

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08331

研究課題名(和文) 新たな抗体改変技術を利用したがんに対する革新的免疫療法の開発研究

研究課題名(英文) Development of Next-Generation Immunotherapy using Antitumor Antibodies armed with Bridging-BiTE against Refractory Tumors

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、抗体製剤を武装化するため新たな二重特異性抗体(B-BiTE: Bridging-Bispecific T-cell Engager)を作製した。実臨床で用いられている抗体医薬品にB-BiTEを結合させることで、抗体に備わるNK細胞活性に加えて、腫瘍細胞に対してT細胞活性を併せて誘導することに成功した。その結果、抗体/B-BiTE複合体は、抗体単剤よりも強い抗腫瘍効果を誘導した。B-BiTEは様々な抗体医薬品に結合させることができるため、効率的に幅広く新型二重特異性抗体を作製することが可能となる。従って、難治性がんに対する抗体免疫療法の治療効果の向上に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫療法は、難治性がんに対する新たな治療法として注目されているが、高額な費用が必要となることなど、多くのがん患者に還元するにはまだ多くの問題を抱えている。我々が確立した新規技術-B-BiTE-を用いれば、これまで開発された、またこれから開発される抗体医薬品にあらかじめB-BiTEを結合させるだけで、新たな二重特異性抗体を迅速かつ容易に作製することが可能となる。本技術によって、コストを抑えつつ、がん免疫療法の治療効果を幅広く増強することが期待できるため、免疫療法医薬品開発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)：In this study, we have developed a new modality, named as B-BiTE (Bridging-Bispecific T-cell Engager) by using gene-engineering technology. B-BiTE possesses two single chain fragment variables (scFvs) which are specific for human IgG-Fc and human CD3, respectively. B-BiTE can bind to an antitumor antibody, thereby generating a new bispecific antibody. A mAb/B-BiTE complex can activate human T cells while preserving human NK-cell reactivity which is mediated by a mAb itself. Therefore, a mAb/B-BiTE complex can induce enhanced in vivo antitumor effects as compared to those mediated by a mAb alone. B-BiTE can allow us to develop a panel of new bispecific antibodies from a series of clinically available mAbs, resulting in further advancement of next-generation antibody-based cancer immunotherapy.

研究分野：血液学・腫瘍免疫学

キーワード：がん免疫療法 二重特異性抗体

1. 研究開始当初の背景

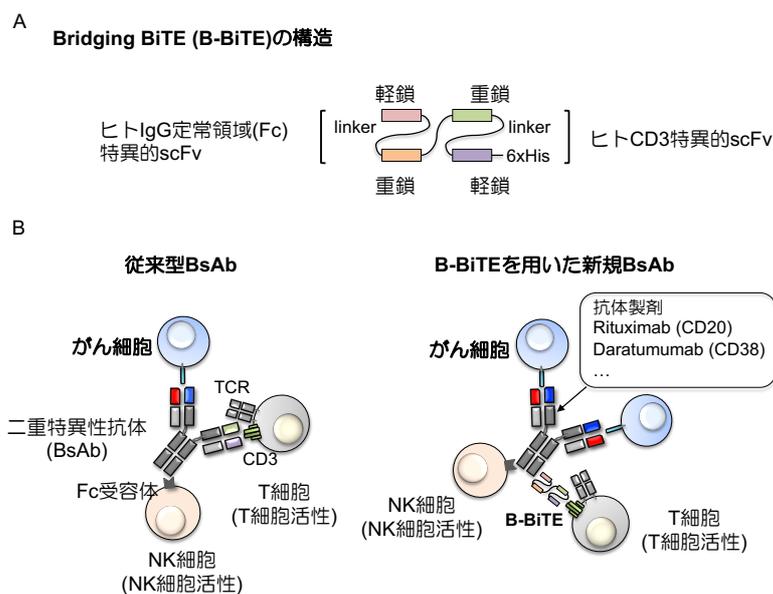
これまでにがんに対する様々な抗体医薬品が開発されてきた。抗体療法は、その治療効果が主にNK細胞による抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) によることが知られている。従って、従来型の抗体製剤では体内免疫の中心的な役割を担う T 細胞を活性化して、がん治療に応用することは困難であった。そこで、治療効果の向上を目指して、T 細胞を活性化できるように抗体を遺伝子改変して、がん治療に応用する新たな免疫療法が開発されるようになった。免疫チェックポイント阻害剤や、キメラ抗原受容体 (CAR: Chimeric Antigen Receptor) などはその代表例であるが、免疫関連有害事象の発症や、細胞製剤の作製に高額な費用が必要となることなど、解決すべき新たな問題も浮き彫りにされた。

