

多発性骨髄腫に対する CAR-NK 細胞療法の開発

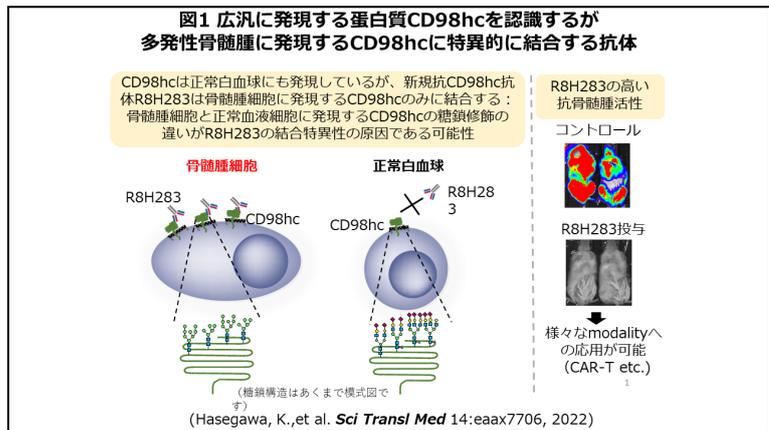
大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学
保仙 直毅

1. 新規多発性骨髄腫特異的抗体 R8H283 の同定とその認識抗原の性状解析

骨髄腫は、抗体を産生する細胞である形質細胞が腫瘍化した血液がんで、日本における患者数は約 1 万 8 千人と言われている。近年の治療の進歩は著しいものの、未だに治癒は極めて困難であり、新たな治療薬の開発が待ち望まれている。骨髄腫細胞表面に発現する抗原を標的としたモノクローナル抗体医薬は骨髄腫患者の予後を大幅に改善した。さらに、近年では CAR-T 細胞など抗体を応用した様々な治療の開発が進んでいる。しかしながら、未だに骨髄腫の治癒は極めて難しいのが現状である。その一つの原因としては単独の抗原を標的とした治療ではその抗原の発現を失うことにより攻撃を逃れてしまうことが考えられる。そこで、更に多くの治療標的抗原を同定することが重要だが、骨髄腫細胞でのみ発現している遺伝子やタンパク質の探索はすでに世界中で徹底的に行われ、新規治療標的の同定は極めて困難と考えられていた。

我々は、骨髄腫細胞に結合するモノクローナル抗体を 10,000 クローン以上自作し、それらの中から、骨髄腫細胞には結合するが正常血液細胞には結合しない抗体として、R8H283 という抗体を同定した。次に、R8H283 が認識している蛋白質が CD98hc であることを明らかにした。不思議なことに、正常な血液細胞にも CD98hc は発現しているにもかかわらず、R8H283 は正常血液細胞には結合しなかった。

R8H283 は CD98hc のモノマーと反応しなかったが、アミノ酸トランスポーターとして機能する複合体である CD98 軽鎖 (CD98lc) と CD98hc のヘテロダイマーには結合した。CD98hc-LAT1 ヘテロダイマーは正常な白血球にも存在するが、R8H283 はそれらと反応しなかった。正常な白血球に存在する 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た。また、GnTI 欠損細胞 (ハイマンノース型の N 型糖鎖を有する CD98hc 蛋白のみを産生する) に対して R8H283 は高度な結合を示した。これらの結果から、CD98hc に付着する糖鎖の違いが、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、トランスクリプトームまたはプロテオーム分析によって同定することができない、ユビキタスに存在する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示している。さらに、マウスを用いた実験において、R8H283 の投与により、正常細胞を傷害されずに、骨髄腫細胞のみが特異的に排除されることを示した。現在さらに、R8H283 をもとに作製した CAR-T 細胞の開発を進めている。(図 1、Hasegawa, K., et al. *Sci Transl Med* 14:eaax7706, 2022)

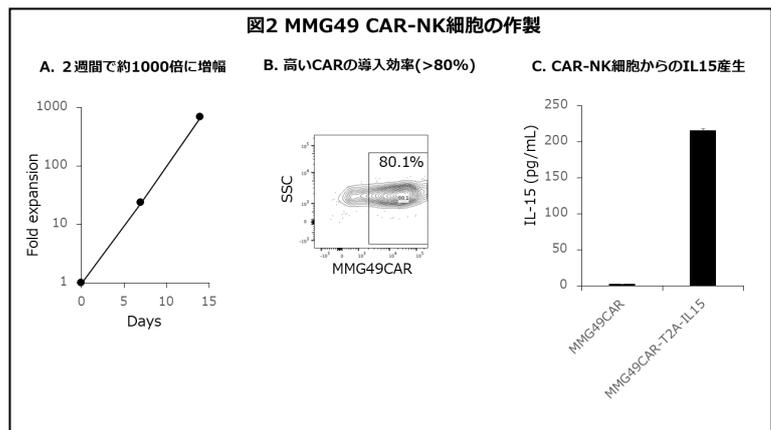


2. 活性型インテグリンβ7 を標的とした臍帯血由来 CAR-NK 細胞療法の開発

キメラ抗原受容体(CAR)-T 細胞療法はがん細胞に発現する細胞表面抗原を標的とする新しい免疫療法であり、その驚くべき効果により世界中の注目を集めている。B 細胞性白血病、悪性リンパ腫に対しては CD19 を標的とした CAR T 細胞が驚くべき臨床効果を示し、我が国でも 2019 年に承認された。ただし、患者毎に自己の T 細胞から CAR-T 細胞を作る必要があるため、そのコストが莫大であるということが大きな問題である。この問題を解決する一つの方法として、同種ドナーの臍帯血を用いて作製する CAR-NK 細胞の臨床での成功例が最近報告された。しかし、その効果の継続性はまだ十分ではなく、さらなる改良が望まれる。本研究では、我々が最近開発に成功した活性型インテグリンβ7 を標的とした多発性骨髄腫に対する CAR (Hosen N et al., *Nature Medicine*, 2017) を用いて CAR-NK 細胞を作製した。

