

急性骨髄性白血病を標的とした新規キメラ抗原受容体導入 T 細胞療法—臨床応用に向けた proof of concept の取得

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、細胞表面抗原を抗体により直接認識させるキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) 導入 T 細胞療法が、CD19 を標的とすることで再発・難治性の B 細胞性腫瘍に著効したことから、既に本邦でも保険承認が得られている (Maude et al. New Engl J Med 2018)。今後他の悪性腫瘍についても CAR-T 細胞療法の開発が大きく期待されているが、同じ造血器腫瘍でも急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) では CAR-T 細胞の開発が標的抗原の観点から奏功していない。これまでに CD33, CD123 を標的とした臨床試験が進んでいる (Cummins et al. Haematologica 2019)。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 (Perna et al. Cancer Cell 2017)。

我々は、AML 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解析を通じて、抗原 A の発現が多く症例で亢進していることを見出した。実際、様々ながん種の細胞株における遺伝子発現プロファイル解析においても、造血器悪性腫瘍、とりわけ骨髄系腫瘍細胞で抗原 A の発現亢進が見られることを確認している。ここで同分子は、通常細胞外へ分泌されるサイトカインであるが、白血病細胞ではこれらが膜型分子として細胞表面に発現していることが近年報告されていることから、細胞表面抗原として CAR の標的とすることが可能である。また抗原 A は正常の造血幹細胞では発現が見られず、単球・マクロファージ、一部の T 細胞などに発現しているのみで、致死的な副作用の発生はないと考えた。これらの背景に基づき、我々は膜型分子 A を標的とする新規モノクローナル抗体を取得し、これをもとにした CAR 遺伝子を合成した。本研究ではこの CAR-T 細胞を用いて以下の研究を進めた。

2. 研究方法及び結果

前年度までに取得した抗体の可変領域配列をもとに作成した CAR-T 細胞の基本的機能について、*in vitro*での検討を行った。抗体クローン 2 種類それぞれについて軽鎖、重鎖の接続順序をかえた計 4 種類の scFV (single chain variable fragment)について、CD28 を共刺激分子ドメインとして有する第二世代 CAR 遺伝子を作製して、健康人由来ヒト末梢血 T 細胞にレトロウイルスを用いて導入した。分子 A を生理的に発現していることが知られている AML 細胞株 (THP1, HL60) との共培養において細胞傷害活性を比較したところ、いずれのクローンにおいても VLVH の接続順序がやや優れていた (図 1)。

また分子 A 全長、または切断・分泌される部分を削った分子を発現させた K562 細胞との共培養でサイトカイン分泌を評価したところ、cl. 35B VLVH 以外ではほぼ同等の分泌能であった (図 2)。また CAR 遺伝子の構造によっては、抗原刺激によらずに重合が起こり、T 細胞の疲弊化が経時的に誘導される tonic signaling が問題となることがあり、抗原非刺激下での PD1 分子の発現有無によって評価できる。上記 4 種類では VLVH の接続順序 tonic signaling は起こりにくいことが示唆された (図 3)。以上の検討を通じて、clone 12D, VLVH の接続順序が最も総合的に機能性の高い CAR 遺伝子であると考え、マウス腫瘍モデルでの検討を進めた。

