

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15569

研究課題名（和文）CAR-T細胞・BiTEの直接比較に基づく前臨床スクリーニングモデルの構築

研究課題名（英文）Construction of a Preclinical Screening Model Based on Direct Comparison of CAR-T Cells and BiTE

研究代表者

丸田 雅樹（Maruta, Masaki）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10895866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：BiTEを作成するもとなる抗体としてどのようなものが最適であるかを探索するなかで、「抗体すべてが有するヒトFc領域に対する二重特異性抗体（Bridging-BiTE; B-BiTE）を作成し既存の抗体と組み合わせることで、理論上はあらゆる抗体をBiTEとして製剤化する」という発想を得て、POC検証を行った。実際に当初の仮説通り、抗体製剤とB-BiTEを混合して作成した複合体はin vitroにおいてNK細胞とT細胞を活性化したのみならず、in vivoにおいても抗体単独に比してより深い奏効を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて得られた知見は、多発性骨髄腫に対する多様な抗体製剤と組み合わせ可能であるばかりでなく、理論上は他の固形腫瘍に対する治療と組み合わせた新たな免疫療法として応用可能である。治療手段としてのBiTEの応用可能性に加えて、（多角的なvalidationが必要であるが）既存の抗体からBiTEを作成した場合の有効性についてスクリーニングすることが可能と思われ、大きな応用可能性を有する。研究成果は学術雑誌を通じて公表済みであり、editorialにおいても多発性骨髄腫に対する免疫療法の新たな展開としてコメントされるなど高い評価を得ている。

研究成果の概要（英文）：We conceived the idea of generating dual-specificity antibodies targeting the human Fc region (referred to as Bridging-BiTE or B-BiTE), during the exploration of optimal antibodies for creating BiTE (Bispecific T-cell Engager), which serves as the basis for BiTE development. By combining these novel B-BiTE constructs with existing antibodies, theoretically, any antibody could be formulated as a BiTE. We conducted proof-of-concept (POC) validation, and as anticipated, the complexes formed by mixing antibody formulations with B-BiTE not only activated NK cells and T cells in vitro but also demonstrated significantly enhanced efficacy compared to antibodies alone in vivo.

研究分野：抗体療法

キーワード：抗体療法 二重特異性抗体 多発性骨髄腫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん免疫細胞療法として CAR-T 細胞療法および BiTE 療法は有望な治療法であるが、腫瘍免疫学的機序や分子学的比較といった臨床決断に資する基礎的観察に乏しい。

(2) 申請者は先行研究により、共通の抗体を利用して作成した CAR-T 細胞および BiTE を利用することにより *in vitro* における直接比較実験系を確立し、CAR-T 細胞と BiTE により活性化された T 細胞が同等のサイトカイン産生能・細胞障害活性を發揮しうることを示した。

(3) 本研究では、共通の抗体から作成した CAR-T 細胞と BiTE によって実現した *in vitro* での直接比較実験系と、BRGShS ラインの持つ高い患者腫瘍組織移植生着効率を組み合わせることで、高い精度での CART 細胞療法と BiTE 療法の *in vivo* 直接比較実験系を確立し、治療選択における臨床決断に資する基礎的観察を行うことを着想した。

### 2. 研究の目的

(1) 同一のがん抗原特異的抗体から作成した CAR-T 細胞と BiTE によって実現された *in vitro* での直接比較実験系と、BRGhS ラインの持つ高い PDX 生着効率を組み合わせることにより、高い精度で CAR-T 細胞療法と BiTE 療法の *in vivo* における有効性を比較し、臨床決断に資する基礎的観察を行うことを目的とした。

