

令和 2 年 9 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07025

研究課題名(和文) 多彩な反応性を保持するがん特異的キメラ抗原受容体レパトアの作成

研究課題名(英文) Generation of chimeric antigen receptors with different reactivity for a tumor antigen

研究代表者

越智 俊元(Ochi, Toshiki)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10571086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫療法はがんに対する新たな治療法として確立された。本研究課題では、抗体を用いた免疫療法の治療効果に大きく影響する一本鎖抗体(scFv)に着目する。そして、キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)と、がん細胞に特異的に発現するNY-ESO-1をモデルとして、我々独自のscFv作製技術を確認する。この技術をもとにCAR-T細胞として様々な標的の反応性を誘導するがん特異的scFvレパトアを作製し、ヒト免疫細胞を用いたトランスレーショナルリサーチを実施する。そしてがんに対するそれぞれの抗体療法に合わせて最も適したscFvを選択できる技術として発展させ、抗体医薬品開発の進展に繋げる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が確立した新規技術を用いれば、scFv内の可変領域配列を自由に变化させることで、scFvの標的認識様式を繊細に調律することが可能となる。そして、CAR-T細胞の抗がん活性を指標としながら新規scFvを作製・同定することが可能となる。本技術を応用すれば、様々な抗体製剤の治療効果に主眼においたこれまでにない迅速かつ網羅的な抗体医薬品作製が可能となるため、がんを含めた難治性疾患に対する免疫療法製剤開発の領域におけるインパクトは大きく、社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Modified antibodies which activate immune cells with cancer specificity has been developed, thereby cancer immunotherapy has shown great success. In this study, we focused on optimizing single chain fragment variables (scFvs) for further development of antibody-based immunotherapy. Using chimeric antigen receptor T cells (CAR-T cells) and an HLA-A2/NY-ESO-1 complex expressed by tumor cells as models, we have established a new scFv generation system which can fine-tune the reactivity of CAR-T cells. Newly generated scFv-expressing CAR-T cells showed target-specific reactivity with different degrees. Among them, we have successfully identified scFv-optimized CAR-T cells which show sufficient antitumor reactivity with minimal unwanted cross-reactivity. This system allows us to optimize each scFv for each antibody-based modality, resulting in the advancement of successful cancer immunotherapy utilizing modified antibodies.

研究分野：血液内科学、腫瘍免疫学

キーワード：キメラ抗原受容体 一本鎖抗体 NY-ESO-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がんに対する T 細胞免疫療法が目覚ましい発展を遂げている。がん細胞に表出される HLA/ペプチド複合体を特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR: T-cell receptor) 遺伝子導入療法が国内外で進められてきた。これらの臨床試験によって、TCR の標的 HLA/ペプチド複合体に対する結合力 (標的親和性) を十分に高めることが、高い治療効果に繋がることが示されている。しかしながら、TCR の標的親和性を人為的に向上させた際、がん特異性が低下し、正常細胞も認識する危険性が示唆されている。

このような TCR に関わる課題を解決する手段の一つとして、抗体の重鎖と軽鎖可変領域配列をもとに一本鎖抗体 (scFv: single chain fragment variable) を作製し、キメラ抗原受容体 (CAR: chimeric antigen receptor) に応用する技術開発が進められた。これらの治療法の一部はすでに承認を受け、一般臨床の場でも用いられる段階に至っている。scFv は TCR と標的分子を認識する様式が異なり、かつ数千倍標的親和性が高いとされている。従って、CAR を利用することによって、安全性を担保しつつ T 細胞をがん特異的に活性化し、がん細胞を効率的に排除できる可能性がある。そのためには、複数のがん特異的 scFv レパトアを作製し、CAR-T 細胞治療に適した scFv を選択する過程が必要となる。

