

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22540

研究課題名（和文）ライソゾーム病酵素補充療法後の中和抗体産生B細胞の特異的排除法の開発

研究課題名（英文）Neutralizing antibody producing B cell deletion by CAR technology in Lysosomal diseases

研究代表者

五條 理志（Gojo, Satoshi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90316745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ライソゾーム病はライソゾーム酵素の欠損等により発症する先天性代謝異常症である。ファブリー病はこのライソゾーム病の一つであり、alpha-galactosidase（GLA）が原因遺伝子となっている。ファブリー病の治療はGLAタンパク質を用いたERTである。しかしながら男性患者の多くは体内でGLAへの中和抗体を産生しERT効果が減衰する。そこで我々はGLA中和抗体を産生するB細胞を特異的に排除する新規治療法（BAR）の開発を試みた。本研究ではBARの有効性を評価するために細胞株を利用した評価系を構築した。これによりBARの有効性を検討できる系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-Tが臨床の場において大きなインパクトを与えている。この技術は自己免疫疾患への応用も期待されているが、具体的な展開は殆どなされていない。特に中和抗体の抑制を目的とした利用はなされておらず、ファブリー病の酵素製剤に対する中和抗体産生B細胞消去の検討は新規性の高い研究である。この研究成果は中和抗体が関与する病態に適應できるため、他のライソゾーム病や血友病への展開も期待されるため、その意義は大きい。またアナフィラキシーへの効果的な介入に展開できる可能性もあるため、本アプローチは極めてユニークでオリジナリティが高いProof of Conceptを証明する萌芽的な研究である。

研究成果の概要（英文）：Lysosomal diseases are inherited metabolic disorders caused by the deficiency enzymes in lysosomes, organelles within cells. Fabry disease is one of these lysosomal diseases, and alpha-galactosidase (GLA) is the causative gene. The current treatment of Fabry disease is ERT using GLA protein. However, almost male patients produce neutralizing antibodies to recombinant GLA proteins in their bodies, reducing the efficacy of ERT. We attempted to develop a novel therapeutic approach (BAR) to specifically eliminate B cells that produce GLA neutralizing antibodies. We constructed an evaluation system using cell lines to evaluate the efficacy of BAR, and evaluated the efficacy of several design sequences. We also designed a model cell line for GLA antibody-producing B cells and constructed a system for the expression of scFv to GLA on the cell surface. By using the above systems, we designed and constructed a system that enables us to search for effective sequences and the efficacy of BAR.

研究分野：病理病態学、感染・免疫学およびその関連分野

キーワード：CAR T 中和抗体 ライソゾーム病 Electroporation mRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病の治療は、組換えタンパク質を用いた酵素補充療法(ERT)が現れることによって、大きく前進した。しかし、酵素が完全欠損に近い病態を有する患者においては、当該タンパク質が自己と認識されず、ERTの実施に伴い中和抗体が出現する。ERTにより抗体が産生された患者群では、抗体を産生しない患者群に比べて、明らかに治療効果が低く、アナフィラキシーを呈した症例も存在することが報告されている。ライソゾーム病以外にも、Recombinant proteinを用いる治療法は極めて多岐な疾患に及んでおり、血友病のような遺伝子病によるタンパク質欠損・活性低下を補充するスキームは、同様の中和抗体の問題が提議されている。中和抗体が引き起こす本病態に対しては、現在のところ臨床応用されている抜本的な対策はない。近年、免疫担当細胞に膜レセプターを作出する技術が急速に進展した。概念は1989年に発表されていたが、scFvの応用、細胞内シグナル伝達経路の解明、その起点となるレセプター細胞内ドメインの解析など周辺機構の理解が進んだことで、標的特異的で高い細胞障害性を有するT細胞: Chimeric Antigen Receptor T cells (CAR T)が臨床の場において大きなインパクトを与えた。CAR technologyの進展は、Regulatory T cellsにCARを表出させることで、その対象を癌から自己免疫疾患や臓器移植における拒絶反応にも広がった。更に、CAR technologyを応用した直接的なB cell deletionの方法により、尋常性乾癬のTargetである自己抗原のDesmoglein1, 3に対する自己抗体除去と病態改善が発表された。膜に発現させるものとして、抗体の抗原認識部位ではなく抗原そのものとし、障害されるべき対象としては、その抗原を認識する抗体を産生するB細胞とするフレームがデザインされた。このEngineered receptorはCD8+ Cytotoxic T cellsに発現させられ、Chimeric AutoAntibody Receptor T cells (CAAR T)と名付けられた。

