

同種移植後再発白血病を目的とした不適合 HLA-DP 分子を標的とした免疫療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科

分子細胞免疫学 特任教授 赤塚 美樹

1. 研究の背景・目的

難治性白血病を根治させる手段として同種造血細胞移植があり、移植後の 5 年生存率は 45%前後で、死因の約半数を再発が占めており、移植後再発白血病の治療法の確立は急務である。近年、CD19 を標的とした CAR-T 細胞療法が実用化され、欧米では移植後再発に対しても一定の効果を上げているが、CD19 陽性白血病は全白血病のごく一部に過ぎず、それ以外の大部分の白血病の移植後再発症例には有効な治療はほとんど無いのが実情である。多くの移植では HLA-A,B,C,DR,DQ 座を一致させるが、HLA-DP 抗原は連鎖不均衡の影響を受けにくいいため 7 割で HLA-DP に不適合が存在する¹⁾。HLA-DP は非血液細胞ではほとんど発現しないため、HLA-DP 不適合は移植片対宿主病を起こしても予後に悪影響しにくい一方、HLA-DP を発現する白血病を傷害することができ、寛解生存率の改善に大きく貢献するものと考えられる。本申請者は過去 4 年にわたって非血縁者間移植を受けた症例を集積し、移植後のドナー由来 T 細胞中に存在する患者のみが有する不適合 HLA-DP 反応性 T 細胞を誘導、クローン化した。これまでに白血病細胞を傷害できる HLA-DPB1*09:01 および DPB1*03:01 拘束性の T 細胞クローンを樹立し、T 細胞受容体遺伝子 (TCR) の配列を特許申請 (出願番号 2021-055988) した。

本研究では、①現在進行中である HLA-DPB1*02:01 および HLA-DPB1*04:02 反応性 T 細胞「株」から T 細胞クローンを樹立して機能解析および、TCR 遺伝子を取得すること、および、②これまでに樹立した T 細胞からクローンから得た TCR 遺伝子と今回得られる TCR 遺伝子を導入した TCR-T 細胞を作成し、超免疫不全マウスに生着させた白血病を治療するモデルにて有効性の確認をすることを目標とする。

2. 研究の対象ならびに方法

新規 T 細胞クローンの樹立と機能評価：

HLA-DPB1*02:01、DPB1*04:02 不適合移植を受けた 2 名の患者の末梢血を移植前の患者末梢血単核球、EBV 不死化ドナー B 細胞株 (B-LCL)、CD86 導入 HLA 欠損 K562 に不適合 DP 遺伝子を導入したもので刺激を行い、不適合 HLA-DP 分子に反応する T 細胞株を得た。これを限界希釈法でクローニングし、不適合 HLA-DP 遺伝子導入 HeLa (非血液細胞とみなす) に反応せず、移植前患者血液由来 B-LCL に反応するクローンのみを特定し、拡大培養した。次いで様々な HLA-DP 型を持つ細胞のパネルや、不適合 HLA-DP 導入白血病株パネルと反応させ、HLA-DP 拘束性や白血病細胞特異性を確認した。以上で目的に合致したものが得られたため、RT-PCR 法で TCR 遺伝子をクローニングして遺伝子配列を決定し、

TCR 遺伝子改変 (TCR) -T 細胞を作成した。

TCR 遺伝子改変 T 細胞の作成と、超免疫不全マウスでの治療モデルの確立：

TCR 遺伝子の導入は内在性 TCR 抑制配列を組み込んだレトロウイルスベクターを用いて行った。TCR 遺伝子はコドンの適正化を行うほか、 $\alpha \cdot \beta$ 鎖が安定的に会合するようにアミノ酸置換を行った。白血病細胞は研究協力施設である愛知医科大学および藤田医科大学より提供を受けた。

