

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09497

研究課題名(和文) 免疫抑制的腫瘍微小環境を打破する遺伝子導入Tリンパ球の開発とその機能解析

研究課題名(英文) Development of transgenic T lymphocytes to break down the immunosuppressive tumor microenvironment and its functional analysis

研究代表者

寺倉 精太郎 (Terakura, Seitaro)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40625141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞が免疫細胞から逃れるために腫瘍細胞上に発現していると考えられるPD-L1という分子に対する抗体のアミノ酸配列情報をもとにPD-L1に結合する単鎖抗体を作成し、細胞内ドメインとしてCD28/4-1BB/その両方をもつ分子をつないだ新規の分子を作成した。この抗体はPD-L1分子を蛍光標識して染色すると、良好に染色されることから、抗原ときちんと結合することが分かった。これをTリンパ球に遺伝子導入し、その働きを試験管内およびマウス生体内で検討した。一方でT細胞が活性化後に発現し、自己に対して抑制的に働くと考えられるCTLA-4という分子をノックアウトする試みを行った。

研究成果の概要(英文)：Based on the amino acid sequence information of the antibody against the molecule PD-L1 thought to be expressed on tumor cells in order that tumor cells escape from immune cells, a single-chain antibody binding to PD-L1 was prepared. We further created a novel molecule with CD28 or 4-1BB or both as a part of domain. When this antibody was stained by fluorescent-labeled PD-L1 molecule, it was found that it stained well, indicating that it binds well to the antigen. This gene was transfected into T lymphocytes and its function was examined in vitro and in vivo in mice. On the other hand, we tried to knock out CTLA-4 molecule, which is expressed after activation of T cells and supposedly acts suppressively on self.

研究分野：遺伝子導入T細胞療法

キーワード：キメラ抗原レセプター 遺伝子導入T細胞療法 CD8陽性細胞 Tリンパ球 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍細胞はその周囲に免疫抑制的環境を形成することによって、免疫監視機構から巧妙に逃れている。Tリンパ球には自己免疫反応などの副反応の発生を抑制するために、多数の自己抑制的メカニズムが存在し、腫瘍や慢性炎症の排除にあたってはその途中で免疫寛容が誘導されてしまうことがある。こうした免疫逃避の為に腫瘍細胞が利用している分子として近年様々な分子が同定されている。なかでも今回我々は PD-L1 に注目し、これまで chimeric antigen receptor (CAR) 遺伝子導入 T細胞 (CAR-T) の開発で培った T細胞に対する遺伝子導入技術を用いて、PD-L1 に結合して免疫を活性化するシグナルを伝える分子を開発することにした。これは既存の CAR-T 細胞の CD28/4-1BB signal を PD-L1 との結合で伝えようとするものであり、CAR においては抗原との結合のみで得られていたシグナル 1 と 2 を分離して得ようとするものである。これは TCR 遺伝子導入 T細胞療法との組み合わせで使用され、TCR 遺伝子導入 Tリンパ球に付加的なシグナルを与えて、PD-L1 特異的な共刺激を受けることによって活性化を得ることを目指した。

(2) Tリンパ球は抗原刺激を受けて一旦活性化すると、その後に CTLA-4 が抗原提示細胞上の B7 分子 (CD80/86) に結合し、不活性化されるという自己抑制性を持っている。これは自己免疫反応や不必要な Tリンパ球の活性化が長引くのを防ぐためであると考えられている。近年がん免疫両方にブレイクスルーをもたらした免疫チェックポイント抗体療法は患者体内の Tリンパ球を非特異的に活性化させ、免疫抑制状態に陥っていた腫瘍特異的 T細胞の活性を呼び戻すものである。しかしながら、全身的には比較的強い副作用が観察され、腫瘍縮小は得られるものの患者 QOL の低下が一定の頻度で見られることが報告されている。今回我々が目指したのは腫瘍特異的リンパ球において特異的に CTLA-4 遺伝子を knock-out (KO) することもである。腫瘍特異的リンパ球が、自己抑制性を発揮しなくなることによって、より長く活性化状態が続き腫瘍に対する効果を増すことを期待した。

2. 研究の目的

(1) PD-L1 に対する chimeric signaling receptor (PD-L1-CSR) 開発および機能解析
腫瘍微小環境に発現し、腫瘍免疫に対して抑制的な環境を作る分子である PD-L1 に着目し、その抑制的なシグナルを、逆に免疫に対する賦活化シグナルに変換する方法を開発する。

