

70. 抗体と T 細胞受容体を融合させた新規がん免疫療法

小林 栄治

Key words : キメラ受容体, TRAIL, がん免疫療法

*富山大学 医学薬学研究部 (医学)
免疫学講座

緒 言

がん治療領域では、抗体医薬品の作用機序として抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害に加え、新たな作用機序としてアポトーシス誘導が注目されており、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) などのアポトーシス誘導受容体を標的にした抗体医薬の開発が世界中で活発に行われている。我々もヒト TRAIL 受容体を免疫したヒト化マウスより、複数の完全ヒト TRAIL 受容体抗体の作製を行い、これらの抗体は抗体結合部位の違いによって TRAIL のアポトーシス誘導効果を促進もしくは阻害することを報告した¹⁾。しかしながら、これら抗体単独のアポトーシス誘導には 2 次抗体の架橋が必要だった。生体内ではホモ 3 量体 TRAIL の結合により TRAIL 受容体が 3 量体を形成するために強いアポトーシスが誘導されると考えられている。従って、抗原に結合する部位が 2 価の抗体によるアポトーシス誘導には限界があると考えられる。一方、がん抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR: T cell receptor) 遺伝子を患者末梢血の T 細胞に導入し、人為的に大量のがん特異的 T 細胞を短期間の培養で作製し、輸注するアプローチが検討されている。このような状況下、我々は独自に樹立した TCR 遺伝子取得法を用いて肝臓がん患者より肝がん抗原特異的 TCR 遺伝子を複数取得し、これらの TCR 導入 T 細胞ががん抗原特異的に細胞を傷害できることを示したが、その効果はがんの完全退縮には不十分なものだった²⁾。近年、抗体と細胞移入療法を組み合わせた、がん抗原特異的なキメラ受容体 (CAR: Chimeric Antigen Receptor) を導入した T 細胞を用いた CAR 導入 T 細胞療法の研究が新たな治療法として研究されている。CAR はがん抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体由来の単鎖抗体 (scFv: single chain variable fragment) と、TCR の細胞質シグナル伝達ドメインである CD3ζ 鎖を遺伝子工学的に結合させて作製された、がん抗原を特異的に認識できる受容体である。その後の遺伝子導入技術の進展により、CAR は細胞内領域が CD3ζ 鎖のみの第 1 世代に続き、新たなドメインを追加した第 2 世代 (T 細胞活性化の副刺激因子 CD28 を追加)、第 3 世代 (T 細胞活性化の副刺激因子 4-1BB を追加) と改良が進められている。このような CAR 導入 T 細胞療法には抗体にはない多価による強い抗原架橋効果と CAR 導入 T 細胞の生体内での長期生存による長期的な抗腫瘍効果が期待されている。このような研究状況を踏まえ、本研究では CAR/TCR 遺伝子を共遺伝子導入したハイブリッド型キラー T 細胞を作製し、がんに対する細胞傷害活性を検証することを目的とした。しかしながら、TRAIL 受容体抗体の CAR 単独でどの程度細胞傷害活性を発揮するか不明であった。そこで抗 TRAIL 受容体抗体 scFv と CD28 分子、4-1BB 分子に加え、単独でもキラー細胞が活性化するように CD3ζ 分子の細胞内ドメインを連結した CAR (TR-CAR) 発現ベクターを作製し、TR-CAR 単独でのキラー T 細胞の細胞傷害活性誘導能について検討した。

方 法

抗 TRAIL 受容体抗体の重鎖と軽鎖をリンカーでつないだ scFv とシグナル分子である CD28 分子、4-1BB 分子、CD3ζ 分子の細胞内ドメインを連結したキメラ受容体 CAR (TR-CAR) 発現ベクターを作製した (図 1)。作製した TR-CAR 発現ベクターをパッケージング細胞に導入し、レトロウイルスを作製した。作製したレトロウイルスを用いて、ヘルパー T 細胞株である Jurkat 細胞、NK 細胞株である KHYG-1 細胞及び健常人末梢血リンパ球に導入し TR-CAR を細胞表面に発現させた。これら TR-CAR 発現細胞の標的細胞に対する細胞傷害活性を測定した。標的細胞には

*現所属 : Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute

TRAIL 受容体を同程度発現する 4 種類の細胞株 (Colo205, Daudi, MCF7, K562) を用いた。陰性コントロールには細胞外領域がヒト CD8 で細胞内領域が TR-CAR と同様の構造を持つ CD8-CAR を用いた。

