

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461427

研究課題名(和文) 特異的キメラ抗原受容体導入T細胞によるATLへの免疫遺伝子治療法開発

研究課題名(英文) Immunotherapy for ATL using specific chimeric antigen receptor

研究代表者

吉満 誠 (Yoshimitsu, Makoto)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：70404530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：極めて難治性である成人T細胞白血病リンパ腫への新規治療法の開発は喫緊の課題である。腫瘍抗原特異的キメラ抗原受容体発現T細胞療法の効果と安全性には適切な標的抗原の決定が重要である。今回我々はATL細胞のT細胞受容体のプロファイルを評価し、T細胞受容体V₂鎖の頻度が高いことを見出した。TCRVb2への抗体樹立のためにTCRVb2のクローニングとレンチウイルスベクターを用いた強発現細胞を樹立した。その抗原に対する抗体配列をファージディスプレイ法を用いて同定しようと試みたが、同定に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Adult T cell leukemia/lymphoma is a retractable hematological malignancy, which requires effective therapeutic modality. It is very important for immunotherapy using chimeric antigen receptor T cell to identify therapeutically relevant target antigen. Here we assessed T cell receptor repertoire among patients with ATL. We found that T cell receptor V beta 2 was the most prevalent TCR, more than 15% of ATL patients express TCRVb2. After cloning of TCRVb2 by RACE, we developed TCRVb2 expressing lentiviral vector and establish TCRVb2 highly expressing cell line. We tried to identify anti-TCRVb2 specific antibody by phage display library. Further optimization of this protocol need to be explored.

研究分野：血液内科

キーワード：CART療法 T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) に対する治療は従来の多剤併用化学療法、造血幹細胞移植により一定の予後改善効果を得られているものの、3 年生存率は急性型で 24%程度と新規治療法開発の必要性については論を待たない。モノクローナル抗体療法は CD20 を標的とするリツキシマブの登場以来造血器悪性腫瘍患者生命予後の改善に大きく貢献してきた。ATL においても抗 CCR4 抗体が開発され(Yamamoto K et al. Journal of Clinical Oncology, 2010 (28) 1591-1598)、2012 年認可となっているが、その長期臨床効果については明らかではない。

(2) 2011 年、治療抵抗性慢性リンパ性白血病に対して CD19 に対する抗体を発現する T 細胞を少量単回投与することで副作用なく著明な腫瘍縮小効果が認められたことが報告された(Porter DL et al. New England Journal of Medicine, 2011 (365) 725-733)。その成功には健常組織に影響の少ない腫瘍関連標的抗原の同定と、より腫瘍殺傷能力の高い抗体の選択が極めて重要であった。

(3) ATL 関連抗原は HTLV-1 ウイルス由来のものが候補として挙がるが、一般に細胞内蛋白であることが多く、その発現量も少ないことが報告されており、抗体療法の標的抗原として適さない。本研究の研究協力者である Laurie Ailles 教授は Ontario Institute of Cancer Research においてフローサイトメトリー法を用いた癌幹細胞の研究で多くの成果を上げてきている。384 種類の抗体を用いた細胞表面抗原発現解析は、mRNA マイクロアレイ法によって同定できた遺伝子と異なり、すでに蛋白として細胞表面に発現されているため抗体標的抗原スクリーニングに適していると考えられる。

(4) 免疫不全マウスを用いた研究は Leukemia initiating cell の同定に大きく貢献してきた。我々は免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3null マウス, NOJ)へ ATL 細胞を異種移植することで ATL マウスを作出可能性を示した。同定された ATL 関連抗原の機能について、本マウスモデルを樹立することで ATL 関連抗原の機能について解析が可能となる。

(5) 抗体作成にはこれまで多くの時間が必要としてきたが、本研究の分担研究者である伊東はファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いてこれまで多くの目的抗体を作出している。またこの方法は抗体蛋白の遺伝子配列も容易に同定できる。

2. 研究の目的

以上の方法を組み合わせることにより、ATL 関連抗原に対する抗体遺伝子導入 T 細胞を用いた免疫遺伝子治療の開発を目指す。ハイスループットフローサイトメトリー法を用いて、ATL 細胞表面抗原の網羅的プロファイルを明らかにし、免疫不全マウスモデルでの腫瘍形成能の検討の上、適切な標的抗原を選択する。その後ファージディスプレイ抗体ライブラリーを用いて候補抗原を認識する抗体単鎖可変領域フラグメント(scFv)を作成する。さらにレンチウイルスベクターを用いて ATL 関連抗原への抗体遺伝子導入 T 細胞を作成する。ハイスループットフローサイトメトリー法とファージディスプレイ抗体ライブラリーを組み合わせることで多様な癌腫へ迅速応用できるシステムを開発する。本提案は、ATL 患者多発地帯である鹿児島で、ATL 異種移植モデルを確立し、レンチウイルスベクター遺伝子治療に取り組んできた当講座において取り組むにふさわしい研究課題である。

