

氏名	稲熊容子
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙第508号
学位授与の日付	平成26年10月6日
学位論文題名	Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H 「HLA-A2拘束性に提示されたマイナー抗原HA-1Hを認識する抗体の単離とCAR-Tの機能」 Gene Therapy 21(6): 575–584. 2014. 6
指導教授	恵美宣彦
論文審査委員	主査 教授 松浦晃洋 副査 教授 谷口孝喜 教授 吉田俊治

論文内容の要旨

【目的】

同種造血細胞移植後の血液悪性腫瘍患者では、患者細胞上に発現している移植抗原であるマイナー組織適合(H)抗原を標的にドナー T細胞による移植片対腫瘍(GVT)効果が生じる。この際、標的として患者の血液幹細胞にのみ発現しているマイナー H抗原を選ぶことで、有害な移植片対宿主病を抑え、選択的GVT効果を得ることができる。HLA-A2を有する患者ではHA-1等がマイナー H抗原として知られている。HA-1は、HLA-A2上に9アミノ酸ペプチドとして提示される。ペプチドのN末から3番目のアミノ酸は遺伝子多型により、His(H)型とArg(R)型の2種類があり、ドナーがHA-1のR型のホモで、患者がH型を有する場合、移植後にはH型を標的とした免疫療法が可能である。免疫療法に必要な大量の抗原特異的T細胞を準備するには多大な労力と時間を要するが、採血して得たbulkのT細胞に抗原特異的T細胞受容体(TCR)遺伝子を導入すれば迅速に充分量の改変T細胞を用意できる。この方法では、遺伝子導入したTCRが内在性TCRとキメラを形成したり、競合で導入TCRの発現が低下する問題が報告されている。一方、抗体を強制発現するキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)導入T細胞は内在性TCRの問題を克服できる。しかし、このCARは通常抗体の特異性を持つため細胞膜上にある抗原にしか応用できない。そこで、T細胞にTCRのように振る舞う抗体を遺伝子導入することによって抗原特異性を与えて細胞内抗原を標的とすることができないか検討した。

【方法】

HLA-A2トランスジェニックマウスをHA-1H/HLA-A2複合体で免疫した。このマウスの

脾臓B細胞からphage libraryを作成し、HA-1H/HLA-A2複合体に選択的に結合するphageをパニング法で得た。得られたphage抗体候補をELISAでさらにスクリーニングし、親和性の高いクローンを選択した。有望なものは単鎖化し蛍光を結合し、HLA-A2陽性細胞上にHA-1Hペプチドを添加し染色の程度を確認した。さらに単鎖抗体のC末にCD28膜貫通領域とCD3ζ鎖のITAM領域を結合したレトロウイルスベクターを作成、健康人から得たT細胞をCD3/28で活性化した後に2回感染し増幅させ解析を行った。

【結果】

5×10⁸のライブラリから3回パニング後144個のクローンを無作為に抽出し調べた結果、18個(12.5%)のクローンがHA-1/HLA-A2に特異性を示した。TCR塩基配列解析により7種類の抗体にグループ化された。これらはいずれもHLA-A2拘束性に提示されたHA-1Hペプチドに特異的であることが確認された。このうちクローン#131は特に結合活性が高く(KD=14.9nM)、HLA-A2陽性細胞に添加したHA-1Hペプチドを10nM以下のレベルまで認識した。一方、HA-1Rペプチドの添加細胞はほとんど認識しなかった。また、このクローン#131を組み込んだCAR-T細胞は、HA-1HペプチドをパルスしたT2細胞をペプチド濃度依存性に傷害した。さらに、CAR-T細胞とすることで#131抗体でわずかに染色が確認できる低濃度でも傷害活性が認められた。しかし、#131 CAR-T細胞は、HA-1H/HLA-A2を認識する本来のキラー T細胞クローンと比較すると依然として100倍以上のペプチド濃度を要した。

【考察】

以上より、HLA分子上に結合したペプチドを認識するTCR様抗体が樹立できることが分かった。さらに検討を要するものの、#131抗体は細胞免疫療法に応用できる可能性がある。

論文審査結果の要旨

抗体によるがんの免疫療法は広く行われているが、通常その標的は細胞表面に存在する抗原に限られる。本論文は、細胞内の抗原蛋白質に由来するペプチドが主要組織適合抗原(MHC)によって細胞表面に提示されたものを認識する抗体の効率的な作成方法を開発し、その抗体をキメラ抗原受容体として発現するT細胞(CAR-T細胞)を樹立し、詳細な機能解析を行ったものである。MHC・ペプチド複合体を認識する抗体の報告は数報に限られ、特に、同種造血細胞移植において抗腫瘍活性を示すアロ抗原であるマイナー組織適合抗原を認識する抗体の樹立は世界で初めてである。本研究では、ヒトMHCトランスジェニックマウスを使用することでHA-1Hペプチド・MHC複合体への高い特異性を示す抗体を得ることに成功したもので、HLAに対し免疫学的寛容であるため通常できにくい複合体に対する抗体が得られるとの初期の作業仮説が見事に実証された。その抗体はわずか9個のアミノ酸からなるペプチド鎖の1アミノ酸の違いを見分ける高い特異性を示した。CAR-T細胞は、HA-1Hペプチド・MHC複合体発現細胞を特異的に認識し、強いサイトカイン産生を示した。細胞傷害活性を増強するという点でのbreakthroughがあれば、臨床へのトランスレーションに繋がる。本研究により、細胞内抗原に対する抗体を樹立しCAR-T細胞を作成する一連のシステムが確立された。以上より、本論文は内在性抗原が関与するがん及び他の疾患の制御への広い応用が期待され、大変意義深く学位論文にふさわしいと評価した。