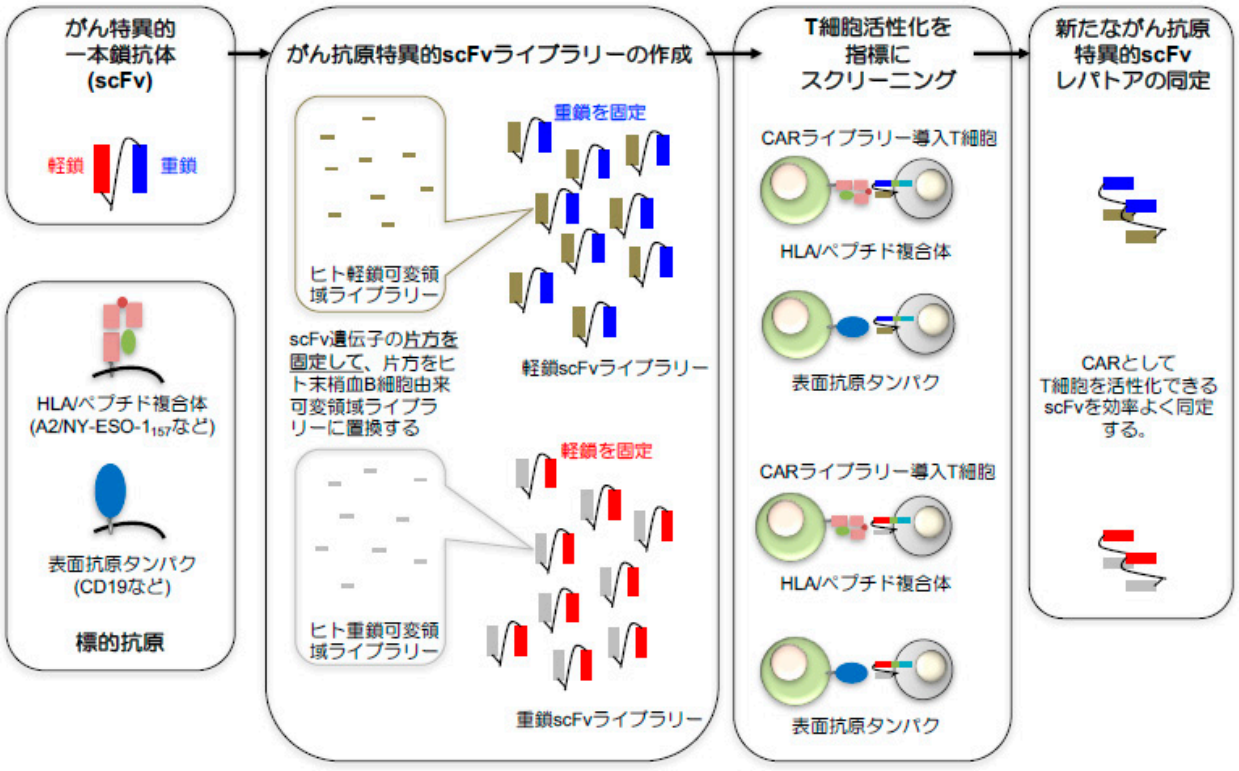
219　新規がん特異的遺伝子改変T細胞療法の開発研究	越智　俊元

【目的】キメラ抗原受容体（CAR：chimeric antigen receptor）に代表されるがん特異的T細胞免疫療法の開発研究が盛んに進められている。このような一本鎖抗体（scFv）をベースとしたT細胞免疫療法の確立によって、T細胞受容体（TCR：T-cell receptor）が抱える様々な課題を克服できる可能性が示された。本研究課題では、改変抗体T細胞療法を推進するために、様々ながん抗原特異的scFvを、T細胞活性化を指標として網羅的かつ効率よくスクリーニングする手法を確立する。そしてT細胞免疫療法に最適なscFvレパトアを作製して臨床応用に繋げる。

【方法】HLA-A*02:01/NY-ESO-$1_{157\text{-}165}$（A2/NY-ESO-1_{157}）を特異的に認識する抗体（3M4E5-scFv）をモデルとする。3M4E5-scFvの可変領域配列の片方を、ヒト免疫グロブリン由来可変領域ライブラリーと組み合わせ、A2/NY-ESO-1_{157}特異的scFvライブラリーを構築する。このscFvライブラリーをCARに組み込んでCARライブラリーを作製し、T細胞応答性をリードアウトした完全ヒト型scFvスクリーニングとscFv機能解析とを行った。