(2) CTLA-4 KO Tリンパ球の開発

Tリンパ球に備わっている自己抑制的メカニズムの中で中心的な役割を果たしている CTLA-4 をロックアウトすることによって、腫瘍特異的 Tリンパ球が患者体内で自己抑制的に収縮することを防ぐ方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) PD-L1 に対する chimeric signaling receptor (PD-L1-CSR) 開発および機能解析

PD-L1-CSR の作成：既に作成し、PD-L1 に結合することも確認した単鎖 PD-L1 抗体に CD28/4-1BB/CD28+4-1BB の 3 種類の膜貫通領域と細胞内ドメインをつないだものを overlap PCR を用いて作成する。また細胞内ドメインを欠く construct も作成する。CD28/4-1BB の膜貫通領域と細胞内ドメインは、既に作成したものを鋳型として使用できる。

PD-L1-CSR 遺伝子をコードするレトロウイルス・ベクターの作成：レトロウイルスを作成するため、レトロウイルス・パッケージ細胞に、我々が作成した PD-L1-CSR をコードするプラスミド・ベクターを遺伝子導入する。培養上清中のレトロウイルスを濃縮してレトロウイルス・ベクターを作成する。これを用いて、PD-L1-CSR を Tリンパ球に遺伝子導入する。

PD-L1 を発現していない腫瘍細胞株に前述のレトロウイルス・システムを用いて PD-L1 を発現させる。腫瘍細胞にレトロウイルスを感染させた後、PD-L1 の発現によって細胞を分取し、発現の十分に高い細胞株を得る。CD4 あるいは CD8 に選択した Tリンパ球を用いて PD-L1-CSR を遺伝子導入し、さらに CAR あるいは TCR 遺伝子を遺伝子導入する。これまで報告したウイルス特異的 T細胞に CAR を遺伝子導入し、純化する方法を応用できる。

(2) CTLA-4 KO Tリンパ球の開発

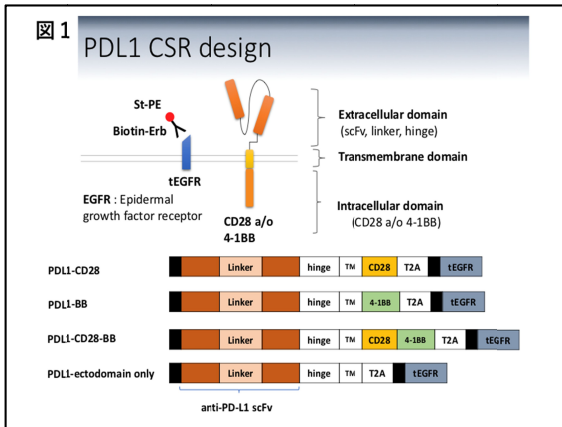
Cas9 system (Sigma) を用いて CTLA-4 遺伝子の KO が可能であるかどうか検討する。KO と同時にドナー・ベクターを用いて Homologous recombination (HR, 相同組み換え) を起こし、TCR あるいは CAR を遺伝子導入する。そうすることによって Tリンパ球に抗原特異性を持たせることが可能になる。このためには HR を起こすために両端に特異配列を配した CAR or TCR 遺伝子配列を組み込んだドナー・ベクターを作成する必要がある。これらの元ベクターは System Bioscience 社から入手した。CTLA-4 を特異的に KO する Cas9 ベクターおよびドナー・ベクターを CD4 あるいは CD8 に選択した Tリンパ球に nucleofection する。

4. 研究成果

(1) PD-L1 に対する chimeric signaling receptor (PD-L1-CSR) 開発および機能

解析

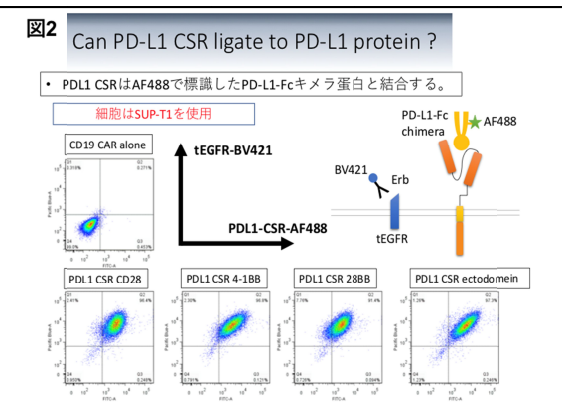
PD-L1-CSR をコードするベクターを作成し、これをパッケージしたウイルスによって遺伝子導入可能な系を確立した(図1)。これに加えて、T 細胞に抗原特異性を持たせるために、CD19CAR を遺伝子導入することにした。これは当初予定していたウイルス抗原特異的なリンパ球では PD-L1-CSR を遺伝子導入



