

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：34417  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K08428  
研究課題名（和文）急性骨髄性白血病に対するCAR-T療法の開発

研究課題名（英文）Development of CAR-T Therapy for Acute Myeloid Leukemia

研究代表者  
藤岡 龍哉（FUJIOKA, Tatsuya）  
関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70403045  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：インテグリン 4の立体構造が活性化状態のときに、より強い結合能をもつ抗体（抗体X）を見出した。

抗体Xが複数の白血病細胞株においてインテグリン 4が活性化状態にあるときにより強い結合能を示すことを明らかにした。

市販抗体に対しては全く結合能を示さず、抗体Xに対してのみ結合能を示す細胞株（細胞株Y）を発見した。今後も細胞株Yのインテグリン 4の構造解析をすすめ抗体Xの特性を明らかにすることにより、抗体Xによる抗体療法、及び抗体Xを応用したCAR-T療法などの白血病治療法の開発につなげたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インテグリン 4は活性化/非活性化状態の変化があり、それぞれ立体構造に違いを持つ。我々は活性化状態にあるときのみ強い結合能をもつ抗体を見出した。インテグリン 4は白血病細胞の表面にも発現していることが多いため、当抗体は白血病に対する新しい治療法に応用できるものと考えられる。

当研究において当抗体のみが強く結合する白血病細胞株があることを発見した。この細胞株のインテグリン 4の構造解析、及び当抗体のエピトープの解析を行うことにより新たな抗体療法やCAR-T療法などの白血病細胞治療法の開発につながるものである。

研究成果の概要（英文）：We found an antibody (antibody X) that has stronger binding ability when the three-dimensional structure of integrin 4 is in the activated state.

We found that antibody X showed stronger binding ability when integrin 4 was in an activated state in several leukemia cell lines.

We discovered a cell line (cell line Y) that shows no binding ability to commercial antibodies, but only to antibody X. We will continue to analyze the structure of integrin 4 in cell line Y to clarify the characteristics of antibody X, which will lead to the development of antibody therapy using antibody X and leukemia treatment methods such as CAR-T therapy using antibody X.

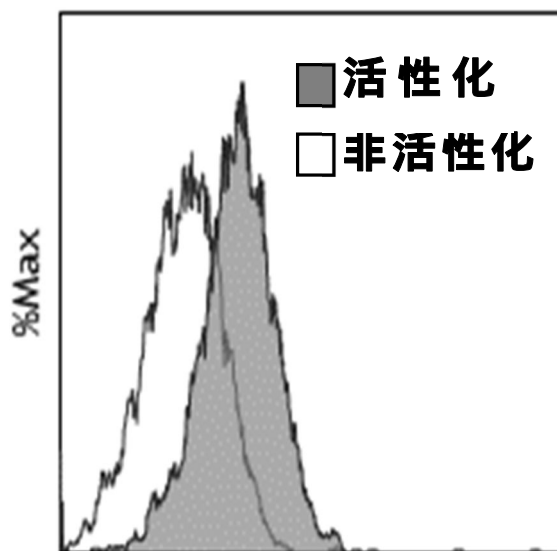
研究分野：白血病治療

キーワード：白血病 抗体療法 CAR-T療法

## 1. 研究開始当初の背景

これまでも造血器腫瘍に対する免疫学的製剤の開発は少なからず行われている。代表的な標的抗原はリンパ系腫瘍に対する CD19 抗原、CD20 抗原であり、他にも AML に対する抗 CD33 抗体、B-CLL に対する抗 CD52 抗体、及び ATL に対する抗 CCR4 抗体（本邦で開発）が現在までに、日米欧で認可されている。これら以外の白血病細胞の標的抗原の候補として基礎研究がすすめられているものとして、TIM3、CD47、CD123、CD44、CLL-1、CD96、CD32、CD25 などが報告されている。これらのほとんどはすでに特許出願されており、将来的に臨床応用される可能性もある。しかしながら、同じ蛋白でありながら立体構造の違いによって生じる抗原性の違いを認識する抗体は上記で述べた多発性骨髄腫に対する MMG49 抗体のみであり、白血病に対する同様の抗体の報告はこれまでにない。

インテグリン 4 は白血病細胞と正常血球細胞の両方に発現していると考えられている細胞表面分子であるが、細胞の状態によりその高次構造を変化させることが知られている。我々はこれまでの白血病細胞に対する研究において多数のモノクローナル抗体クローンを作製しており、その中からインテグリン 4 の立体構造が活性化状態のときに、より強い結合能をもつ抗体（抗体 X）を見出した（図 1）。抗体 X の応用により新たな白血病治療の開発が可能であると考え本研究に着手した。