【結果】本手法を用いて、我々は新規A2/NY-ESO-1_{157}特異的scFvレパトアの同定に成功した。A2/NY-ESO-1_{157}特異的重鎖可変領域を固定して、異なる軽鎖可変領域をもつCAR発現細胞株を樹立したところ、A2/NY-ESO-1_{157}に対してそれぞれ異なる標的親和性と交差反応性とを示すことが明らかとなった。

T細胞活性化を指標としたがん特異的scFvスクリーニング法



219. 新規がん特異的遺伝子改変 T 細胞療法の開発研究

越智　俊元

愛媛大学 大学院医学系研究科 血液・免疫・感染症内科学講座

Key words：T 細胞免疫療法，一本鎖抗体，キメラ抗原受容体，可変領域ライブラリー，NY-ESO-1

緒　言

近年、がんに対する T 細胞免疫療法が目覚ましい発展を遂げている。がん細胞に表出される HLA／ペプチド複合体を特異的に認識する T 細胞受容体（TCR：T-cell receptor）遺伝子導入療法が国内外で進められてきた［1］。これらの臨床試験によって、TCR の標的 HLA／ペプチド複合体に対する結合力（標的親和性）を十分に高めることが、高い治療効果に繋がることが示されている。しかしながら、TCR の標的親和性を人為的に向上させた際、がん特異性が低下し、正常細胞も認識する危険性が示唆されている。

このような TCR に関わる課題を解決する手段の一つとして、抗体の重鎖と軽鎖可変領域配列をもとに一本鎖抗体（scFv：single chain fragment variable）を作製し、キメラ抗原受容体（CAR：chimeric antigen receptor）に応用する技術開発が進められた。これらの治療法の一部はすでに承認を受け、一般臨床の場でも用いられる段階に至っている。scFv は TCR と標的分子を認識する様式が異なり、かつ数千倍標的親和性が高いとされている。従って、CAR を利用することによって、安全性を担保しつつ T 細胞をがん特異的に活性化し、がん細胞を効率的に排除できる可能性がある。

そこで本研究では、各種がん細胞表面に発現されている HLA-A*02:01/NY-ESO-$1_{157\text{-}165}$ ペプチド複合体（A2/NY-ESO-1_{157}）を標的モデルとして、A2/NY-ESO-1_{157} を特異的に認識する既知の抗体（3M4E5）の可変領域配列と、ヒト免疫グロブリン可変領域ライブラリーとを組み合わせ、scFv ライブラリーを作製する。作製した scFv ライブラリーを CAR の基本構造に組み込んで、CAR ライブラリーを作製して、T 細胞の応答性をリードアウトとした独自の完全ヒト型 scFv スクリーニング法を確立する。さらに、新たに同定した scFv レパトアを応用して、新規抗原特異的 CAR を作製し、A2/NY-ESO-1_{157} を標的とした造血器腫瘍や固形癌に対する CAR-T 細胞療法に応用する。

方　法

1.　細胞

K562 細胞株、Plat-A 細胞株（東大医科学研究所、北村俊雄先生より供与）、Jurkat 76 細胞株（Leiden 大学、Dr. Heemskerk より供与）、PG13 細胞株、T2 細胞株を使用した。ヒト末梢血単核球は健常人より単離して、使用時まで液体窒素内で保管した。

2. 遺伝子導入

レトロウイルスベクターに組み込んだ目的遺伝子を Plat-A 細胞に導入してレトロウイルスを得た。これらレトロウイルスを用いて、K562 細胞株に *CD80*、*CD83*、および *HLA-A*02:01* 遺伝子を導入した細胞株（K562／A2／CD80／CD83）を樹立した。また、同様にして、Jurkat 76 細胞株に新規 scFv を保持する *CAR* 遺伝子を導入した。

3. キメラ抗原受容体

A2/NY-ESO-1_{157} を特異的に認識する抗体（clone 3M4E5）の可変領域を利用して、3M4E5-scFv を作製した。これを、CD28 膜貫通領域、CD3 鎖を持つ第二世代 CAR に組み込んで、3M4E5-CAR を作製した。*CAR* 遺伝子導入 T 細胞を検出するために、*NGFR（nerve growth factor receptor）* 遺伝子をタグ遺伝子として利用した。