これと同等の手法による組換えタンパク質に対する中和抗体産生B細胞消去の研究は、血友病に対して報告された。ライソゾーム酵素製剤に対する中和抗体産生B細胞消去の検討は全く新規である。挑戦的研究としての意義もしくは可能性として、BAR T細胞による選択的B細胞除去の実証は、中和抗体が引き起こすあらゆる病態に適応可能であり、ファブリー病のERTだけではなく、他のライソゾーム病でERTが行われている疾患や血友病の組み換えタンパク質投与中の問題などを解決できるという意味で、極めてその意義は大きいと考える。また、中和抗体による治療効果の減弱もしくはアナフィラキシーへの効果的な介入方法は存在しない現状において、本アプローチは極めてユニークでオリジナリティが高く、実証されていないことのProof of Conceptを証明する萌芽的な研究である。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、プライマリーT細胞へのBAR遺伝子の導入とBAR-T細胞のファブリー病モデルマウスによる有効性の証明であったが、プライマリーT細胞を用いたBARの有効性評価は困難であった。BAR遺伝子のデザインについて詳細な検討ができるように複数のデザインを設計し、それぞれの構築と有効性について検討することにした。またその有効性を評価するに当たり、CD69をマーカーとした評価系の構築も検討した。それぞれの細胞はプライマリー細胞に比べて比較的遺伝子導入が容易な細胞株(Jurkat, NALM-6)を選択した。これにより、複数のBAR遺伝子を評価する系を構築し、最適化を容易に検討できる。

3. 研究の方法

ファブリー病に対するBAR遺伝子は、細胞外にGLAタンパク質、細胞膜までのLinkerタンパク質、細胞膜間に膜貫通タンパク質(TM, Transmembrane)、細胞内にシグナル伝達する4-1BBとCD3zの3区画に分けることができる。そこで、現在報告されているCAR-TのデザインをもとにGLAタンパク質を細胞外に配置し、HingeとTM、4-1BBとCD3zを結合したGLA_BAR1をデザインした。次にターゲット細胞膜上にGLA抗体を発現させるために、GLAモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(明治薬科大学臨床遺伝学教室櫻庭均教授より供与)のGLA抗体配列をRNA-seqを用いて解析し、scFvをデザインした。GLA_scFvはTMを介して蛍光タンパク質mCherryを配置したもの、しなかったものをデザインし、それぞれGLA_scFvが細胞膜上に発現できるようにした(図1)。

BARの有効性を評価する前に、我々はCAR Tシステムの再現性を本研究室で構築することから初めた。ヒト倫理指針の提出後、ヒト健常者(ボランティア)の血液からパーコールを用いてPMBC(末梢血単核細胞)分画を単離し、CD3とCD28コーティングしたプレートに播種し、IL-7とIL-15を加えた。培養2日後、レンチウイルスにてCD19 CARとGFPをそれぞれ導入し、CD19を発現している細胞株Rajiと4日間、共培養し、Killing assayによる細胞数の変化をFACSにて評価した。またこのKilling assayを用いてBAR遺伝子に関しても同様の解析を行った。エフェクター細胞はヒトT細胞を用いて、ターゲット細胞

