

「多発性骨髄腫に対する新規 CAR-T および CAR-NK 細胞療法の開発」

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授

保仙 直毅

要旨

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。本研究においては、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同定した骨髄腫特異的抗体R8H283の特異性のメカニズムの解明を進めた。R8H283はCD98hcを認識するが、CD98hcを発現する正常リンパ球には結合しなかった。正常な白血球に発現するCD98hcのグリコフォームは、骨髄腫細胞に存在するものとは異なっていることが、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、がん特異的ではない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。さらに我々は、CAR-T 細胞療法の大きな問題点である、患者毎に自己のT 細胞からCAR-T 細胞を作るために必要となる莫大なコストを解決することを目指して、臍帯血由来CAR-NK 細胞の作製に取り組み、その作製系を完成させた。

背景・目的

(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多発性骨髄腫特異的新規 MMG49CAR-T 細胞療法の開発に成功した(文献1)。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 は活性型構造のインテグリン β 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 細胞が著明な抗骨髄腫効果を示すことを証明した。本課題では下記を目的として研究を実施した。

(目的)

目的1 多発性骨髄腫に対する CAR-T 細胞の為の新規標的抗原の同定

目的2 多発性骨髄腫に対する CAR-NK 細胞の開発

方法

目的1 多発性骨髄腫に対する CAR-T 細胞の為の新規標的抗原の同定

我々は自作した 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の中から、上記の MMG49 とは異なる多発性骨髄腫特異的抗体として R8H283 を同定し、その特異性のメカニズムの解明を行った。

目的2 多発性骨髄腫に対する臍帯血由来 CAR-NK 細胞の開発

上述の MMG49CAR を用いて、ヒト臍帯血由来 CAR-NK 細胞の開発を進めた。

結果

目的1 多発性骨髄腫に対する CAR-T 細胞の為の新規標的抗原の同定

1. 多発性骨髄腫特異的 mAb としての R8H283 の同定

我々はまず、様々な 骨髄腫(MM)細胞株と結合するモノクローナル抗体 (mAb) を分泌するハイブリドーマを 10,000 個以上樹立し、次に、健康人末梢血単核球に結合しない mAb を産生するハイブリドーマを 500 個選択してストックした。次に、これらの候補 mAb で多くの MM 患者の BM 細胞を染色し、最終的に R8H283 を MM 特異的 mAb として同定した (図 1)。

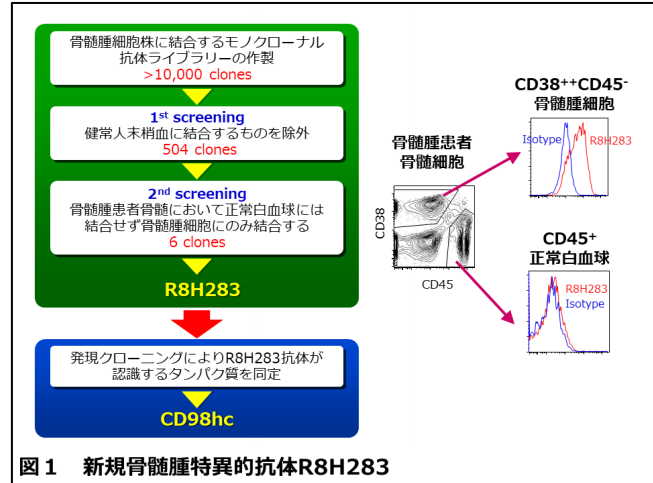


図1 新規骨髄腫特異的抗体R8H283

2. R8H283 は CD98hc を認識する

R8H283 が認識する抗原は、レトロウイルスを用いた発現クローニングによって同定された具体的には、RPMI8226 細胞 (R8H283 陽性) から作成した cDNA ライブラリーを持つレトロウイルスを用いて BaF3 細胞 (R8H283 陰性) に感染させ、R8H283 で標識した細胞を FACS で濃縮した。濃縮された R8H283 陽性細胞に導入されている cDNA の塩基配列を決定することにより、R8H283 は CD98hc を認識することが明らかになった (図 1)。R8H283 は、CRISPR-Cas9 システムを用いて CD98hc を欠損させた U266 細胞において反応性を失うことから、R8H283 は CD98hc と特異的に反応することが示された。

