

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08373

研究課題名(和文) 一本鎖抗体を応用してシグナルを制御する次世代型サイトカインの作製と臨床応用

研究課題名(英文) Development of a novel single-chain antibody which regulates cytokine signaling

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IL-2は、T/NK細胞が発現するIL-2R β 型に結合して抗腫瘍効果を増強する一方、主に制御性T細胞が発現するIL-2R α 型にも結合して免疫を抑制する。本研究では、IL-2R α (CD132) を認識する一本鎖抗体とIL-2とを連結させ、サイトカイン結合型抗体(hyperkine)を新たに開発した。その結果、IL-2と比較すると、作製したhyperkineの1つがIL-2R β 型受容体に同程度結合し、一方でIL-2R α 型受容体にはより強く結合できることが明らかとなった。腫瘍免疫の増強と自己免疫の制御を目指して、現在各受容体に選択的に結合できるhyperkineの作製を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫療法は、造血器腫瘍などの難治性がんならびに、自己免疫疾患の新たな治療法として注目されている。IL-2は免疫を司る重要なサイトカインであるが、免疫の正と負の反応を選択的に誘導することは依然難しい可能性がある。新たなサイトカイン型抗体の作製によってこの問題が解決されれば、抗腫瘍免疫反応のみ増強したり、不要な自己免疫反応のみ抑制することが可能となりうる。まだ検討すべきいくつかの課題が残されている一方で、今回の研究で得られた成果や、さまざまなサイトカインにも応用が可能と考えられる本技術の持つ高い汎用性は、免疫療法医薬品開発領域に重要なインパクトを及ぼすものであり、社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：IL-2 can enhance antitumor immunity by stimulating T/NK cells expressing IL-2R β . On the other hand, it can also activate regulatory T cells expressing IL-2R α , resulting in suppression of unwanted immune responses. In this study, we have designed a new antibody-based cytokine, named as “hyperkine”, which possesses a single chain fragment variable (scFv) for IL-2R α (CD132) fused with IL-2. We have demonstrated that binding of a hyperkine to IL-2R β is similar to that of IL-2. In contrast, it can strongly bind to IL-2R α when compared to IL-2, which might be explained by fine-tuning of IL-2R using scFv for CD132. Based on these findings, we are now preparing a panel of hyperkines specific for IL-2R β or IL-2R α , to selectively regulate antitumor responses and autoimmune reactivities including graft-versus host responses.

研究分野：造血器腫瘍、免疫生物学、合成生物学

キーワード：サイトカイン 一本鎖抗体 IL-2 腫瘍免疫 自己免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫療法は、難治性がんや自己免疫疾患の新たな治療法として大きな期待を集めている。Interleukin 2 (IL-2)は、免疫の司令塔であるT細胞制御に大きく関わるため、様々な免疫療法に応用されている。IL-2受容体 (IL-2R)には、beta/gamma ($\beta\gamma$)型とalpha/beta/gamma ($\alpha\beta\gamma$)型とが存在し、前者はT細胞/NK細胞に、後者は制御性T細胞に強く発現している。そして、IL-2によって活性化T細胞と制御性T細胞との増幅のバランスが制御されている。例えば、IL-2R $\beta\gamma$ を発現する腫瘍浸潤リンパ球や遺伝子改変T細胞を体外で増幅して、高用量IL-2とともにがん患者に投与するがん免疫細胞養子療法が行われている。一方、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ に対するIL-2結合親和性が高いことを応用して、IL-2を低用量で投与して制御性T細胞を体内で増幅し、同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (GVHD)に対する治療も行われている (NEJM, 2011)。ところが、IL-2はIL-2R $\beta\gamma$ とIL-2R $\alpha\beta\gamma$ に同時に結合しうるため、IL-2の投与量の調節のみでは、免疫の正と負の反応を選択的に誘導することは容易ではない可能性が推察される。

