

遺伝子改変により長期生存能を賦与した新規キメラ抗原受容体導入 T 細胞療法の開発

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫応答研究分野 主任研究員 伊藤雄介

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫応答研究分野 分野長 籠谷勇紀

1. 研究の背景・目的

キメラ抗原受容体 (CAR: chimeric antigen receptor) 導入 T 細胞療法 (CAR-T 療法) は、特に CD19 陽性の B 細胞系の血液腫瘍に対して高い治療効果をもたらしたが、概してその効果は限定的でかつ一過性に留まっており、治療有効性を高めるためにはさらなる改良が必要である。効果が不十分である原因の一つとして、CAR-T 細胞が体内に長期間残存せずに消失してしまうことが挙げられる。投与時の CAR-T 細胞の分化状態が重要であることが示されており、分化した T_{EM} (Effector memory T cell) より、未分化なメモリー形質を有する T_{SCM} (stem-cell like memory T cell)、 T_{CM} (central memory T cell) の割合がより多い方が治療成績が良好であることが報告されている。

患者の血液から T 細胞を採取し、CAR を導入し、増殖させてから体内に戻すという現状の製法では、投与前に刺激を加えて増殖している間に T 細胞が分化し、 T_{SCM} や T_{CM} の分画が徐々に失われ、 T_{EM} に置き換わっていく。また、体内に投与後も次第に老化してメモリー形質が失われていく。これらの各分画の分化にはエピジェネティック制御が深く関わっていることが知られており、これまでに申請者の研究室では、BLIMP1 というヒストン修飾因子のノックアウトによって、 T_{SCM} や T_{CM} の割合を維持する方法を樹立した。本研究では、上記の研究で培った方法を推し進め、 T_{SCM} や T_{CM} の状態を維持するのみならず、 T_{EM} の状態にある T 細胞に遺伝子改変を加え、より未分化な T_{SCM} や T_{CM} の状態に戻すことで、さらに強力に長期生存能を賦与させた T 細胞療法を開発することを目的とした。

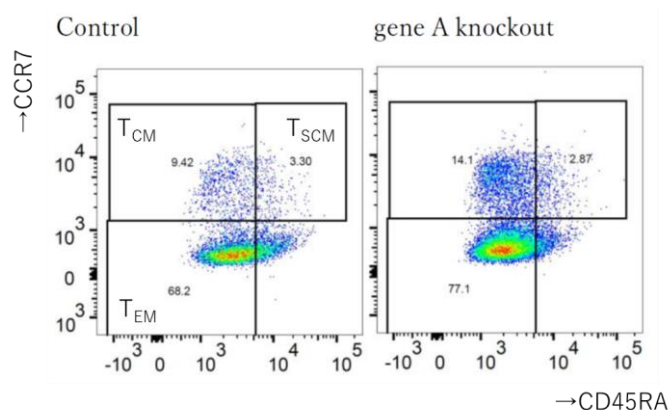
2. 研究の対象ならびに方法

T 細胞の分化機構に深く関わっているエピジェネティック因子や転写因子を標的として個別にノックアウトスクリーニングを行い、 T_{EM} の状態からより未分化な状態に戻すことのできる遺伝子改変を探索した。また、BLIMP-1 のノックアウトと組み合わせることで相乗高効果を得られるかを検証し、最適な遺伝子改変の組合せを決定した。このようにして得られた新規 T 細胞の遺伝子発現プロファイル RNA シークエンス解析で評価した。また *in vivo* で免疫不全マウスに打ち込んだ際の長期生存能を比較することで、実際に体内で長期間残存することを確認した。

3. 研究結果

(1) ノックアウトスクリーニング

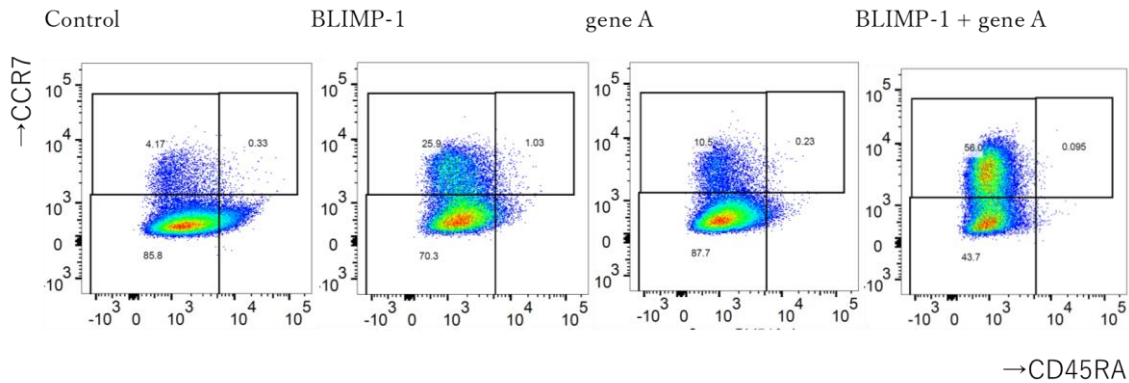
ヒト T 細胞の各分化段階のトランスクリプトームを比較したデータベース (GSE123235、GSE88987、GSE83978、GSE84105) を用いて、 T_{EM} に分化するにつれて発現が増加するエピジェネティック因子や転写因子を 13 種類抽出した。ヒト T 細胞を *in vitro* で 3 週間反復刺激を与えながら培養し、 T_{EM} に分化させた状態で、これらの候補遺伝子を個別に CRISPR/Cas9 でノックアウトし、CD45RA、CCR7、CD62L、CD27、CD28 の発現を指標として、 T_{CM} の割合を経時的にフォローした。その結果、gene A のノックアウトによって T_{CM} の割合が有意に増加することを示した。下図は、ノックアウトした 1 週間後のフローサイトメトリー解析の結果であり、CCR7 陽性 CD45RA 陰性の T_{CM} 分画が増加している。