そこで、新しい遺伝子改変抗体として二重特異性抗体 (BsAb: Bispecific Antibody) が盛んに開発されてきている。抗体製剤は可変領域からなる二つの抗原認識部位を備えており、一般的にどちらも同一抗原を認識して結合する。BsAb は、それぞれの抗原認識部位が異なる抗原に結合する工夫を施した改変抗体である。片方の抗原認識部位はがん細胞に発現されている抗原に結合し、もう片方の抗原認識部位が CD3 分子に結合すれば、患者体内において T 細胞とがん細胞とを架橋して、T 細胞をがん特異的に活性化することが可能となる。さらに、NK 細胞活性の誘導には抗体の定常領域が重要な役割を担うが、抗体の基本骨格を保持する BsAb を用いれば、NK 細胞による抗腫瘍効果も期待できる。従って、がんに対する T 細胞療法と NK 細胞療法、両者の利点を効率よく活用できるだけでなく、BsAb には、これまでの抗体療法/T 細胞療法に纏わる課題を解決できる可能性がある。しかし、BsAb は分子学的に複雑な構造をとる場合が多く、その合成は一般的には容易ではない。効率よく BsAb を作製する新たな技術を開発すれば、次世代型がん免疫療法の推進に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、CD3 に対する抗体とヒト免疫グロブリン IgG サブクラス (IgG1-G4) を選ばず定常領域 (Fc) を特異的に認識する抗体の可変領域をもとにそれぞれ一本鎖抗体 (scFv: single chain fragment variable) を作製する。そして2つの scFv をリンカー配列で連結して架橋型一本鎖二重抗体 (B-BiTE: Bridging Bispecific T-cell Engager) とする。これまでがん治療に用いられてきた既存の抗体製剤に結合させることで、抗体/B-BiTE 複合体を作製して、抗体製剤に BsAb の機能を賦与する。効率的かつ簡便に BsAb を作製しがん治療に応用することが本研究の目的である (図 1)。

図1. Bridging BiTEを利用した新規遺伝子改変抗体



3. 研究の方法

(1) B-BiTE の作製

CD3 に結合する scFv と、IgG-Fc に結合する scFv とをリンカー配列で連結して、B-BiTE を作製した。B-BiTE 遺伝子を 293 細胞株に導入して、B-BiTE を安定して産生する 293 細胞株をクローニングした。B-BiTE は 6xhis で標識されており、タンパク産生後、Ni カラムで純化して使用した。

(2) 抗体/B-BiTE 複合体の作製と T 細胞/NK 細胞機能解析

抗ヒト CD19 抗体、また、実臨床で用いられている抗ヒト CD20 抗体 Rituximab、抗ヒト CD38 抗体 Daratumumab をモデルとして用いた。各抗体に B-BiTE を結合させて、抗体/B-BiTE 複合体を作製した。

まず、抗体/B-BiTE 複合体が標的細胞に特異的に結合することを確認した。検出には、PE 標識抗 6xhis 抗体を用いた。次に、ヒト末梢血単核球から、Pan T-cell isolation kit を用いて T 細胞を単離した。抗体/B-BiTE 複合体存在下において、ヒト末梢血 T 細胞の標的細胞株に対する

各サイトカイン (IL-2、IFN- γ 、TNF- α) 産生と T 細胞増殖性を検討した (細胞内サイトカイン染色法/CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester 染色法)。