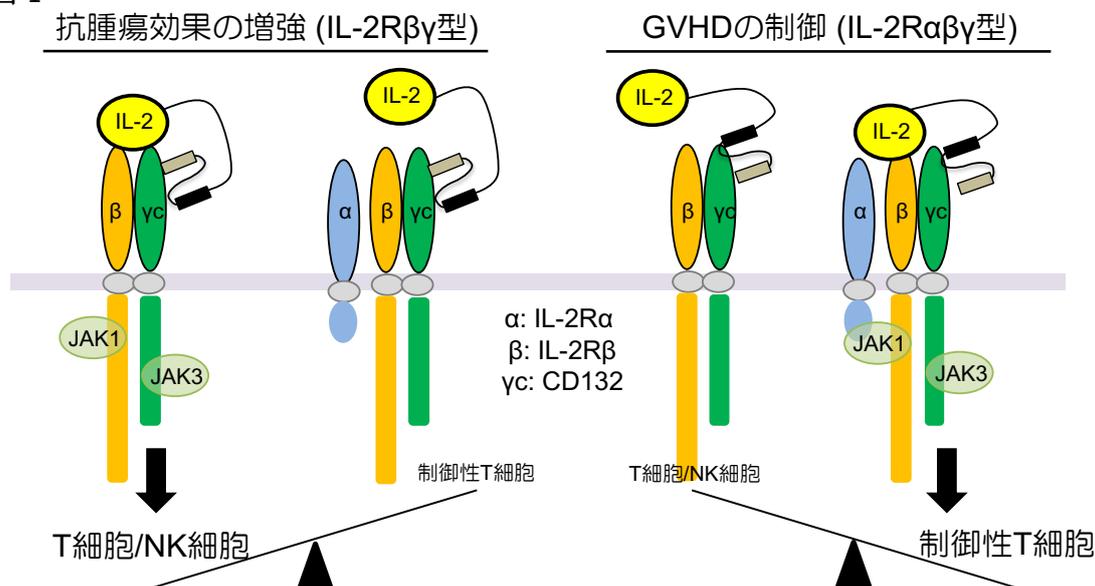
このような背景のもと、IL-2R $\beta\gamma$ またはIL-2R $\alpha\beta\gamma$ に選択的にシグナルを伝達できる遺伝子改変タンパク質の開発研究が試みられている。例えば、IL-2と抗体とを結合させて立体構造を変化させ、IL-2R $\beta\gamma$ に選択的にシグナルを伝達するタンパク質複合体の開発が進められている (Sci Transl Med, 2016)。また、IL-2R $\beta\gamma$ への結合性を高めた遺伝子改変IL-2開発 (Nature, 2012)や、変異型IL-2にのみ結合する変異型IL-2R導入T細胞の研究も進められている (Science, 2018)。しかし、これら製剤の安定性や体内での持続性など、未だ解決すべき課題も多い。

そこで、IL-2R $\beta\gamma$ またはIL-2R $\alpha\beta\gamma$ に選択的に結合する抗体をアゴニストとして利用すれば、シグナルの選別だけでなく、製剤の安定性に基づくサイトカイン効果の長期的持続に繋がる可能性がある。そして、このような抗体製剤は、がん免疫療法の促進ならびに画期的なGVHD治療薬の開発、両者に繋がると考えられる。しかし、結合性だけでなく機能性に主眼を置いた抗体の作製は容易ではなく、効率よく特異的なシグナルを伝達できる抗体の開発は難しい背景がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、まずCD132 (IL-2R γ : γ C) に特異的に結合できる一本鎖抗体 (scFv) を作製する。そして、CD132 scFvとIL-2とを連結し、CD132 scFv-IL-2 “IL-2 hyperkine” の作製を行う。我々独自のscFv作製技術 -Eumbody System- を応用して、IL-2Rに対するCD132 scFvの結合様式を繊細に変化させながら、IL-2R $\beta\gamma$ あるいはIL-2R $\alpha\beta\gamma$ にそれぞれ選択的にIL-2シグナルを伝達できる、異なる2種類のIL-2 hyperkineの作製に繋げる。その結果として、ヒトT細胞/NK細胞や、制御性T細胞を選択的に活性化できる、がんやGVHDに対する新規治療薬の開発を目指す。さらに、様々な新規リガンド製剤開発に向けた礎となる研究を遂行する (図1)。