(2) BLIMP-1 ノックアウトとの相乗効果

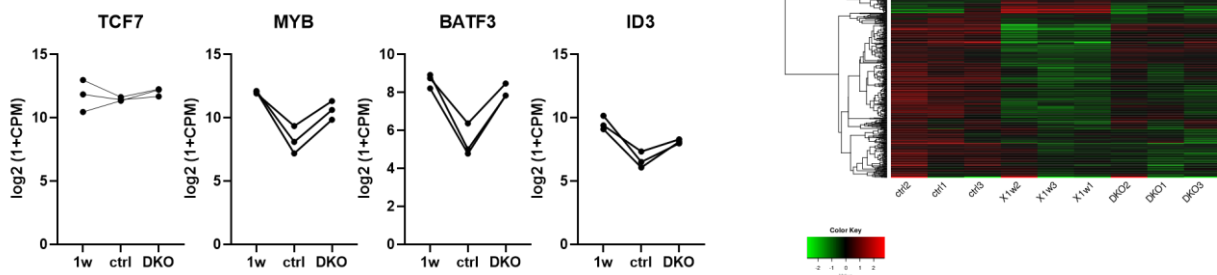
続いて、以前我々の研究室で同定した BLIMP-1 ノックアウトとの相乗効果を見るため、上記と同じ実験系で、BLIMP-1 と gene A のダブルノックアウトを行ったところ、単独のノ

ックアウトに比して、ダブルノックアウトでさらなる T_{CM} の割合増加が確認できた。下図はノックアウト1週間後のフローサイトメトリー解析の結果である。また、再刺激後の増殖能、サイトカイン産生能もコントロールと比して優れており、 T_{CM} の機能を獲得していることが示唆された。



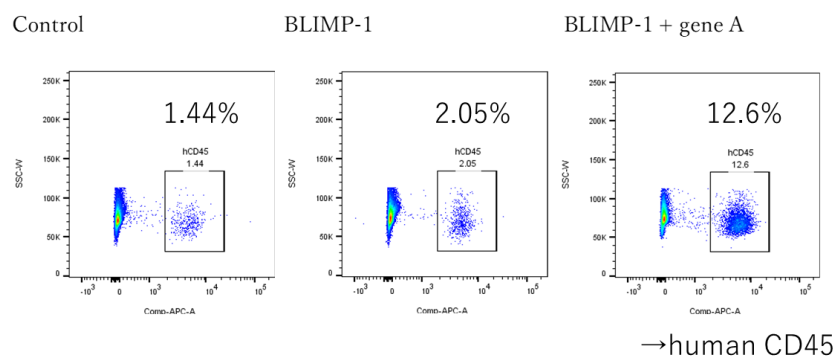
(3) RNA シークエンス解析

ダブルノックアウトによって T_{CM} の性質を獲得できているかをさらに検証するため、RNA シークエンス解析を施行した。T 細胞を起こして1週間後の T_{CM} から T_{SCM} の状態 (1w 群)、起こして4週間後の T_{EM} に分化した状態 (ctrl 群)、3週間後にダブルノックアウトを行い、その1週間後の状態 (DKO 群) の3群での比較を行った。クラスタリング解析の結果、右図の通り、DKO 群 (緑) は、ctrl 群 (赤) よりも1w 群 (青) に近い遺伝子発現プロファイルを獲得していることが明らかとなった。個別の遺伝子に着目すると、下図に示す通り、未分化段階で発現が高いことが知られている TCF7、MYB、BATF3、ID3 といった転写因子は1w 群より ctrl 群で発現が低い、ctrl 群よりも DKO 群で発現が上がっていた。



(4) in vivo での長期生存能の検証

in vitro で見られた性質の変化が in vivo での長期生存能につながるかを検証した。3週間培養した後にノックアウトを行い、さらに1週間経ったT細胞を5M個ずつ免疫不全マウスに静脈内投与し、4週間後の末梢血中のヒトT細胞の割合を解析した。下図のように、BLIMP-1ノックアウトによって、末梢血中のヒトCD45陽性T細胞の割合が上がり、gene Aを加えたダブルノックアウトによって、さらに長期生存能を獲得することが示された。



4. 考察

今回の研究により、BLIMP-1とgene Aのダブルノックアウトが、一度分化したT細胞を未分化な状態にリプログラミングできる可能性が示された。この手法は、体内でより長期にわたって残存し続けるCAR-T細胞療法に応用することができるのみならず、腫瘍内に浸潤して終末分化しているT細胞(TIL)に再度増殖能を賦与することで、TIL療法の効果改善にも応用できる。

T_{CM} の有する長期生存能、サイトカイン産生能といった性質を獲得した一方、細胞傷害活性やグランザイム、パーフォリン産生能といったエフェクター機能は低下した。そのため、 T_{CM} の有する長期生存能と T_{EM} の有するエフェクター機能の両立が今後の課題である。

5. 文献

1. Yoshikawa T, Wu Z, Inoue S, Kasuya H, Matsushita H, Takahashi Y, Kuroda H, Hosoda W, Suzuki S, Kagoya Y. Genetic ablation of PRDM1 in antitumor T cells enhances therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy. *Blood*. 2022;139: 2156- 2172

6. 論文発表

2022年11月に開催されたIFReC International School on Advanced Immunologyで口頭発表した。