

血液がんに対する新規 CAR-T 細胞療法の開発

保仙直毅

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

【研究の背景】

我々は、一貫して血液がん細胞表面に発現する標的抗原の同定と、それを標的とした抗体療法・CAR-T細胞療法の開発を行ってきた。その成果の一つとして最近、多発性骨髄腫特異的新規CAR-T細胞療法の開発に成功した(Hosen N et al, *Nature Medicine*, 2017)。まず、自作した10,000クローン以上の抗骨髄腫細胞モノクローナル抗体の中から骨髄腫特異的抗体MMG49を同定した。次に、MMG49は骨髄腫細胞において恒常的に高発現している活性型構造のインテグリン $\beta 7$ を特異的に認識することを明らかにした。さらに、MMG49由来のCAR-T細胞が正常造血細胞を傷害することなく著明な抗骨髄腫効果を示すことを証明し、変異のない細胞膜蛋白質の活性型立体構造を標的としたがん特異的CAR-T細胞療法が可能であることを示した。この成果は企業に導出され、現在治験が行われている。

【目 的】

多発性骨髄腫に対してさらに新たな CAR-T 細胞の標的抗原の同定を行う。また、未だに有効な CAR-T 細胞が開発されていない急性骨髄性白血病を対象に同様のアプローチにより CAR-T 細胞の開発を目指す。

【方 法】

目的 1 新規多発性骨髄腫特異的抗体が認識する抗原構造形成の分子メカニズムの解明

上述の骨髄腫特異的抗体のスクリーニングにおいて新規多発性骨髄腫抗体として同定した R8H283 は CD98hc を認識するが、不思議なことに CD98hc を発現する正常リンパ球には結合しないので、その原因を検討した。

目的 2 新規急性骨髄性白血病特異的抗体の同定およびそれが認識する抗原構造形成の分子メカニズムの解明

我々は既に、10,000 クローン以上の抗骨髄性白血病細胞株モノクローナル抗体を作製し、それらの中で正常ヒト末梢血球には結合しない抗体を選択し保存していたが本研究においてさらに抗体の作製とスクリーニングを続けた。それらの抗体の中から、多くの急性骨髄性白血病患者骨髄検体において CD34⁺CD38⁻白血病幹細胞分画を含む AML 細胞に結合する抗体を同定した。次に、CRISPR gRNA ライブラリーを用いたランダムノックアウトを応用した方法等により抗体が認識する抗原を同定し、抗原蛋白質の発現が非血液組織には認められないものに候補を絞った。さらに、それらの抗原構造の白血病特異性のメカニズムを解析した。

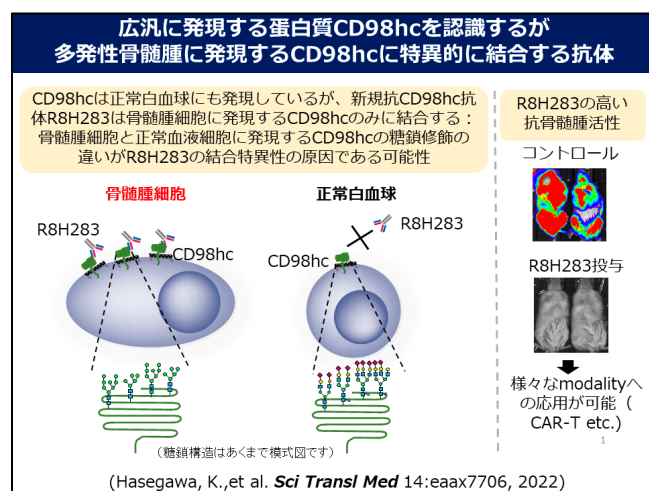
目的 3 新規急性骨髄性白血病特異的抗原構造を標的とした CAR-T 細胞療法の開発

同定された急性骨髄性白血病特異的抗体を元に CAR-T 細胞を作製し、その抗原特異的細胞傷害活性を in vitro および in vivo xenograft model において解析した。