図1

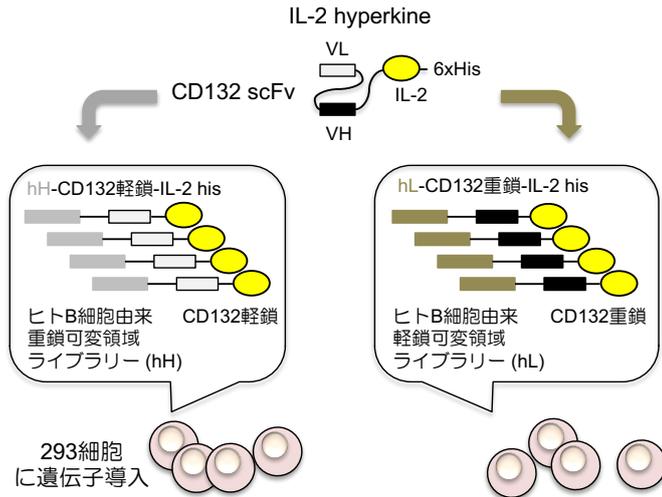


3. 研究の方法

(1) CD132 scFv-IL-2 の作製

これまでに報告されている CD132 に対する抗体 (clone X) の可変領域を応用して、scFv を設計した。CD132 scFv、IL-2、それから CD132 scFv と IL-2 とをリンカー配列で連結した CD132 scFv-IL-2 をそれぞれ設計し、6xhistidine (6xhis) を標識した (図 2 上)。こうして作製した各遺伝子を 293 細胞株に導入して上清を回収し、Ni カラムを用いて可溶性タンパクを抽出した。

図 2



(2) 各 IL-2R を発現する標的細胞株の作製

K562 細胞株は、IL-2R 陰性の細胞株である。そこで、作製した CD132 scFv、IL-2、CD132 scFv-IL-2 が、標的となる IL-2R に結合できることを確認するために、IL-2R γ (CD132)、IL-2R β (CD122)、IL-2R α (CD25) 遺伝子を個別にクローニングして K562 細胞株に導入し、K562/IL-2R γ (K562/CD132)、K562/IL-2R γ /IL-2R β (K562/IL-2R $\beta\gamma$)、K562/IL-2R γ /IL-2R β /IL-2R α (K562/IL-2R $\alpha\beta\gamma$) 細胞株をそれぞれ樹立した。

(3) CD132 scFv-IL-2 ライブラリーの作製

5' RACE 法を用いてヒト末梢血 B 細胞より cDNA を作製し、ヒト免疫グロブリン可変領域配列をクローニングした。Eumbody system を用いて、CD132 scFv の片側の可変領域配列 (軽鎖もしくは重鎖) を固定して、もう片方の重鎖あるいは軽鎖を、クローニングした免疫グロブリン可変領域ライブラリー配列に置換した。こうして片側の配列のみライブラリー化した CD132 scFv ライブラリーを作製し、IL-2 と連結することで、最終的に CD132 scFv-IL-2 ライブラリーを作製した (図 2 下)。

(4) CD132 scFv-IL-2 の解析

作製した可溶性タンパクが K562 細胞株に発現させたそれぞれの IL-2R に結合することと、その結合強度を、PE 標識抗 his 抗体を用いてフローサイトメトリー法で比較解析した。また、IL-2、CD132 scFv-IL-2 の濃度を变化させて、IL-2R に対する結合力を示す EC50 値を検出した。