(2) 従来の Nod-scid マウスを用いた実験系ではがん抗原特異的抗体を利用した CAR と BiTE の分子としての機能を比較することに主眼を置いていたが、本研究の *in vivo* 実験系では患者体内における腫瘍免疫動態により近い形でエフェクター細胞の解析を行うことを目指した。BRGhS ラインの持つ高い PDX 生着効率を応用して患者由来腫瘍細胞・患者由来リンパ球を検討に用いるという拡張性も考えられ、将来的には CAR 分子と患者の HLA・内在性 T 細胞受容体の相互作用や、CAR 作成時・BiTE 投与前のスクリーニングデバイスとして臨床的に応用することも目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 標的抗原についての検討

多発性骨髄腫に対する抗体療法が一時的には非常に有効性が高い一方で、効果持続期間が比較的短いことは解決すべき課題である。

そこで、まずはどのような抗原を標的とするのが適切であるかを患者検体を用いて探索した。その過程において抗体すべてが有するヒト Fc 領域に対する二重特異性抗体 (Bridging-BiTE; B-BiTE) を作成し既存の抗体と組み合わせることで、理論上はあらゆる抗体を BiTE として製剤化しうるという着想を得て、POC 検証を行った

#### (2) *in vitro/vivo* における B-BiTE の有用性

既存の抗体製剤と B-BiTE を混合して作成した複合体は *in vitro* において NK 細胞と T 細胞を活性化したのみならず、*in vivo* においても抗体単独に比してより深い奏効を示した。

#### (3) BRGhS マウスによる実験系

BRGhS マウスのもつ高い PDX 生着効率を活かして上記実験系と組み合わせるべくマウスコロニーの確立を行った。

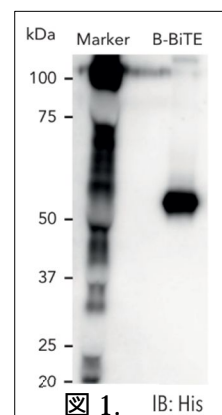
### 4. 研究成果

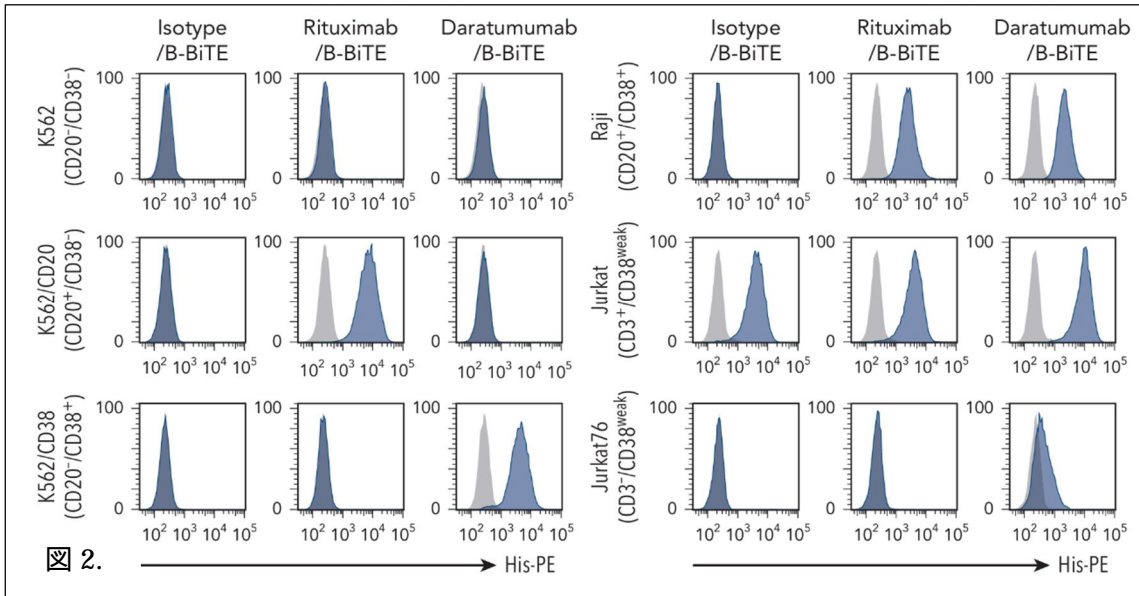
#### (1) Bridging-BiTE (B-BiTE) の作成

ヒト IgG の Fc 領域に対する抗体の可変領域と CD3 に対する抗体の可変領域を用いて、既存の抗体製剤と CD3 を架橋することができる B-BiTE を設計した。これを遺伝子導入して蛋白精製し、純化したものを試薬として作成した (図 1)。

