

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19529

研究課題名（和文）他家CAR-Tの限界を突破する全く新しい抗体・細胞複合体高度化技術の開発

研究課題名（英文）Development of a completely new antibody-cell complex advanced technology that overcomes the limitations of allogeneic CAR-T therapy.

研究代表者

米満 吉和（Yonemitsu, Yoshikazu）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40315065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：GAIA-102上の標的分子としてNKp46, 2B4, NKp30を選択し、それら標的分子に特異的に結合するモノボディの選択を実施した。全クローンともGAIA-102へ結合することを確認した。同時に、GAIA-102結合Monobodyの機能的評価を進めるため、既知の抗体配列を元にscFvを作成し、MonobodyとのFusion proteinのデザインを行った。本研究成果は狙い通り「抗体・細胞複合体」高度化技術の開発に資するデータであり、今後は臨床開発に向けた規格化や製造に向けた実用化開発ステップへと進む。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性悪性腫瘍に対し、期待されながらも製剤化の困難に直面する他家CAR-T(キメラ遺伝子導入T細胞治療)の限界を突破するために、独自特許技術であるNK細胞製剤GAIA-102 (AMEDの支援にて開発中)の機能を更に高度化するための遺伝子導入技術を用いず既存抗体医薬品の全てに適応可能な「抗体・細胞複合体」高度化技術を開発することで、未だ治療成果が十分では無い広範な悪性腫瘍に有効な治療法を提供する。

研究成果の概要（英文）：We have selected NKp46, 2B4, and NKp30 as target molecules on GAIA-102 and conducted selection of monobodies that specifically bind to these target molecules. All clones were confirmed to bind to GAIA-102. In addition, we designed scFv based on known antibody sequences and fusion proteins with monobody for functional evaluation of GAIA-102 binding monobodies. These research results provide valuable data for the development of advanced "antibody-cell complex" technology as intended and will now move on to the practical development steps for standardization and manufacturing towards clinical development.

研究分野：外科学、病理学、腫瘍免疫学

キーワード：NK細胞 抗体医薬 固形腫瘍 CAR-T がん免疫 他家細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

背景 1)他家 CAR-T 開発の困難さと、劇的な臨床効果を示し始めた NK 細胞利用のメリット

CD19 CAR-T の成功以来、世界中の研究者・製薬企業が開発に乗り出している。特に製品化する場合に重要な観点は、1 固形がんへの適応拡大、2 大量製造保管のための他家細胞活用、3 副作用制御(脳浮腫・サイトカインストーム)、4 遺伝子導入を要するため高額、であるが、現在 1 の成功事例が少なく、2 には GvHD 予防に T 細胞受容体等 2~3 遺伝子のノックダウンなど、複雑な遺伝子改変を要することから、現在開発は大きくスローダウンしている。

ところが最近、T 細胞ではなく他家 NK 細胞を用いた CD19 CAR-NK が驚くほどの成果を示すことが明らかになった(奏功率:CAR-T に匹敵、安全性:脳浮腫・サイトカインストーム 無し: Lie E, et al. *N Engl J Med.* 2020;382:545-553)。これは NK 細胞を用いることで、CAR-T の問題点である 2 及び 3 を必然的に解決可能であることを意味する。但し我々は、従来の活性化 NK 細胞は、そもそも固形がんへの適応は難しいことを明らかにしている(下図)。これは GAIA-102 を用いることで CAR-T の問題点 1 を解決可能であることを意味する。

背景 2)固形がんを効率的に破壊する新しい phenotype の NK 細胞「GAIA-102」

我々は他家 NK 細胞の増幅培養技術を開発(開発コード:GAIA-102)、更にそのスケールアップ培養技術を開発し、2021 年春からの治験開始へ向けて準備している(AMED 臨床研究・治験推進研究事業にて支援)。この細胞の機能を調べる過程で、GAIA-102 は表現形と性質は NK 細胞に類似しているにも関わらず、遺伝子発現プロファイルを含めた性質は CAR-T に酷似し(下図)、更に固形がん極めて高い殺傷能力を示すことを明らかにした(下図)。これは GAIA-102 を用いることで CAR-T の問題点 1 を解決可能であることを意味する。