**図 1 抗体 X の活性化型インテグリン 4 の認識能**

インテグリンを活性化にする条件（2mM Mn<sup>2+</sup>存在下）及び非活性化型にする条件（1mM Ca<sup>2+</sup>/1mMMg<sup>2+</sup>存在下）で BALL-1 細胞株（B-ALL）に対する抗体 X の結合能を解析した。活性化型に対して有意に強い結合能を示した。他の細胞株 THP-1、KG-1、F-36P、NALM-6 を用いた場合にも同様の結果を得た。

## 2. 研究の目的

本研究の目標は、抗体 X を用いた新規がん免疫療法につながる動物モデルでの検証（実験的 POC）、すなわち抗体 X、および抗体 X の可変領域配列を持つ CAR-T 細胞が動物モデルで抗白血病細胞効果を発揮することを確認することである。

## 3. 研究の方法

- (1) 標的抗原の他の手法による確認 抗体 X の標的抗原は免疫沈降と質量分析により判明し siRNA による追試を行った。さらに、非発現細胞に対する強制発現、Crisper/Cas9 による

ノックアウト、ELISA 法での確認を行い確実性を確保する。

- (2) 多数のヒト白血病細胞に対する結合能の確認 現時点で研究室には AML (M1-M7 全て)、ALL、CML などの白血病検体が計 80 例所蔵されている。あらゆる病型の白血病に対する結合能を測定し、抗体 X の結合能の評価を行う。市販の抗インテグリン 4 抗体を対照として解析を行い、抗体 X の優位性を示す。
- (3) 可変領域アミノ酸配列の取得 PCR 法により可変領域を増幅し精製したプロダクトに対して DNA シーケンス解析を行うことにより配列を取得する。
- (4) エピトープの所在の確認 抗体 X のエピトープがインテグリン立体構造が活性化型をとる時に表出する部位にあることを明らかにする。Overlap-extension PCR 法によりヒト/マウスキメラインテグリン 4 の cDNA を合成する。キメラ遺伝子を導入して細胞株に発現させ FACS 解析により陽性細胞、陰性細胞を区別し、それぞれの cDNA 配列を比較することによりエピトープの所在を特定する。
- (5) CAR-T 細胞の作製 取得したアミノ酸配列情報より CAR コンストラクトを作製する。申請者が日常的に使用しているレトロウイルスを用いて T 細胞に導入し CAR-T 細胞を作製する。
- (6) in vitro での抗体・CAR-T の効果確認 我々が樹立したヒト骨髄由来 SSEA-4 陽性 CD271 陽性 MSC (Stem Cells 33:1554, 2015) は白血病細胞を in vitro で支持する。これを用いた患者検体由来白血病細胞の共培養系に抗体、CAR-T 細胞を添加し、白血病細胞の生存率を測定することにより抗体・CAR-T 細胞が抗白血病細胞効果を持つことを確認する。
- (7) in vivo での抗体・CAR-T の効果確認 患者検体由来白血病細胞を NOG マウスの脛骨骨髓内に移植する。抗体は移植後 24 時間後より抗体 300  $\mu$ g を週に 3 回腹腔内に投与し、CAR-T 実験の場合は移植後 7~10 日後に尾静脈より投与する。経時的にマウスを犠牲死させ、骨髓、末梢血、脾臓の白血病細胞数を測定し抗体・CAR-T 細胞の抗白血病細胞効果を確認する。

#### 4. 研究成果

抗体 X が複数の白血病細胞株においてインテグリン 4 が活性化状態にあるときにより強い結合能を示すことを明らかにした。白血病においてこのような報告はこれまでになく新規性が高い。

白血病患者由来の白血病細胞に対して同様にインテグリン 4 の活性化状態と抗体 X の結合能の強さについての解析を行い、患者により結合能の違いがあることが判明した。白血病の病型により限定されることなく、様々な病型の白血病細胞に対する結合能を認めた。

患者由来白血病細胞と白血病細胞株に対する特異性を調べるためのスクリーニングを進めるなかで、市販抗体に対しては全く結合能を示さず、抗体 X に対してのみ結合能を示す細胞株 (細胞株 Y) を発見した。他の白血病検体や細胞株では結合能の程度の違いを認めることがあるが、この細胞株のように顕著な差を示すものは見つかっていない。細胞株 Y の持つ特異的な抗原構造は当研究を推進するにあたり強力なツールとなると考えられる。細胞株 Y のインテグリン 4 の構造、及び抗体 X のエピトープを明らかにすることにより抗体 X の特性を理解することにつながると考えている。今後も細胞株 Y のインテグリン 4 の構造解析をすすめ、抗体 X による抗体療法、及び抗体 X を応用した CAR-T 療法などの白血病治療法の開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------