

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700995

研究課題名(和文)キメラ抗原受容体発現T細胞を用いた養子免疫遺伝子療法における治療効果増強法の開発

研究課題名(英文)Development of switch promoters driven by activation signals from the chimeric antigen receptors.

研究代表者

内堀 亮介(Uchibori, Ryosuke)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20458285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：キメラ抗原受容体からの活性化シグナルにより駆動する、分子スイッチ機能を有したプロモーターの開発を行った。変型SV40 polyAを2つ、ヒトIL-2プロモーター領域に存在する転写因子NFAT結合領域を4つ、IL-2の最小プロモーター、レポーター遺伝子(ZsGreen1またはELuc)、BGH polyAを順に連結することで、ON/OFF比に優れたスイッチプロモーターを作製することができた。このスイッチ発現カセットを導入したPBMCをCD19陽性の標的細胞と共培養すると、時間経過と共にZsGreen1やELucの発現が特異的に誘導された。

研究成果の概要(英文)：Chimeric antigen receptor (CAR)-based immunotherapy shows therapeutic efficacy. However additional genetic modification is necessary for enhancement of the efficacy and safety of CAR-T cells. For example, production of an antitumor cytokine from CAR-T cells can potentially enhance their tumor-killing activity, but there are concerns that constitutive expression of anticancer molecules will cause systemic side effects. Therefore, it is important that exogenous gene expression is confined to the tumor sites. In this study, we aimed at developing switch promoters that would respond to activation signals from a CAR. We prepared a switch cassette that was arranged in order of two SV40 polyAs, four NFAT-REs, a minimal IL-2 promoter, ZsGreen1, and a BGH polyA sequence. Genes encoding switch cassettes were transferred into CD19-targeted CAR-expressing PBMCs. ZsGreen1 expression in PBMCs was strongly induced by co-culture with CD19-positive target cells.

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：腫瘍免疫学

キーワード：キメラ抗原受容体 細胞・遺伝子治療 がん シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会の進展とともにがんの罹患率ならびに死亡率は益々増加傾向にあり、B細胞性リンパ腫腫瘍においても。分子標的治療薬のような抗体医薬の臨床開発も進み、治療成績も向上しつつあるが、再発・難治例も依然として多く、満足できる治療法が確立されているとは言い難い。そこで、従来の化学療法・放射線療法・抗体療法とはコンセプトの全く異なる新しい治療法の開発が期待されている。例えば、抗がん作用を有する治療薬のがん病巣へのターゲティング技術の開発が、副作用を減じ、有効性を高める上で極めて重要であり、遺伝子改変T細胞を用いた養子免疫遺伝子療法に注目が集まっている。キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor; CAR)発現T細胞を用いた養子免疫遺伝子療法は、既存の化学療法に対して抵抗性を示す腫瘍に対しても有効な治療法として今後の発展が期待されているが、T細胞の抗腫瘍活性を高める工夫が重要な課題となっている。治療効果の増強法としては抗腫瘍性サイトカインの併用が考えられる。しかし、組換え製剤を全身投与するストラテジーでは、副作用の出現頻度が高くなるため、ベネフィットが上回るとは言い難い。さらに、血中半減期が短いために頻回投与を必要とする問題もある。頻回投与を避けるには、遺伝子の形で投与し、ある程度の期間は体内での持続的な発現が期待できることが望ましい。また、全身性の副作用を極力抑えるためには、がん組織局所で抗腫瘍性サイトカインを発現させ、局所で働かせるシステムが必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、CAR発現T細胞が抗原(標的となるがん細胞)と結合することで発現が誘導される分子スイッチ機能を有したプロモーターを作製する。そして、腫瘍局所で抗腫瘍性サイトカインを発現することで抗腫瘍効果の増強を図る治療ストラテジーを構築し、CAR発現T細胞を用いた養子免疫遺伝子療法の有効性向上に繋がる成果を上げることが目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分子スイッチプロモーターの作製。

ヒトIL-2プロモーターの最小プロモーターの上流にNFAT結合領域を4個または6個タンデムに連結し、これらを分子スイッチの候補とした。さらに、改変型SV40 early polyAとBGH polyAを挿入した。レポーター遺伝子としてZsGreen1またはELucを使用した。

(2) 分子スイッチ搭載型レトロウイルスベクターの作製。

分子スイッチカセットを自己不活性化レトロウイルスベクター(pQCX1X)に、レトロウイルスベクターゲノムの転写方向とは逆向きにサブクローニングした。このプラス

ミドをGag-pol発現プラスミドおよびVSV-G発現プラスミドと共にリン酸カルシウム法で293T細胞に遺伝子導入し、一過性のレトロウイルスベクター上清を回収した。上清中のベクター力価を定量的PCR法で測定し、レトロネクチン法で目的とする細胞(Jurkat、健常ドナー由来PBMC)に遺伝子導入した。

(3) 分子スイッチの機能比較(*in vitro*)。

抗原となるCD19とCARが結合して細胞が活性化することにより、分子スイッチが意図した通りに作動することを*in vitro*で検証した。分子スイッチ搭載型CAR発現細胞をCD19発現細胞(Raji)と共培養し、一定時間経過後にルシフェラーゼアッセイを行って発光量を測定した。ネガティブコントロールにはCD19非発現細胞(K562)との共培養群を使用し、ポジティブコントロールにはTPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)およびIonomycinで活性化した細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) 分子スイッチプロモーターの作製。

