

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03710
研究課題名（和文）CAR T細胞の標的として同定した新規急性骨髄性白血病細胞特異的抗原の特性解析

研究課題名（英文）Characterization of novel acute myeloid leukemia-specific cell surface antigen identified as targets for CAR T cell therapy

研究代表者
保仙 直毅（Hosen, Naoki）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10456923
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：B細胞以外の健常人末梢血には結合せず、AML細胞に結合する抗体として32クローンを同定し、発現クローニング法、免疫沈降物のLC-MS/MS解析、あるいはCRISPR gRNAライブラリーを用いたランダムノックアウト法によりそれぞれの候補抗体が認識する抗原の同定を行った。その結果、32候補抗体のうち22抗体の抗原を同定した。そのうち抗体Xが認識する抗原Aの発現自体は正常血液細胞にも見られ白血病特異的でないが、抗体の結合が白血病特異的であった。そこで、それらに研究対象を絞り込み、抗体Xを元にCAR-T細胞を作製したところ、抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん細胞特異的モノクローナル抗体をできるだけ多く単離し、その後それらの抗体が認識する抗原の特性を丹念に解析することにより、網羅的なトランスクリプトーム解析では同定できないがん特異的細胞表面抗原を同定できるというコンセプトをAMLにおいても示すことができた。この結果は、新たなAMLに対するCAR-T細胞の臨床開発につながるだけでなく、他のがん種においても同様な試みがなされるべきであることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：We identified 32 clones as antibodies that bind to AML cells but do not bind to peripheral blood of healthy individuals other than B cells, using expression cloning methods or LC-MS/MS analysis of immunoprecipitates. The antigens recognized by some candidate antibodies were identified by the random knockout method using CRISPR gRNA libraries. As a result, we identified 22 antigens out of 32 candidate antibodies. Among them, antigen A recognized by antibody X was expressed in normal blood cells and was not leukemia-specific, but antibody binding was leukemia-specific. Therefore, we narrowed down our research targets to them and created CAR-T cells derived from Antibody X, which showed an antitumor effect.

研究分野：血液内科学

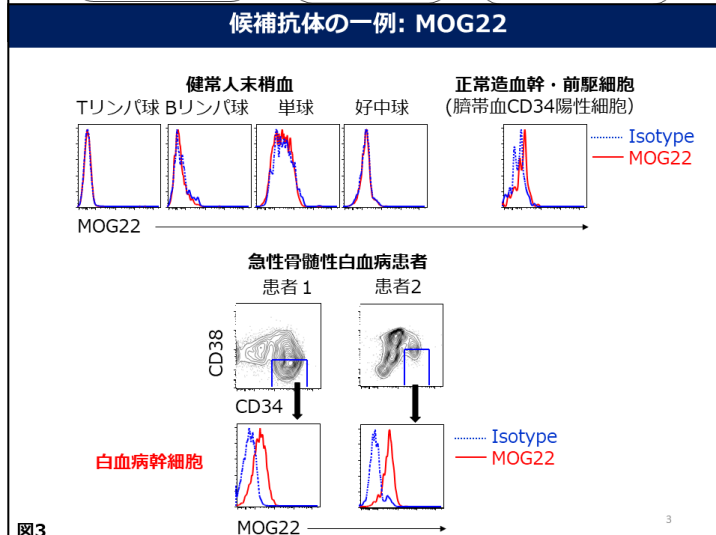
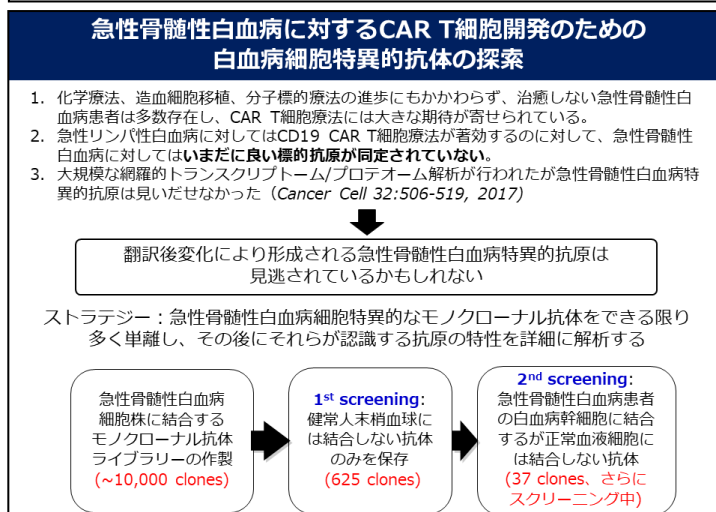
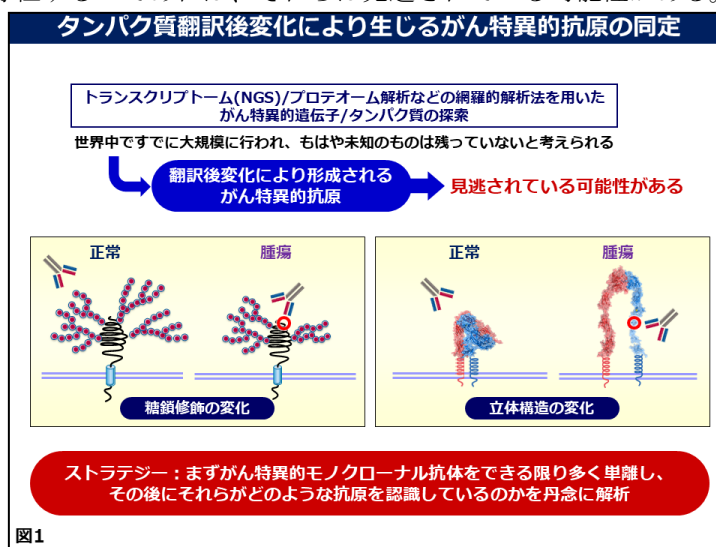
キーワード：CAR-T細胞