【結 果】

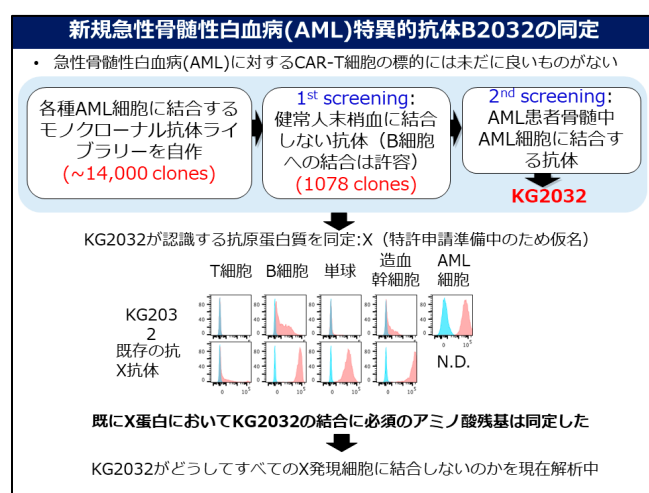
目的 1 新規多発性骨髄腫特異的抗体が認識する抗原構造形成の分子メカニズムの解明

R8H283 は CD98hc のモノマーと反応しなかったが、アミノ酸トランスポーターとして機能する複合体である CD98 軽鎖 (CD98lc) と CD98hc のヘテロダイマーには結合した。CD98hc-LAT1 ヘテロダイマーは正常な白血球にも存在するが、R8H283 はそれらと反応しなかった。正常な白血球に存在する CD98hc の糖鎖修飾は、骨髄腫細胞に存在するものとは異なっていた。また、GnTI 欠損細胞 (ハイマンノース型の n 型糖鎖を有する CD98hc 蛋白のみを産生する) に対して R8H283 は高度な結合を示した。これらの結果から、CD98hc に付着する糖鎖の違いが、正常な白血球に R8H283 が結合しない原因である可能性が示唆された。これらの結果は、トランスクリプトームまたはプロテオーム分析によって同定することができない、ユビキタスに存在するタンパク質における癌特異的 conformational epitope が、ヒト腫瘍サンプルを用いた広範なスクリーニングによって同定され得ることを改めて示している。(Hasegawa, K., et al. *Sci Transl Med* 14:eaax7706, 2022)



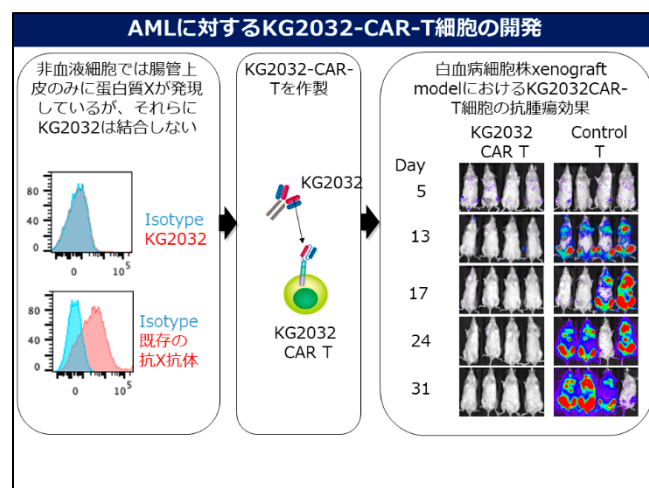
目的 2 新規急性骨髄性白血病特異的抗体の同定およびそれが認識する抗原構造形成の分子メカニズムの解明

CD19 CAR-T 細胞の成功は、標的抗原が AML 細胞以外に正常 B 細胞には発現していることも許容され得ることを示唆している。そこで、我々は、抗 AML 細胞株モノクローナル抗体を約 14,000 クローン作製し、その中から B 細胞以外の健常人末梢血には結合しない 1,078 クローンを同定した。次にそれらを用いて、AML 患者由来骨髄検体のフローサイトメリー解析を行い、約半数の患者において CD34⁺CD38⁺AML 幹細胞を含む AML 細胞に結合する抗体として KG2032 を同定した。次に、CRISPR gRNA ライブラリースクリーニングにより、KG2032 は蛋白 X (特許申請中のため仮名でお許しください) を認識することを明らかにした。興味深いことに、X 蛋白質は単球や造血幹細胞などにも発現しているが、KG2032 はそれらにはほとんど結合しなかった。すでに、X 蛋白において KG2032 の結合に必須のアミノ酸残基は同定したので、KG2032 がどうしてもすべての X 発現細胞に結合しないのかについてさらに現在解析中である。