つづいて、CD19 microbeads を用いて B 細胞を除去した、ヒト T 細胞/NK 細胞を含む末梢血単核球を用意した。抗体/B-BiTE 複合体存在下において、T 細胞/NK 細胞の標的細胞株に対するサイトカイン産生を検討した。

(3) 抗体/B-BiTE 複合体による *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

Raji 細胞株に luciferase 遺伝子を導入した Raji/SLR 細胞株を樹立した。これを免疫不全マウスである NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) マウス (NOG) マウスに移植した後、*in vivo* 発光イメージング法を用いて生着を確認した。T 細胞、NK 細胞は IL2 (100 U/mL) と抗 CD3 抗体 (OKT3) とを用いて刺激増殖し実験に用いた。CD20 を標的モデルとして、活性化 T 細胞/NK 細胞とともに Rituximab 単剤、もしくは Rituximab/B-BiTE 複合体を Raji/SLR 移植 NOG マウスに輸注して、それぞれの抗腫瘍効果について比較検討した。

4. 研究成果

(1) CD19 抗体/B-BiTE 複合体の作製と T 細胞機能解析

ヒト IgG Fc を保持する抗ヒト CD19 キメラ抗体と、isotype 抗体とを用意した。B-BiTE を結合させて、isotype/B-BiTE 複合体と、CD19 抗体/B-BiTE 複合体とを作製した。

各細胞株を染色すると、CD19 抗体/B-BiTE 複合体は、CD19 陽性細胞に特異的に結合した。さらに、isotype/B-BiTE 複合体、CD19 抗体/B-BiTE 複合体ともに、CD3 陽性である Jurkat 細胞株には結合するが、CD3 陰性である Jurkat 76 細胞株には結合しないことが明らかとなった (図 2A)。

次に、ヒト末梢血未刺激 T 細胞を単離して、抗体/B-BiTE 複合体存在下において、CD19 陽性である Raji 細胞株と共培養を行った。その結果、CD19 抗体/B-BiTE 複合体によって、T 細胞が Raji 細胞株を認識して、各サイトカインを産生することが明らかとなった (図 2B)。

図2. CD19抗体/B-BiTE複合体

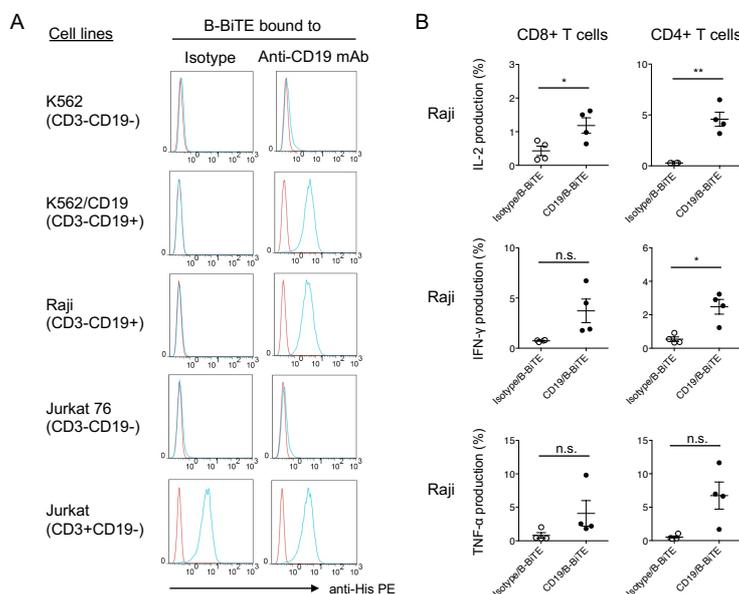


図 2. CD19 抗体/B-BiTE 複合体による未刺激 T 細胞の活性化

K562 (CD3-CD19-)、K562/CD19 (CD3-CD19+)、Raji (CD3-CD19+)、Jurkat 76 (CD3-CD19-)、Jurkat (CD3+CD19+) 細胞株を用意した。Isotype/B-BiTE、CD19 抗体/B-BiTE 複合体を標的細胞に添加した後、PE 標識抗 6xhis 抗体を用いて結合性を評価した (抗体 : 30 ug/mL、B-BiTE : 10 ug/mL) (A)。各抗体/B-BiTE 複合体を用いて、Raji 細胞株、ヒト末梢血未刺激 T 細胞とを共培養し、各サイトカイン産生を評価した (抗体 : 7.5 ug/mL、B-BiTE : 2.5 ug/mL) (B)。*p < 0.05; **p < 0.01; n.s., not significant.