NY-ESO-1 は正常組織においては精巣にのみ発現が限局している、細胞内に発現するがん特異的抗原の 1 つである。悪性黒色腫を中心とした様々な固形がんにおいて高発現していることが知られている。近年、難治性がんを標的として、HLA-A*02:01/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ ペプチド複合体 (A2/NY-ESO-1₁₅₇) を特異的に認識できる TCR を遺伝子導入した T 細胞輸注療法の臨床試験が行われ、大きな副作用なく一定の治療効果を発揮することが示された。安全性を保持しつつ治療効果の向上を目指す上で、A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv を応用した CAR-T 細胞療法は有望ながん免疫療法の一つとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究課題では、CAR-T 細胞に適した新たな scFv 作製技術を確立することを目的とする。各種がん細胞表面に発現されている A2/NY-ESO-1₁₅₇ を標的モデルとして、A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv ライブラリーを作製し、第二世代 CAR (CD28 ζ) に組み込む。この中から、CAR-T 細胞として機能する複数の scFv レパトアを同定する。つづいて、既知の A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv、または新規 scFv を保持する第二世代 CAR を末梢血 T 細胞に遺伝子導入して機能解析を

行う。新たに確立した scFv 作製技術の有用性を検討し、臨床応用を見据えて、がん治療に最適であると考えられる A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR を同定する。

3. 研究の方法

(1) A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv と、scFv ライブラリーの作製

重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカー配列で連結して、HLA-A*02:01/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (A2/NY-ESO-1₁₅₇) を特異的に認識する scFv (3M4E5) を作製した。

次に、CD19 microbeads を用いてヒト末梢血 B 細胞を単離した。ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域を 5' RACE 法を用いて単離して、可変領域ライブラリーを作製した。これを、3M4E5 重鎖可変領域 (3M4E5-H) ならびに軽鎖可変領域 (3M4E5-L) と連結して、A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv ライブラリーを作製した。

(2) A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR 遺伝子の作製

A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv (3M4E5-scFv) を、CD28 膜貫通領域、CD3 ζ 鎖を持つ第二世代 CAR (CD28 ζ) に個別に組み込んで、A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR を作製した。同様にして、A2/NY-ESO-1₁₅₇ scFv ライブラリーを第二世代 CAR に組み込んで、A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR ライブラリーを作製した。遺伝子導入 T 細胞を検出するために、NGFR (nerve growth factor receptor) 遺伝子をタグ遺伝子として利用した。フローサイトメトリー法を用いて、NGFR 陽性細胞をゲートして解析を行った。

(3) A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR-T 細胞、CAR ライブラリー T 細胞の作製とその機能解析

ヒト末梢血単核球 (PBMCs) を採取、保存し研究に用いた。100 U/mL IL-2、50 ng/mL ヒト CD3 抗体 (OKT3) 存在下においてヒト T 細胞を刺激増幅し、A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR 遺伝子、CAR ライブラリー遺伝子を導入した。具体的には、各遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込み、PG13 細胞株に遺伝子導入して、T 細胞指向性をもつレトロウイルスを作製し、ヒト T 細胞に遺伝子導入した。

A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞を作製後に、A2 テトラマー (A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマー、A2/HIV Gag₇₇ テトラマー) を用いて染色し、その標的特異性を確認した。また、

A2 陽性 NY-ESO-1 陽性標的細胞に対する CAR-T 細胞のサイトカイン産性能について、細胞内サイトカイン染色法を用いて検討した。

一方、CAR ライブラリー T 細胞については、作製後に、標的抗原を発現する抗原提示細胞で繰り返し刺激した。A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR-T 細胞集団を濃縮した後、新規 scFv を同定した。

(4) 新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv の解析

新たに同定した scFv を保持する第二世代 CAR 遺伝子を、TCR 欠損細胞株である Jurkat 76 に導入して機能解析した。A2 テトラマーで染色するとともに、標的細胞に対する反応性を、CD69 発現解析を通してフローサイトメトリー法で検討した。

4. 研究成果

(1) A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR-T 細胞

3M4E5-L と 3M4E5-H を、LH の順に連結した scFv と、HL の順に連結した scFv とを作製した。3M4E5-LH CAR-T 細胞、3M4E5-HL CAR-T 細胞はともに A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマーで特異的に染色された (図 1A)。また、3M4E5-CAR 導入 CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞は、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした HLA-A*02:01 陽性である T2 細胞を選択的に認識して、各サイトカインを産生した (図 1B)。

