

主論文の要旨

**Spacer Length Modification Facilitates Discrimination
between Normal and Neoplastic Cells and Provides
Clinically Relevant CD37 CAR T Cells**

（スパーサーの長さの調整により、正常細胞と腫瘍細胞の識別が
促進され、臨床的に適切な CD37CAR-T 細胞がもたらされる）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

奥野 真吾

【緒言】

難治性造血器腫瘍の治療において、キメラ抗原受容体導入 T 細胞 (Chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) の開発が進み、目覚ましい成果を挙げている。その中でも CD19 抗原を標的とした CAR-T 療法 (CD19CAR-T) は、再発難治性の B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-lymphoblastic leukemia, B-ALL) と、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) に対し高い寛解率を呈し、既に臨床応用がなされている。しかし、寛解例の半数以上で再発し、その 1/3 程度は CD19 の陰性化が原因と考えられている。また、DLBCL における寛解率は B-ALL と比較して低い。治療成績向上のため、新たな治療標的・治療戦略が求められている。

CD37 は tetraspanin superfamily に属する 4 回膜貫通型の蛋白質であり、B 細胞・T 細胞の両方において免疫反応に関与するとされている。既報では CD37 の発現は血液細胞に限定的であり、特に成熟 B 細胞において強く、それ以外では弱く発現しているとされている。造血器腫瘍では濾胞性リンパ腫やマントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病といった成熟 B 細胞腫瘍において強く発現している。上記の特徴的な発現パターンから理想的な治療標的の一つと考えられた。

CAR-T 療法では、T 細胞上の CAR 分子による強力な抗原認識により、標的細胞が根絶されるまでその効果が持続する。CD19CAR-T 療法の有害事象として B 細胞機能不全が報告されているが、これは免疫グロブリン補充療法で対応が可能である。しかし、T 細胞、好中球もしくは単球が傷害された場合、より重篤で致死的な免疫不全状態となる恐れがある。そのため、CD37 を標的とした新たな CAR-T 療法の開発においては、CD37 発現の評価と CD37 抗原への親和性の最適化は極めて重要である。CAR 分子による抗原認識には CD37 と直接結合する可変領域の影響が大きいと考えられるが、それ以外にも細胞外のスペーサードメインの長さと抗原認識の関連が過去に報告されている。過去の二つの CD37CAR-T 療法に関する論文では、CA37CAR-T 細胞の fratricide については明確に述べられていなかった。我々は今回の研究において、スペーサーが長い CD37CAR-T 細胞は fratricide により増殖が不良となることを認め、CD37 を発現する正常細胞への影響を最小限とした最適な CD37CAR 分子を開発した。

【結果】

健常成人の末梢血白血球において、CD37 を高発現する細胞は CD19 陽性の B 細胞であり、それ以外の T 細胞や好中球、単球は CD37 を弱く発現していた (Figure 1A, B)。T 細胞では CD3/CD28 刺激の翌日に CD37 発現が一過性に上昇したが、その後 24 時間以内に刺激前と同程度となった (Figure 1C)。

健常成人の骨髄において、CD19 陽性 B 細胞の成熟に伴う CD37 発現の変化を評価した。CD10 と CD45 の発現量を用いて骨髄 B 細胞および B 前駆細胞を 4 つの分化段階において検討した結果、分化早期では CD37 発現は弱く、分化が進むに従って CD37 発現は強くなった (Figure 1D)。骨髄における成熟 B 細胞の CD37 発現は末梢血 B 細胞と同等であった。

次にヒト化抗 CD37 抗体の DNA 配列を基に抗 CD37 短鎖抗体(scFV)をデザインした(Figure 2A)。CD37CAR 分子は、scFV が細胞外のスペーサーによって膜貫通部位と結合され、細胞内には CD28 シグナル伝達ドメインと CD3 ζ の細胞内ドメインが結合されている。このスペーサーは IgG4 を基にしており、全長 232 アミノ酸(aa)で構成される。これを最長とし、細胞外スペーサードメインのない 0aa とその中間の長さの分子も含め、計 6 種類の CD37CAR 分子をデザインした(細胞外スペーサーの長さにより区別し、長いものから 232aa、125aa、60aa、30aa、15aa、0aa と呼称した)。これらを T 細胞に遺伝子導入すると、スペーサーの長さに伴い遺伝子導入効率が向上した(Figure 2B)。しかし、遺伝子導入から 7 日目の細胞数はスペーサーの長さに伴い減少する傾向を示した(Figure 2C)。6 種類それぞれの CD37CAR-T 細胞を純化し、放射線照射を行った Ramos(CD37 陽性の腫瘍細胞株)と共培養すると、スペーサーが最も長い 232aa と最も短い 0aa において細胞増殖が不良であり、比較的スペーサーの短い 15aa や 30aa において最も良好な細胞増殖が認められた(Figure 2D)。スペーサーの長さ T 細胞のアポトーシス、及び細胞傷害活性の関係を評価するため、CD37 発現具合の異なる腫瘍細胞株(NALM6)と共培養し、annexin V/PI アッセイを行った。刺激後 4 時間、又は 8 時間の評価では、長いスペーサーを持つ CD37CAR-T 細胞においてアポトーシスを起こしている細胞の割合が高く、fratricide が起きていると考えられた(Figure 2E)。次に、蛍光標識した自己 T 細胞との共培養を行った。すると長いスペーサーを持つ CD37CAR-T 細胞との共培養において、自己 T 細胞の割合が減少し、アポトーシスを起こしている細胞の割合が高かった(Figure 2G, H)。長いスペーサーを持つ CD37CAR-T 細胞は、正常 T 細胞と CAR-T 細胞のどちらにも細胞傷害活性を示すことが認められた。次に CD37CAR 分子による細胞内シグナル伝達として、CD3 ζ 、p38、ERK のリン酸化を評価した(Figure 3A-D)。結果として、陽性コントロールとして用いた CD19CAR-T 細胞におけるリン酸化が最も強く、スペーサーの短い CD37CAR-T 細胞では細胞内シグナルは弱まっていた。スペーサーが短くなると細胞内シグナルが低下し、fratricide が起こりにくくなると考えられた。この後の検討には 15aa のスペーサーを持つ CD37CAR 分子を使用した。

