

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14631

研究課題名(和文)細胞内抗原を認識可能とする抗体によるキメラ抗原受容体T細胞療法の開発

研究課題名(英文)Development of CAR that can recognize pMHC molecule derived from endogenous antigen of tumor cells

研究代表者

赤堀 泰 (Akahori, Yasushi)

三重大学・医学系研究科・特任講師(研究担当)

研究者番号：80221711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor, CAR)で使用できる、がん特異的なペプチドMHC複合体(peptide MHC complex, pMHC)認識抗体を効率的に単離する方法の確立について検討し、それを達成した。単離抗体使用CARの安全性検討である。認識特異性を検討する目的で、ターゲットペプチドのアラニン置換とそれに続くアミノ酸置換による検討の結果、2Y, 2W, 3N, 3S, 4F, 5Hが置換可能であることがわかった。これを基にblast検討を行い、得られた42個のペプチドについて検討し、2個のペプチドが認識されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I selected WT1 as my target. Next, I isolated TCR-like antibody clones by combining magnet beads screening, peptide pulsed T2A24 cell screening and plate screening strategy and isolated twelve type of antibodies. After testing recognition specificity and affinity, I chose #213 as candidate clone for chimeric antigen receptor (CAR) therapy. Next, I investigated whether it is safe for cancer therapy. In the first, I checked critical amino acids for #213 CAR recognition by alanine substitution. Among nine amino acids of WT1p235-243, 2M, 3T, 4W, 5N were shown to be critical for #213 CAR recognition. Next, I further tested amino acid substitution by similar ones. 2W, 3N, 3S, 4F and 5H were shown to be recognized by #213 CAR. After blast search, I chose 42 off-target candidate peptides. In them, two peptides, that were expressed in normal tissues, were shown to be recognized by #213 CAR.

研究分野：免疫学及び分子生物学

キーワード：CAR TCR-like antibody pMHC complex antibody library screen

1. 研究開始当初の背景

がんに対する有効な治療法を開発することはたいへん重要である。そのなかで、免疫治療の方法は、その侵襲性の低さと有効性から注目されている。そのなかでも、CAR 治療法は、CD19CAR による顕著な治療効果が報告されており、注目されている。しかしながら、がん特異的な細胞表面抗原は少なく、治療法の開発が待たれている。研究代表者は、細胞内がん抗原に由来するペプチド MHC 複合体を認識する TCR の認識機構に着目し、WT1pMHC を認識する CAR 治療法を開発することを考えた。しかしながら、研究開始当初、pMHC を認識できる抗体をスクリーニングにて単離する有効な方法はまだ確立できていなかった。CAR の構築についても手探り状態であったので、研究代表者は、これらを確立しつつ、CAR 治療のシステムを構築していった。一方、TCR 導入 CTL 治療の実験システムについては研究が進んでおり、研究代表者はそれらを活用してアッセイのシステムを構築することができた。安全性の確認に関しては、アラニン置換ペプチドによる解析が知られていたが、それ以上の検討は困難だった。

2. 研究の目的

研究代表者は、本研究の目的を、pMHC を認識する抗体を効率的に選別するシステムを開発すること、および 選択した抗体より構築した CAR の安全性を検討すること、とした。

3. 研究の方法

人工抗体ライブラリを用いた WT1 pMHC スクリーンを実施した。従来は magnet beads を使用したスクリーンと plate のスクリーンを組み合わせたものであったが、今回、T2A24 細胞にペプチドパルスを行い、これを使用したスクリーンを実施した。得られた #213scFv を PCR 増幅し、zG 型の細胞内シグナルドメインを有する CAR に組み込みを行った。これをレトロウィルスベクターに変換し、ヒト PBMC への遺伝子導入を行った。それを用いて細胞傷害性試験を行い、マウス担癌モデルでのがん抑制効果を検討した。

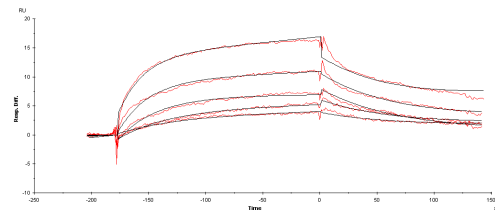
安全性試験に関しては、WT1p235-243 からなる 9 アミノ酸ペプチドについて、アラニン置換した変異ペプチドを設計し、これを T2A24 細胞にパルスして、CAR による認識を検討した。

4. 研究成果

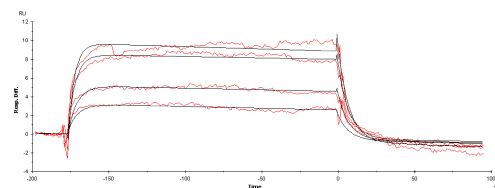
研究代表者は、人工抗体ライブラリ AIMS を使用して、人工的に作製した A24WT1 pMHC に対するスクリーンを行い、12 種類の抗体クローンを得た。これらに関して、各種 pMHC に対する認識を ELISA にて検討し、特異性の検討を行った。また、BIAcore 検討を行い、affinity を検討した。その結果、#213 が選択された。これは、調べた限りでは認識特異