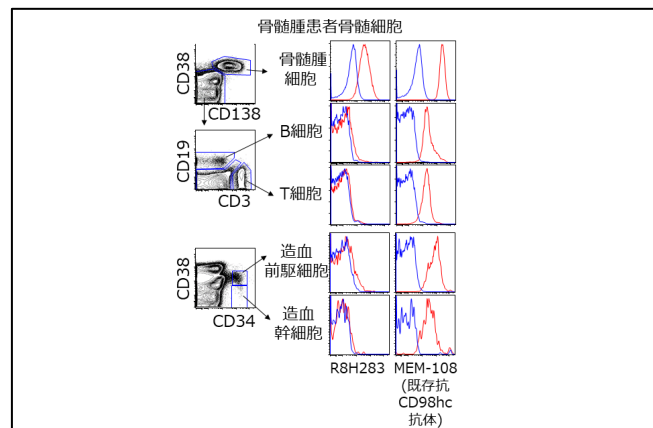


図2 R8H283は正常血液細胞に発現しているCD98hcには結合せず、骨髄腫細胞に発現するCD98hcのみに結合する

R8H283 のエピトープ領域は、CHO 細胞で発現させたヒト/マウス CD98hc キメラ蛋白に対する R8H283 の結合を解析することにより、アミノ酸 365-409 にマッピングされた。

3. R8H283 は正常白血球や非造血組織に発現している CD98 タンパク質とは反応しない

既存の抗 CD98hc mAb MEM-108 で染色すると、すべての白血球で CD98hc の発現が認められた。対照的に、R8H283 は正常白血球と反応しなかった。MM 患者の BM 細胞では、R8H283 は MM

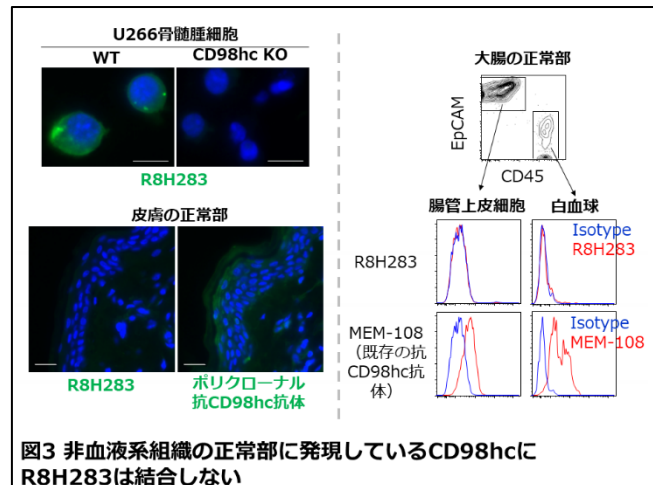


図3 非血液系組織の正常部に発現しているCD98hcに R8H283は結合しない

細胞のみに結合したのに対し、MEM-108 は CD34+造血幹/前駆細胞を含むすべての BM 細胞に結合した (図 2)。MM の治療に広く使用されているプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブで治療すると、MM 細胞上の R8H283 抗原の発現が増加しましたが、正常リンパ球上では増加しなかった。CD98hc タ

ンパク質の発現が検出されたヒトの皮膚と結腸の非罹患領域では、免疫組織化学やフローサイトメトリーで R8H283 陽性細胞は検出されなかった (図 3)。

4. 正常白血球に発現する CD98hc 糖鎖は、MM 細胞に発現する糖鎖とは異なる。

健常者の末梢血単核球および MM 細胞の細胞溶解液を電気泳動し、抗 CD98 ポリクローナル抗体で免疫ブロットした。MM 細胞と正常白血球で発現している CD98hc の電気泳動移動度は異なっていたが、PNGase F 処理による N-糖鎖の除去後は類似していた (図 4) ことから、正常白血球は MM 細胞で発現しているものとは異なる CD98hc グライコフォームを発現していることが示された。さらに、高マンノース型 N-グリカン構造を産生する GnTI 欠損細胞では、MEM-108 の結合は変化しないが、R8H283 に対する反応性が増加することがわかった (図 5)。これらの結果は、N-グリコシル化の違いが R8H283 の反応性に影響することを示唆している (図 6)。