1. 臍帯血由来 MMG49 CAR-NK 細胞の作製

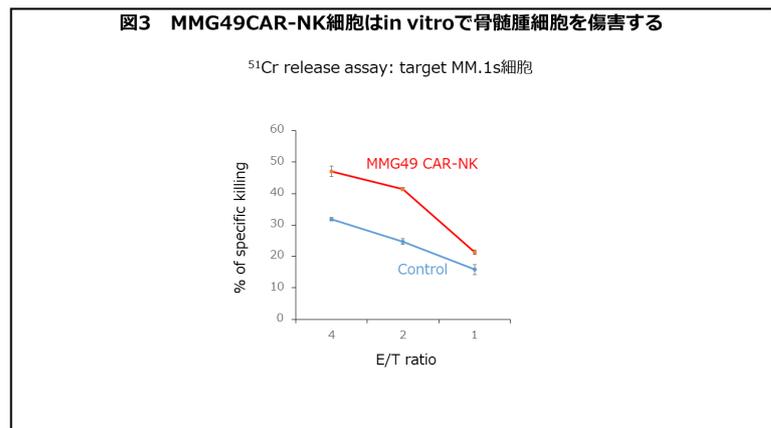
臍帯血由来単核球を単離し、膜結合型 IL-15 と 4-1BB ligand を発現させた K562 細胞および IL-2 で刺激した。次に、レトロウィルスベクターにより MMG49 CAR と IL-15 を共発現させ、拡大培養することにより CAR-NK 細胞を作製した。その結果、2 週間で約 1000 倍に NK 細胞を増幅することに成功した (図 2A)。増幅された NK 細胞への CAR の導入効率は 80% を超えて極めて高効率であった (図 2B)。また、CAR-NK 細胞が IL15 を産生しているこ



とも確認した (図 2C)

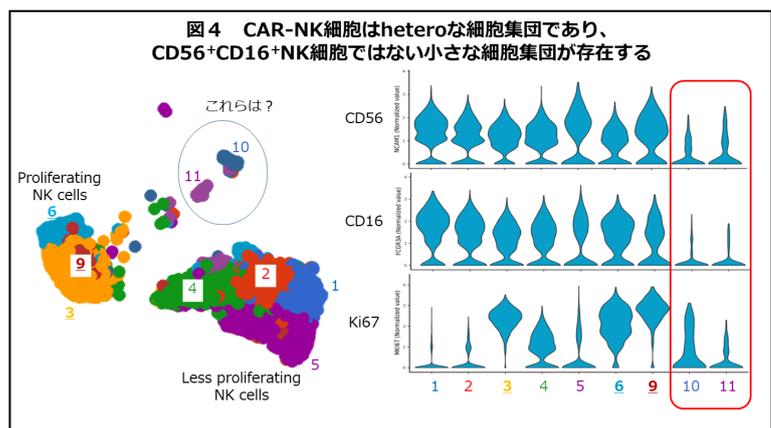
2. 有効性の評価

⁵¹Cr を用いた骨髄腫細胞に対する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 (図 3)。骨髄腫細胞を移植した免疫不全マウスに対して、MMG49-CAR-NK 細胞の投与が in vivo で効果を示すかを現在検討中である。



3. CAR-NK 細胞の heterogeneity の 説明

MMG49 CAR-NK 細胞の heterogeneity を解明するため、single cell RNA seq 解析を行なった。その結果、CAR-NK 細胞集団の中に、一般に NK 細胞のマーカーとされる CD56 と CD16 の発現を



欠く細胞集団が存在することを見出した（図4）。現在のその characterization を進めている。

4. 考察と今後の展望

我々の結果は、CD98hc 中に存在する多発性骨髄腫特異的抗原構造を認識する R8H283 を、骨髄腫に対する新たな抗体治療あるいはそれを応用した CAR-T 細胞治療などへ用いることが可能であることを示しており、現在開発が進められている。さらに重要なことは、蛋白質自体ががんの特異的でなくても、糖鎖修飾など蛋白質翻訳後の変化にがん特異的なものがあれば、がんの特異的な抗原構造が形成される可能性があり、それらを標的としてがん特異的な免疫療法の開発が可能であることを示したことである。今後、他の多くのがん種において同様にヒトがん検体を用いた精力的なスクリーニングが行われることにより、新たな治療標的が同定されることが期待される。

多発性骨髄腫に対する特異的な CAR として我々が開発した MMG49-CAR (活性型インテグリン b7 を標的とする) を用いた臍帯血由来 CAR-NK 細胞の作製とその抗腫瘍効果の証明に成功した。さらに推し進めて、多発性骨髄腫に対する新規 CAR-NK 細胞の臨床応用を目指す。

CAR-NK 細胞については CAR-T 細胞に比べると、まだまだ改良の余地が多く、我が国においてもその開発競争に乗り出すべき分野である。我々は、オリジナルな CAR を用いて CAR-NK 細胞の開発にチャレンジしているが、そこで得られた知見は様々な標的をターゲットとする CAR-NK 細胞に応用可能であり、この分野の進展に大きく寄与すると考えられる。

血液内科において CAR-T 細胞療法はもはや一般臨床となりつつあり、その実施数も急増する中で、高額医療であることが大きな問題となりつつある。そのような中で、他家細胞を用いる CAR-NK 細胞が実用化されれば、多くの患者がより安価な免疫細胞療法の恩恵を受けることになり、社会的なニーズに対応するものであることは間違いない。