4. 可変領域ライブラリーの作製

ヒト末梢血単核球より CD19 マイクロビーズを用いて末梢血 B 細胞を単離した。RNA を単離した後、5'RACE 法に準じて cDNA を作製した。軽鎖もしくは重鎖定常領域を認識するプライマーを用いて 5'RACE PCR を行なった。この PCR 産物を鋳型として、J 領域特異的なプライマーセットを利用して semi-nested PCR を行い、ドナー毎に可変領域ライブラリーソースを作製した。

5. A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリーの作製

3M4E5-scFv の片方の鎖を固定して、もう片方を可変領域ライブラリーソースに置換することで、A2/NY-ESO-1_{157} scFv ライブラリーを作製した。これを第二世代 CAR の scFv 領域に組み込んで、A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリーを作製した。

6. A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリーT 細胞の作製

Plat-A 細胞株を用いて A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリーを含有するレトロウイルスを得た。これを PG13 細胞株に導入して、GaLV レトロウイルスを作製した。末梢血 T 細胞を 50 ng/mL 抗 CD3 抗体（clone OKT3）、100 U/mL IL-2 存在下で刺激した後、CAR ライブラリー遺伝子を末梢血 T 細胞に導入して、A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリー T 細胞を樹立した。MACS ビーズを用いて NGFR 発現細胞を単離し、NY-ESO-1_{157} ペプチドをパルスした K562／A2／CD80／CD83 細胞株で繰り返し刺激して、A2/NY-ESO-1_{157} 特異的 CAR-T 細胞を濃縮した。

7. フローサイトメトリー

A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリー遺伝子を導入した T 細胞を、A2/NY-ESO-1_{157} テトラマーおよび A2/HIV Gag_{77} テトラマーで染色し、CD8、CD4、NGFR 抗体で共染色した。さらに、FACSAria を用いて $NGFR^+CD8^+$A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性細胞および $NGFR^+CD4^+$A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性細胞を単離した。CAR-T 細胞の標的特異的サイトカイン産生を解析するために、TNF-α抗体、IL-2 抗体、IFN-γ抗体を用いて CAR-T 細胞内染色を行なった。

結　果

1. 3M4E5-CAR 導入 T 細胞の A2/NY-ESO-1_{157} 特異性

A2/NY-ESO-1_{157} CAR（3M4E5-CAR）を遺伝子導入した T 細胞は、A2/NY-ESO-1_{157} テトラマーによって特異的に染色された。さらに、HLA-A*02:01 陽性である T2 細胞株に NY-ESO-1_{157} ペプチドをパルスした標的細胞を特異的に認識して、各サイトカインを産生した（図 1）。

2. CAR ライブラリー導入 T 細胞の A2/NY-ESO-1_{157} 特異性

末梢血 T 細胞に A2/NY-ESO-1_{157} CAR ライブラリーを遺伝子導入した。NGFR 陽性細胞を単離し、NY-ESO-1_{157} ペプチドをパルスした K562/A2/CD80/CD83 細胞株で刺激した。3 回刺激後、CAR ライブラリーT 細胞における A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性率を解析した。その結果、軽鎖（Lambda : L 鎖）ライブラリーと 3M4E5 重鎖からなる scFv を保持する CAR ライブラリーT 細胞において、CD8 陽性 T 細胞においても、CD4 陽性 T 細胞においても、有意に A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性細胞が増加した（図 2）。重鎖（H 鎖）ライブラリーと 3M4E5 軽鎖からなる scFv を保持する CAR ライブラリーT 細胞においても、一部のドナーにおいて A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性細胞を検出した（図 2）。