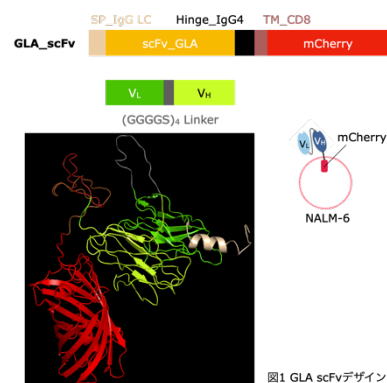


図1 GLA scFvデザイン

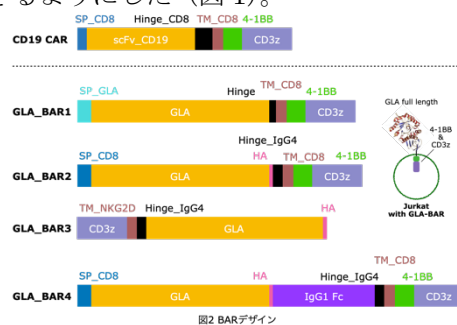


図2 BARデザイン

は M1 (マウス骨髄性白血病細胞株) を用いてそれぞれ GLA_BAR1 と GLA_scFv 遺伝子を導入した。

この Killing assay では細胞増殖の鈍化は観察されたものの、ターゲット細胞の排除はほとんど起きていなかった。そこで GLA_BAR1 のデザインをもとに 2 種類の BAR をデザインした (GLA_BAR2, 4)。さらに Type II 膜タンパク質を参考にしたデザイン (GLA_BAR3) も行い、合計 3 種の BAR 遺伝子を追加デザインした (図 2)。これらのデザインをレトロウイルスベクター (pMSCV-GFP) に挿入した。

我々の Killing assay ではプライマリー T 細胞を利用するため、複数の BAR 遺伝子のデザインを評価には適さない。そこで、デザインした各種 BAR 遺伝子をそれぞれ導入した Jurkat (ヒト T 細胞性白血病由来細胞株) をエフェクター細胞として樹立し、最適なデザインを検討することにした。ターゲットとなる細胞も scFv_GLA-mCherry を発現させた NALM-6 (ヒト B 細胞白血病細胞由来細胞株) を用いることで安定した結果を得られるように変更した。BAR 遺伝子の有効性評価は T 細胞が活性化された際に発現する CD69 をマーカーとした Bloemberg D (Mol Ther Methods Clin Dev. 2020) の報告を参考にした。

最適な BAR 遺伝子デザインの決定後、これを導入したマウス T 細胞を作成し、中和抗体を産生するファブリー病モデルマウスに移植、治療効果を確認する実験系をデザインした。まずファブリー病モデルマウスに中和抗体を産生させるため、GLA 抗原として Fabrazyme (サノフィ社) 50 µg をアジュバンド (Rockland Immunochemicals 社) と共に同モデルマウスの足底より 4 週間毎に計 2 回投与した。その後、経時的に血液内の抗体量を評価した。抗体量は anti-mouse IgG HRP-linked 抗体を用いて ELISA で評価した。

4. 研究成果

我々は CD19 CAR のデザインを参考に BAR 遺伝子 (GLA_BAR1) をデザインした (図 2)。BAR 遺伝子を目的通り動作させるには細胞膜上に GLA タンパク質を抗原として配置する必要がある。そこで細胞外分泌型シグナルペプチドとして、GLA 遺伝子のオリジナルのシグナルペプチドを利用した。GLA 配列の後には TM (CD8A 由来) と 4-1BB、CD3z を配置し、CD19 CAR と同じ配列にした。次にターゲット細胞膜上に GLA_scFv (GLA single chain Fv) を発現させるために、GLA モノクローナル抗体発現ハイブリドーマの抗体配列を RNA-seq を用いて解析し、IgG 抗体の可変領域 (Fv) の抗原結合部位の V_H と V_L の配列を決定した。決定した配列をもとに、ペプチドリンカー (GGGGS)₄ を V_L の C 末端と V_H の N 末端の間に挿入し、GLA_scFv の配列をデザインした (図 1)。これらのデザインした配列はレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターに挿入し、本研究にて利用した。