15aa のスペーサーを持つ CD37CAR を健常成人の CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入効率は 60-80%程度であり、tEGFR を標的として CD37CAR-T 細胞を純化することが可能であった(Figure 4A)。CD37CAR-T 細胞は、Raji(CD37 陽性の腫瘍細胞株)に対し IFN- γ や IL-2 といったサイトカインを産生し(Figure 4B-D)、腫瘍細胞の増殖を抑制し(Figure 4E, F)、細胞増殖を示した(Figure 4G, H)。

B 細胞リンパ腫を含む各種造血器腫瘍に由来する腫瘍細胞株の CD37 発現を評価した(Figure 5A)。CFSE で蛍光ラベルした各腫瘍細胞株と CD37CAR-T 細胞を共培養すると、ごく弱い程度の発現であっても CD37 を発現する腫瘍細胞株の増殖は抑制された。しかし特筆すべきこととして、末梢血 T 細胞や好中球、単球よりも CD37 発現が弱い腫瘍細胞株でも増殖抑制効果が認められた(Figure 5B)。

CD37CAR-T 細胞と放射性クロムで標識した正常血液細胞を共培養すると、

CD37CAR-T 細胞は CD37 発現の高いリンパ球の他に、CD37 発現の低いリンパ球や単球に対しても僅かに、しかし有意に細胞傷害活性を示した (Figure 6A)。サイトカイン産生に関しては、CD37 発現の高いリンパ球に対してのみ有意な反応を示したが、それも Positive control に比べると非常に弱い反応であった (Figure 6B, C)。また、ヒトの骨髄細胞に対する影響を評価するため、ヒトの造血幹細胞を免疫不全マウスに移植した Humanized mice を作成し (Figure 6D)、CD37CAR-T 細胞の輸注前後の骨髄を比較したが、hCD45 を発現するヒト骨髄細胞の減少は認められなかった (Figure 6E)。ヒト由来の T 細胞、好中球、造血幹細胞の CD37 発現に有意な変化はなく、CD37 を強く発現する B 細胞分画だけが消失していた (Figure 6F)。同様に Humanized mice に CD19CAR-T 細胞を輸注すると、骨髄中の CD19 陽性細胞は完全に消失したが、CD37CAR-T 細胞の輸注後では CD19 陽性細胞は残存していた (Figure 6G)。

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫と診断された 2 人の患者の腫瘍細胞では、CD20、CD19、CD37 が高発現であった (Figure 7A)。これらに対し CD37CAR-T 細胞は良好なサイトカイン産生を示し、それは CD19CAR-T 細胞よりも高値であった (Figure 7B, C)。免疫不全マウスに Raji を移植し、その後 CD37CAR-T 細胞を輸注することで、in vivo での抗腫瘍効果を評価した (Figure 8A)。CD37CAR-T 細胞は腫瘍細胞の増殖を有意に抑制し、免疫不全マウスの生存期間を延長した (Figure 8B-D)。

【考察】

難治性造血器腫瘍に対する新たな治療法として CD37CAR-T 細胞療法を開発した。CD37 は主に成熟 B 細胞に強く発現しており、その他の T 細胞、好中球、単球にも弱く発現が認められた。正常細胞への影響を最小限とするため、スペーサーの長さを調整し抗原認識の最適化を試みた。スペーサーが長くなると fratricide により細胞増殖が著しく不良となり、スペーサーを適切に短くすることで抗腫瘍効果を保ちつつ fratricide を抑制することが可能であった。15aa のスペーサーを持つ CD37CAR-T 細胞は、in vitro でも in vivo でも CD37 陽性の腫瘍細胞に対し抗腫瘍効果を示し、正常細胞に対しては、in vitro で単球に対し僅かな細胞傷害活性を示した。ヒト造血を再現した Humanized mice では、CD37 を高発現する細胞を傷害したがヒト造血細胞に大きな影響を与えなかった。CD37CAR-T 投与後も CD19 陽性細胞の残存が認められ、CD37CAR-T 細胞輸注の影響は CD19CAR-T 細胞輸注よりも軽度である可能性が示唆された。

CD37CAR-T 療法の開発においては、安全性の面で正常細胞への影響を最小限とすることが最も肝要であった。スペーサーを短くすることで細胞内シグナルが低下し、結果的に抗腫瘍効果と正常細胞への影響の最適化が可能であった。CD37 は成熟 B 細胞腫瘍の他、T 細胞腫瘍の一部にも発現するため、一つの治療法が複数の腫瘍に対して有効となる可能性がある。また今回得られた知見により、スペーサーの長さを調整することで抗腫瘍効果を保ちながら正常細胞への影響を軽減することは可能であり、今後の新たな CAR-T 細胞開発において有用な手段となり得ると考えられた。

【結語】

CD37CAR-T 療法は難治性造血器腫瘍に対する有効な治療法となる可能性がある。