1. 研究開始当初の背景

B細胞性悪性腫瘍に対する CD19 CAR T細胞の効果は驚異的であるが、他の多くのがん種においては未だに CAR T細胞のための適切な標的抗原がない。トランスクリプトーム/プロテオーム解析などの網羅的解析によるがん特異的分子の探索はすでに世界中で大規模に行われており、もはや未知のものは残されていないと考えられる。しかし、タンパク質の立体構造の違いや糖鎖修飾の違いはそれらの網羅的解析法では検出できないため、そのような翻訳後の変化により形成されるがん特異的細胞表面抗原が存在するのであれば、それらは見逃されている可能性がある。

そこで、がん細胞特異的モノクローナル抗体をできるだけ多く単離し、その後それらの抗体が認識する抗原の特性を丹念に解析することにより、そのようなタンパク質翻訳後の変化により形成されるがん特異的細胞表面抗原を同定できるかもしれない(図1)。類似の試みは1980年代に多く行われたが、当時と比べ現在では抗体が認識する抗原の同定法が格段に進歩しており、今まで見逃されてきたがん特異的抗原が同定できる可能性は十分ある。我々はそのようなアイデアに基づいて、活性型インテグリンβ7を標的とした多発性骨髄腫に対するCAR T細胞療法の開発に成功し、すでにその成果を製薬企業へ導出した。

急性骨髄性白血病(AML)は頻度の高い血液がんの一つであるが、化学療法、造血幹細胞移植を行っても治癒しない症例は多く、新たな治療法の開発が急務である。急性リンパ性白血病におけるCD19 CAR T細胞療法の大成功を受けて、AMLに対してもCAR T細胞の開発が全世界的な競争となっている。CD33やCD123を標的としたCAR T細胞が開発されているが、これらの標的はいずれも正常造血前駆細胞にも発現しており、正



常造血細胞の傷害は避けられないため、より AML 細胞に特異的な抗原の同定が求められている。そこで、我々は、上述のストラテジーを AML に対しても応用し、AML 細胞特異的抗原の同定およびそれを標的とした CAR T 細胞療法の開発を目指した研究を R1 年度より開始した。まず、様々な AML 細胞株をマウスに免疫することにより、以前に作製したものも含め、およそ 10,000 クローンの抗 AML 細胞株モノクローナル抗体を既に作製した。次に、AML 細胞株の少なくとも一つには結合するが、正常ヒト末梢血球には結合しない 625 クローンの抗体を選択し、抗体およびそれを産生するハイブリドーマ細胞を保存した。さらに、それらの AML 細胞株特異的モノクローナル抗体の中から、正常造血幹・前駆細胞およびその他の正常血液細胞には結合しないが、複数の AML 患者検体における CD34⁺CD38⁻ 白血病幹細胞分画に結合する抗体を、複数得ており、さらにスクリーニングを続けていた (図 2, 3)。