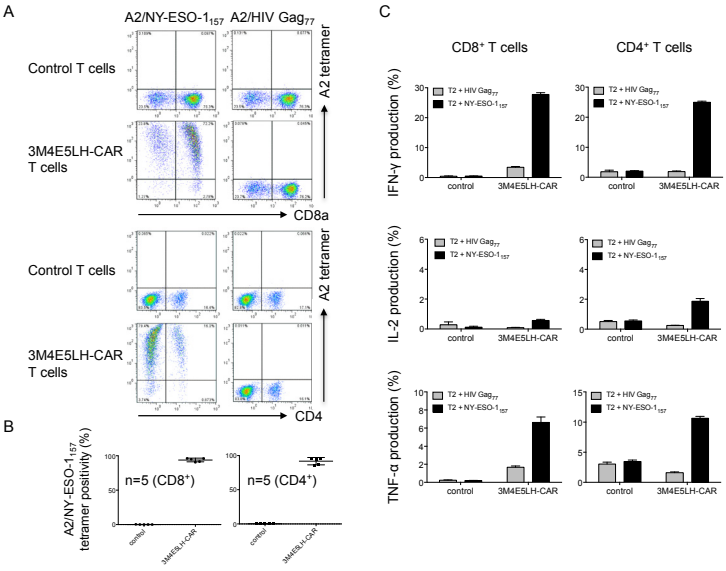


図 1. A2/NY-ESO-1_{157} 特異的 CAR-T 細胞

A) A2/NY-ESO-1_{157} 特異的 scFv（3M4E5-scFv）を組み込んだ第二世代 CAR を末梢血 T 細胞に遺伝子導入して、A2 テトラマーで染色を行った。NGFR 陽性細胞をゲーティングして解析した。

B) 3M4E5-CAR-T 細胞は再現性をもって A2/NY-ESO-1_{157} テトラマーに染色された （n = 5）。

C) 3M4E5-CAR-T 細胞は NY-ESO-1_{157} ペプチドをパルスした T2 細胞を認識して、各サイトカインを産生した。

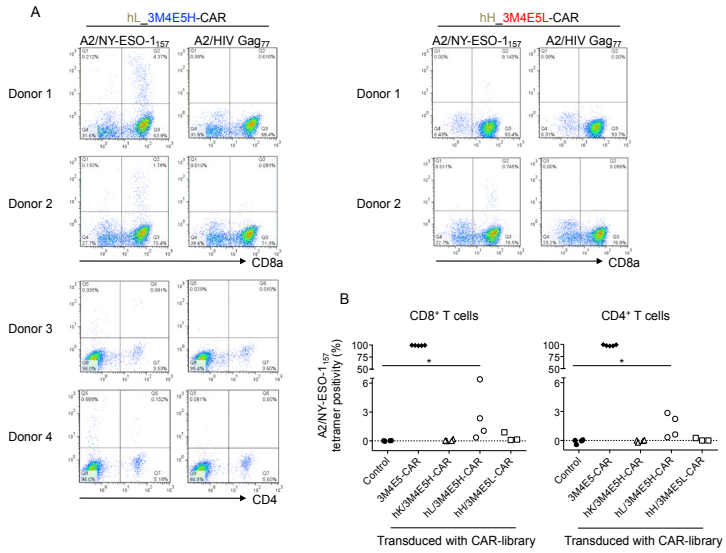


図 2. A2/NY-ESO-1_{157} 特異的 CAR ライブラリーT 細胞

A) L 鎖 CAR ライブラリー、および H 鎖 CAR ライブラリーを末梢血 T 細胞に導入後、A2 テトラマーで染色した。

B) L 鎖 CAR ライブラリーT 細胞は、CD8 陽性 T 細胞も、CD4 陽性 T 細胞も有意に A2/NY-ESO-1_{157} テトラマーに染色された（Mann Whitney test、* $p < 0.05$）。

3. 新規 A2/NY-ESO-1_{157} *scFv* 遺伝子の同定

上記 A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性細胞を単離して、新規 *scFv* 遺伝子の同定を行なった。その結果、全く新しい H 鎖である H1 と、複数の L 鎖とを同定した。さらに、軽鎖（Kappa：K 鎖）ライブラリーと H1 からなる scFv を保持する CAR ライブラリーT 細胞の中から、CD8 陽性 T 細胞において A2/NY-ESO-1_{157} テトラマー陽性細胞を検出したため（図 3）、同様にこの集団を単離して、新規 *scFv* 遺伝子の同定を行なった。その結果、全く新しい複数の K 鎖を同定した（表 1）。

