

学 位 論 文 要 旨

氏 名 丸田 雅樹

論 文 名

改変抗体 CAR/BiTE で誘導されるがんに対する T 細胞反応性の比較解析

【背景】改変抗体を応用した T 細胞療法は難治性腫瘍に対する治療法として有望視されている。近年の遺伝子改変技術の進歩により、キメラ型抗原受容体 (CAR: chimeric antigen receptor) と二重特異性抗体 (BiTE: bispecific T-cell engager) の研究開発が進み、臨床試験でも難治性造血器腫瘍に対して有効性が示された。CD19 分子を認識する CAR および BiTE に代表されるように、これまでに報告された多くの CAR/BiTE は、HLA/ペプチド複合体とは異なる表面抗原を認識する一本鎖抗体 (scFv: single chain fragment variable) を用いて作製されている。そのため、T 細胞受容体 (TCR: T-cell receptor) と異なり、治療効果と安全性に深く関わる標的特異性や交差反応性について詳細な解析を行うことが困難であった。そこで今回我々は、がん細胞表面に選択的に発現されている HLA/ペプチド複合体を認識する同一の scFv を保持した CAR/BiTE を使用し、ペプチド配列と HLA アリルとを変化させながら、CAR および BiTE の標的抗原に対する特異性、がん細胞に対する反応性および安全性に繋がる潜在的な交差反応性について、*in vitro/in vivo* ともに詳細な比較検討を行った。

【方法】NY-ESO-1 は難治性骨髄腫を含めたがん細胞内において発現がみられるがん精巢抗原である。さらに、HLA-A*02:01/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 複合体 (A2/NY-ESO-1₁₅₇) が、がん細胞表面において発現されていることが報告されている。そこで、A2/NY-ESO-1₁₅₇ を特異的に認識する scFv をもとに CAR および BiTE を作製し、A2/NY-ESO-1₁₅₇ を発現する骨髄腫細胞をモデルとして、標的特異性と交差反応性とを詳細に検討した。HLA-A*02:01 陽性 T2 細胞株、HLA-A*02:01 分子、もしくは A*02:06 分子を遺伝子導入した K562/A*02:01 (K562/A2)、K562/A*02:06 細胞株、K562/A2 に NY-ESO-1 遺伝子を導入した K562/A2/NY-ESO-1 細胞株、骨髄腫細胞株などを標的細胞として用いた。また、NY-ESO-1₁₅₇ ペプチド、ならびに類似ペプチドを合成して、標的親和性と交差反応性の検討を行った。CAR/BiTE で活性化された T 細胞の標的細胞に対する反応性については、細胞内サイトカイン染色、⁵¹Cr 放出試験を用いて比較検討した。また、HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性の骨髄腫細胞株である U266 にルシフェラーゼ遺伝子を導入して樹立した U266/SLR 細胞株を NOG マウスに移植し、CAR/BiTE で活性化された T 細胞の *in vivo* 抗腫瘍効果について発光イメージング法を用いて比較検討を行った。

【結果】 A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 CAR-T 細胞および A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 BiTE により活性化された末梢血 T 細胞は、いずれも A2/NY-ESO-1₁₅₇ ペプチド特異性を示し、A2/NY-ESO-1₁₅₇ を内在性に発現する K562/A2/NY-ESO-1 細胞株、HLA-A2 陽性 NY-ESO-1 陽性の骨髄腫細胞株を認識し傷害した。また、活性化 T 細胞を用いた検討において、CAR-T 細胞と BiTE 刺激 T 細胞が、標的細胞に対して同等の標的親和性を示すことが明らかとなった。その結果、U266 移植 NOG マウスを用いた *in vivo* 実験系においても同等の抗腫瘍効果を確認した。さらに、CAR-T 細胞と BiTE により活性化された末梢血 T 細胞は、HLA-A*02:01 により提示された類似ペプチドおよび HLA-A2 アリル (A*02:01、A*02:06) により提示された NY-ESO-1₁₅₇ ペプチドに対してそれぞれ異なる強度で交差反応性を示したことから、CAR および BiTE の立体構造が交差反応性に影響する可能性が示唆された。

【結論】 改変抗体 CAR/BiTE を用いた T 細胞免疫療法は、HLA/ペプチド複合体をも標的とできること、そして T 細胞が活性化された条件においては、骨髄腫に対して CAR/BiTE とともに同等の治療効果が期待できることが示された。また、scFv を応用した CAR/BiTE であっても、T CR と同様に潜在的交差反応性を保持しうるが、その反応性は改変抗体の立体構造に影響される可能性が示された。従って本研究成果は、今後様々な改変抗体を用いた T 細胞免疫療法の開発研究において、有効性と安全性とを把握する上で重要な知見となることが期待される。

【承認された倫理審査機関】

本研究は、愛媛大学医学部医学系研究科のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会、遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験委員会により承認されている。

キーワード (3 ~ 5)	Chimeric antigen receptor (CAR) Bispecific T-cell engager (BiTE) 標的親和性 交差反応性 多発性骨髄腫
---------------	---