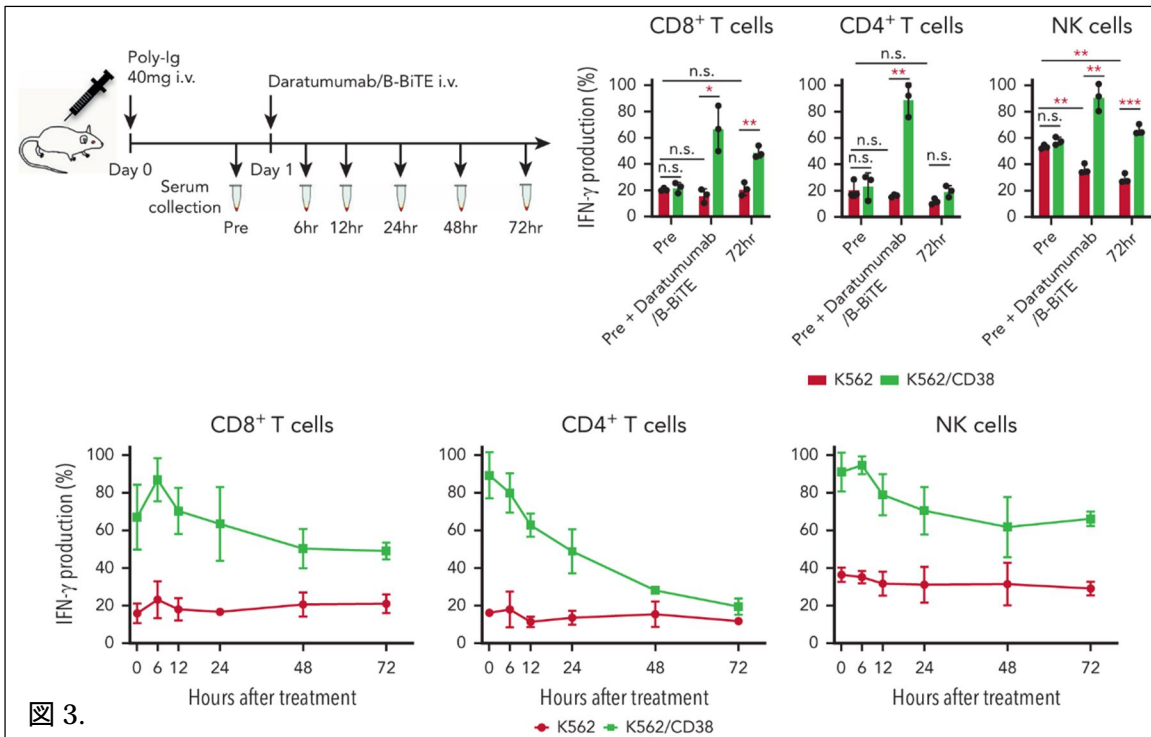
#### (2) B-BiTE の *in vitro* での特異性・細胞障害活性

次に、B-BiTE と既存の抗体製剤であるリツキシマブ (抗 CD20 抗体) とダラツムマブ (抗 CD38 抗体) を組み合わせて、*in vitro* での特異性と細胞障害活性について検討を行った。図 2 に示すように、リツキシマブ/B-BiTE 複合体およびダラツムマブ/B-BiTE 複合体は、遺伝子導入で作成した CD20 陽性細胞と CD38 陽性細胞にそれぞれ特異的に結合した。また、サイトカイン産生においても標的的特異的な T 細胞活性を誘導することを示した。