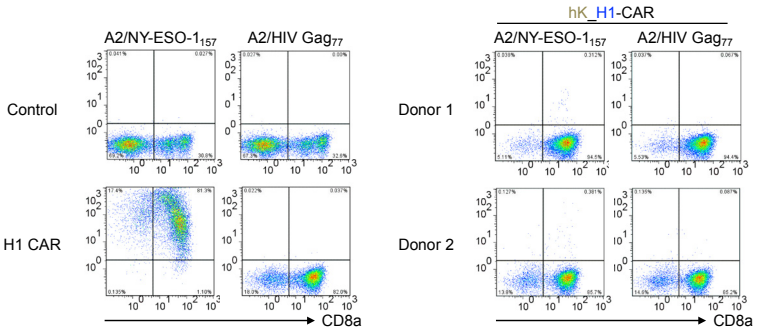


図 3. A2/NY-ESO-1_{157} 特異的 K_H1-CAR ライブラリーT 細胞

H1 を固定した K 鎖 CAR ライブラリーT 細胞を、A2 テトラマーで染色した。

表 1. 新たに同定した A2/NY-ESO-1_{157} 特異的可変領域配列

Clone	V region	J region
Heavy chains		
H1	4-59*01	6*02
3M4E5H	3-20*01	6*02
Light chains (paired with H1)		
K131	1-NL1*01	5*01
K145	1-NL1*01	1*01
K151	1-39*01	5*01
K156	3-15*01	3*01
K160	3-15*01	1*01
3M4E5L	11*01	1*01

3M4E5Lを固定して、H鎖ライブラリーより新たにA2/NY-ESO-1_{157}特異的なH1鎖を同定した。
同様にH1を固定して、K鎖ライブラリーよりA2/NY-ESO-1_{157}特異的な各K鎖を同定した。

4. 新規 A2/NY-ESO-1_{157}-CAR の標的特異性

新しく同定した scFv を保持する *CAR* 遺伝子を、それぞれ Jurkat 76（J76）細胞株に遺伝子導入して、その標的特異性を確認した。図 4 に示す通り、J76/H1_3M4E5L CAR は、J76/3M4E5 CAR 細胞株と同様に A2/NY-ESO-1_{157} テトラマーで染色された。さらに、J76/K_H1 細胞株は、K 鎖を変化させることによって、A2/NY-ESO-1_{157} に対して様々な標的親和性と交差反応性とを示すことが明らかとなった。

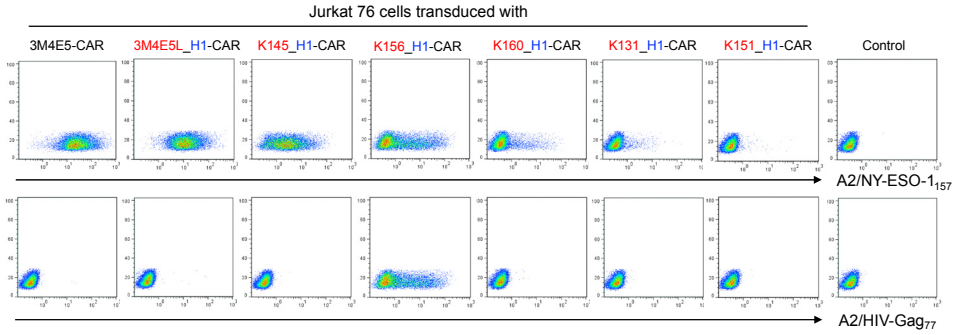


図 4. A2/NY-ESO-1_{157} 特異的新規 *CAR* 遺伝子の標的特異性と交差反応性

H1 と、様々な K 鎖を保持する *CAR* 遺伝子をそれぞれ個別に Jurkat 76 細胞株に遺伝子導入し、A2 テトラマーで染色した。positive control として 3M4E5-CAR を遺伝子導入した Jurkat 76 細胞株を、negative control として NGFR のみ遺伝子導入した Jurkat 76 細胞株を用意した。

考　察

我々は、A2/NY-ESO-1_{157}特異的抗体をモデルとして、末梢血 B 細胞由来可変領域を用いた CAR ライブラリーを作製した。片方の鎖を可変領域ライブラリーソースに置換することで、CAR をベースに T 細胞応答性をリードアウトとした全く新しい新規 *scFv* 遺伝子の同定法を確立した。

がん抗原特異的 scFv を同定する方法は大きく 2 つに分けられる。1 つは Phage display 法、もう 1 つはマウスに標的抗原を免疫して抗体を作製するハイブリドーマ法である。どちらの方法も、作製した scFv が CAR として機能するかはスクリーニングの時点では不明である。しかし、本手法では、*scFv* 遺伝子内の軽鎖、もしくは重鎖可変領域遺伝子の片方を抗原特異的な鎖に固定することによって、理論上 10^6程度のヒト免疫グロブリン可変領域ライブラリーを駆使して新たな scFv をスクリーニングすることが可能となる［2］。従って、T 細胞を用いて CAR として機能する scFv をスクリーニングできることから、効率の良いシステムであると言える。