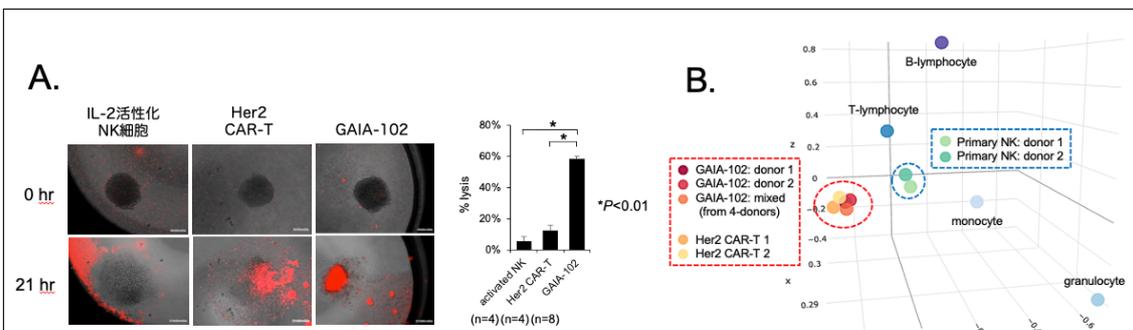


図 GAIA-102NKはCAR-Tに類似する一方、CAR-Tより強力な固形がん破壊作用を持つ

(A) Her2陽性ヒト卵巣癌 (SKOV-3) に対するスフェア破壊効果の直接比較：がん細胞スフェア形成後、色素ラベルしたNK細胞、Her2 CAR-T、GAIA-102を添加し、21時間後までTime-laps撮影し、その後死細胞率をFACSにて定量化した。NK細胞はそもそも集積不可能、CAR-Tは集積出来るものの殺傷能力が弱く遅いこと、そしてGAIA-102は効率的にスフェアへ集積し、高い効率で殺傷することが明らかとなった。

(B) 各血球系細胞とHer2 CAR-T及びGAIA-102の遺伝子発現に関するPCA解析：健康人血球細胞 (T細胞・B細胞、NK細胞、単球、顆粒球) とGAIA-102 (個別ドナー培養、混合培養)、Her2 CAR-T (2ロット) の遺伝子発現をアレイにて定量化し、3次元マッピングした。Her2 CAR-TとGAIA-102はそれぞれの母細胞であるT細胞・NK細胞とは全く異なるパターンを示し、類似の細胞であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

難治性悪性腫瘍に対し、期待されながらも製剤化の困難に直面する他家 CAR-T(キメラ遺伝子導入 T 細胞治療)の限界を突破するために、独自特許技術である NK 細胞製剤 GAIA-102 (AMED の支援にて開発中)の機能を更に高度化するための遺伝子導入技術を用いず既存抗体医薬品の全てに適応可能な「抗体・細胞複合体」高度化技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

これまで prototype として、「既知の一本鎖 agonistic 抗体+既知の細菌由来 Fc 結合ドメイン」を持つ架橋構造体を in silico シミュレーションを基に合成し、それが実際に抗体医薬品と GAIA-102 に結合可能であることを明らかにした(下図)。

検証用プロタイプ架橋物質により、抗体医薬品を GAIA-102 上にアンカリングし、安定的に維持可能であることを検証する。加えて、アンカリングした GAIA-102 が高い細胞傷害活性を有しているかどうかの検証を行う。いずれもフローサイトメーター、FlowJo ソフトウェアなどの解析/分析ツールによる数値化を行う。