GLA BAR の有効性を評価するために、まずはポジティブコントロールとして、CD19 CAR T 細胞の Killing assay を行った。この結果、ターゲットとなる Raji の細胞割合がコントロールと比較して 50%程度減少していたため、評価系は構築できた (図 3)。次に、BAR 遺伝子でも同様の Killing assay を行った。GLA_BAR1 T 細胞を作製し、scFv_GLA を発現させた M1 細胞と共培養したところ、CD19 CAR のように細胞数を半減させるまでにはいかなかったが、ターゲット細胞の M1 の増殖を鈍化させる結果となった (図 4)。この結果は BAR の有効性を示せたが、現在の BAR 遺伝子デザインは最適化されていない可能性がある。そこで、我々は複数の GLA BAR 遺伝子のデザインを行い、これらの評価を行えるシステムを構築することにした。

そこで CAR T 遺伝子と GLA BAR 遺伝子の配列を比較し、各種のキーと機能ドメインについて検討し直した。まず細胞外分泌型シグナルペプチドとして、GLA 遺伝子のオリジナルのシグナルペプチドの代わりに CD19 CAR でも利用されている CD8A シグナルペプチドを利用することにした (GLA_BAR2, 4)。また Type II 膜タンパク質の NKG2D の配列を利用し、CD3z を N 末端側に配置した GLA_BAR3 もデザインした (図 2)。さらに GLA 遺伝子の末端に HA タグを配置し、発現解析の指標に利用できるようにした (GLA_BAR2, 3, 4)。GLA と膜タンパク質の間の Hinge は IgG4 由来の配列を利用し

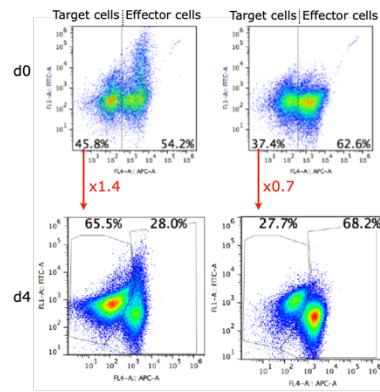


図3 CD19 CAR-Tシステムを用いたKilling assay

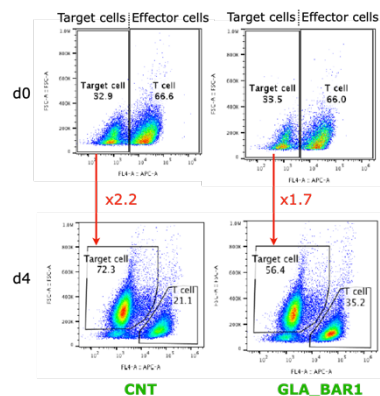


図4 GLA BARシステムを用いたKilling assay

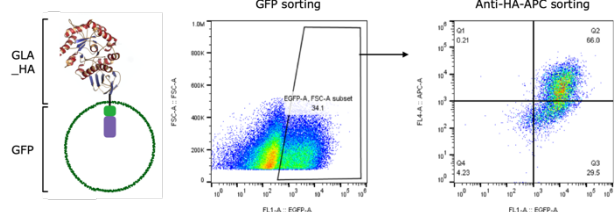


図5 Jurkat pMSCV-BAR2-HA-GFPのソーティング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

た (GLA_BAR2, 3, 4)。GLA_BAR4 は GLA と膜タンパク質の間に IgG1 Fc 配列を挿入し、GLA タンパク質が 2 量体を形成できるようにした (図 2)。これらのデザインした配列はレトロウイルスベクター-pMSCV に挿入し、Jurkat、もしくは NALM-6 に導入した。それぞれの導入効率は FACS を用いて HA 抗体による陽性率を評価した。この結果、BAR2 では 66%まで純化できた (図 5)。また GLA_BAR1 は GLA 抗体を用いて評価したが、FACS に利用できる抗体がなかったため、細胞外の GLA の存在は確認できなかった。なお、BAR3 と BAR4 はレトロウイルスベクター作製が完了した直後のため、HA 抗体による評価は未検討である。また、NALM-6 への導入効率は、Anti-Fab2 抗体を用いてソートしたところ、44.8%まで純化できた (図 6)。