多くのがん抗原特異的マウス由来 scFv においては、マウスとヒト遺伝子配列との相同性を利用して、超可変領域を除いてヒト型に置換したヒト型類似 scFv などが作製され臨床応用されてきた。しかし、輸注時に生じる異種アレルギー反応を回避するためには、完全ヒト型がん抗原特異的 scFv を作製し利用することが望ましい。本手法を用いれば、理論上、マウス由来 scFv をもとに完全ヒト型 scFv レパトアを作製することが可能となる。scFv の片鎖を固定したスクリーニング技術であるため、標的結合部位を保持したレパトア作製が可能である点も大きな特徴である。

図 4 に示すように、新規に同定した A2/NY-ESO-1_{157}特異的 H1 鎖を固定して、K 鎖を変化させることで、非常に幅広く scFv の A2/NY-ESO-1_{157}結合性を変化させることが可能であった。さらに、K156_H1-CAR のように、A2/NY-ESO-1_{157}にも、A2/HIV Gag_{77}にも、両方に結合する新規 scFv の同定にも成功した。MHC／ペプチド複合体を認識する scFv の結晶構造解析によると、scFv の標的認識方法には大きく 3 種類ある。（A）MHC とペプチド複合体とを両方認識する場合、（B）MHC α1 ドメインに寄りかかる形で認識する場合、（C）MHC α2 ドメインに寄りかかる形で認識する場合である。（B）と（C）の認識様式では、MHC への依存度が高まり、ペプチド依存性が低下するようである［3，4］。3M4E5-CAR や、多くの K_H1-CAR レパトアは A2/NY-ESO-1_{157}特異的に認識しているため、（1）の認識様式が想定されるが、K156_H1-CAR は（2）および（3）の認識様式が想定される。このことは、片方の差を変化させることによって、A2/NY-ESO-1_{157}に対する標的親和性、ならびに交差反応性が細かく変化していくことを示している。将来的には NY-ESO-1_{157}ペプチド依存性を高めた CAR（scFv）の同定も可能であるかもしれない。

CAR-T 細胞の標的に対する反応性は、scFv の標的親和性だけでなく、CAR 細胞内シグナル伝達ドメインにも大きく影響される。新規 A2/NY-ESO-1_{157} scFv は、第二世代 CAR を用いて同定したものである。CAR の細胞内ドメインを改良して、T 細胞活性化シグナルを強化する試みが盛んになされているが、細胞内ドメインや CAR の構造に応じて、scFv の適切な標的親和性/立体構造が異なる可能性がある。その意味で、様々な A2/NY-ESO-1_{157} scFv レパトアを作製して保持することは、次世代 CAR に適した scFv レパトアを保持することでもあり、極めて有用であると考えられる。

本研究課題では A2/NY-ESO-1_{157}をモデルとしたが、他の抗体可変領域を利用した scFv においても応用が可能である。初期段階ではあるが、我々は、CD19 特異的抗体（clone FMC63）を用いて、HLA／ペプチド複合体以外の表面抗原においても本技術が応用可能であることを確認している。将来的には、がん免疫 T 細胞療法、特に CAR-T 細胞療法において最適と考えられる様々ながん抗原特異的 scFv レパトアを作製して、臨床応用を目指したいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究において、愛媛大学プロテオサイエンスセンターの安川正貴先生にご指導を賜った。

文 献

1) Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. Nat Med. 2015;21（8）:914-21. PMID:26193344 DOI 10.1038/nm.3910

2) Jespers LS, Roberts A, Mahler SM, et al. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. Biotechnology （N Y）. 1994;12（9）:899-903. PMID:7521646

3) Mareeva T, Martinez-Hackert E, Sykulev Y. How a T cell receptor-like antibody recognizes major histocompatibility complex-bound peptide. J Biol Chem. 2008;283 （43） :29053-9. PMID:18703505 DOI:10.1074/jbc.M804996200

4) Ataie N, Xiang J, Cheng N, et al. Structure of a TCR-Mimic Antibody with Target Predicts Pharmacogenetics. J Mol Biol. 2016;428（1）:194-205. PMID:26688548 DOI:10.1016/j.jmb.2015.12.002