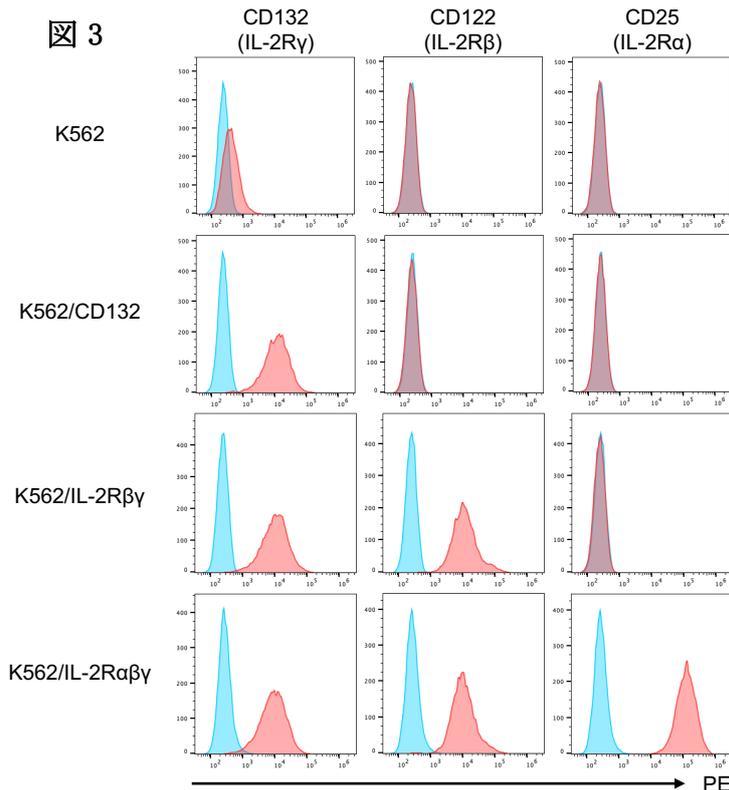
4. 研究成果

(1) CD132 scFv、IL-2、CD132 scFv-IL-2 の標的特異性と その解析

最初に我々は、K562/CD132、K562/IL-2R $\beta\gamma$ 、K562/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 細胞株を樹立した。抗 CD132、抗 CD122、抗 CD25 抗体で染色して、それぞれの受容体コンポーネントが細胞表面に発現されていることを確認した (図 3)。

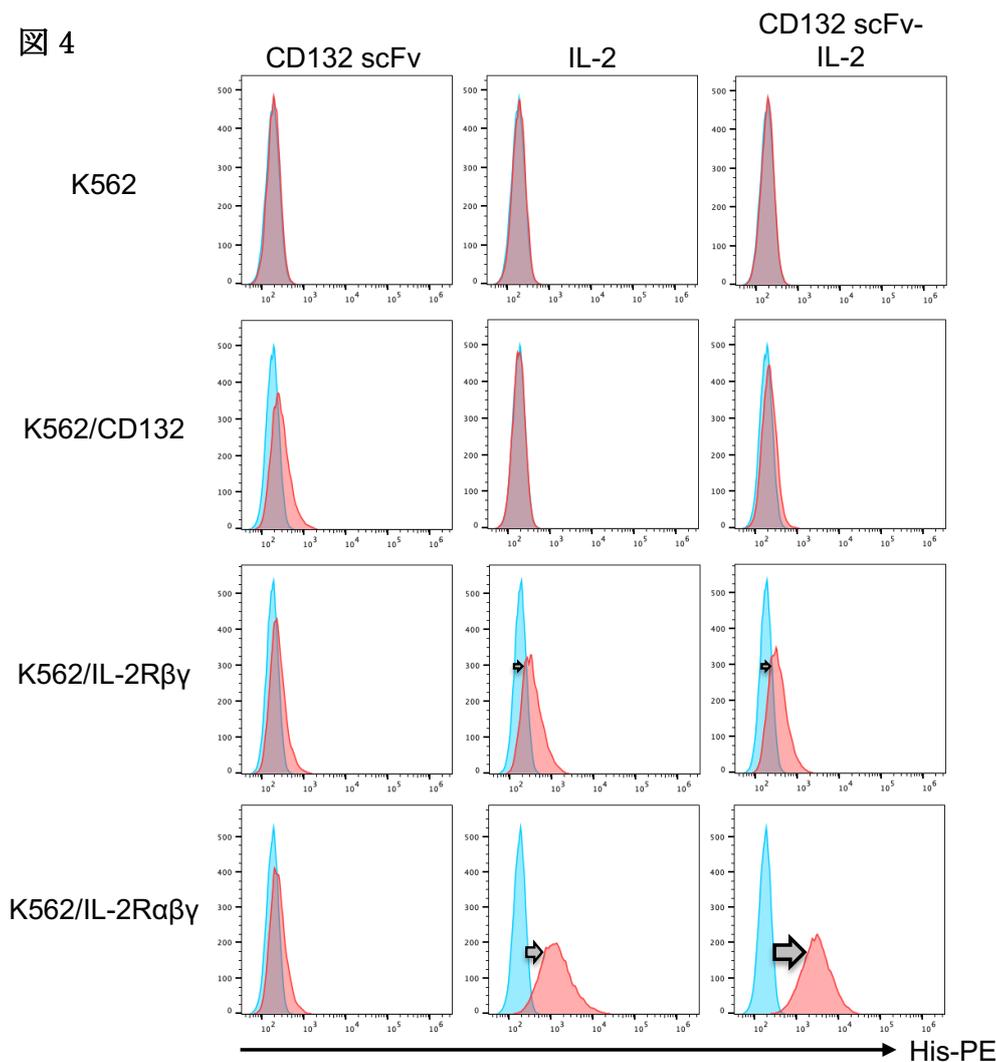
次に、CD132 scFv、IL-2、CD132 scFv-IL-2 を用いて、それぞれの細胞株を染色した。

