

二重特異性抗体を用いた新規移植片対宿主病治療法の開発研究

小西達矢

愛媛大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

【研究の背景】

同種造血幹細胞移植における移植片対宿主病¹⁾ (graft-versus-host disease: GVHD)は、移植後の予後を大きく左右する重要な合併症である。特に腸管 GVHD は治癒が困難であり、重症化した場合は致命的となる。腸管 GVHD に対する治療である免疫抑制剤の全身投与では、腸管組織以外の免疫も全身性に抑制するため、抗白血病効果 (graft-versus-leukemia: GVL) の減弱や、重症感染症の発症が懸念される。腸管の局所免疫のみ抑制できれば GVHD を選択的に制御できる可能性があるが、この着眼点に基づいた治療薬は未だ開発されていない。申請者はこれまでに、同種造血幹細胞移植に関連した複数の臨床研究を実施し、さらに遺伝子改変技術に基づいた新規二重特異性抗体の開発に取り組むなど、造血器腫瘍に対する免疫療法研究に尽力してきた。本研究では、腸管上皮幹細胞に発現する Lgr5²⁾ (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) と、T 細胞を含む免疫細胞に発現し、免疫を負に制御する TIGIT³⁾ (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) の 2 つの分子に着目し、新規の二重特異性抗体を作製して、腸管上皮幹細胞に対する免疫応答を選択的に抑制するための研究計画を立案した。

【目 的】

本研究では、腸管粘膜の免疫反応を選択的に抑制するために、免疫抑制性のチェックポイント分子である TIGIT と、腸管上皮の幹細胞に発現する Lgr5 とに結合する Bispecific T-cell Engager (BiTE) ベースの新規二重特異性抗体 (TIGIT-Lgr5 BiTE) を作製する。TIGIT-Lgr5 BiTE により、腸管粘膜局所で TIGIT を介した免疫抑制環境を形成させ、腸管 GVHD を選択的に治療する新規薬剤の開発を目的とした。

【方 法】

TIGIT 側の分子構築については、TIGIT 特異的 scFv の取得を試みたものの、安定した結合能を示す配列を得ることができなかった。このため、本研究では TIGIT のリガンドである CD155 を利用する設計とし、CD155 と Lgr5 に対する scFv を融合した候補モダリティ (CD155×Lgr5 scFv) を複数作製した。結合特異性を評価するため、K562 細胞に TIGIT または Lgr5 をそれぞれ強制発現させた細胞株を樹立し、各モダリティの結合能をフローサイトメトリーで解析した。さらに、免疫抑制効果の評価として、CD19 標的 CAR-T 細胞を作製し、CD19 陽性かつ Lgr5 陽性標的細胞との共培養系を構築した。モダリティの存在下で CAR-T 細胞のサイトカイン産生を測定した。加えて、CAR-T の強い活性化が影響する可能性を考慮し、ヒト末梢血 T 細胞を IL-2、OKT3 で刺激した活性化 T 細胞集団を準備した。これらの活性化 T 細胞に対してモダリティ存在下で標的細胞と共培養を行い、CFSE 希釈アッセイにより増殖能の変化を解析した。

【結 果】

TIGIT 特異的 scFv 配列は取得できなかったが、代替アプローチとして作製した CD155×Lgr5 scFv の 3 種類の候補モダリティは、いずれも樹立した K562/TIGIT 細胞および K562/Lgr5 細胞に対して特異的な結合を示した。CAR-T 細胞との共

培養実験では、CD19 陽性 Lgr5 陽性標的細胞に対する CAR-T 細胞のサイトカイン産生量は、モダリティの有無によって大きな変化を認めず、CAR-T の強力な活性化は抑制されなかった。一方で、IL-2 と OKT3 で活性化したヒト T 細胞を用いた系では、モダリティ存在下で T 細胞増殖の抑制が CFSE アッセイにより確認された。このことから、本モダリティは強力な CAR シグナル下では抑制効果がマスクされるものの、より生理的強度の T 細胞活性化レベルでは機能を発揮することが示された。

【考 察】

本研究で作製した CD155×Lgr5 scFv モダリティは、TIGIT 側 scFv が得られないという制約下でも、CD155 を介した負の免疫調節シグナルの誘導という目的を維持した設計を実現できた。K562 強制発現細胞を用いた解析で特異的結合が確認されたことから、腸管上皮幹細胞 (Lgr5) を足場とした局所的免疫抑制というコンセプトは技術的に成立することが示唆された。CAR-T 細胞実験において抑制効果が観察されなかった点は、CAR 刺激が極めて強く、TIGIT/CD155 軸による抑制シグナルが相殺された可能性が高い。一方、生理的な活性化レベルに近い活性化 T 細胞では増殖抑制が認められたことから、本モダリティが本来想定する「局所で過剰な T 細胞活性化を抑える」という GVHD 病態に近い条件下では機能性を示すことが期待される。今後は、腸管上皮細胞とのより生体環境に近い三次元培養モデル、マウス GVHD モデルを用いた *in vivo* 評価により、腸管 GVHD 治療薬としてのコンセプトの実証を目指す。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

腸管 GVHD は治療抵抗性で予後不良である一方、既存治療は全身性免疫抑制を伴い GVL 効果の低下や感染症リスクを増大させる。本研究で開発した CD155×Lgr5 モダリティは、腸管上皮幹細胞を標的として局所的に TIGIT 経路を活性化させるという、新規かつ臓器選択的な免疫調節を可能にすることが期待される。これは、GVHD 治療の根本的なパラダイムシフトとなりうるアプローチであり、過剰な T 細胞反応を腸管局所で抑制することで、GVL 効果を保持しつつ GVHD 制御を達成できる可能性がある。本研究概念が実証できれば、臓器特異的免疫制御という新しい治療概念の確立に寄与し、移植医療の長期成績向上に直接的な貢献が期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Chakraverty R, Teshima T. Graft-versus-host disease: a disorder of tissue regeneration and repair. *Blood*. 2021 Nov 4;138(18):1657-1665.
- 2) Hayase E, Ara T, Saito Y, Takahashi S, Yoshioka K, Ohigashi H, Ogasawara R, Yokoyama E, Yamakawa T, Ebata K, Hasegawa Y, Tomizuka K, Teshima T. R-Spondin1 protects gastric stem cells and mitigates gastric GVHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Adv*. 2024 Feb 13;8(3):725-731.
- 3) Zhang P, Liu X, Gu Z, Jiang Z, Zhao S, Song Y, Yu J. Targeting TIGIT for cancer immunotherapy: recent advances and future directions. *Biomark Res*. 2024 Jan 16;12(1):7.