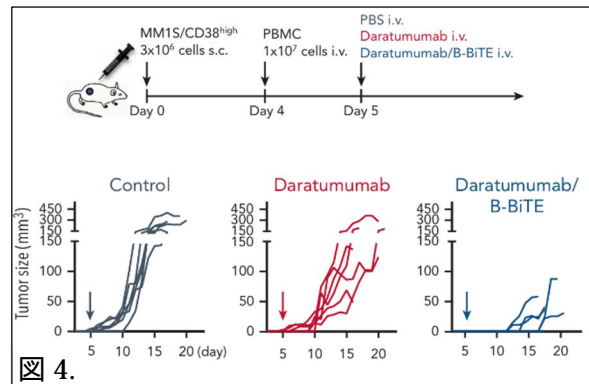




(3) *in vivo* での B-BiTE の安定性および T 細胞・NK 細胞活性化能の検討  
 続いて、*in vivo* での B-BiTE の安定性および T 細胞・NK 細胞活性化能について検討を行った。NOD-Shi-scid マウスに放射線照射を行ったうえでヒト IgG を day0 に静注したものに、ダラツムマブ/B-BiTE を投与した。投与前、6、12、24、48、72 時間後にマウス血清を採取し、CD4/CD8 陽性 T 細胞と NK 細胞と共培養し CD38 陽性の標的細胞に対する特異的な活性化能を示した(図 3)。



(4) *in vivo* での抗腫瘍活性の検討  
 さらに、骨髄腫モデルマウスを用いて、*in vivo* での抗腫瘍活性を検討した。ダラツムマブ/B-BiTE 投与群では、ダラツムマブ単剤あるいは PBS 投与群に比して有意な生存期間延長を示した(図 4)。



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 0件）

1. 著者名 Ochi Toshiki, Maruta Masaki, Tanimoto Kazushi, Kondo Fumitake, Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Fujiwara Hiroshi, Masumoto Junya, Takenaka Katsuto, Yasukawa Masaki	4. 巻 4
2. 論文標題 A single-chain antibody generation system yielding CAR-T cells with superior antitumor function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01791-1	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 Konishi Tatsuya, Ochi Toshiki, Maruta Masaki, Tanimoto Kazushi, Miyazaki Yukihiro, Iwamoto Chika, Saitou Takashi, Imamura Takeshi, Yasukawa Masaki, Takenaka Katsuto	4. 巻 142
2. 論文標題 Reinforced antimyeloma therapy via dual-lymphoid activation mediated by a panel of antibodies armed with bridging-BiTE	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1789 ~ 1805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2022019082	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 14) 平川直樹, 小西達矢, 近藤史孟, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 山之内純, 越智俊元, 竹中克斗
2. 発表標題 CD8分子はキメラ抗原受容体導入T細胞の機能を増強しうる
3. 学会等名 第119回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西達矢, 越智俊元, 平川直樹, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 安川正貴, 竹中克斗
2. 発表標題 CAR-T細胞の機能性におけるCD8分子の役割
3. 学会等名 第14回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西達矢, 越智俊元, 平川直樹, 丸田雅樹, 宮崎幸大, 谷本一史, 安川正貴, 竹中克斗
2. 発表標題 The role of CD8 molecule in the reactivity of T cells redirected with chimeric antigen receptor
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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 新規改変型二重特異性抗体の作製と骨髄腫に対する革新的免疫療法の開発
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 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 Konishi, T., Ochi, T., Maruta, M., Tanimoto, K., Saitou, T., Imamura, T., Yasukawa, M., Takenaka, K.
2. 発表標題 Development of novel immunotherapy for myeloma using a new BiTE-based modality.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1)Konishi, T., Ochi, T., Hirakawa, N., Maruta, M., Miyazaki, Y., Tanimoto, K., Yasukawa, M., Takenaka, K.
2. 発表標題 The independent role of CD8 molecule in enhancing the reactivity of T cells redirected with chimeric antigen receptor
3. 学会等名 20th CIMT Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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