図 1. A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞

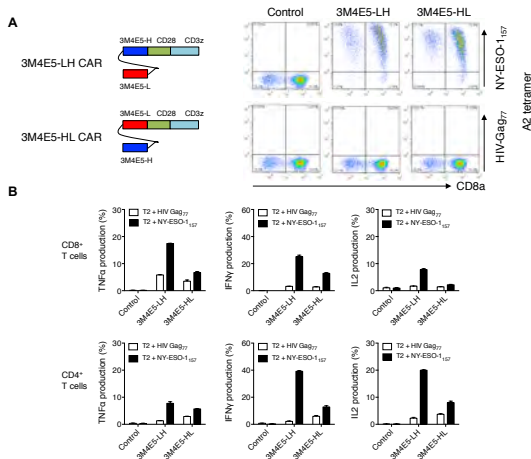


図 1. A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR-T 細胞 3M4E5-LH、3M4E5-HL 第二世代 CAR を遺伝子導入した CAR-T 細胞を A2 テトラマーで染色した (A)。A2/NY-ESO-1₁₅₇ CD8⁺ CAR-T 細胞、CD4⁺ CAR-T 細胞と、各標的細胞とを共培養しサイトカイン産生能を解析した (B)。

(2) A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR ライブラリー T 細胞の樹立

ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域配列を、3M4E5-L または 3M4E5-H と連結して作製した scFv ライブラリーをもつ CAR 遺伝子を作製した。これを末梢血 T 細胞に遺伝子導入して CAR ライブラリー T 細胞を作製し、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした HLA-A*02:01 陽性腫瘍細胞を標的として繰り返し刺激した。

こうして樹立した A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR ライブラリー T 細胞 (hL/3M4E5-H, hH/3M4E5-L) は、A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマーで特異的に染色された (図 2A)。軽鎖ライブラリーの中から、A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR ライブラリー T 細胞を高頻度に検出した (図 2B)。この CAR ライブラリー T 細胞は、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした T2 細胞に対して標的的特異的にサイトカインを産生した (図 2C)。

図 2. A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR ライブラリー T 細胞

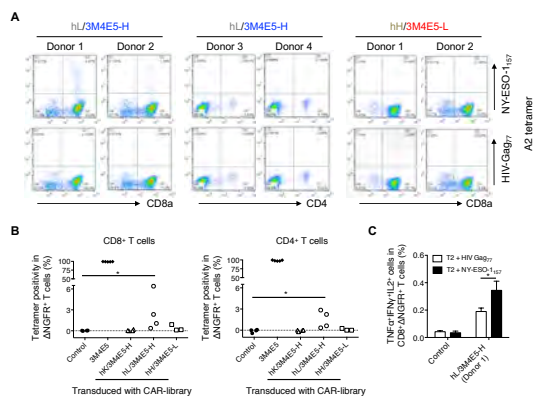


図 2. A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR ライブラリー T 細胞

A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR ライブラリー T 細胞を樹立し、A2 テトラマーで染色した (A)。4 人の異なるドナーより作製した CAR ライブラリー T 細胞における A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマー陽性率をまとめた (B)。A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR ライブラリー T 細胞 (hL/3M4E5-H, donor 1) の標的細胞に対するサイトカイン産生を示す (C)。

(3) 新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞の標的反応性の解析

A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR ライブラリー T 細胞の中から、A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマー陽性細胞を単離して、新規 scFv 遺伝子をクローニングした。その結果、5 種類の新規軽鎖可変領域と、2 種類の新規重鎖可変領域を同定した。

新規 scFv を搭載した第二世代 CAR を Jurkat 76 細胞株に遺伝子導入した。それぞれ異なる scFv を発現する Jurkat 76/CAR 細胞株は、A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマーによつ

て異なる染色強度で染色された (図 3A)。また、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした T2 細胞に対して異なる強度で反応した (図 3B)。A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマーおよびペプチド濃度を変化させながら structural/functional avidity を測定すると、scFv 内可変領域の片側を変化させることによって、A2/NY-ESO-1₁₅₇ に対する反応性が幅を持って変化することが明らかとなった (図 3C)。

図3. 新規A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T細胞の標的反応性

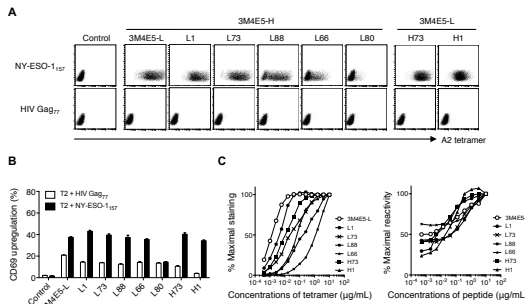


図 3. 新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞の標的反応性

各 CAR 遺伝子を Jurkat 76 細胞株に遺伝子導入し、A2 テトラマーで染色した (A)。Jurkat 76/CAR 細胞株を各標的細胞と共培養し、CD69 の発現を測定した (B)。A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマー、および NY-ESO-1₁₅₇ ペプチド濃度を変化させながら、structural avidity、functional avidity を測定した。10 μg/mL での A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマー染色強度、10 μg/mL での NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドに対する反応性をそれぞれ 100% として、各濃度における反応性を相対的に算出した (C)。

(4) 新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞のがん細胞反応性と交差反応性の検討

新たに同定した L1 CAR と、従来型の 3M4E5-L CAR 遺伝子をヒト末梢血 T 細胞に遺伝子導入した。L1 CAR-T 細胞、3M4E5-L CAR-T 細胞ともに A2/NY-ESO-1₁₅₇ テトラマーで特異的に染色された (図 4A)。

図4. 新規A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T細胞のがん細胞反応性と交差反応性

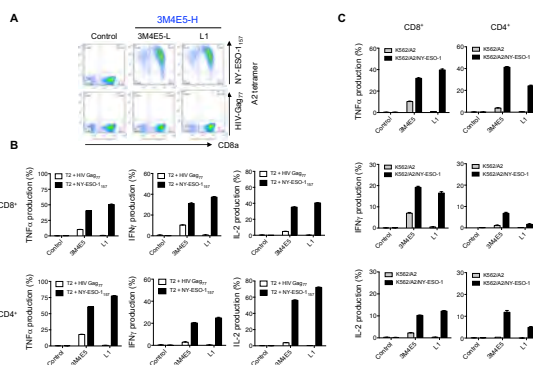


図 4. 新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞のがん細胞反応性と交差反応性

3M4E5-L、L1 CAR を遺伝子導入した CAR-T 細胞を A2 テトラマーで染色した (A)。A2/NY-ESO-1₁₅₇ CD8⁺ CAR-T 細胞、CD4⁺ CAR-T 細胞と、各標的細胞とを共培養しサイトカイン産生能を解析した (B)。同細胞を K562/A2 細胞株、K562/A2/NY-ESO-1 細胞株と共培養し、同様にしてサイトカイン産生能を解析した (C)。

また、L1、3M4E5-CAR 導入 CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞は、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドをパルスした HLA-A*02:01 陽性である T2 細胞を選択的に認識して、各サイトカインを産生した (図 4B)。さらに、HLA-A*02:01/NY-ESO-1₁₅₇ 複合体を内在性に発現する K562/A2/NY-ESO-1 細胞株を樹立して標的として用いたところ、L1 CAR-T 細胞、3M4E5-L CAR-T 細胞ともに K562/A2/NY-ESO-1 細胞株を認識してサイトカインを産生した。重要なこととして、L1 CAR-T 細胞は K562/A2 細胞株を認識せず、3M4E5-L CAR-T 細胞とは異なる様式で A2/NY-ESO-1₁₅₇ を認識することが明らかとなった (図 4C)。