5. R8H283 は正常な造血細胞を傷つけることなく有意な抗 MM 効果を発揮する

R8H283 は MM 細胞に対して抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) と補体依存性細胞傷害性 (CDC) を引き起こした。対照的に、正常 PBMC は R8H283 の存在下では ADCC や CDC によって傷害されなかった。MM 細胞の増殖は、エフェクター細胞や補体の非存在下では R8H283 によって阻害されなかったことから、R8H283 が CD98hc-軽鎖複合体のアミノ酸トランスポーターとしての機能を阻害する可能性は低いことが示唆された。さらに我々は、SCID マウスに OPM2 細胞を注入して樹立した皮下 MM 腫瘍モデルを用いて、R8H283 の in vivo 抗 MM 活性を試験した。R8H283 の投与は、腫瘍増殖を有意に減少させた。さらに、R8H283 の投与は免疫不全マウスの BM に移植された U266 細胞を根絶し、これらの動物の生存期間を有意に延長した。

目的 2 多発性骨髄腫に対する臍帯血由来 CAR-NK 細胞の開発

活性化インテグリン b7 に対する特異的抗体 MMG49 を用いて CAR-NK 細胞の開発を行った。臍帯血由来単核球から B/ T 細胞/ミエロイド系細胞を除き、膜結合型 IL-15 と 4-1BB ligand を発現させた K562

