

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19477

研究課題名(和文)がん特異的タンパク立体構造を標的としたCAR-T細胞療法の開発

研究課題名(英文)Development of CAR-T cell therapy targeting cancer-specific protein conformations

研究代表者

保仙 直毅(Hosen, Naoki)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10456923

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):乳がんにおいて高発現しており、構造変化を起こすことがわかっている細胞膜蛋白質であるインテグリン α 6 を標的とした。まず、インテグリン α 6 ノックアウトマウスをBalb/cバックグラウンドで作製した。ヒトインテグリン α 6 を強制発現させたマウス由来細胞を抗原としてインテグリン α 6 ノックアウトマウスを免疫し、モノクローナル抗体を多数作製した。それらの中から、ヒト、マウス両方のインテグリン α 6 に結合する抗体を7クローン同定した。単離した7つの抗体を元にCAR T細胞を作製した。それらは、in vivoにおいてマウス正常組織を傷害しなかったが、有意な抗腫瘍効果を示すものも得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からインテグリン α 6 のような正常組織にも発現している蛋白質を標的としてCAR T細胞を作製しても必ずしも正常組織を傷害しないことは明らかである。一方で、抗腫瘍効果も得られていなかった。我々はこの結果から考えて、臨床応用可能なCAR T細胞を開発するためには、やはり、特に標的蛋白質を絞らないで地道にがん特異性の高い抗体/抗原を探索するしかないと思ひ直し、様々ながんに対するモノクローナル抗体ライブラリーの作製とそこからのがん特異的抗体の単離を進めており、良いものが取れば、それに焦点を当てて、次のステップへと進むことにしている。

研究成果の概要(英文):We targeted integrin α 6, a cell membrane protein that is highly expressed in breast cancer and known to undergo structural changes. First, integrin α 6 knockout mice were generated in Balb/c background. A large number of monoclonal antibodies were prepared by immunizing integrin α 6 knockout mice with the mouse-derived cells forcibly expressing human integrin α 6 as an antigen. From among them, 7 clones of antibodies that bind to both human and mouse integrin α 6 were identified. CAR T cells derived from the seven isolated antibodies. They did not damage normal mouse tissues in vivo, but none of them showed significant antitumor effect.

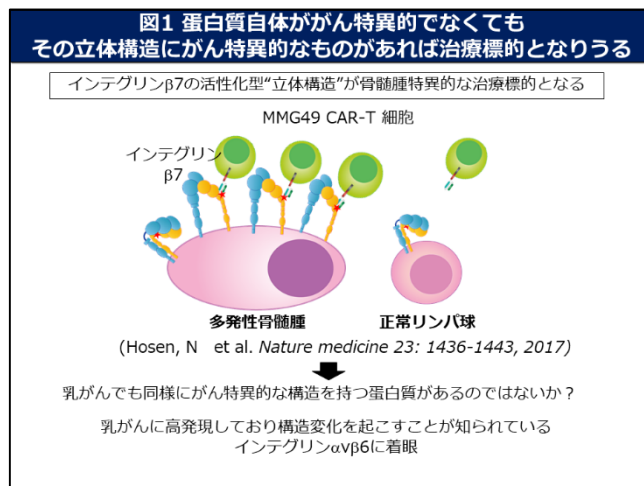
研究分野:血液内科学

キーワード:CAR T細胞療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん特異的抗体を元に作製されるキメラ抗原受容体(CAR)T細胞は、Bリンパ性悪性腫瘍に対するその驚くべき効果により、世界中の注目を集めるようになった新しい免疫療法である。がんの特異的に結合する抗体の抗原認識部位とCD28およびCD3 ζ というT細胞受容体のシグナルを伝える分子の融合体であるCARを患者のT細胞に発現させることにより作製されたCAR-T細胞は、特異的かつ強い細胞傷害活性を発揮するだけでなく、体内で増殖するため、非常に強い抗腫瘍活性を示す。我々は一貫して血液がん(幹)細胞に特異的に発現する細胞表面抗原を同定し、さらにそれを標的とした抗体医薬あるいはCAR-T細胞を開発するということを目標に研究を進めてきた。その成果として、最近、多発性骨髄腫において活性化型構造のインテグリン $\beta 7$ が恒常的に高発現していることを明らかにし、さらに、それを標的としたCAR-T細胞が強い抗骨髄腫活性を有することを見出した(Hosen N et al. *Nature Medicine*, 23:1436-43, 2017)。この結果は、蛋白質自体ががん特異的でなくても、その立体構造にがん特異性の高いものがあれば、それががん特異的な治療標的となりうるという重要な知見を示している(図1)。



2. 研究の目的

固形がんへのCAR-T細胞の効果は未だ不十分であり、その最大の理由は適切ながん特異的抗原が未だに見つかっていないということにある。そこで本研究では、乳がんにおいて、“がん特異的蛋白質立体構造”を同定し、それを標的としたCAR-T細胞療法を開発することを目指している。まずは、その標的となる蛋白質として、乳がんにおいて高発現しており、細胞の状態によって構造変化を起こすことがわかっている細胞膜蛋白質であるインテグリン $\alpha\beta 6$ に焦点を当てて進めることにした。