以下の 3 つの柱を中心に明らかにしていく。

ハイスループットフローサイトメトリー法を用いて ATL 関連抗原を同定する(Dr. Ailles との共同研究)。

ATL 関連抗原認識抗体をファージディスプレイ抗体ライブラリー法により作成する(分担研究者 伊東教授との共同研究)。

ATL 関連抗原への抗体遺伝子導入 T 細胞を作成し、**免疫遺伝子治療**の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) ハイスループットフローサイトメトリー法を用いた ATL 関連抗原の検討

末梢血に ATL 細胞を有する未治療急性型 ATL 患者(40 名)より同意を得た後採血(20 ml)を行い、末梢血単核球を分離する。通常 ATL 細胞は CD4/CD25 陽性であるが、その中には制御性 T 細胞分画も含まれるため、T 細胞受容体 (TCR) レパトア抗体 (10 Test Beta Mark TCR Vb レパトア解析キット, Beckman Coulter)を用いて ATL 細胞特異的 TCR を同定し純粋な ATL 細胞の分離を行う (FACSriaII, BD)。分取された ATL 細胞を Ontario Institute of Cancer Research、Laurie Ailles 教授研究

室でハイスループットマイクロアレイ法を用いて ATL 関連抗原プロファイルの検討を行う。分離された ATL 細胞は冷凍保存され、共同研究者 Dr. Laurie Ailles (Ontario Institute of Cancer Research) へ送付する。Dr. Ailles 研究室において、ハイスループットフローサイトメトリーアレイを行い網羅的に ATL 細胞の表面抗原形質の解析を行う。ハイスループットマイクロアレイ法は 96 ウェルプレート 4 枚に撒かれた 384 種類の抗体を用いてフローサイトメトリーを行う。患者あたり、 1×10^7 細胞、3 時間要するのみである。従来の DNA マイクロアレイ法と異なり、同定された抗原はすでに蛋白として細胞表面に発現されているため、抗体療法標的抗原候補になりうるアドバンテージがある。

(2) 同定された ATL 関連抗原の有無による免疫不全マウスへの生着能について検討

解析結果をもとに ATL 細胞特異的抗原を選択する。ATL 細胞での高発現、健常組織での低発現、T 細胞での異所性発現、既知の cancer initiating cell 関連抗原を念頭に選択を行う。よりよい標的抗原の同定に ATL initiating cell (AIC) 関連抗原の同定も目指す。AIC の同定には免疫不全マウス異種移植モデルを用いる。NOJ マウスを用いることで至適な ATL 患者細胞の生着を確立する。

(3) ATL 関連抗原抗体をファージディスプレイヒト抗体ライブラリー法により作成

鹿児島大学伊東祐二教授研究室(分担研究者)において ATL 関連抗原抗体をファージディスプレイヒト抗体ライブラリーを用いて作成する。標的抗原の同定後は、その標的抗原発現組み換えレンチウイルスベクター(LV)を作製し、安定細胞株を樹立する。その細胞を用い、ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーにより候補抗原を認識する抗体単鎖可変領域フラグメント(scFv)を作成する。