2. 研究の目的

目的 1 急性骨髄性白血病細胞特異的抗体が認識する抗原タンパク質の同定： 単離されたすべての候補抗体についてそれが認識する抗原タンパク質の同定を試みる。

目的 2 急性骨髄性白血病細胞特異的抗体が認識する抗原の特性の解明： 目的 1 にて同定された抗原タンパク質自体が正常血液細胞にも発現しているという場合、抗体が認識しているのはタンパク質の翻訳後変化によって形成された白血病特異的抗原である可能性が高いため、それらの抗体/抗原に焦点を絞り研究を進める。抗原タンパク質の種類に合わせて、構造変化、糖鎖修飾、複合体形成などの観点からそれぞれの抗体の白血病特異性のメカニズムの解明を行う。

目的 3 新規急性骨髄性白血病細胞特異的抗原を標的とした CAR-T 細胞の機能評価

目的 2 にて同定された標的に対する CAR-T 細胞を作製し、その機能評価を行う。

3. 研究の方法

目的 1 急性骨髄性白血病細胞特異的抗体が認識する抗原タンパク質の同定

本研究において、抗 AML 細胞株モノクローナル抗体を新たに作製し、その中から B 細胞以外の健康人末梢血には結合しないものを同定した。それらと以前に準備していた AML 細胞株特異的抗体とを合わせた抗体ライブラリーを用いて、AML 患者由来骨髄検体のフローサイトメトリー解析を行い、複数の検体において CD34⁺CD38⁻-AML 幹細胞を含む AML 細胞に結合する抗体を選択した。

目的 2 急性骨髄性白血病細胞特異的抗体が認識する抗原の特性の解明

発現クローニング法、免疫沈降物の LC-MS/MS 解析、あるいは CRISPR gRNA ライブラリーを用いたランダムノックアウト法によりそれぞれの候補抗体が認識する抗原タンパク質の同定を行い。その結果に基づいて、標的抗原およびそれを認識する抗体を絞り込んだ。

目的 3 新規急性骨髄性白血病細胞特異的抗原を標的とした CAR-T 細胞の機能評価

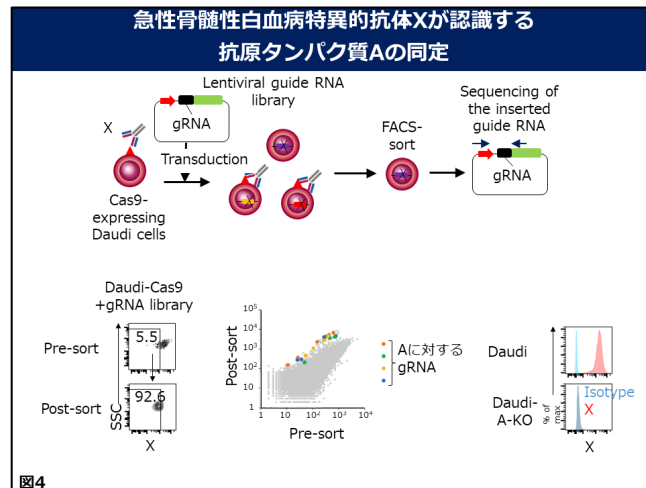
目的 2 に候補とすることにした抗体 X を元に CAR-T 細胞を作製し、in vitro, in vivo において抗腫瘍効果を有するかどうかの検討を行った。

4. 研究成果

目的 1 急性骨髄性白血病細胞特異的抗体が認識する抗原タンパク質の同定

本研究において、抗 AML 細胞株モノクローナル抗体を新たに約 4,000 クローン作製し、その中から B 細胞以外の健康人末梢血には結合しない 641 クローンを同定した。それらと以前に準備していた 437 クローンの AML 細胞株特異的抗体とを合わせた約 1000 クローンの抗体を用いて、AML 患者由来骨髄検体のフローサイトメトリー解析を行い、複数の検体において CD34⁺CD38⁻-AML 幹細胞を含む AML 細胞に結合する抗体として 32 クローンを選択した。次に、発現クローニング法、免疫沈降物の LC-MS/MS 解析、あるいは CRISPR gRNA ライブラリーを用いたランダムノックアウト法によ