性が高く、WT1pMHC に対する affinity は 741nM であった。

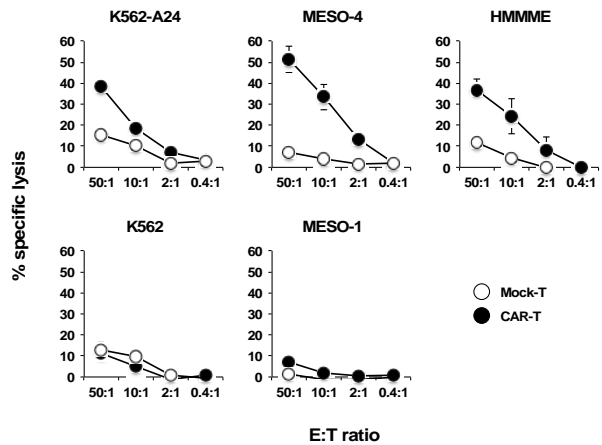
WT1 <sub>236Y</sub>	ka	kd	Rmax	KD	chi2
	3.86e5	0.0143	14.5	3.70e-8	0.101



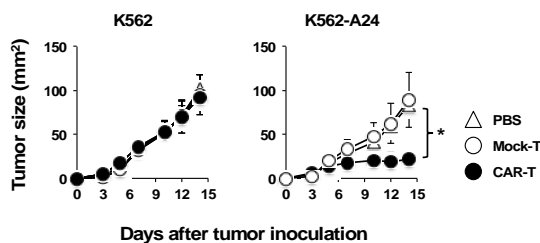
WT1 <sub>235-243</sub>	ka	kd	Rmax	KD	chi2
	1.85e5	0.137	25.9	7.41e-7	0.17



次に、これを使用したキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor, CAR) の構築を行い、それをレトロウィルスによって遺伝子導入した末梢血 T リンパ球を作製した。これを使用して各種のがん細胞株に対する細胞傷害性試験を行ったところ、HLA-A24 陽性かつ WT1 陽性の細胞を認識して傷害することが確認できた。

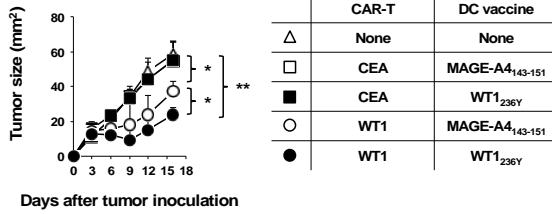


さらに、K562A24, MESO-4 を使用した担癌モデルにおいて、がん増殖を抑制することが確認された。

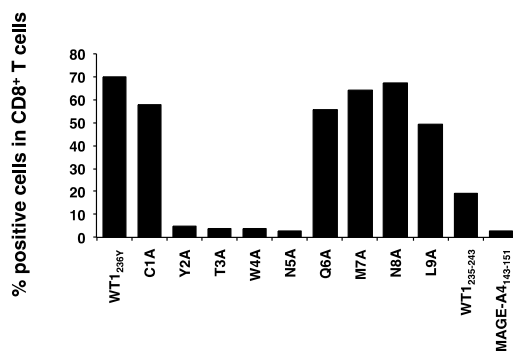


この作用はペプチドパルスした樹状細胞の同時投与によって促進することが確認さ

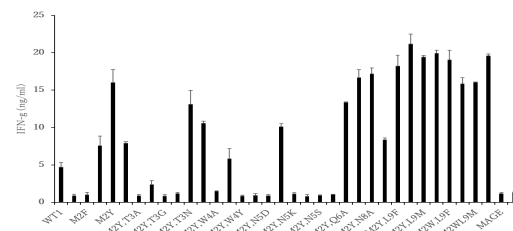
れ、ワクチン作用が確認できた。



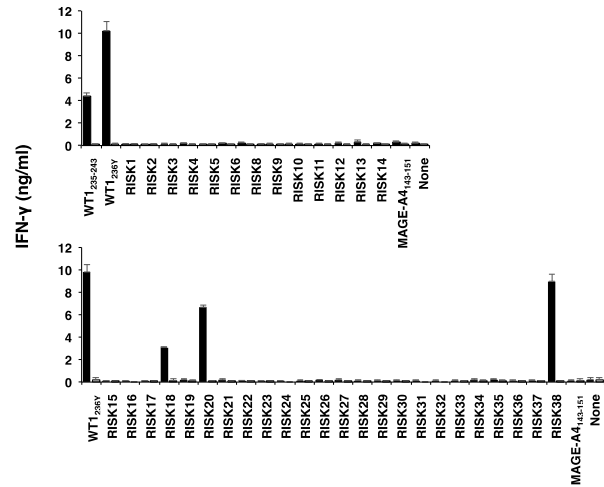
次に、安全性に関する検討を行った。WT1p235-243 についてのアラニン置換ペプチドを設計し、これを T2A24 細胞にパルスして、CAR T 細胞に対する認識を検討した結果、2M, 3T, 4W, 5N が認識に関与することが確認された。



それで、xMTWNxxxx, 及び xYTNxxxx をコンセンサス配列として blast 検索した結果、14 種類のペプチドが見つかったので、それらについての認識検討を行ったのであるが、いずれも認識されなかった。それで、さらに、これら 4 か所のアミノ酸を性質の似たもので置換して認識検討を行い、2W, 3N, 3S, 4F, 5H が許容されることを確認した。



この情報を基に再度の blast 検討を行い、24 個の off-target 候補ペプチドを得た。これらについて CAR T 認識を検討した結果、3 個のペプチドが認識されることがわかった。これらのうち 1 個は偽遺伝子で発現しないが、2 個のペプチドは正常組織において発現の見られる遺伝子である。これらの遺伝子産物が、本当に pMHC として細胞表面に発現され、#213CAR によって認識されるのか、という問題が次の課題となる。



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 0 件)

[学会発表](計 1 件)  
2018 年がん免疫学会総会  
赤堀泰

Anti-tumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination  
2018 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

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

赤堀 泰 (AKAHORI, Yasushi)

三重大学・医学系研究科・特任講師 (研究担当)

研究者番号 : 80221711

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :

(4)研究協力者

( )