そこで、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドの各アミノ酸をアラニンに 1 塩基置換した 9 種類の類似ペプチドを作製し、各 CAR-T 細胞が保持する潜在的な交差反応性について検討を行った。その結果、3M4E5-L CAR-T 細胞は多数のアラニン置換ペプチドに対して反応を示し、高い交差反応性を保持する可能性が示唆された。一方、L1 CAR-T 細胞は、2、4、5、6、8 番目をアラニン置換したペプチドに対して反応性が消失あるいは低下し、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドに対してより特異的に反応することが明らかとなった (図 5)。

図5. 新規A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T細胞の潜在的交差反応性

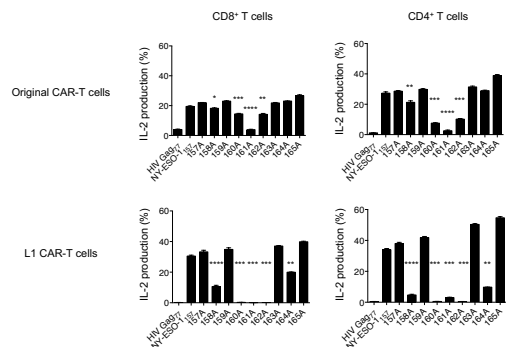


図 5. 新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ CAR-T 細胞の潜在的交差反応性

NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドの各アミノ酸をアラニンに 1 塩基置換したアラニン置換ペプチドと、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドとをそれぞれ T2

細胞にパルスして、各 CAR-T 細胞の標的細胞に対する IL-2 産生能を比較検討した。

本研究課題を通して我々は、CAR ライブラリー T 細胞を用いることで様々な反応性を示す新規 scFv を作製・同定するための新規技術を確立した。本技術を用いて scFv 内の可変領域配列を変化させることによって、CAR-T 細胞の反応性を繊細に調律し、CAR-T 細胞として最適な scFv の同定に繋がること示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Maruta M, Ochi T, Tanimoto K, Asai H, Saitou T, Fujiwara H, Imamura T, Takenaka K, Yasukawa M. Direct comparison of target-specific reactivity and cross-reactivity induced by CAR/BiTE-redirected T cells for the development of antibody-based T-cell therapy. *Sci Rep.* 2019; 9: 13293. 査読有.
DOI: 10.1038/s41598-019-49834-2
 2. Ochi T. Development of innovative T-cell therapy using antitumor receptors for hematological malignancies. *Rinsho Ketsueki.* 2019; 60: 824-33. 査読有.
DOI: 10.11406/rinketsu.60.824
 3. 越智俊元, 安川正貴. 造血器腫瘍に対する免疫療法 新たな標的抗原とその治療応用. *実験医学.* 2019; 37: 2622-2626. 査読無.
 4. 越智俊元. 白血病幹細胞の免疫細胞治療. *血液フロンティア.* 2018; 28: 887-97. 査読無.
 5. 越智俊元. 遺伝子改変抗体を応用したがんに対する T 細胞免疫療法. *愛媛医学.* 2018; 37: 49-53. 査読無.
- [学会発表] (計 17 件)
1. Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Fujiwara H, Takenaka K, Yasukawa M. Next-generation CAR T-cell therapy using antitumor scFvs optimized by a cell-based screening system. The 81st JSH Annual Meeting, 2019.
 2. 越智俊元. 免疫療法の未来を拓く次世代型抗体の開発とその応用 日本骨髄腫学会 第 1 回骨髄腫セミナー, 2019.
 3. 越智俊元, 丸田雅樹, 谷本一史, 藤原弘, 竹中克斗, 安川正貴. A novel scFv screening technology by exploiting T cells in combination with CAR-based scFv library. 第 23 回日本がん免疫学会総会, 2019.
 4. 越智俊元, 丸田雅樹, 谷本一史, 藤原弘, 竹中克斗, 安川正貴. Development of next-generation CAR-T cell therapy using antitumor scFvs optimized by a novel cell-based screening system. 第 11 回日本血液疾患免疫療法学会学術集会, 2019.
 5. Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Fujiwara H, Takenaka K, Yasukawa M. Establishment of a novel T-cell-based scFv screening technology to advance modified antibody-based immunotherapy. The 17th CIMT Annual Meeting, 2019.
 6. Ochi T. Generation of optimal antitumor receptors for T-cell therapy in hematological malignancies. The 80th JSH Annual Meeting, 2018.
 7. Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Asai H, Saitou T, Yakushijin Y, Fujiwara H, Imamura T, Takenaka K, Yasukawa M. Development of anti-myeloma immunotherapy by exploiting modified antibodies specific for A2/NY-ESO-1. The 4th CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference, 2018.
 8. Ochi T. Anti-myeloma T-cell therapy by exploiting modified antibodies specific for A2/NY-ESO-1. 4th Annual Immunotherapy in Myeloma Scientific Workshop, 2018.
 9. Maruta M, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Strategically Comprehensive Immunotherapy Utilizing Modified Antibody Targeting NY-ESO-1 for Myeloma. The 8th JSH International Symposium, 2017.
 10. Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Azuma T, Fujiwara H, Yasukawa M. Development of immunotherapy for