りそれぞれの候補抗体が認識する抗原蛋白質の同定を行った。特に本研究期間中に、CRISPR gRNAライブラリーを用いた抗原同定の系（Cas9を導入した抗原陽性細胞株に、レンチウイルスによりCRISPR gRNAライブラリーを導入し、抗体の結合が低下した細胞に導入されているguide RNA配列をNGSにて解読することにより抗体が認識している抗原を同定する）を確立したことにより、抗原同定のスピードが加速された



(図4)。その結果、32候補抗体のうち22抗体の抗原蛋白質を同定することに成功した。

目的2 急性骨髄性白血病細胞特異的抗体が認識する抗原の特性の解明

同定した急性骨髄性白血病細胞特異的抗体の認識抗原の正常血液細胞での発現を、既存の抗体がある場合にはフローサイトメトリーによりタンパク質レベルで、ない場合にはRT-PCRによりmRNAレベルで解析した。その結果、抗原タンパク質の発現自体は正常血液細胞にも見られ白血病特異的でないが、抗体の結合が白血病特異的であった、抗原Aを認識する抗体X（特許出願中の為仮名）を候補の抗原、抗体としてこれらに研究対象を絞り研究を進めることとした。多くの急性骨髄性白血病検体に抗体Xが結合するか否かを検討し、多数例での結合が見られた。さらに、抗原Aを発現する正常非血液臓器に抗体Xが結合するかどうかの検討を開始した。興味深いことに抗原Aは正常の単球にも発現しているが、抗体Xは単球には結合しなかった。白血病細胞に比べ正常単球では抗原Aの発現が少ないこと、そして、既存の抗A抗体に比べ、抗体Xのアフィニティーが低いことが、原因の一つであるが、それだけで説明可能かどうかは未だに明らかではない。また、抗原Aは正常の腸管上皮にも発現していることが知られている。そこで、消化器外科との共同研究により、抗体Xが正常ヒト腸管粘膜上皮に結合するかを検討したが、その結合は見られなかった。そこで、抗体Xを元にCAR-T細胞を作製すればAML細胞だけを特異的に攻撃すると思われた。

目的3 新規急性骨髄性白血病細胞特異的抗原を標的としたCAR-T細胞の機能評価

抗体Xを元にCAR-T細胞を作製し、抗腫瘍効果を有するかどうかの検討を行った。まず、in vitroにおける白血病細胞との共培養にて有意なサイトカイン産生と細胞傷害活性を示した。さらに、ルシフェラーゼを発現させた白血病細胞株を移植しておいた免疫不全マウスに上記のCAR-T細胞を投与した後、IVISを用いて、腫瘍量をフォローしたところ、CAR-T細胞投与群で、コントロール群に比べて有意な腫瘍量の低下がみられ、in vivoでの強い抗腫瘍効果が示された。同様の抗腫瘍効果は患者由来AML細胞を用いたPDXモデルでも示され、X由来CAR-T細胞の有用性が示された。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Toda Jun, Ichii Michiko, Oritani Kenji, Shibayama Hirohiko, Tanimura Akira, Saito Hideaki, Yokota Takafumi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Kitai Yuichi, Muromoto Ryuta, Kashiwakura Jun-ichi, Matsuda Tadashi, Hosen Naoki, Kanakura Yuzuru | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Signal-transducing adapter protein-1 is required for maintenance of leukemic stem cells in CML | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 5601 ~ 5615 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01387-9 | 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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 保仙直毅. |
| 2. 発表標題 遺伝子改変T細胞療法. |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 保仙直毅. |
| 2. 発表標題 CAR-T cell therapy for multiple myeloma |
| 3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会・総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Naoki Hosen |
| 2. 発表標題 New targets for CAR-T cell therapy against multiple myeloma |
| 3. 学会等名 38th World Congress of the International Society of Hematology（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2022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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|