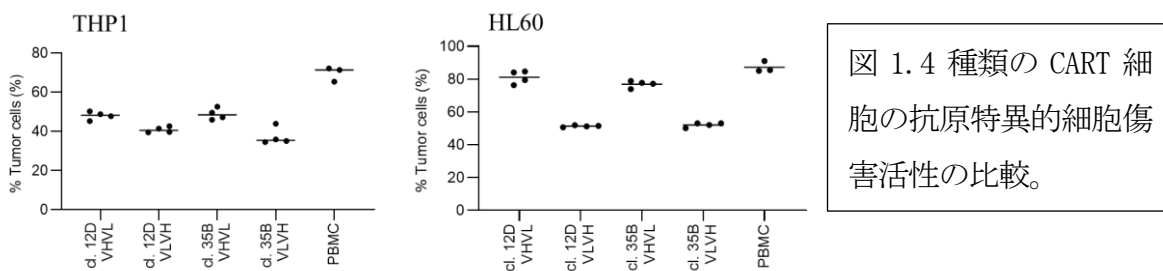


図 1.4 種類の CART 細胞の抗原特異的細胞傷害活性の比較。

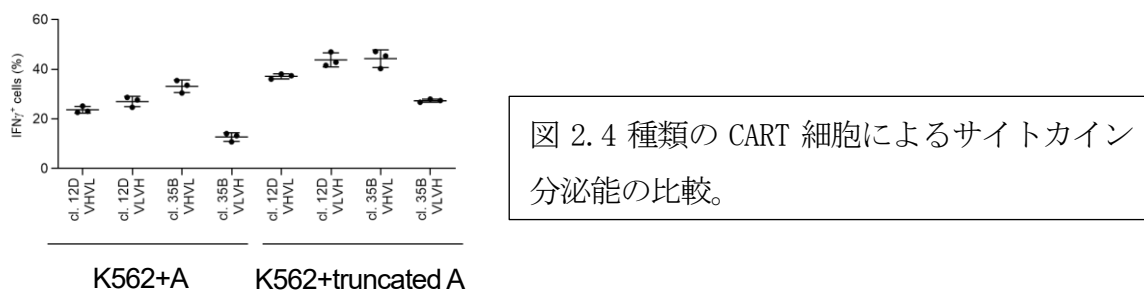


図 2.4 種類の CART 細胞によるサイトカイン分泌能の比較。

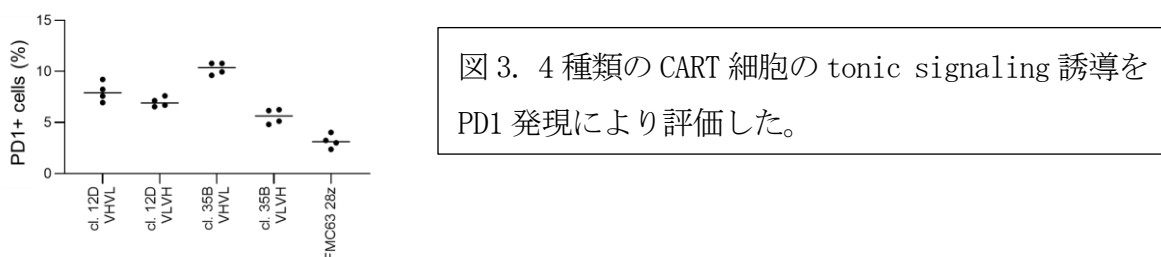


図 3. 4 種類の CART 細胞の tonic signaling 誘導を PD1 発現により評価した。

抗原 A を発現する AML 細胞株 THP1 を NSG マウスに輸注した上で、CAR-T 細胞 (clone.

12D, VLVH)を輸注して治療効果を評価した。図4に示すように、無治療群と比較して有意に生存延長効果が見られたことから、開発した CAR-T 細胞の客観的な抗腫瘍効果が証明された。一方、同 CAR 細胞は輸注後徐々に消失し、それに伴い腫瘍細胞の増生を認めたことから、いずれのマウスにおいても治癒には至らなかった。

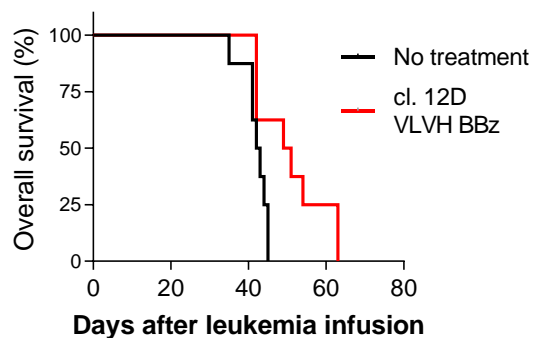


図4. THP1 移植白血病マウスモデルを用いた CAR 細胞の治療効果評価。

4. 考察

上記のデータで示したように、AML に対する新規抗原を標的とした CAR-T 細胞の *in vitro*, *in vivo* における一定の抗腫瘍効果を証明できた。一方、CD19 に対する CAR 細胞と比較して、*in vivo* における抗腫瘍効果が少なくとも使用したモデルでは不十分であった。CAR-T cell の治療効果には標的抗原の発現量が大きく関わっており、この点で不十分である可能性が考えられる。今後は我々が有する細胞内ドメインの改変や遺伝子改変技術 (文献1) により抗原発現量の少ない標的に対する細胞傷害効果、長期生存能の改善が可能であるか、既知の AML 抗原に対する CAR と組み合わせて二重特異性を持たせることで、治療効果の増強が可能であるかについて検討を進める計画である。

5. 文献

1. Yoshikawa T, Wu Z, Inoue S, Kasuya H, Matsushita H, Takahashi Y, Kuroda H, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y. Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy. *Blood*. 2022;139: 2156-2172.

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。