養子免疫実験では、超免疫不全 NSG マウスの尾静脈もしくは眼窩静脈叢より HLA-A2 / HA-1H 遺伝子強制発現 K562 細胞株、DPB1*09:01 およびルシフェラーゼを強制発現させた U937 細胞株をそれぞれ移植し、5 日後の時点でそれぞれの抗原型に特異的な TCR を遺伝子導入した健康人末梢血 T 細胞を養子移入した。その後、定期的にルシフェリンを腹腔内投与し IVIS 下にてバイオイメージングを行った。また必要に応じて末梢血の白血病細胞の動態や、安楽死時点で骨髄や脾臓、肝臓等での白血病細胞の残存の評価を予定した。

3. 研究結果

新規 T 細胞クローンの樹立と機能評価：

・HLA-DPB1*02:01 特異的 T 細胞クローンの樹立は、同 DP 抗原不適合移植を受けた患者の移植後 40 日目および 100 日目に採取した末梢血の CD4 陽性 T 細胞を用いて行った。培養 14 日後の細胞増殖は第 40 日目検体で不変、第 100 日目検体で 13 倍であったため、後者よりクローニングを行った。合計で 82 個のクローンが得られ、特異性試験の結果合計で 18 クローンが HLA-DPB1*02:01 と反応した。このうち白血病細胞株との反応性が良好な 5 クローン (#2, #3, #9, #2, #15) を選択し、さらに患者から得られた白血病と反応させたところ #2 が良好なインターフェロン γ 産生性を示したため、このクローンより TCR 遺伝子の同定・獲得を試みた。TCR β 鎖は V24-1*01、J2-1*01、D2*02、 α 鎖は V13-1*02、J20*01 と判定された。

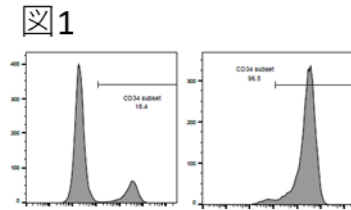
・DPB1*04:02 特異的 T 細胞クローンの樹立は、上記と同様に行った。本症例では第 110 日目検体から得られた T 細胞株の増殖と特異性が不良であったが、第 40 日目検体から得られた細胞株は 20 倍増殖し、合計で 136 個のクローンが得られた。特異性試験で 21 クローンに絞り、最終的に血液細胞株に対してのみ反応性を示した 2 クローン (#2, #5) が患者から得られた白血病細胞に対してインターフェロン γ を産生したため TCR 遺伝子の同定・獲得を試みた。TCR β 鎖は V7-9*03、J1-4*01、D1*01、 α 鎖は V29DV5*01、J53*01 と判定された。

現在、得られた TCR 配列をもとに TCR 遺伝子導入用のベクターの合成を実施中である。

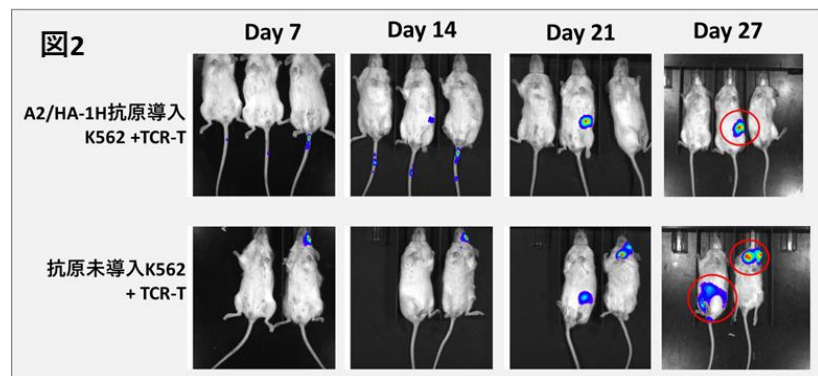
TCR 遺伝子改変 T 細胞の作成と、超免疫不全マウスでの治療モデルの確立：

HLA-DPB1*09:01 特異的 T 細胞クローンから得られた TCR 遺伝子配列をもとにレトロウイルスベクターの合成を行った。さらに陽性コントロールとして、過去に TCR-T 細胞作成