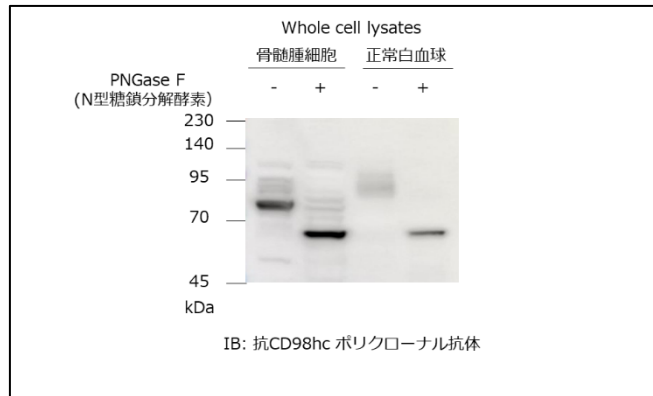


図4 骨髄腫と正常白血球では発現しているCD98hc glycoform が異なる

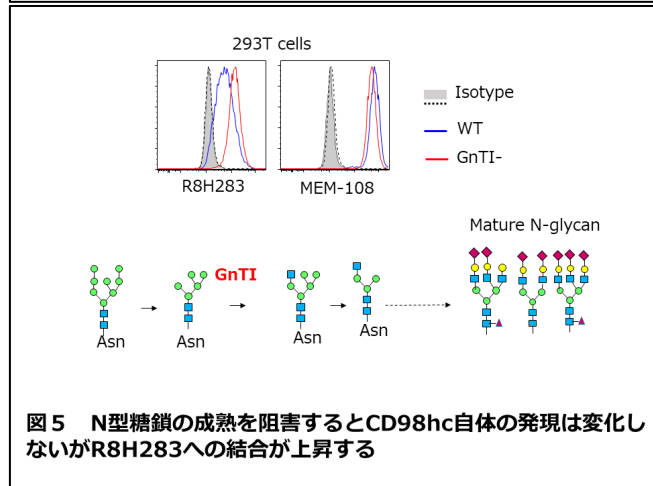


図5 N型糖鎖の成熟を阻害するとCD98hc自体の発現は変化しないがR8H283への結合が上昇する

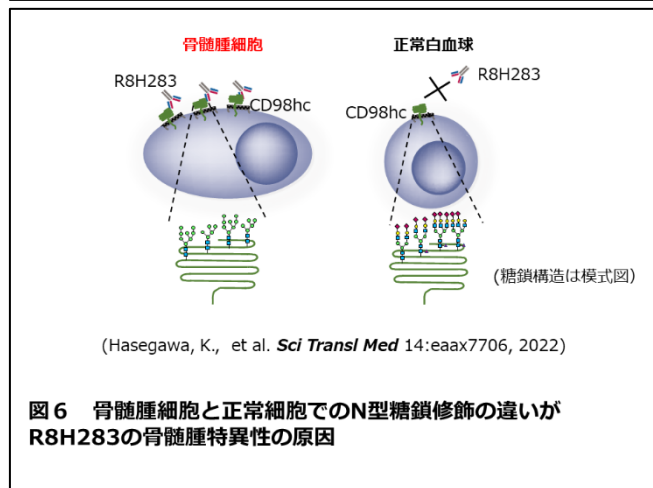


図6 骨髄腫細胞と正常細胞でのN型糖鎖修飾の違いが R8H283の骨髄腫特異性の原因

細胞および IL-2 で刺激した。次に、レトロウイルスベクターにより MMG49 CAR と IL-15 を共発現させ、拡大培養することにより CAR-NK 細胞を作製した。そして、既に CAR-NK 細胞と骨髄腫細胞あるいは正常血液細胞を共培養した際に産生されるサイトカインの測定、⁵¹Cr を用いた細胞傷害活性の測定を行い、有意な細胞傷害活性が得られることを示した。また、上記の方法により作製した MMG49 CAR-NK 細胞の in vivo での有効性を、異種移植モデルを用いて検討した。luciferase を発現するヒト骨髄腫細胞株を NOG マウスに経静脈的に移入することにより骨髄に生着させた後、MMG49 CAR-NK 細胞を投与し、IVIS を用いて経時的に腫瘍量の変化を観察することにより抗腫瘍効果を検討した。その結果、CAR を導入していない NK 細胞の投与と比較して有意な抗腫瘍効果を認めた。

考察

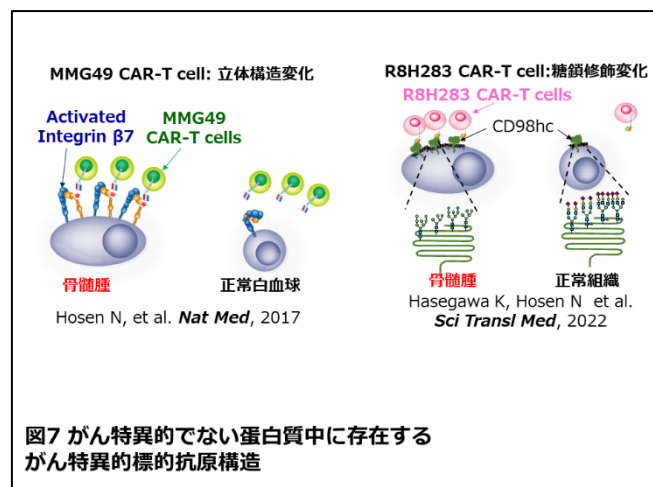
本研究では、新規抗 CD98hc mAb である R8H283 が、すべての正常造血細胞で CD98hc がユビキタスに発現しているにもかかわらず、MM 細胞に選択的に結合することを示した。R8H283 は軽鎖とヘテロ二量体を形成する CD98hc と反応するが、CD98hc 単量体とは反応しなかった。CD98 ヘテロダイマーは正常白血球にも発現しているが、R8H283 はこれらと反応しなかった。CD98 軽鎖の表面発現は重鎖の存在に依存しているため、CD98 ヘテロダイマーは CD98 軽鎖を発現している他のいくつかの組織、例えば腸や皮膚でも発現している。しかしながら、免疫組織化学やフローサイトメトリー解析では、これらの組織への R8H283 の結合は認められなかった。

正常白血球を極めて高濃度の R8H283 で染色しても R8H283 の結合は検出されなかったことから、R8H283 の反応性の欠如は単に CD98 ヘテロダイマーの発現レベルが低いことや R8H283 の親和性が低いことによるものではないことが示唆された。N-グリコシル化の違いが R8H283 の反応性に影響を与え、その結果正常白血球では R8H283 の反応性が欠如していることが示唆された。正常白血球に発現している CD98hc への R8H283 の結合を阻害する N-糖鎖の正確な種類は今後の研究で明らかにする。

R8H283 は正常白血球を損傷することなく MM 細胞を標的とすることができる。MM に対する主要な薬剤であるボルテゾミブによる治療は、MM 細胞上の R8H283 抗原の発現を増加させた。CD98hc は MM 細胞の増殖と生存に重要な役割を果たしていることから、CD98hc の発現低下による免疫逃避は MM では起こりにくいことが示唆された。これらの観察から、R8H283 は MM に対する有望な治療手段の候補であることが示唆された。がん細胞は高レベルのアミノ酸を必要とするため、アミノ酸トランスポーターである CD98 軽鎖特に LAT1 はいくつかのタイプの癌で高発現している。したがって、R8H283 は MM 細胞以外のがん細胞にも反応する可能性がある。実際、一部の患者において、R8H283 は肺癌細胞と結合したが、正常肺上皮細胞とは結合しなかった。