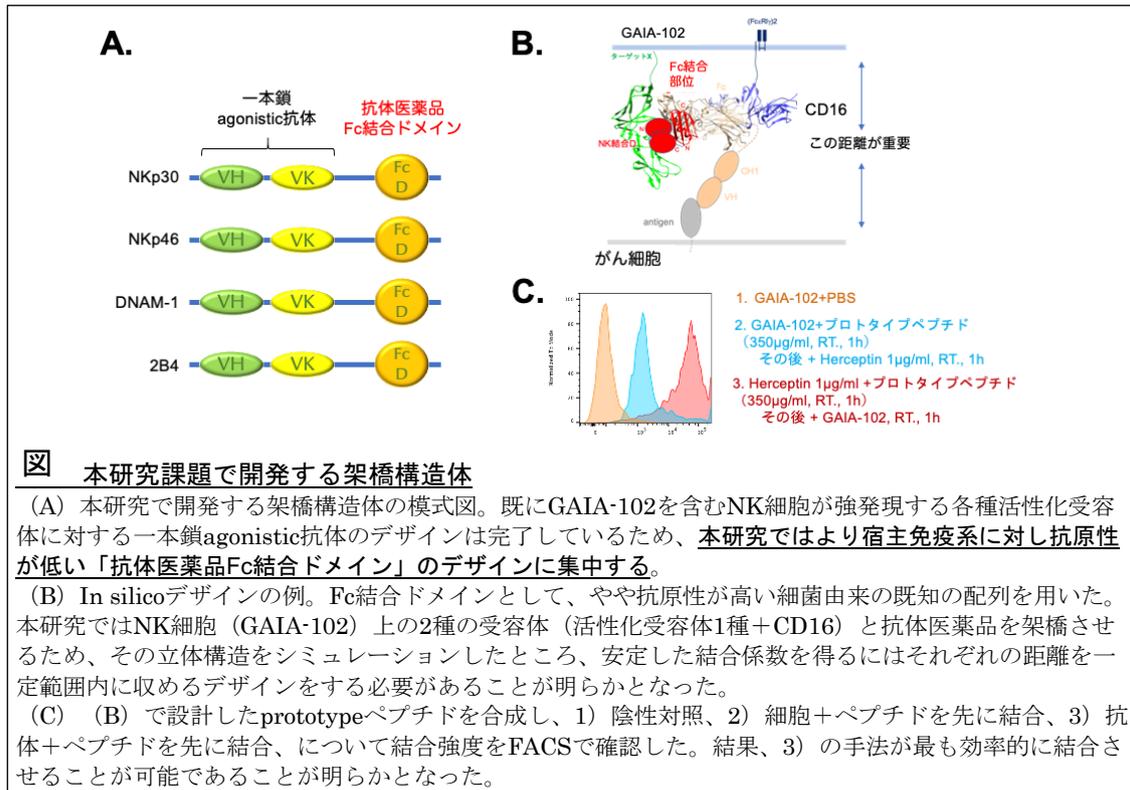


図 本研究課題で開発する架橋構造体

(A) 本研究で開発する架橋構造体の模式図。既にGAIA-102を含むNK細胞が強発現する各種活性化受容体に対する一本鎖agonistic抗体のデザインは完了しているため、**本研究ではより宿主免疫系に対し抗原性が低い「抗体医薬品Fc結合ドメイン」のデザインに集中する。**

(B) In silicoデザインの例。Fc結合ドメインとして、やや抗原性が高い細菌由来の既知の配列を用いた。本研究ではNK細胞 (GAIA-102) 上の2種の受容体 (活性化受容体1種+CD16) と抗体医薬品を架橋させるため、その立体構造をシミュレーションしたところ、安定した結合係数を得るにはそれぞれの距離を一定範囲内に収めるデザインをする必要があることが明らかとなった。

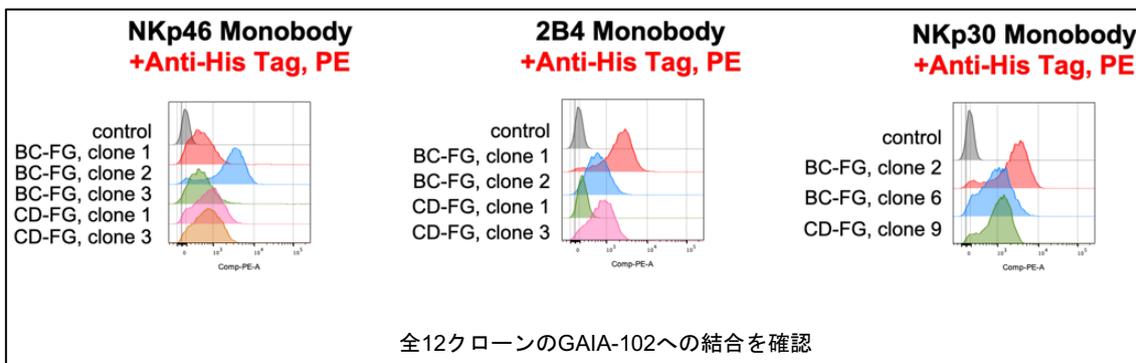
(C) (B) で設計したprototypeペプチドを合成し、1) 陰性対照、2) 細胞+ペプチドを先に結合、3) 抗体+ペプチドを先に結合、について結合強度をFACSで確認した。結果、3) の手法が最も効率的に結合させることが可能であることが明らかとなった。