した後、in vivo でその有用性を検討できるモデルがなかったためである。

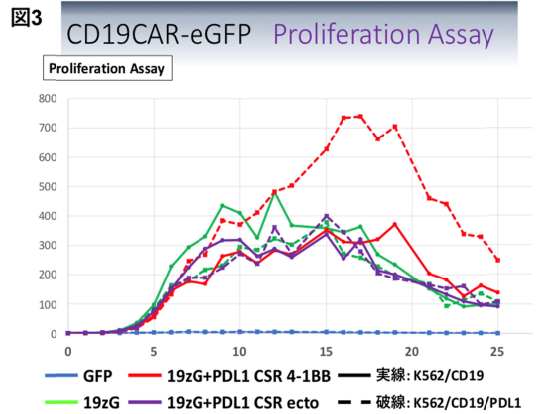
PD-L1-CSR と CD19CAR を同時に遺伝子導入できる系の確立を目指したが容易ではなかった。一回の遺伝子導入で双方の遺伝子が等量発現するように双方の遺伝子を 2A 配列を介して繋いだベクターを作成したが、うまく発現しなかった。そのため最終的に別々に、連続的に遺伝子導入を行うことにした。これによって十分な発現を確保することができた。

前述のようにして作成した PD-L1-CSR/CD19CAR を遺伝子導入した T 細胞腫瘍細胞株 (SUP-T1) を用いて実験を行った。PD-L1-CSR 陽性細胞は、PD-L1 分子を蛍光標識して染色すると、良好に染色されることから、PD-L1 分子ときちんと結合することが分かった (図2)。



次に、健常人の末梢血由来のリンパ球に CD19CAR/PD-L1-CSR を遺伝子導入し、in vitro における効果を検討した。PD-L1-CSR を遺伝子導入すると、PD-L1 を持つ標的細胞

で刺激をした場合のみ、刺激後の T リンパ球の活性化・増殖が改善することがわかった。一方で PD-L1 発現のない標的細胞で刺激をしても、そういった効果は確認されなかった(図3)。PD-L1 発現のある腫瘍細胞株に対する反応を検討したが、細胞傷害活性には変化はなかった。サイトカイン産生は PD-L1-CSR を発現している CTL で改善する傾向が見られた。PD-L1-CSR を発現した CTL は PD-L1 発現のある細胞株との共培養



において、刺激後増殖が増強することが観察された。

2018 年度以降にはこれらの結果を検証するため、ヒトの腫瘍細胞株を移植したマウスにおける動物実験を計画している。

(2) CTLA-4 KO T リンパ球の開発

はじめにプラスミド・ベクターを用いて nucleofection を行う系において CTLA-4 の KO を検討したが、使用した細胞に対する細胞障害性が非常に強く、十分な生細胞を得ることができなかった。そこでプラスミド・ベクターの代わりに RNA を作成し、これを Cas9 タンパクと一緒に作用させる系において遺伝子導入を行なった。これにより一連の遺伝子導入後に十分な生細胞の割合を得ることが出来、標的遺伝子の KO が可能となった。次に健常人の末梢血由来 T リンパ球において CTLA-4 を KO するため、Cas9 protein system を用いて CTLA-4 を標的として実験を進めた。Cas9 protein を作用させた後に細胞を再刺激して CTLA-4 発現が低下しているかどうか検討したところ、CTLA-4 発現が低下していることが確認出来た。PCR により該当部分の配列を増幅し、遺伝子配列が切断されていることを確認することができた。

同様の方法を用いて、他の標的遺伝子を KO できるかどうかも検討した。我々の開発した遺伝子改変 CD3zeta と併用することを想定し、CD3zeta を KO した。

2018 年度以降には CTLA-4 KO/CD19CAR T リンパ球を作成するため、細胞作成の手順を検証し、CTLA-4 KO T リンパ球を作成することに加えて CD19CAR を遺伝子導入する方法を検討している。これにより CD19 によ

る刺激を行なった場合の CTLA-4 KO の効果を検討する予定としている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