(2) 実臨床で用いられる抗体を用いた抗体/B-BiTE 複合体の作製と T 細胞機能解析

抗ヒト CD20 抗体 (Rituximab: Rit)、抗ヒト CD38 抗体 (Daratumumab: Dar) に、B-BiTE を結合させて、Rit/B-BiTE 複合体と、Dar/B-BiTE 複合体とを作製した。

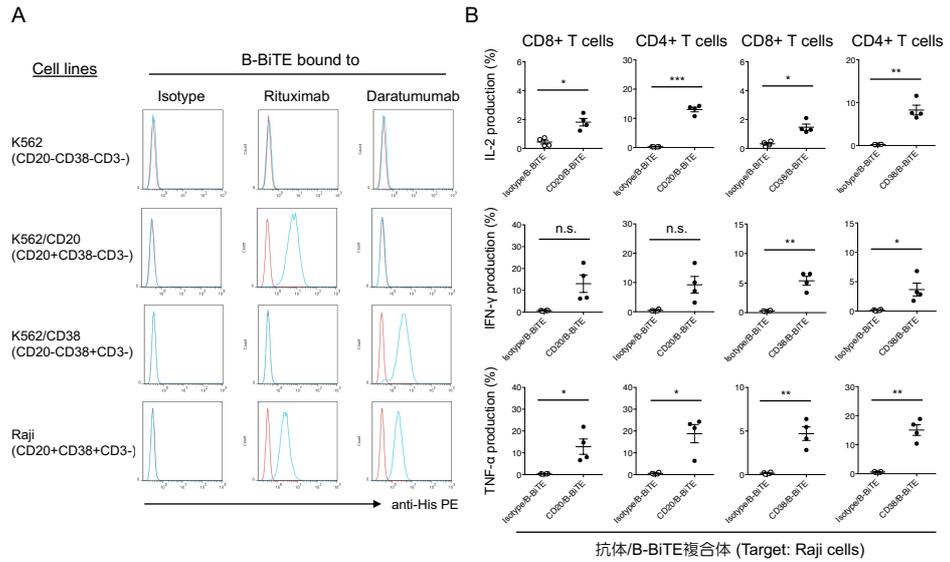
各細胞株を染色すると、Rit/B-BiTE 複合体は CD20 陽性細胞に、Dar/B-BiTE 複合体は CD38 陽性細胞にそれぞれ特異的に結合した (図 3A)。

また、ヒト末梢血未刺激 T 細胞を単離し、(1) の検討と同様にして、Raji 細胞と共培養を行った。その結果、Rit/B-BiTE 複合体、Dar/B-BiTE 複合体によって、T 細胞が Raji 細胞株を認識して、各サイトカインを産生することが明らかとなった (図 3B)。

図 3. Rit/B-BiTE 複合体、Dar/B-BiTE 複合体による未刺激 T 細胞の活性化

K562 (CD3-
CD20-CD38-),
K562/CD20
(CD3-
CD20+CD38-),
K562/CD38
(CD3-CD20-
CD38+), Raji
(CD3-
CD20+CD38+)
細胞株を用意
した。
Isotype/B-
BiTE、Rit/B-
BiTE、Dar/B-
BiTE 複合体を
標的細胞に添
加した後、PE
標識抗 6xhis
抗体を用いて
結合性を評価した (抗体 : 30 ug/mL、B-BiTE : 10 ug/mL) (A)。各抗体/B-BiTE 複合体を用いて、
Raji 細胞株、ヒト末梢血未刺激 T 細胞とを共培養し、各サイトカイン産生を評価した (抗体 :
7.5 ug/mL、B-BiTE : 2.5 ug/mL) (B)。*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; n.s., not
significant.