の実績のある HLA-A2 拘束性 HA-1H マイナー組織適合抗原を認識する細胞傷害性 T 細胞の TCR 遺伝子をベクター作成に用いた。ベクターはウイルスパッケージング細胞に導入し、その上清を健康人 T 細胞へ感染させた。T 細胞への TCR 遺伝子導入の成否と濃縮は抗 TCR サブタイプ抗体または共発現マーカーで行った。図 1 の左パネルが陽性選択による濃縮前、右パネルが濃縮後の結果を示す。



次いで濃縮した T 細胞をさらに増幅し、 2×10^7 個程度の遺伝子改変 T 細胞を得た。ポジティブコントロール実験では抗原遺伝子 (HLA-A2 および HA-1H マイナー組織適合抗原) 導入 K562/Luciferase 細胞 (N=3)、未導入 K562/Luciferase 細胞 (N=2) を尾静脈 (不可能な場合は眼窩静脈叢) から移植し、5 日目に本抗原特異的 TCR を遺伝子導入した健康人 T 細胞を静注した。移植後 27 日目の段階では抗原未導入 K562 細胞からのルミネッセンスが 2 匹中 2 匹で確認されたのに対し、抗原導入 K562 細胞からのルミネッセンスは 3 匹中 1 匹のみで確認された。HLA-DPB1*09:01 特異的 TCR-T 細胞を用いた実験は、報告書記載時点で経過観察中であり、結論は出ていない状態にある。



4. 考察

目的としていた HLA-DPB1*02:01 および HLA-DPB1*04:02 反応性 T 細胞クローンを樹立し、また TCR-T 細胞作成を進めていた 2 つの TCR-T 細胞についてマウスにて *in vivo* 治療効果を検討した。HA-1H マイナー抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞による移植後再発白血病の臨床試験は欧米で実施中である^{2,3)}。申請者らが樹立した HA-1H 特異的 T 細胞クローンの TCR を導入した T 細胞により、マウスモデルで抗腫瘍効果を示唆する結果が得られた。実験に用いたマウス数に限りがあり、各治療群のマウス数を増やして再確認の必要があるが、再現性が示されれば臨床試験に繋げることが可能と考えられる。

HLA-DPB1*09:01 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞による治療効果は観察期間が短く結論は困難である。不適合 HLA-DP を標的とした養子 T 細胞免疫療法は現在ドイツおよびオランダのグループが研究を進めており^{4,5)}、HLA-DPB1*04:01/04:02 特異的 T 細胞を用いたマウスモデルでの検証が報告されている⁴⁾。彼らは患者由来の白血病細胞を用いており、より臨床応用に近い検討となる。HLA-DP 遺伝子を強制発現した細胞株と異なり、患者由来白血病細胞は HLA 発現低下や欠損を来した細胞も含まれる多様性があるため、養子免疫細

胞療法の特長や欠点をより明確にすることができると考えられる。現在検討中の細胞株を用いた実験結果が良好であれば、次のステップとして患者検体を用いた検討を行う必要があると考える。

5. 文献

- 1) Kawase T, et al. Blood. 2009 Mar 19;113(12):2851-8.
- 2) Dossa RG, et al. Blood. 2018 Jan 4;131(1):108-120.
- 3) van Balen P, et al. Front Immunol. 2020 Aug 20;11:1804.
- 4) Herr H, et al. Leukemia. 2017 Feb;31(2):434-445.
- 5) Rutten CE, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2013 Jan;19(1):40-8.

6. 論文発表

- 1) Katsuyama N, et al. T cell receptor-engineered T cells derived from target human leukocyte antigen-DPB1-specific T cell can be a potential tool for therapy against leukemia relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. Nagoya J Med Sci (In press) .
- 2) Carlyne Barakat, ら. 不適合 HLA-DP を同種標的とした白血病に対する TCR-T 細胞療法の開発. 第 45 回日本造血・免疫細胞療法学会 2023 年 2 月 10 日.
- 3) 赤塚 美樹, ら. 非血縁者間移植患者からの不適合 HLA-DP 特異的クローンの樹立. 第 84 回日本血液学会総会 2022 年 10 月 15 日.