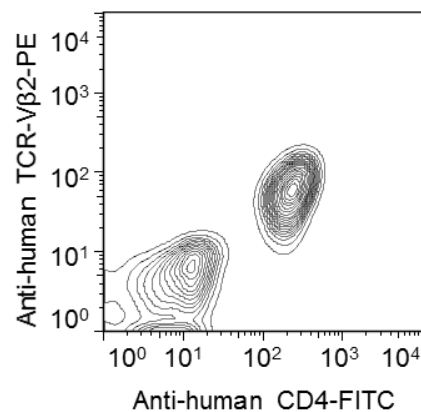
(4) ATL 関連抗原への抗体遺伝子を発現する T 細胞を作成する。

ファージディスプレイ法で同定され

た抗体の配列を用いて遺伝子組換えレンチウイルスベクターを作製する。研究代表者はこれまでに数多くの組み換えレンチウイルスベクターの作成にあたってきている。本法では scFv をコードする遺伝子配列が同定できるため、scFv キメラ抗原受容体(CAR)発現 LV の作成は従来の方法に比較し容易である。なお scFv-CAR 発現 LV の作成にあたり、CAR の細胞内ドメインには細胞表面発現を誘導する CD3 部位と scFv-CAR 細胞の増幅を促す 4-1BB ドメインを挿入する。T 細胞への遺伝子導入を行い、in vitro で抗 ATL 効果を検証する。一般にヒト T 細胞へのレンチウイルスベクターによる遺伝子導入は容易ではないが、ウイルス量を増やすこと(MOI 100)で導入効率が飛躍的に亢進することを確認できている。免疫不全マウスを用いて抗体遺伝子発現 T 細胞の抗 ATL 効果を検証する。scFv-CAR 導入 T 細胞を用いて抗 ATL 効果を in vivo で検討する。

4. 研究成果

1) 鹿児島大学病院臨床倫理審査承認後に ATL 患者 40 例より末梢血採血を行った。末梢血単核球を分離後冷凍保存した。より enrich された ATL 細胞において細胞表面抗原ハイスループット FCM を行うために、T 細胞受容体レパトアキットを用いて、ATL 細胞 TCR レパトアを同定した。その中で TCR V₂ を持つ ATL 細胞が 11 例/38 例と 28.2% と占めた。これは通常のレパトア割合 9.36% より有意に高いと考えられた ($P = 0.00053$)。

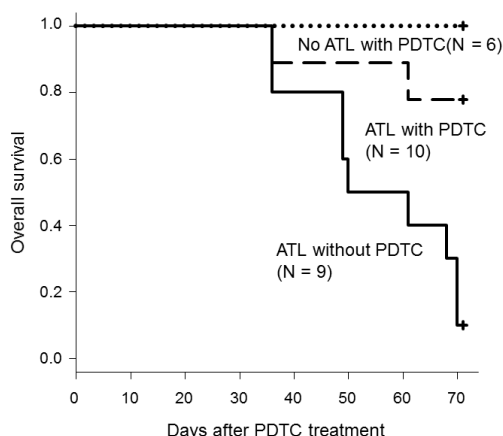


2) ハイスループットフローサイトメトリー法を用いた ATL 関連抗原の検討については近年 BD Lyoplate Human Cell Surface Marker

Screening Panel が販売され、ヒト細胞表面抗原 242 をスクリーニング可能となった。本研究では引き続き本パネルを用いて検討を行う。

3) ATL 異種移植モデルの樹立

ATL 患者由来細胞を用いることで、安定した異種移植モデルを樹立できた。患者 ATL 細胞は末梢血、肝臓、脾臓、肺を中心に浸潤し、ATL 様症状をきたした。またこれまで in vitro で抗 ATL 効果を認めた PDTC について in vivo での検討を行い、治療群において生存の有意な延長を認めた。



4) ATL 腫瘍抗原としての TCRV2

TCR のレパトア解析で TCRV 2 を高率に認めため、CAR-T 療法の標的抗原として TCRV 2 を選択した。TCRV 2 を標的とした場合には正常組織に与える影響が軽微であるため候補抗原としての特性を備えていると判断した。TCRV 2 の配列は RACE 法により同定し、発現ベクターを作成した。TCRV 2 発現ベクターを Jurkat 細胞へ発現させ、TCRV 2 に対する抗体をファージディスプレイ法で作成過程である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Daisuke Nakamura, Makoto Yoshimitsu, Ayako Kuroki, Miho Hachiman, Yuhei Kamada, Chibueze C Ezinne, Akihiko Arai, Hirosaka Inoue, Heiichirou Hamada, Maiko Hayashida, Shinsuke Suzuki, Satoshi Fujino, Naosuke Arima, Mamiko Arima, Tomohisa Tabuchi, Seiji Okada, and Naomichi Arima. A new ATL xenograft model and evaluation of pyrrolidine dithiocarbamate as a potential ATL therapeutic agent. *Experimental Hematology*, 査読有、43 巻 2015、944-950

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉満 誠 (YOSHIMITSU, Makoto)

鹿児島大学・歯学域医学系・准教授

研究者番号：70404530

(2) 研究分担者

伊東祐二 (ITO H Yuji)

鹿児島大学・理工学域理学系・教授

研究者番号：60223195