2. 研究の目的

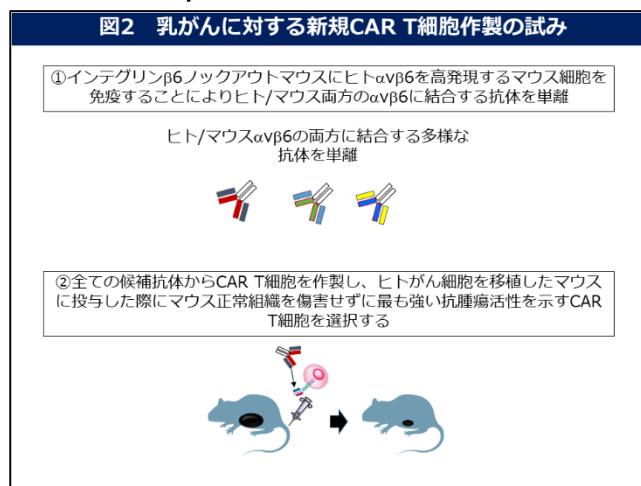
3. 研究の方法

目的1 ヒト、マウス $\alpha\beta 6$ の両方に結合する抗 $\alpha\beta 6$ 抗体の単離

まず、インテグリン $\beta 6$ ノックアウトマウスにヒト $\alpha\beta 6$ を高発現するマウス細胞を免疫することによりヒト/マウス両方の $\alpha\beta 6$ に結合する抗体を単離

ヒト/マウス $\alpha\beta 6$ の両方に結合する多様な抗体を単離

②全ての候補抗体からCAR-T細胞を作製し、ヒトがん細胞を移植したマウスに投与した際にマウス正常組織を傷害せずに最も強い抗腫瘍活性を示すCAR-T細胞を選択する



目的 2 候補抗体を用いた CAR T 細胞療法の作製と評価

目的 1 にて単離した 7 つの抗体から可変部領域配列をクローニングし、それらを元に CAR T 細胞を作製した。次に、それらすべてに関して、*in vitro* での抗原特異的サイトカイン産生および細胞傷害活性を検討し、さらに、*in vivo* においてマウス正常組織を傷害しないかを免疫不全マウスに投与することによって検討した (図 2)。

4. 研究成果

目的 1 ヒト、マウス $\alpha v\beta 6$ の両方に結合する抗 $\alpha v\beta 6$ 抗体の単離
ヒト、マウス両方のインテグリン $\alpha v\beta 6$ に結合する抗体を 7 クローン同定した。

目的 2 候補抗体を用いた CAR T 細胞療法の作製と評価

7 つの抗 $\alpha v\beta 6$ 抗体から作製した CAR-T 細胞はいずれも *in vitro* において強い細胞傷害活性を示した。そこで、*in vivo* での効果を検証した。その結果、2-145 と命名した CAR T 細胞は、3 か月にわたって免疫不全マウスの体内に存在し続けていたが、マウスは健康で、明らかな臓器障害はなかった (図 3)。そこで、次にヒトがん細胞株を腹腔内に移植しておいた免疫不全マウスに 2-145CAR T 細胞を投与したが、有意な抗腫瘍効果は見られなかった (図 4)。

本研究の結果からインテグリン $\alpha v\beta 6$ のような正常組織にも発現している蛋白質を標的として CAR T 細胞を作製しても必ずしも正常組織を傷害しないことは明らかである。一方で、抗腫瘍効果も得られていないので、今後、*in vitro* ではきちんとがん細胞を傷害できる CAR T 細胞がどうして *in vivo* では全く抗腫瘍効果を示さないのかということ明らかにすることを目指している。一方で、本研究の戦略は $\alpha v\beta 6$ にがん特異的なエピトープが存在するという大胆な仮説に基づいているが、当然そのようなものが存在しない可能性は十分あり、その場合には臨床応用可能な CAR T 細胞を作ることが不可能である。そこで、我々は現在では、臨床応用可能な CAR T 細胞を開発するためには、やはり、特に標的蛋白質を絞らないで地道にがん特異性の高い抗体/抗原を探索するしかないと思直し、様々ながんに対するモノクローナル抗体ライブラリーの作製とそこからのがん特異的抗体の単離を進めており、良いものが取れば、それに焦点を当てて、次のステップへと進むことにしている。

図3 2-145 CAR-T細胞のみを投与してもマウス正常組織の傷害は起こらない

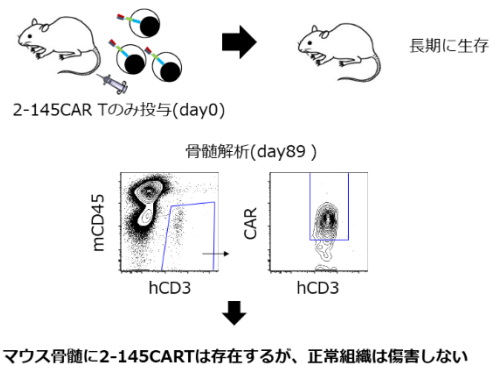
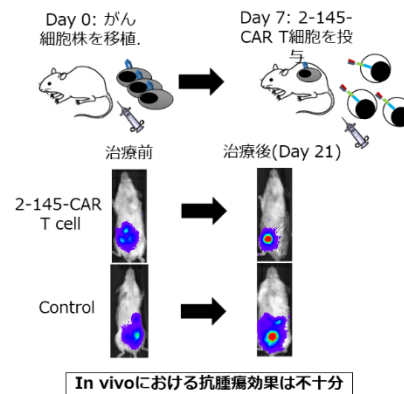


図4 2-145CAR-T細胞のin vivoでの抗腫瘍効果



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 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 保仙 直毅 |
| 2. 発表標題 Development of new CAR T cell therapies |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|