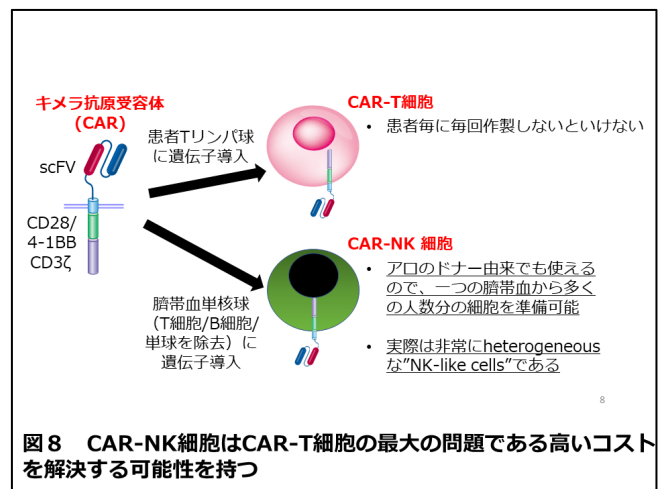
我々は、R8H283 抗体自体の抗骨髄腫効果をすでに示したが、さらに R8H283 由来の CAR-T 細胞を作製しており、その抗腫瘍効果も確認している。上述のように R8H283 は骨髄腫以外のいくつかの癌種においてもがん特異的結合が見られることから、他の癌種、特に固形がんへの応用が期待される。

ほとんどの癌において適切な癌特異的細胞表面タンパク質がないことが、CAR T 細胞のような治療用



mAb やその誘導体の開発を妨げてきた。今回の結果より、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析では同定できない、がん特異的でない蛋白質に発現するがん特異的コンフォメーションエピトープが、ヒト原発腫瘍サンプルの広範なスクリーニングにより同定されることが改めて示された(図 7)。

さらに我々は、MMG49CAR を用いた CAR-NK 細胞の作製に成功した。その抗腫瘍効果は CAR-T 細胞と比較するとまだ十分とは言えないが、まだ世界的にも十分に研究が進んだ領域ではなく、今後世界に負けないように開発を進めていくための良いスタートが切れたと考えている。臍帯血由来 CAR-NK 細胞はアロのドナーからの細胞を使用可能であるので、”off the shelf”製剤の作製が可能であり、一人のドナーから多くの CAR-NK 細胞を作ることができるようになれば大幅に安価な細胞治療が可能になる (図 8)



今後これらの成果を元にさらに研究を続け、日本発の新しい遺伝子細胞治療を開発していくべく努力を続ける。CAR-T 細胞をはじめ遺伝子細胞治療分野において、日本は残念ながら米国、中国に大きく後れを取っており、今後新たな標的、新たな細胞ソースなど新規性を持った開発を続けて世界と対峙していくことが重要である。

共同研究者

なし

引用論文

1. Hosen, N., Y. Matsunaga, K. Hasegawa, et al. The activated conformation of integrin beta7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med* 2017. 23:1436-1443.

助成研究に関連した発表論文

1. 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. 2022. Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitous protein CD98 heavy chain. *Sci Transl Med* 14:eaax7706.

2. Nakagawa, T., N. Kijima, K. Hasegawa, S. Ikeda, M. Yaga, T. Wibowo, T. Tachi, H. Kuroda, R. Hirayama, Y. Okita, M. Kinoshita, N. Kagawa, Y. Kanemura, N. Hosen, and H. Kishima. 2023. Identification of glioblastoma-specific antigens expressed in patient-derived tumor cells as candidate targets for chimeric antigen receptor T cell therapy. *Neurooncol Adv* 5:vdac177.
3. Hosen, N. 2023. [Identifying and targeting multiple myeloma-specific antigens resulting from post-translational protein modifications by CAR-T cell therapies]. *Rinsho Ketsueki* 64:427-431.
4. Hosen, N., S. Yoshihara, H. Takamatsu, M. Ri, Y. Nagata, H. Kosugi, Y. Shimomura, I. Hanamura, S. Fuji, K. Minauchi, J. Kuroda, R. Suzuki, N. Nishimura, N. Uoshima, H. Nakamae, Y. Kawano, I. Mizuno, H. Gomyo, K. Suzuki, S. Ozaki, S. Nakamura, Y. Imai, M. Kizaki, E. Negoro, H. Handa, and S. Iida. 2021. Expression of activated integrin beta7 in multiple myeloma patients. *Int J Hematol* 114:3-7.
5. Hosen, N. 2021. CAR T cell therapy. *Immunol Med* 44:69-73.
6. Hosen, N. 2021. [Chimeric antigen receptor T-cell therapy for multiple myeloma]. *Rinsho Ketsueki* 62:619-623.