4. 研究成果

GAIA-102 結合 Monobody の作出

GAIA-102 上の標的分子として NKp46, 2B4, NKp30 を選択し、研究協力者の村上裕教授 (名古屋大学) の協力のもと TRAP 提示法による標的分子に特異的に結合するモノボディの選択を実施した。1st ラウンドから 7th ラウンドまで実施し、cDNA を次世代シーケンサーで解析し、出現率と P/N 比から発現するクローンを選択することで、有望なクローン全 12 種を得た (NKp46: 5 クローン、2B4: 4 クローン、NKp30: 3 クローン)。バイオレイヤー干渉法により解離定数測定を行い、強く結合するモノボディの選択に成功した ($KD=1.0 \times 10^{-2} \text{ nM} \sim 2.8 \text{ nM}$)。これは抗体医薬として用いられている抗体の解離定数とほぼ同程度であることから、十分な解離定数の値だと考えられる。 k_{off} は $1.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1} \sim 5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ と遅く、NK細胞上のタンパク質に結合して解離しにくい、目的のモノボディが創製できたと言える。

得られた全クローンについて、GAIA-102 に対する結合性の確認およびその活性に対する影響を精査した。Monobody の His タグを利用し、anti-His による定量的な分析の結果、全クローンで GAIA-102 への結合を確認した。中でも結合が強固なクローン数種は、血液中での培養を行ってもなお解離せず、体内での作動に機能的な課題は無いことが示唆された。一方、1 クローンでのみ、GAIA-102 の傷害活性に対して negative な影響が生じることが確認された。GAIA-102 上の標的分子に結合する際、その標的分子とターゲット細胞上のリガンドとの結合に干渉する位置に monobody が結合することが原因であることが想定されたが、当該クローンを除いても有力なクローンが複数えられていることから、当該クローンは除外することとした。



Monobody と scFv の Fusion protein の作出

続いて、抗体医薬をアンカリングするために Fc 結合性の Monobody の作出を進めた。上記の NK 細胞上の標的分子に対する Monobody と同様にして、有望なクローンを複数得る事が出来た。同時に、GAIA-102 結合 Monobody の機能的評価を進めるため、既知の抗体配列を元に scFv を作成し、Monobody との Fusion protein のデザインを行った。基本的なデザインは AlphaFold2 を用いて確認し、大腸菌および哺乳類細胞を用いて発現を行った。構造上、可溶性分画への回収が困難であったため、標識タグを工夫することなどで問題を解決し、purity の高い fusion protein を得るに至った。

尚、いずれの実験とも GAIA-102 に発現のない human CTLA4 及び murine CTLA4 を標的分子とする Monobody を negative control として同時に作出し、その GAIA-102 への結合性が無いことを確認している。

今後の展開

本研究成果は狙い通り「抗体・細胞複合体」高度化技術の開発に資するデータであり、今後は臨床開発に向けた規格化や製造に向けた実用化開発ステップへと進む予定である（2023 年度 AMED シーズ A 採択）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 T細胞 vs. NK細胞：次世代細胞医薬品としての可能性
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 再生医療等製品を取り巻く諸問題：特に薬価について
3. 学会等名 琉球大学AMED再生事業シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 MANUFACTURING: Optimizing Cell Expansion Protocols for High Quality Product Yield GAIA-NK: Off-the-shelf 'NK-like' cell product that can eliminate solid tumors
3. 学会等名 7th Innate Killer Summit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 GAIA-NK: Off-the-shelf 'NK-like' cell product that can eliminate solid tumors
3. 学会等名 Oncology Immunotherapy Webinar Virtual Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 固形がんを破壊可能な新しいINK細胞様フェノタイプGAIA-NKの臨床開発
3. 学会等名 第28回 日本遺伝子細胞治療学会 (JSGCT2022)
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