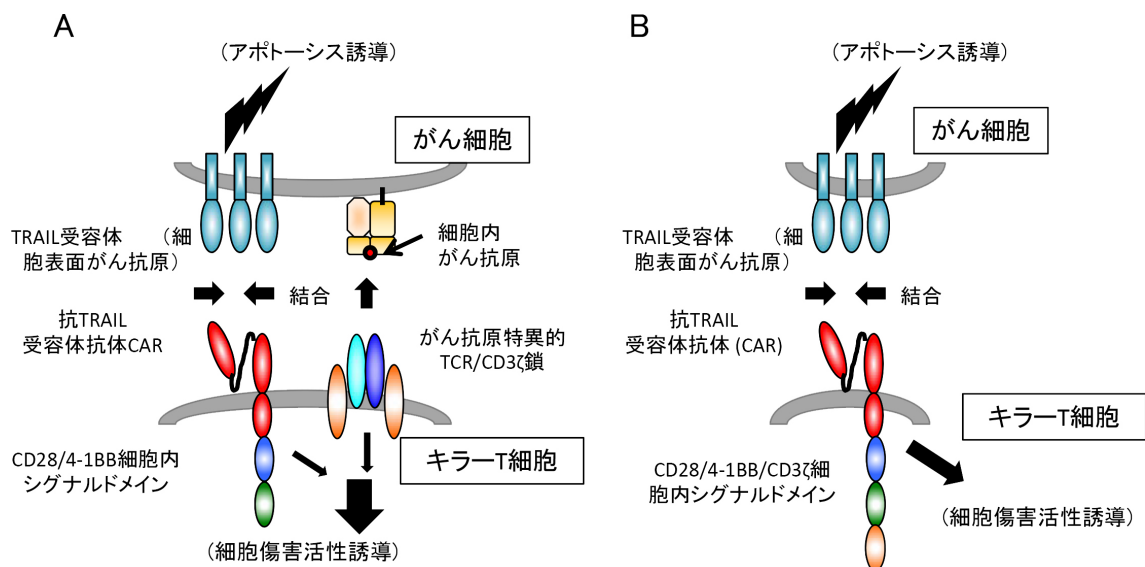


図 1. CAR/TCR 導入キラー T 細胞によるがん細胞傷害機構の模式図。

A) TRAIL 受容体抗体 CAR により, TRAIL 受容体発現がん細胞のアポトーシス誘導とキラー T 細胞への補助シグナルが伝達される. この補助シグナルのみではキラー T 細胞は活性化されない. TCR/CD3 ζ 鎖複合体ががん抗原に結合することによって初めてキラー T 細胞の細胞傷害活性が誘導される. B) TRAIL 受容体架橋抗体 CAR により, TRAIL 受容体発現がん細胞のアポトーシス誘導に加え, キラー T 細胞への主・補助シグナルの両方が伝達されるため, キラー T 細胞の細胞傷害活性が誘導される.

結 果

初めに TR-CAR を発現したヘルパー T 細胞株 Jurkat 細胞 (TR-CAR-Jurkat) の細胞傷害活性を検討した. TR-CAR-Jurkat は Colo205 に対してエフェクター細胞対標的細胞比が 13~50 の時に 9~12% の細胞傷害を認めたが, その他の細胞株への細胞傷害活性は観察されなかった. 陰性コントロール CD8-CAR-Jurkat はいずれの細胞株に対しても細胞傷害活性は認められなかった (図 2A). TR-CAR-Jurkat は Colo205 細胞との共培養により, 活性化マーカー 4-1BB の発現が誘導されていることから, Colo205 細胞表面に発現する TRAIL 受容体と Jurkat 細胞表面に発現する TR-CAR が架橋したことにより Jurkat 細胞内へシグナルが伝達されていることが示唆された. しかしながら細胞傷害性物質であるグランザイム B の分泌は認められなかったことから, TR-CAR-Jurkat は Colo205 の細胞表面の TRAIL 受容体を架橋することにより, Colo205 に細胞傷害を誘導していることが示唆された.

次に TR-CAR を発現したヒト NK 細胞株である KHYG-1 細胞 (TR-CAR-KHYG-1) の細胞傷害活性を検討した. TR-CAR-Jurkat とは異なり, TR-CAR-KHYG-1 は Colo205 のみならず, 用いた細胞株すべてに対して高い細胞傷害活性が認められた (図 2B). 一方, CD8-CAR-KHYG-1 においても K562 に対しては TR-CAR-KHYG-1 と同程度の細胞傷害活性であったことから, K562 は KHYG-1 による非特異的な NK 活性により傷害されていることが示唆された. TR-CAR-KHYG-1 は Colo205 細胞との共培養により活性化マーカー 4-1BB の発現が誘導されており, 細胞傷害性物質であるグランザイム B の分泌が認められた. これらの結果から TR-CAR-KHYG-1 細胞は標的細胞の TRAIL 受容体架橋によるアポトーシス誘導のみならず, パーフォリン・グランザイムによる細胞傷害の 2 つのメカニズムで標的細胞に細胞死を誘導している可能性が示唆された.

