

がん抗原特異的 T 細胞レセプター遺伝子導入 T 細胞の細胞内遺伝子改変によるシグナル増強の検討

名古屋大学医学部附属病院

血液内科 助教 寺倉精太郎

1. 研究の背景・目的

T 細胞の抗原特異性を決定している T 細胞レセプター (TCR) は、免疫細胞に外から遺伝子導入することが出来る。TCR の α 鎖と β 鎖を遺伝子導入することで抗原特異性を付与するものである。この手法を用いて近年では腫瘍抗原を特異的に認識する TCR を遺伝子導入し、T 細胞に腫瘍を攻撃させるようにする TCR 遺伝子導入 T (TCR-T) 細胞療法が出現した。これまでいくつかのがん特異的抗原を標的として TCR-T 療法は臨床応用が試みられているが、一時的な臨床効果を示すものはあるものの、長期にわたる臨床効果は見られていない。一方で chimeric antigen receptor (CAR) を遺伝子導入した T 細胞を用いる CAR-T 療法は、CD19 に対する CD19CAR-T 療法において顕著な効果を上げている。CD19CAR-T 療法では、細胞内シグナルドメインとして CD3zeta の他に CD28 や 4-1BB などの T 細胞活性化に関わる分子の細胞内ドメインが用いられており、CD19CAR-T 細胞は CD19 と結合するだけで、TCR の伝えるシグナル 1 が CAR の下流の CD3zeta によって伝えられ、また本来共刺激因子が伝えるシグナル 2 が CD28/4-1BB 細胞内ドメインによって T 細胞内に伝えられる。これにより CAR-T 細胞はひとつのシグナルで完全な活性化を得ることが出来る。とくに 4-1BB を細胞内ドメインに用いている場合にはヒトの体内で CAR-T 細胞は長期に生存し、臨床効果を発揮する。これらの背景をもとに、我々はすでに抗原特異的 T 細胞において、アダプター分子だけを遺伝子導入して、その反応を解析した。実際に、ある種のアダプター分子の遺伝子導入によって、抗原刺激後の T 細胞増幅・生存が高まることが分かった¹。

本研究では申請者らは CAR-T で成功した細胞内ドメインの遺伝子導入を、TCR との組み合わせにおいて検討することにした。CAR-T の場合には直列につながった CD28/4-1BB と CD3zeta が細胞内ドメインとして採用されており、抗原刺激が加わることによって刺激を伝える、と考えられている。本研究の目的は TCR に直列に CD28 や 4-1BB などのシグナルドメインをつなぎ、その効果を検討することである。

2. 研究の対象ならびに方法

これまで研究を進めてきた NY-ESO-1 TCR の遺伝子に改変を加えて、文献 1 において報

告したアダプター分子が直列に発現するようにさせたものや、別々に発現するようにさせたものを作成し、それらがどのようなシグナルを伝達し、細胞の生存に寄与するかを in vitro, in vivo で検討する。