NFATを4つまたは6つ連結したプロモーターの発現強度を比較した。6つ連結した者では、キメラ抗原受容体からの活性化シグナルによって駆動した際の発現強度は高かったが、無刺激下(バックグラウンドレベル)での発現も高く、発現ON/OFFは十分ではなかった。4つ連結したものでは、駆動した際の発現強度は6つ連結した場合と比較して低かったものの、バックグラウンドレベルの発現も低い為、良好なON/OFF比を得ることができた。さらに、このNFAT配列の上流に、バックグラウンド低減シグナルとして挿入したところ、レポーター遺伝子のバックグラウンドレベルでの発現をさらに抑制することができた。最終的に、改変型SV40 early polyAを2つ、ヒトIL-2プロモーター領域に存在する転写因子NFAT(nuclear factor of activated T-cells)結合領域を4つ、IL-2の最小プロモーター、レポーター遺伝子(ZsGreen1またはELuc)、BGH(bovine growth hormone) polyAを順に連結することで、ON/OFF比に優れたスイッチプロモーターを作製することができた。

(2) 分子スイッチ搭載型レトロウイルスベクターの作製。

スイッチ発現カセットを自己不活性化レトロウイルスベクターにサブクローニングした。この際に、レトロウイルスベクターゲノムの転写方向と正方向に挿入すると、レポーター遺伝子のバックグラウンドレベルでの強い発現が観察された。しかし、レトロウイルスベクターゲノムの転写方向と逆方向に挿入することで、この問題は解消された。レトロウイルスベクターを作製し、Jurkat及びPBMCへ遺伝子導入を行った。

この時、レトロウイルスベクターのエンベロープとして、Jurkat では VSV-G を用いたシュードタイプ化、PBMC では GaLV エンベロープを用いた場合に良好な遺伝子導入効率を得ることができた。しかし、本研究においては、CD19 特異的 CAR 発現ベクターと、スイッチ発現カセットを共に遺伝子導入する必要がある。最終的に、CAR 発現ベクターは GaLV エンベロープ、スイッチ発現カセットを VSV-G でシュードタイプ化し、各ベクターを 1:1 (vol./vol.) で混合したベクター溶液を用いてレトロネクチン法で単回遺伝子導入することによって、CAR およびスイッチカセットの良好な導入効率を得ることが出来た。

(3) 分子スイッチの機能比較 (*in vitro*)。スイッチ発現カセットと CD19 特異的 CAR 発現ベクターを共に、Jurkat またはヒト健康者由来の PBMC に遺伝子導入した。この細胞を CD19 陽性の標的細胞 (Raji、K562/CD19) と共培養すると、時間経過と共に ZsGreen1 や ELuc の発現が誘導された。一方、CD19 陰性細胞 (K562) との共培養では、レポーター遺伝子の発現は誘導されなかった。Jurkat と PBMC 共に、effector/target 比が 1 前後の時に優れたスイッチカセットの発現誘導が認められ、共培養開始数時間後には観察可能なレベルの ELuc または ZsGreen1 の遺伝子発現が誘導された。このスイッチからの遺伝子発現は、CD19 陽性の細胞との共培養だけでなく、CD3/CD28 での刺激によっても誘導されたが、キメラ抗原受容体からの活性化シグナルがそもそも CD3/CD28 からの活性化シグナルと同様の経路を辿るため、不可避な応答であった。しかし、様々なサイトカインを培養系に添加してスイッチの発現を観察したが、有意な誘導は観察されず、このスイッチカセットはキメラ抗原受容体からの活性化シグナルに特異性をもったものであると結論づけた。また、この発現誘導はキメラ抗原受容体からのシグナルのうち、カルシニューリンを介したシグナル伝達系に依存していると考えられた。そこで、カルシニューリン阻害剤である FK506 で処理することによりスイッチの誘導発現を経時的に観察したが、共培養前に FK506 で処理した場合はスイッチの誘導発現は全く起こらなかったが、共培養後に処理した場合においても有意に抑制することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

2. Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, Uchibori R, Ido H, Teruya T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J,

Takeesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K. CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun.* 438:84-9, 2013. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.030.

1. Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K. NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res.* 73:364-72, 2013. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0088.

[学会発表](計 3 件)

1. Uchibori R, Ninomiya S, Tsukahara T, Ido H, Teruya T, Ohmine K, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Mineno J, Ozawa K. DEVELOPMENT OF SIN RETROVIRAL VECTORS EQUIPPED WITH SWITCH PROMOTERS DRIVEN BY ACTIVATION SIGNALS FROM THE CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS. 第 18 回日本遺伝子治療学会. 2013 年 7 月 6 日. 岡山.

2. Uchibori R, Ninomiya S, Tsukahara T, Ido H, Teruya T, Ohmine K, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Mineno J, Ozawa K. Development of switch promoters that would respond to activation signals from the chimeric antigen receptors. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 5 日. 横浜.

3. Uchibori R, Ninomiya S, Tsukahara T, Ohmine K, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Mineno J, Ozawa K. Development of switch promoters driven by activation signals from the chimeric antigen receptors. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内堀 亮介 (RYOSUKE UCHIBORI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20458285