更に TR-CAR をヒト末梢血リンパ球 (Peripheral Blood lymphocyte: PBL) に導入し (TR-CAR-PBL), その細胞傷害活性を検討した. TR-CAR-PBL は Colo205 に対してエフェクター細胞対標的細胞比の 13~50 の時に 9~17% の細胞傷害を認めた (図 2C). KHYG-1 細胞と同様に用いた細胞株すべてに対して細胞傷害活性が認められたが, KHYG-1 細胞とは異なり K562 に対する非特異的な細胞傷害活性はほとんど認められなかった. TR-CAR-PBL は Colo205 細胞と

の共培養により活性化マーカー 41BB の発現が誘導されており，グランザイム B の分泌が認められた．これらの結果から NK 細胞株同様に，TR-CAR-PBL は標的細胞の TRAIL 受容体架橋によるアポトーシス誘導のみならず，パーフォリン・グランザイムによる細胞傷害の 2 つのメカニズムで標的細胞に細胞死を誘導していることが示唆された．しかしながら，NK 細胞感受性細胞 K562 に対する非特異的な細胞傷害が認められないことから，これら細胞傷害活性のエフェクター細胞はキラー T 細胞が主体である可能性が考えられた．

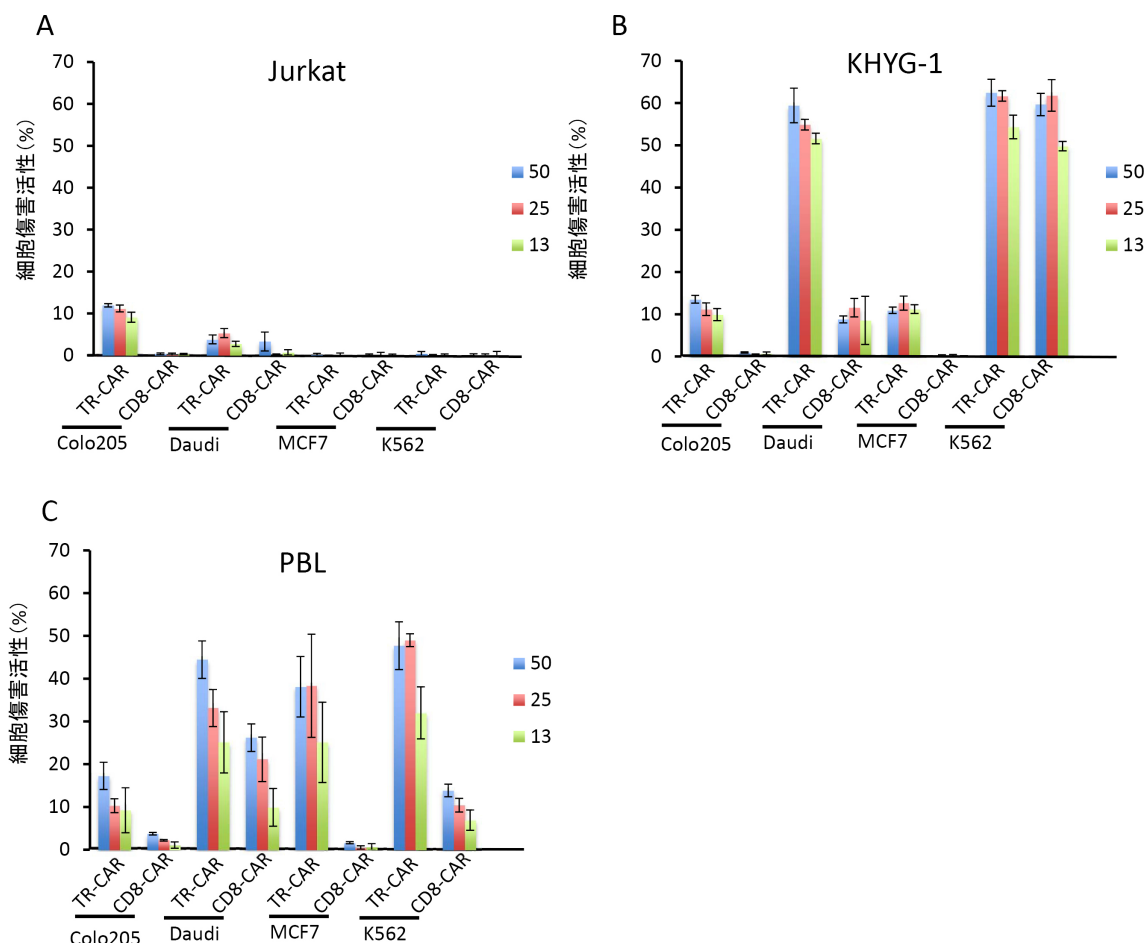


図 2. CAR 導入エフェクター細胞の細胞傷害活性の測定.