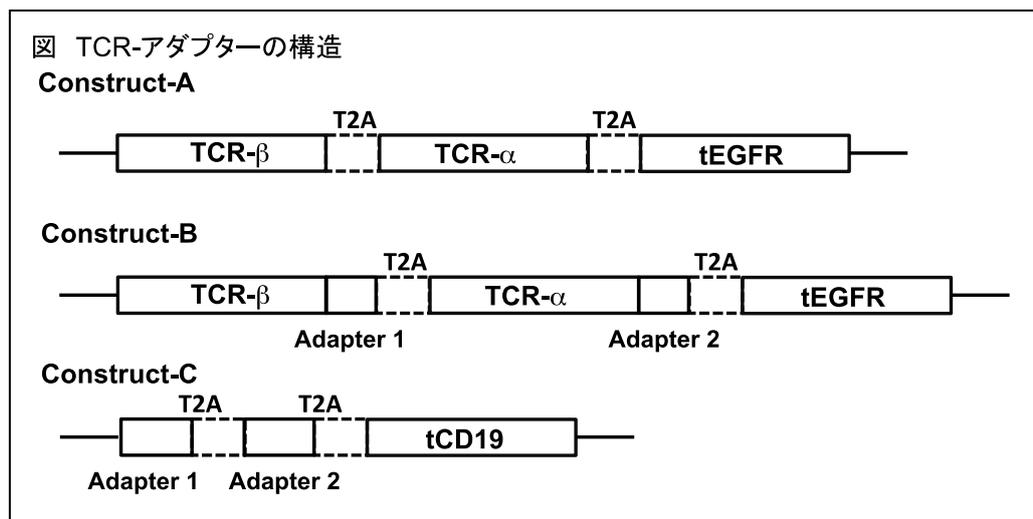
3. 研究結果

(1) アダプター分子を直列につないだ TCR 遺伝子コンストラクトの作成

数種類のアダプター分子をつけた TCR- α 鎖・ β 鎖を作成した。アダプター分子と TCR が直列に繋がったものと、別れて発現するものを作成した。TCR- α 鎖/ β 鎖を遺伝子導入する元来の Construct-A を改変し、TCR- α 鎖および TCR- β 鎖の細胞内ドメインにあたる部分にアダプター分子を直接結合させたものを作成した (Construct-B)。Construct-C は TCR- α 鎖/ β 鎖と別々にアダプター分子を遺伝子導入するものである。Construct-A では、これまで我々が用いてきたように細胞内ドメインを欠く EGFR を TCR- α 鎖/ β 鎖と等量発現するように工夫されている。そのため EGFR 発現を遺伝子導入マーカーとして、TCR を発現している細胞を純化し、その上で Construct-C を遺伝子導入することが可能である。同様に Construct-C を遺伝子導入したあとには細胞内ドメインを欠く CD19 を発現するように工夫し、これをマーカーとして細胞純化を行い、引き続いて実験に用いた。ウイルス・ベクターを作成し、TCR-アダプター遺伝子をドナーである健常人末梢血 T リンパ球に遺伝子導入し、刺激後のインターロイキン-2 放出量および実際の TCR 刺激後の細胞増幅を中心にさまざまな

T 細胞機能を検討した。

(2) 実際
に
Construct-A を作成し、
ヒト末梢血
T 細胞に遺



伝子導入したところ、NY-ESO-1 特異的テトラマーはほとんど陽性にならなかった。TCR- α 鎖および TCR- β 鎖の膜貫通領域を CD28 に変更してみたが、やはり同様に NY-ESO-1 テトラマーはほとんど陽性にならず、TCR としての 3次元構造をとっていないものと考えられた。

そのため、前回の実験で用いた遺伝子改変 CD3zeta を TCR- α 鎖および TCR- β 鎖の下流に T2A 配列を介して配するベクターを作成したところ、NY-ESO-1 テトラマーは陽性となった。

(3) こうして作成した TCR-T 細胞を用いて実験を進めた。CD28 細胞内ドメインあるいは 4-1BB 細胞内ドメインを CD3zeta に組み込んだものを用いて実験を行なっているが、前回の結果と同様に 4-1BB を組み込んだ CD3zeta 分子を遺伝子導入した場合に TCR 特異的な刺激後の増殖が改善した。

4. 考察

TCR- α 鎖および TCR- β 鎖に直接遺伝子改変 CD3zeta を結合させた場合に、NY-ESO-1 テトラマーが陽性にならなかったことは、おそらく分子全体の大きさが大きく変化したために TCR としての 3 次元構造を取れなかったためと考えている。TCR- α 鎖および TCR- β 鎖とは別に遺伝子改変 CD3zeta 分子を遺伝子導入することによって問題を解決できた。今回作成した TCR-T を用いて実験を進め、これまで報告してきた TCR-T の刺激後増幅改善が見られるようであれば、これを臨床に用いられるよう開発を進めていきたいと考えている。

5. 文献

1. Miyao K, Terakura S, Okuno S, Julamanee J, Watanabe K, Hamana H, Kishi H, Sakemura R, Koyama D, Goto T, Nishida T, Murata M, Kiyoi H. Introduction of Genetically Modified CD3 ζ Improves Proliferation and Persistence of Antigen-Specific CTLs. *Cancer Immunol Res.* 6(6):733-744, 2018.

6. 論文発表

未