図 3. Rit/B-BiTE, Dar/B-BiTE 複合体

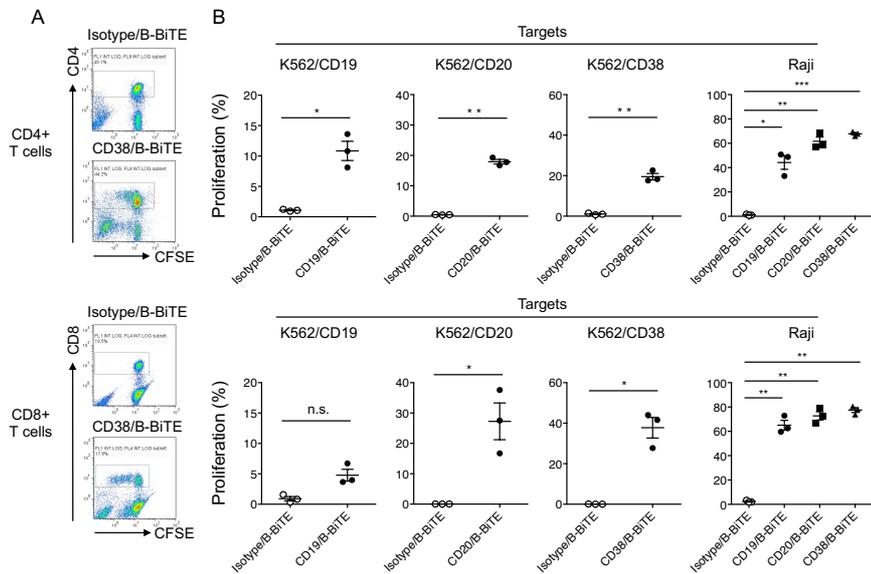


次に、T 細胞を CFSE で染色し、抗体/B-BiTE 複合体存在下において、各細胞株とともに共培養
を行った。その結果、各腫瘍細胞に対して、標的的特異的に T 細胞が分裂し増殖することが明らか
となった (図 4)。

図 4. 抗体/B-BiTE 複合体による未刺激 T 細胞分裂能

末梢血未刺激 T 細胞を CFSE で染色し、
各抗体/B-BiTE 存在
下に、K562/CD19、
K562/CD20、
K562/CD38、Raji 細胞
株と共培養した
(抗体 : 30 ug/mL、B-
BiTE : 10
ug/mL) (A)。
Isotype/B-BiTE 存在
下での control
MFI と、CD19 抗体/B-
BiTE、Rit/B-BiTE、
Dar/B-BiTE 存在下
での experimental
MFI を測定し、分裂
度 (%) = (control
MFI - experimental
MFI) / control MFI
によって算出した (B)。*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; n.s., not significant.

図 4. 抗体/B-BiTE 複合体により誘導される T 細胞分裂能



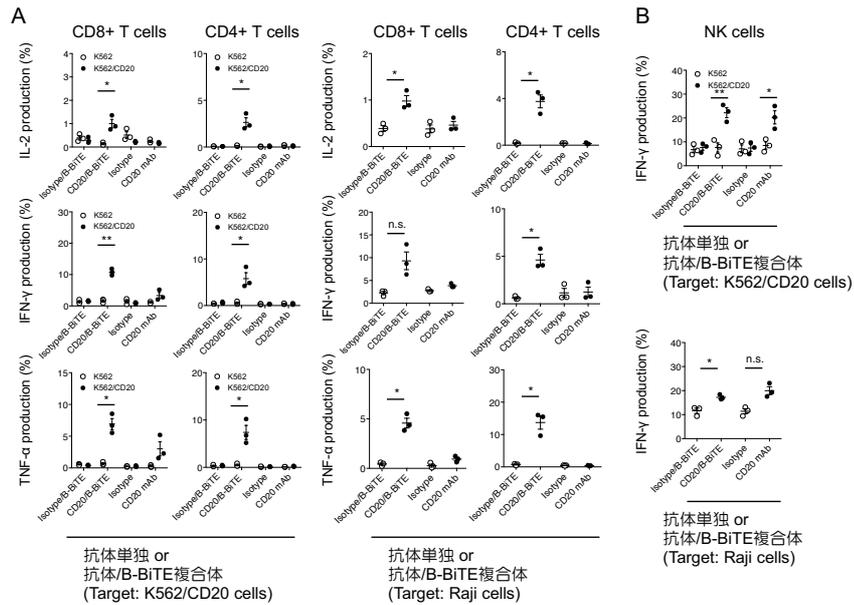
(3) 抗体/B-BiTE 複合体により誘導される T 細胞・NK 細胞活性の解析

