

# 急性骨髄性白血病に対する新規キメラ抗原受容体導入 T 細胞療法の開発

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫応答研究分野・分野長 籠谷 勇紀

## 1. 研究の背景・目的

がん抗原を特異的に認識する T 細胞を体外で準備して、患者に輸注することで治療する養子免疫療法は、CD19 を標的としたキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) 導入 T 細胞療法が再発・難治性の B 細胞性腫瘍に著効したことから注目されており、他の悪性腫瘍についても標的探索・治療効果の検証が進んでいる<sup>1</sup>。急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) は難治性の造血器悪性腫瘍の 1 つで、化学療法による完全寛解後も高率に再発を来す。一部のサブタイプを除き、現在のところ造血幹細胞移植が治癒を目指せる唯一の治療法であるが、治療強度の高い前処置化学療法を必要とする上、移植片対宿主病 (GVHD) など、生涯にわたる副作用のリスクがあることが問題である。AML においても CAR-T 細胞療法の有効性が検証されており、主に CD33, CD123 を標的とした臨床試験が進んでいる<sup>2</sup>。しかしこれらの標的抗原は正常の造血幹細胞においても発現しているため治療に伴う造血障害が懸念されており、実際に CAR-T 細胞治療を受けた一部の症例では造血不全が報告されている。AML に特異的な表面抗原の探索が行われてきたが、現在のところ特異性・有効性を同時に満たす標的抗原は見つかっていない。

我々は、AML 細胞が発症の始原であり、自己複製能に優れた白血病幹細胞 (leukemia stem cell: LSC) における遺伝子発現プロファイルを正常の造血幹細胞と比較することで、発現亢進している遺伝子群において、通常表面抗原分子とは分類されていないものの、その一部が細胞表面に発現することが知られている遺伝子 A を同定した。そこで本研究では、同遺伝子により翻訳される膜型抗原 A を AML に対する有望な標的抗原と考え、CAR の新規開発を行い、治療効果を実証することを目的とした。

## 2. 研究の対象ならびに方法

同抗原由来ペプチドをマウスに輸注し、腸骨リンパ節法により B 細胞を取得した後、ハイブリドーマを作製した。元の抗原ペプチドとの反応性、及び抗原 A を強制発現させた細胞株に培養上清を反応させた際のフローサイトメトリーによる抗原発現解析をもとに、

最終的にモノクローナル抗体を2つ取得した(図1)。これらの抗体より重鎖、軽鎖の各可変領域を RACE PCR 法で増幅し、アミノ酸配列を同定した上で、単鎖状につないだ(single chain fragment variable: scFV)。作製した CAR 遺伝子をレトロウイルスによりヒト T 細胞に導入し、CAR-T 細胞を作製した上で、同抗原を発現させた腫瘍細胞株と共培養したところ、効率よくサイトカインを分泌し(図2)、また同抗原を発現させた腫瘍細胞株との共培養により細胞傷害活性を評価することで、抗原特異的なエフェクター効果を示した<sup>3</sup>。

以上より、抗原 A に対する新規 CAR を開発し、同 CAR を遺伝子導入した抗原特異的な細胞傷害活性を誘導できることを確認した。

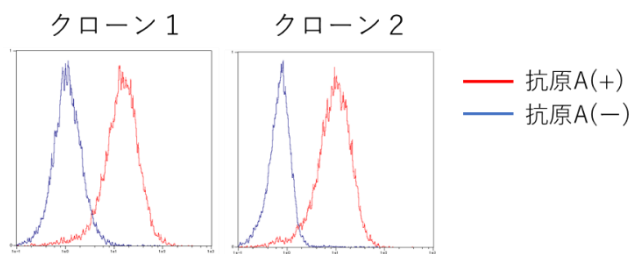


図1. 抗原 A を強制発現させた細胞株、及び抗原陰性の元細胞株に取得抗体 2 クローンを添加した後、蛍光色素付きの抗マウス抗体で染色し、発現をフローサイトメトリーで解析した。

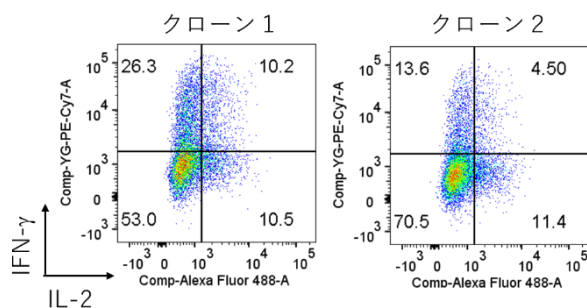


図2. 抗原 A を強制発現させた細胞株と同抗原特異的な CAR-T 細胞を共培養したところ、いずれの抗体クローンにおいても効率よいサイトカイン産生が確認された。

#### 4. 考察

上記のデータに示されるように、AML に対する新規抗原を標的とした CAR 遺伝子の合成に成功した。今後は、同抗原を発現する腫瘍細胞株を用いたマウス腫瘍モデルを用いて、CAR-T 細胞の *in vivo* における治療効果を評価することが必要である。その際に、既に臨床でも用いられている CD19 に対する CAR-T 細胞と比較して性質を評価することで、今後臨床応用に向けた準備を進める価値があるかどうかを見極めることが重要となる。

また同抗原は、AML 細胞株においては発現が確認されているが、実際の臨床検体における発現率を把握する必要があることから、患者検体の集積を行い、今回取得したモノクローナル抗体により解析を行う計画である。

5. 文献

- 1 Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **378**, 439-448, doi:10.1056/NEJMoa1709866 (2018).
- 2 Cummins, K. D. & Gill, S. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia: how close to reality? *Haematologica* **104**, 1302-1308, doi:10.3324/haematol.2018.208751 (2019).
- 3 Kagoya, Y. *et al.* BET bromodomain inhibition enhances T cell persistence and function in adoptive immunotherapy models. *J Clin Invest* **126**, 3479-3494, doi:10.1172/JCI86437 (2016).

6. 論文発表

本研究に関連した知財申請を準備中のため、発表は行っていない。