図 3



CD132 scFv は、K562/CD132、K562/IL-2Rβγ、K562/IL-2Rαβγに同等にかつ弱く結合した (図 4 左)。

図 4



IL-2 は K562/CD132 に結合せず、K562/IL-2Rβγに弱く結合し、K562/IL-2Rαβγに強く結合した (図 4 中央)。一方で、CD132 scFv-IL-2 は、K562/IL-2Rβγに IL-2 と同等に結合する一方で、K562/IL-2Rαβγには IL-2 と比較してより強く結合する可能性が示された (図 4 右)。

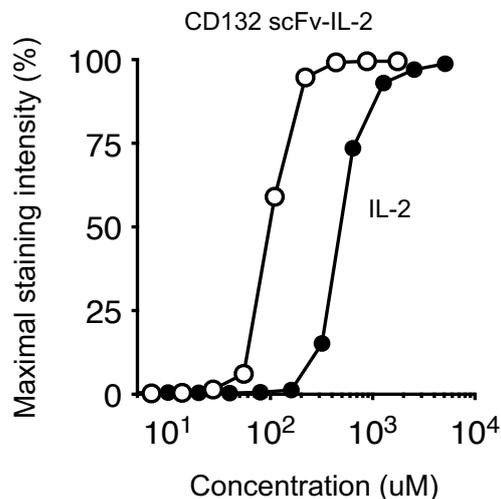
そこで、IL-2 と CD132 scFv-IL-2 の濃度を変化させながら、K562/IL-2Rαβγ細胞株の染色を行った。モル濃度換算で標的結合性をプロットすると、CD132 scFv-IL-2 は、IL-2 と比べてより低い濃度の EC50 値 (CD132 scFv-IL-2: $1.0 \times 10^2 \mu\text{M}$, IL-2: $5.0 \times 10^2 \mu\text{M}$) を示すことが明らかとなった (図 5)。

図 5

(2) CD132 scFv-IL-2 ライブラリーの作製

二人の異なるドナーに由来するヒト免疫グロブリン可変領域配列と CD132 特異的可変領域配列とを連結して、CD132 scFv ライブラリーを個別に作製し、これを IL-2 と連結した CD132 scFv-IL-2 ライブラリーの作製を完了した。293 細胞株に遺伝子導入して、CD132 scFv-IL-2 ライブラリーを含む上清の回収を行っている。

また、CD132 scFv-IL-2 ライブラリータンパクを用いて、IL-2Rβγを発現する T 細胞/NK 細胞、および IL-2Rαβγを発現する制御性 T 細胞に選択的に結合して増殖させる CD132 scFv-IL-2 を同定を試みており、その遺伝子配列の決定を進めているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Toshiki Ochi, Tatsuya Konishi, Katsuto Takenaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Bispecific antibodies for multiple myeloma: past, present and future	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-024-03766-4	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 -

1. 著者名 Tatsuya Konishi, Toshiki Ochi, Katsuto Takenaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Development of novel bispecific antibody therapy for multiple myeloma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Rinsho ketsueki	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.65.428	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 -

1. 著者名 Toshiki Ochi	4. 巻 63
2. 論文標題 Recent progress of bispecific antibody-based therapy for hematological malignancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rinsho ketsueki	6. 最初と最後の頁 1298-1309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.1298	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5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshiki Ochi
2. 発表標題 Development of Novel Immunotherapy for Myeloma
3. 学会等名 The 85th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智 俊元
2. 発表標題 がん治療の未来を拓く免疫療法を学ぼう! -創薬の進歩と現在とこれから-
3. 学会等名 -世界小児がん啓発キャンペーン- Smile Action in 愛媛 市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshiki Ochi
2. 発表標題 Recent Advances of Bispecific Antibody Therapy for Myeloma
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Myeloma (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智 俊元
2. 発表標題 がん免疫療法はここまで進化した! -遺伝子改変抗体療法の実際とその未来-
3. 学会等名 松山大学大学院医療薬学研究科 がんプロ第10回公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiki Ochi
2. 発表標題 Recent Progress of Bispecific Antibody-based Therapy for Hematological Malignancies
3. 学会等名 The 84th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (招待講演)
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
---------	---------