抗 TRAIL 受容体 CAR を (A) ヘルパー T 細胞株である Jurkat 細胞, (B) NK 細胞株である KHYG-1, (C) 健常人末梢血リンパ球 (PBL) に導入し, TRAIL 受容体を発現する 4 種類の標的細胞 (Colo205, Daudi, MCF7, K562) に対する細胞傷害活性を測定した. 陰性コントロールには細胞外領域がヒト CD8 で細胞内領域が TR-CAR と同様の構造を持つ CD8-CAR を用いた. 標的細胞に ^{51}Cr を取り込ませ, 遊離した ^{51}Cr 量により細胞傷害を算出した. 細胞傷害活性 (%) = (CAR 導入エフェクター細胞存在時の放出量 - 自然放出量) / (最大放出量 - 自然放出量) \times 100. CAR 導入エフェクター細胞対標的細胞比 50:1 (青), 25:1 (赤), 13:1 (緑). Error bar: SD.

考 察

本研究では TRAIL 受容体抗体 CAR を導入したエフェクター細胞が, 1) 標的細胞上の TRAIL 受容体架橋によるアポトーシス誘導, 2) CAR 導入エフェクター細胞の細胞傷害活性誘導の 2 つのメカニズムで標的細胞を傷害するかどうかを検討した. ヘルパー T 細胞株である Jurkat 細胞では標的細胞上の TRAIL 受容体を架橋することによってのみ細胞傷害が誘導され, NK 細胞株である KHYG-1 細胞や健常人末梢血リンパ球では標的細胞上の TRAIL 受容体の架橋及び CAR を介したエフェクター細胞による細胞傷害活性の誘導の 2 つのメカニズムによって行われていることを明らかにし, 本研究成果を学術誌に報告した³⁾. これまで我々は独自の完全ヒト抗体クローニング技術を用いて, TRAIL

受容体の結合部位が異なる TRAIL 受容体抗体 10 種類を取得している⁴⁾。今後は、今回用いた抗体以外についても CAR 遺伝子を作製し、その細胞傷害活性を比較する。その結果、最も効果的に TRAIL 受容体発現細胞に細胞死を誘導する TR-CAR を同定する。また、今回 CAR の膜貫通ドメインには CD28 を用いたが、CD3 ζ の膜貫通ドメインを用いた CAR の方がより効率的にシグナル伝達が誘導されると報告されていることから⁵⁾、CAR の細胞内構造の最適化を行う。その後、同定した TR-CAR の CD3 ζ 分子を除いた遺伝子と我々が独自にクローニングした肝細胞がん抗原特異的 TCR を導入したキラー T 細胞 (図 1) の肝細胞がんに対する細胞傷害活性を測定する。これらの解析により、作製したハイブリッド型キラー T 細胞は TCR と抗体の両方の長所を備えたがん細胞傷害性 T 細胞であるかどうかの検討を行う。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lin, Z., Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Obata, T., Ishida, I., Jin, F., Kishi, H. & Muraguchi, A. : Post-translational modification of TRAIL receptor type 1 on various tumor cells and the susceptibility of tumors to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **395** : 251-257, 2010.
- 2) Kobayashi, E., Mizukoshi, E., Kishi, H., Ozawa, T., Hamana, H., Nagai, T., Nakagawa, H., Jin, A., Kaneko, S. & Muraguchi, A. : A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of patients with cancer within 10 days. *Nature Med.*, **19** : 1542-1546, 2013.
- 3) Kobayashi, E., Kishi, H., Ozawa, T., Hamana, H., Nakagawa, H., Jin, A., Lin, Z. & Muraguchi, A. : A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453** : 798-803, 2014.
- 4) Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Lin, Z., Obata, T., Ishida, I., Kishi, H. & Muraguchi, A. : Generation of TRAIL-receptor 1-specific human monoclonal Ab by a combination of immunospot array assay on a chip and human Ab-producing mice. *Eur. J. Immunol.*, **40** : 3591-3593, 2010.
- 5) Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M. & Gilham, D. E. : The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3 ζ transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J. Immunol.*, **184** : 6938-49, 2010.