次に、抗体/B-BiTE 複合体存在下において、T 細胞・NK 細胞が腫瘍細胞に対してともに活性化
されることを検討した。末梢血単核球から B 細胞を除去し、T 細胞/NK 細胞を含むエフェクター
細胞集団を用意した。CD20 をモデル標的としたとき、Rit/B-BiTE 複合体によって、T 細胞、NK
細胞がともに活性化し、サイトカインを産生することが明らかとなった (図 5)。

図 5. Rit/B-BiTE 複合体による未刺激 T 細胞・NK 細胞の活性化

末梢血単核球より T 細胞/NK 細胞を含むエフェクター細胞集団を用意した。抗体単剤、抗体/B-BiTE 複合体存在下において、エフェクター細胞と、K562/CD20、Raji 細胞株とを共培養し、T 細胞 (A)、NK 細胞 (B) における各サイトカイン産生を評価した (抗体 : 7.5 ug/mL、B-BiTE : 2.5 ug/mL)。*p < 0.05; **p < 0.01; n.s., not significant.

図 5. 抗体/B-BiTE 複合体により誘導される T 細胞/NK 細胞の活性化



(4) 抗体/B-BiTE 複合体により誘導される *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

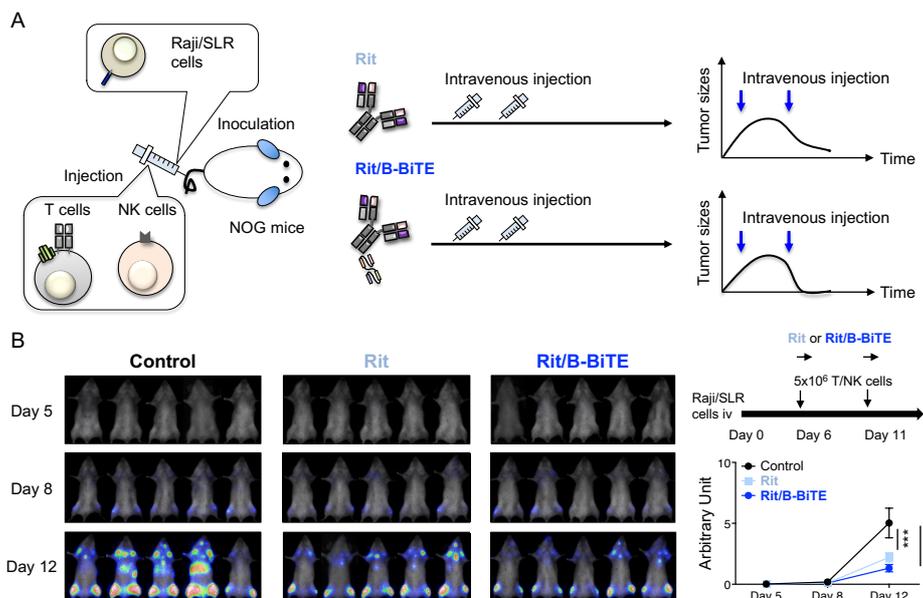
樹立した Raji/SLR 細胞株を、NOG マウスに経静脈的に投与した。CD20 をモデル標的とした検討を行った。腫瘍移植後 Day 5 に生着を確認した後、Day 6 と Day 11 に活性化 T 細胞・NK 細胞を経静脈的に投与し、Rit 単剤、もしくは Rit/B-BiTE 複合体を同様に経静脈的に投与した。発光イメージング法で抗腫瘍効果を経時的に検討したところ、Rit 単剤と比較して、Rit/B-BiTE 複合体によって抗腫瘍効果が増強されることが明らかとなった (図 6)。

