織適合抗原を認識している可能性、および誘導された T 細胞 (全て CD4 陽性) が Th1 型に分化せず IFN- を産生できなかった可能性が考えられた。

そこで、(A)移植後末梢血から分離された CD4 陽性細胞を反応細胞とする、(B) 刺激細胞として移植前単核球だけでなく、より特異的な刺激として不適合 HLA-DP を導入したドナー由来 B-LCL も用いる、(C) Th1 型 T 細胞を優先的に刺激・維持出来るように interleukin-12 を添加することを試みた。この結果、DPB1*09:01 など 3 種類の HLA-DP 不適合移植を受けた 2 例の末梢血 CD4 陽性細胞が、単回刺激だけで 14 日間で 13~260 倍増殖出来るようになり、かつ目的とした不適合 HLA-DP に反応する T 細胞集団も 5~30% の効率で得られるようになった。結果として各 T 細胞株から 90 種類前後のクローンが得られ、そのうちの 20% 前後が不適合 HLA-DP 反応性のクローンであった。これまでに収集した白血病検体のうち 3 種類が DPB1*09:01 を保有していたため、DPB1*09:01 反応性クローンと反応させたところ、2 種類のクローンが全ての DPB1*09:01 陽性白血病細胞と反応 (上図) し、うち 1 つは DPB1*09:01 強制発現非血液細胞にほとんど反応しなかった。このクローンは GVHD を回避しつつ抗白血病効果をもたらす T 細胞療法への応用が可能と期待され、さらに開発を進める予定である (論文執筆中)。

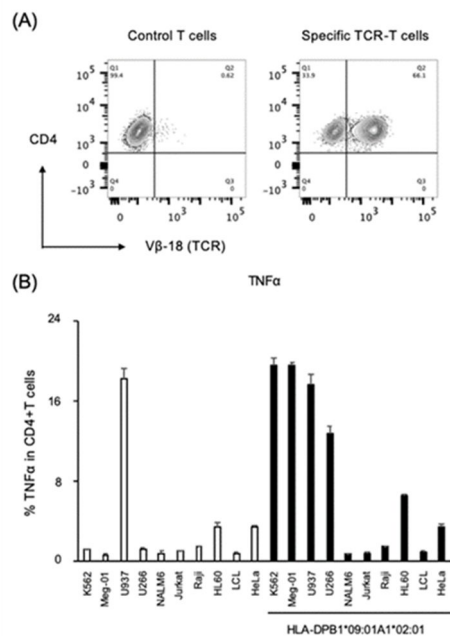


(2) クローンの TCR 遺伝子解析

上述の健康人から得た 1 クローンおよび患者から得た 1 クローン (共に DPB1*09:01 拘束性) から RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を合成した。既報のプライマー配列 (Biochem Biophys Res Commun. 2016;474:709) を用いて PCR を行い、鎖および鎖の可変領域および CDR3 領域の塩基配列を同定し、特許申請した。外来性の TCR 遺伝子を T 細胞で強制発現すると、内在性 TCR との鎖-鎖間でキメラ蛋白を作り、発現量が減少したり、想定外の特異性が賦与される場合があるため、これを防止するために鎖・鎖が結合する部位を既報 (J Immunol. 2010;184:6223) に従いマウスの TCR 配列で置換した。さらに発現量を高めるためにコドン修飾を実施し、レトロウイルスベクターに P2A 配列を介して鎖 鎖の順に組み込み、ウイルス産生細胞を作成した。

(3) 遺伝子改変 TCR-T 細胞の機能評価

HLA-DPB1*09:01 陰性の健康人より採血を行い、CD4 陽性細胞を分離、CD3/CD28 ビーズで刺激した。刺激 2, 3 日後に (2) で作成したウイルス産生細胞の培養上清をハーベストし、活性化 T 細胞に感染して TCR 遺伝子導入を行った。TCR 鎖は TRBV18 型であったため、市販の抗 TRBV18 抗体による染色で可視化が可能であった。(A) に示すように未感染 T 細胞は 0.6% が陽性 (内在性の TRBV18 陽性分画) であったのに対して、感染後は平均して 60% 前後の細胞が陽性となり、遺伝子が効率良く導入されていたことが確認された。次いで (B) に示すようにさまざまな白血病細胞株に HLA-DPB1*09:01 遺伝子を強制発現したもの (右側の黒バー) としなかったもの (左側の白抜きバー) に対する TCR 導入 T 細胞の反応性を検討した。その結果、元々反応性を示した U937 を除いて、刺激に用いた K562 (K86) 以外に、巨核球性白血病細胞株である MEG01 や骨髄腫細胞株である U226 に対して TNF- α や IFN- γ を産生し、元の T 細胞クローンと同様な特異性を示した。



以上より、アロ HLA-DP 反応性 T 細胞を健康人末梢血および HLA-DP 不適合同種造血幹細胞移植患者双方より誘導、クローン化できることを明らかにした。特に今回誘導したクローンは日本人が高頻度に有する HLA-DP 型に反応するものを優先的に選択しており、将来的には HLA-DP 不適合移植を受けた患者が再発した場合、患者型の HLA-DP に特異的な TCR を導入した遺伝子改変 T 細胞により、再発白血病の治療に応用できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 赤塚美樹	4. 巻 67
2. 論文標題 がん免疫療法の展開と展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 現代医学	6. 最初と最後の頁 37-46
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akatsuka Y	4. 巻 11
2. 論文標題 TCR-Like CAR-T Cells Targeting MHC-Bound Minor Histocompatibility Antigens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00257	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 Akatsuka Y	4. 巻 60
2. 論文標題 Progress in immune checkpoint inhibitor therapies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 1341-1350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.60.1341	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 Akahori Y, Wang L, Yoneyama M, Seo N, Okumura S, Miyahara Y, Amaishi Y, Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Maki T, Fujiwara H, Akatsuka Y, Kato T, Shiku H.	4. 巻 132
2. 論文標題 Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood. 2018 Sep 13;132(11):	6. 最初と最後の頁 1134-1145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2017-08-802926	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 -

1. 著者名 Ohta R, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, Fujiwara H, Kuzushima K.	4. 巻 466
2. 論文標題 Improving TCR affinity on 293T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunol Methods	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2018.11.010.	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 -

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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 赤塚美樹
2. 発表標題 同種造血細胞移植後の再発白血病に対する新規アロ養子免疫療法の開発
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤塚美樹、楯屋良子、西尾信博、一戸辰夫、岡村文子、西川博嘉
2. 発表標題 不適合HLA-DP抗原を標的とする同種造血細胞移植後の養子免疫療法の開発
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤塚美樹, 勝山直哉, 川瀬孝和, 西尾信博, 楢屋良子, 岡村文子, 一戸辰夫
2. 発表標題 不適合HLA-DPB1*02:01抗原を標的とした同種移植後細胞免疫療法の開発
3. 学会等名 第12回日本血液疾患免疫療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiki Akatska
2. 発表標題 Cellular therapies against recurring hematological malignancies after allogeneic HCT
3. 学会等名 The 25th meeting of Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation Group (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤塚美樹, 勝山直哉, 白石圭子, 楢屋良子, 岡文子
2. 発表標題 不適合HLA-DP抗原を標的とした同種移植後細胞免疫療法の検討
3. 学会等名 第11回血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝山 直哉, 楢屋 良子, 白石 圭子, 西尾 信博, 一戸 辰夫, 赤塚 美樹
2. 発表標題 不適合HLA-DP抗原を標的とする同種移植後細胞免疫療法の検討
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 T細胞受容体	発明者 赤塚美樹、他2名	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-055988	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------