目的 3 新規急性骨髄性白血病特異的抗原構造を標的とした CAR-T 細胞療法の開発

非血液細胞では腸管上皮のみに蛋白質 X が発現しているが、それらに KG2032 はそれらには結合しなかった。そこで、上記の結果と考え合わせ、KG2032 由来 CAR-T 細胞は、白血病細胞特異的な CAR-T 細胞として臨床応用可能と考えた。CAR コンストラクトを、KG2032 の抗原認識部位配列 (scFv) と、4-1BB および CD3ζ の細胞内シグナル伝達ドメインを融合することにより作製した。レトロウイルスを用いて KG2032 由来の CAR をヒト T リンパ球に導入し KG2032-CAR-T 細胞を作製した。出来上がった KG2032-CAR-T 細胞は AML 細胞



との共培養によりサイトカインを産生し、細胞傷害活性を示した。さらに、免疫不全マウスに生着させた KG1aAML 細胞に対して、KG2032-CAR-T 細胞の投与は、in vivo で有意な抗 AML 効果を示した。また、患者由来 AML 細胞を用いた PDX モデルにおいても KG2032-CAR-T 細胞の投与により有意な抗腫瘍効果が得られた。

【考察】

R8H283 は、正常な白血球を傷害することなく骨髓腫細胞を攻撃することができ、R8H283 あるいはそれを元に作製した CAR-T 細胞が骨髓腫の有望な治療ツールとなりうることを示唆している。CD98hc は、他のいくつかの種類の癌でも高度に発現しており、R8H283 は骨髓腫細胞以外のがん細胞にも反応する可能性があり、現在解析中である。KG2032 の白血病特異性のメカニズムについては特許の内容に触れずに説明することは困難なため、本報告書では割愛させていただくが、今までにないユニークな抗原・抗体であり、今後臨床試験に向けて開発を進めていく。これらの結果は、他のがん種においても同様に、網羅的なトランスクリプトーム解析等では同定できない、蛋白質の翻訳後変化により生ずるがん特異的抗原構造を同定がまだまだ見逃されている可能性を示唆する。それらは、抗がんモノクローナル抗体ライブラリーを用いて、ヒトがん患者検体への結合を解析し続けることにより同定されうると考え、現在他の様々ながんで同様の探索を続けている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

新規抗骨髓腫抗体 R8H283 は既に製薬企業に導出され、臨床に向けた開発が進んでいる。急性骨髄性白血病に対する CAR-T 細胞はまだ世界で誰も開発に成功しておらず、本研究により開発に成功すれば、世界中の白血病患者に大きなメリットがあり、KG2032-CAR-T 細胞については医師主導治験に向けた準備が進められている。

【参考・引用文献】

Hasegawa, K., S. Ikeda, M. Yaga, K. Watanabe, R. Urakawa, A. Iehara, M. Iwai, S. Hashiguchi, S. Morimoto, F. Fujiki, H. Nakajima, J. Nakata, S. Nishida, A. Tsuboi, Y. Oka, S. Yoshihara, M. Manabe, H. Ichihara, A. Mugitani, Y. Aoyama, T. Nakao, A. Hirose, M. Hino, S. Ueda, K. Takenaka, T. Masuko, K. Akashi, T. Maruno, S. Uchiyama, S. Takamatsu, N. Wada, E. Morii, S. Nagamori, D. Motooka, Y. Kanai, Y. Oji, T. Nakagawa, N. Kijima, H. Kishima, A. Ikeda, T. Ogino, Y. Shintani, T. Kubo, E. Mihara, K. Yusa, H. Sugiyama, J. Takagi, E. Miyoshi, A. Kumanogoh, and N. Hosen. Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitous protein CD98 heavy chain. *Sci Transl Med* 14:eaax7706, 2022