図 6. Rit/B-BiTE 複合体による *in vivo* 抗腫瘍効果

治療概念図 (A)。5.0x10⁵ 個の Raji/SLR 細胞株を NOG マウスに経静脈的に移植した (Day 0)。

Day 6 と Day 11 に 5.0x10⁶ 個の活性化 T 細胞/NK 細胞と、30 ug の Rit、40 ug の Rit/B-BiTE (Rit 30 ug/B-BiTE/10 ug) 複合体とを経静脈的に投与した。Luciferin を投与して、発光イメージング法を用いて腫瘍量を定量的に評価した (B)。***p < 0.001; ****p < 0.0001.

図 6. 抗体/B-BiTE 複合体により誘導される *in vivo* 抗腫瘍効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maruta M, Ochi T, Tanimoto K, Asai H, Saitou T, Fujiwara H, Imamura T, Takenaka K, Yasukawa, M	4. 巻 9
2. 論文標題 Direct comparison of target-reactivity and cross-reactivity induced by CAR- and BiTE-redirceted T cells for the development of antibody-based T-cell therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49834-2	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 Ochi T	4. 巻 60
2. 論文標題 Development of innovative T-cell immunotherapy for hematological malignancies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 824-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.60.824	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Konishi T, Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Saitou T, Imamura T, Yasukawa M, Takenaka K.
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF NEXT-GENERATION ANTITUMOR ANTIBODIES ARMED WITH BRIDGING-BITE TO ADVANCE ANTI-MYELOMA IMMUNOTHERAPY
3. 学会等名 European Hematology Association（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Konishi T, Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Saitou T, Imamura T, Yasukawa M, Takenaka K.
2. 発表標題 Development of innovative antitumor antibodies armed with Bridging-BiTE to advance anti-myeloma immunotherapy
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Konishi T, Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Saitou T, Imamura T, Yasukawa M, Takenaka K.
2. 発表標題 Development of novel bispecific antibodies armed with Bridging-BiTE for targeting a variety of tumors
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西 達矢, 越智 俊元, 丸田 雅樹, 谷本 一史, 齋藤 卓, 今村 健志, 安川 正貴, 竹中 克斗
2. 発表標題 難治性骨髄腫に対する新規治療を目指した次世代型遺伝子改変二重特異性抗体の開発
3. 学会等名 第13回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智俊元
2. 発表標題 免疫療法の未来を拓く次世代型抗体の開発とその応用
3. 学会等名 日本骨髄腫学会 第1回骨髄腫セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Ochi
2. 発表標題 Generation of optimal antitumor receptors for T-cell therapy in hematological malignancies. Symposium 7, -Rising star in JSH-
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越智俊元, 丸田雅樹, 谷本一史, 朝井洋晶, 斉藤卓, 今村健志, 竹中克斗, 安川正貴
2. 発表標題 臨床ニーズに即したがん免疫療法を目指す新規改変抗体の開発研究
3. 学会等名 第6回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越智俊元
2. 発表標題 改変抗体を応用したがんに対する新規免疫療法の開発研究
3. 学会等名 第2回先進医薬研究報告会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Ochi T, Maruta M, Hirano N.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 267
3. 書名 Methods in Molecular Biology.	

1. 著者名 越智俊元, 安川正貴	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 267
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 越智俊元	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 384
3. 書名 血液疾患 最新の治療2020-2022	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 複合体化 タンパク質、抗体複合体、医薬組成物、および核酸	発明者 越智俊元, 安川正貴, 竹中克斗	権利者 国立大学法人愛媛大学
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2020/166714	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

最先端研究紹介 infinity 免疫の力で白血病を治そう! https://www.ehime-u.ac.jp/data_study/data_study-100509/

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