myeloma utilizing T cells redirected with modified antibodies specific for NY-ESO-1.
The 36th Sapporo International Cancer Symposium, 2017.

11. Maruta M, Ochi T, Tanimoto K, Azuma T, Fujiwara H, Yasukawa M. Development of T-cell therapy by exploiting modified antibodies specific for A2/NY-ESO-1 for refractory myeloma. The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2017.
12. Ochi T, Maruta M, Fujiwara H, Yasukawa M. Anti-myeloma immunotherapy utilizing T cells redirected by modified antibodies targeting NY-ESO-1. 第 42 回日本骨髄腫学会学術集会, 2017.
13. 越智俊元. 造血器腫瘍に対する抗原特異的 T 細胞を用いた免疫遺伝子治療. 第 45 回日本臨床免疫学会総会, 2017.
14. 越智俊元, 丸田雅樹, 藤原弘, 安川正貴. NY-ESO-1 を認識する改変抗体を応用した骨髄腫に対する新たな包括的免疫療法の開発. 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会, 2017.
15. 丸田雅樹, 越智俊元, 谷本一史, 東太地, 藤原弘, 安川正貴. A2/NY-ESO-1 特異的改変抗体を応用した多発性骨髄腫に対する新規免疫療法の開発. 第 21 回日本がん免疫学会総会, 2017.
16. 越智俊元, 丸田雅樹, 谷本一史, 東太地, 藤原弘, 安川正貴. A2/NY-ESO-1 特異的改変抗体を応用した骨髄腫に対する新たな免疫療法の開発. 第 9 回血液疾患免疫療法学会, 2017.
17. 丸田雅樹, 越智俊元, 藤原弘, 安川正貴. 改変抗体を応用した多発性骨髄腫に対する新たな免疫療法の開発. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017.

[図書] (計 2 件)

1. Ochi T, Maruta M, Hirano N. Gene modification and immunological analyses for the development of immunotherapy utilizing T cells redirected with antigen-specific receptors. *Methods Mol Biol.* 2019; 2048: 27-39. 査読無.

DOI: 10.1007/978-1-4939-9728-2_3

2. 越智俊元. 主な診断法・治療法 8. 細胞免疫療法. 血液疾患 最新の治療 2020-2022. 2019; 349-352. 査読無.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: CAR ライブラリおよび scFv の製造方法
発明者: 越智俊元、安川正貴、竹中克斗、藤原弘
権利者: 国立大学法人愛媛大学
種類: 特許
番号: 特願 2020-531552/W02020162452
出願年月日: 2020/02/04
国内外の別: 国内・国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 俊元 (Ochi, Toshiki)
愛媛大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 10571086

(2) 研究分担者

()

••

研究者番号:

()

••

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()