

主論文の要約

**Target Antigen Density Governs the Efficacy of
Anti-CD20-CD28-CD3 ζ Chimeric Antigen
Receptor-Modified Effector CD8⁺ T Cells**

〔 標的抗原密度が抗 CD20-CD28-CD3 ゼータ鎖キメラ抗原受容体改変
エフェクターCD8 陽性 T 細胞の有効性を支配する 〕

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

(指導：清井 仁 教授)

渡邊 慶介

【緒言】

キメラ抗原受容体遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T)細胞療法は、従来療法不応の急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)等の B 細胞性腫瘍に対し著明な臨床効果が報告される等有望な治療法である。CAR-T 細胞療法の利点は、第一に、抗原刺激と共に CD28 等の共刺激が同時に伝達される事で強力な作用が得られる点、第二に、ヒト白血球抗原 (HLA) を介さず直接標的抗原を認識する事から HLA に依存せず抗原陽性の全ての患者の治療が可能である点である。一方、大腸癌、乳癌等に発現する ERBB2(HER2)を標的とした CAR-T 細胞療法では、CAR-T 細胞が標的臓器外に僅かに発現する標的抗原を認識して引きこされた重篤な肺合併症が報告される等、その作用が強力である故に標的抗原の設定が効果および有害事象の両面から重要である。しかしながら、その標的抗原の選択にあたり、CAR-T 細胞がどの程度まで低発現の標的抗原を認識し傷害し得るかは明らかになっていない。そこで、本研究では、ヒト化抗 CD20 抗体を基に新規ヒト化抗 CD20CAR-T 細胞を樹立し、CAR-T 細胞が認識、傷害し得る最低の標的抗原発現閾値を明らかにする事、および、抗体療法後に標的抗原の発現が低下し治療抵抗性となった腫瘍細胞に対する CAR-T 細胞の効果を明らかにする事を目的とした。

【方法】

抗 CD20CAR は、ヒト化抗 CD20 抗体の塩基配列を基に、抗 CD20 単鎖可変領域 (scFv) を設計し、これを、ヒンジ部を介し CD28 および CD3 ζ 鎖へつなぎ構成した。この CAR を遺伝子導入および選択マーカーとして細胞内ドメインを欠く上皮成長因子受容体 (tEGFR)と共に CD8 陽性 T 細胞へレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。その後、CAR 陽性細胞を抗 EGFR 抗体を用いた磁気ビーズ法にて純化、リンパ芽球様細胞株(LCL)による 1 コースの刺激増幅後以下の実験に用いた。

【結果】

まず初めに、樹立した CAR-T 細胞の機能を確認する為、CD20 を遺伝子導入した K562 細胞株 (K562-CD20)を標的細胞もしくは刺激細胞とし、⁵¹Cr 放出試験による細胞傷害活性および細胞内染色による IFN- γ 産生を評価した。CAR-T 細胞は CD20 を特異的に認識し傷害する事が確認された。

次に、標的抗原密度と細胞傷害活性との関連を詳細に検討する為、元来 CD20 陰性である T 細胞系細胞株の CCRF-CEM 細胞株に CD20 を遺伝子導入して得られた様々な CD20 発現をもつ 30 株 (CEM-CD20)(CD20: 240-230,546 molecules/cell)を標的として CAR-T 細胞による細胞傷害活性を評価した。CAR-T 細胞は、CD20 発現の低い細胞株から高い細胞株まで、同等かつ良好に傷害した (CD20: 5,172 molecules/cell or more, 40-60% of specific lysis at E:T ratio=10:1)。また、CAR-T 細胞は 30 株中最も CD20 発現の低い株をも傷害した(240 molecules/cell, 22.8 \pm 2% of lysis)。

次に、同 30 株のうち代表的な 4 株: VL-CEM (CD20: 240 molecules/cell)、L-CEM

(5,320)、M-CEM (26,900)、H-CEM (142,722)を刺激細胞として、CD20CAR-T 細胞の活性化を細胞内 IFN- γ 染色、ERK リン酸化 による細胞内シグナル解析およびCFSE による T 細胞分裂試験にて評価した。VL-CEM の刺激では CAR-T 細胞の活性化 (IFN- γ 産生、ERK リン酸化、T 細胞分裂) を認めなかったが、L-、M-、H-CEM の刺激では良好かつ同等の活性化を認めた。

次に、CD20 低発現の細胞株および腫瘍細胞に対する有効性を検討する為、リツキシマブを含む化学療法後に CD20 発現が低下し、抗体療法不応となった B 細胞性リンパ腫患者から樹立された細胞株である RRBL1 および WILL2、再発時 CD20 が低発現となっていた DLBCL 患者の胸水より分離した腫瘍細胞を標的細胞として CAR-T 細胞の細胞傷害活性を検討した。いずれの細胞も CD20 発現が低下していたが CAR-T 細胞はこれらの細胞を効果的に傷害した。

最後に、抗体療法と CAR-T 細胞療法が有効である CD20 発現の閾値を詳細に比較検討する為、再発難治性の CLL 患者より抗 CD20 抗体であるリツキシマブおよびオファツムマブによる治療後に残存した CLL 細胞を分離した。分離した CLL 細胞の CD20 陽性分画は抗体療法により消失し、残存腫瘍は CD20 を僅かに発現するのみであったが CAR-T 細胞はこれらの残存腫瘍に対し細胞傷害活性を示し、また、これらの細胞の刺激は CAR-T 細胞の IFN- γ 産生を誘発し得た。

【結論】

CAR-T 細胞は標的細胞あたり数百分子という低発現の標的抗原を認識、傷害し得る事が明らかとなった。また、CD20 発現が低下し、抗体療法不応となった患者の治療へも適用可能である事が示唆された。