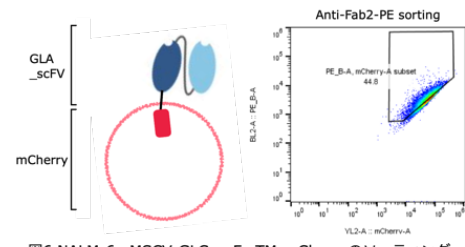


図6 NALM-6 pMSCV-GLC_scFv-TM-mCherryのソーティング

これらの複数のエフェクター細胞を同時に評価するにあたり、T 細胞活性化で細胞表面に発現する CD69 を指標にした解析系の構築を検討した。まず既存の CD19 CAR を発現させた Jurkat 細胞を樹立し、Raji と共培養した。24 時間後、共培養前と共培養後の細胞を回収して FACS にて解析したところ、CD19 CAR-Jurkat の細胞表面に CD69 が発現していた (図 7)。これらの結果から、CD3z による T 細胞の活性化は Jurkat でも確認できるため、解析系の構築ができた。現在はこの系を用いた BAR 遺伝子の評価を進めている。

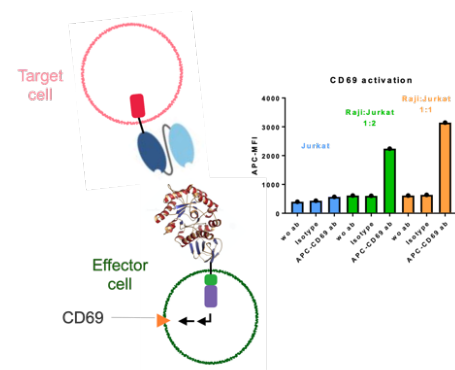


図7 BAR遺伝子の評価系の構築とCAR-Tシステムの結果

ファブリー病モデルマウスに GLA 抗原として Fabrazyme を計 2 回投与した後、1,2,4 週間後に抗体量を ELISA で評価した。投与群ではコントロール群と比較して ELISA での吸光度の上昇が持続的に認められ、中和抗体が持続的に産生されていることが確認された (図 8)。またマウス T 細胞に BAR 遺伝子を導入するためにレトロウイルスを用いるモデルを構築中である。

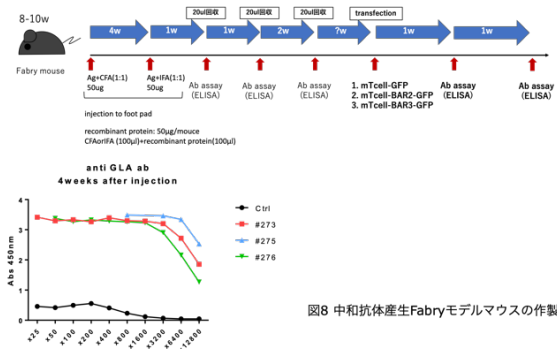


図8 中和抗体産生Fabryモデルマウスの作製

今後は最適化した BAR 遺伝子にて、中和抗体を産生させたファブリー病モデルに遺伝子導入した T 細胞を移植することで中和抗体産生能の減衰について評価していく。これらの結果は今後の中和抗体による病態に対する新たな治療モデルとなるだけでなく、ERT の恩恵を得られない患者への福音となりえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志熊明、前田遼太郎、鈴木陽介、田谷俊彦、上大介、的場聖明、五條理志
2. 発表標題 A New Therapy for Fabry Disease with Autoantibodies Applying Chimeric Antigen Receptor T cell Technology
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ライソゾーム病酵素製剤への中和抗体産生B細胞の特異的排除法	発明者 五條理志、上大介、 星野温、南嘉人	権利者 京都府公立大学 法人
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-199624	出願年 2019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
研究分担者	星野 温 (Hoshino Atsushi) (50737210)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	上 大介 (Kami Daisuke) (80415588)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

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
---------	---------