① Hosen N, Matsunaga Y, Terakura S, et al. (他 30 名 26 番目) Wada N, Morii E, Nishimura J, Takeda K, Oji Y, Sugiyama H, Takagi J, Kumanogoh A. The activated conformation of integrin $\beta(7)$ is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med.* 2017 Dec;23(12):1436-1443. doi: 10.1038/nm.4431. 査読あり

② Tawara I, Kageyama S, Terakura S, et al. (他 21 名 9 番目) Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood.* 2017 Nov 2;130(18):1985-1994. doi: 10.1182/blood-2017-06-791202. 査読あり

③ Terakura S, Kuwatsuka Y, et al. (他 20 名 筆頭著者) GvHD prophylaxis after single-unit reduced intensity conditioning cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2017,52(9):1261-1267. doi:10.1038/bmt.2017.116. 査読あり

④ Kawashima N, Terakura S, Nishiwaki S, Koyama D, Ozawa Y, Ito M, Miyamura K. Increase of bone marrow macrophages and CD8(+) T lymphocytes predict graft failure after allogeneic bone marrow or cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017,52(8):1164-1170. doi: 10.1038/bmt.2017.58. 査読あり

⑤ Terakura S, Wake A, et al. (他 16 名 筆頭著者) Exploratory research for optimal GvHD prophylaxis after single unit CBT in adults: short-term methotrexate reduced the incidence of severe GvHD more than mycophenolate mofetil. *Bone Marrow Transplant.* 2017,52(3):423-430. doi: 10.1038/bmt.2016.255. 査読あり

⑥ Kanda J, Morishima Y, Terakura S, et al. (他 16 名 3 番目) Impact of graft-versus-host disease on outcomes after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia.* 2017,31(3):663-668. doi: 10.1038/leu.2016.288. 査読あり

⑦ 寺倉精太郎 (他 10 名 筆頭著者) 心臓浸潤を認めた悪性リンパ腫 臨床血液 2017, 58(3):239-242.

doi: 10.11406/rinketsu.58.239. 査読あり

⑧ Sakemura R, Terakura S, et al. (他 10 名 2 番目, corresponding author) A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration. *Cancer Immunol Res.* 2016,4(8):658-68. doi: 10.1158/2326-6066. 査読あり

⑨ Terakura S, Atsuta Y, et al. (他 11 名 筆頭著者) Comparison of Outcomes of 8/8 and 7/8 Allele-Matched Unrelated Bone Marrow Transplantation and Single-Unit Cord Blood Transplantation in Adults with Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016,22(2):330-338. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.10.006. 査読あり

⑩ Terakura S, Martin PJ, Shulman HM, Storer BE. Cutaneous macrophage infiltration in acute GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 2015,50(8):1135-7. doi: 10.1038/bmt.2015.114. 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

① 寺倉精太郎 臍帯血移植における免疫抑制療法 第 40 回日本造血細胞移植学会総会 2018 年

② Julamanee J The synergistic T-cell signal by CD79A/CD40 costimulatory endodomain enhances CD19 chimeric antigen receptor T-cell proliferation and survival. The 59th annual meeting of the American Society of Hematology 2017 年

③ 寺倉精太郎 急性白血病に対する減量前治療を用いた臍帯血移植における GVHD 予防法の比較研究 第 79 回日本血液学会学術集会 2017 年

④ 宮尾康太郎 Improvement of antigen-specific CTL persistence by transduction of novel artificial adapter molecule. The 8th JSH International Symposium 2017 年

⑤ 宮尾康太郎 Improvement of antigen-specific CTL persistence by transduction of novel artificial adopter molecule. 58th ASH Annual Meeting and Exposition 2016 年

⑥ 宮尾康太郎 Gene modification by adapter molecule improves the expansion of antigen-specific CTL. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年

⑦ 寺倉精太郎 An exploratory research for the GVHD prophylaxis after conventional CBT for adult leukemia. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年

⑧ 宮尾康太郎 人工アダプター分子の遺伝子導入による抗原特異的 CTL 療法の改良 第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会

2016年

⑨ 酒村玲央奈 A novel strategy of switching on/off CD19CAR expression under Tetracycline based system. 57th ASH Annual Meeting and Exposition. 2015年

⑩ 酒村玲央奈 Inducible CD19 CAR expression under tetracycline-based regulation system. 第77回日本血液学会学術集会 2015年

⑪ 酒村玲央奈 テトラサイクリンシステムを用いたCD19CARの発現コントロール. 第7回血液疾患免疫療法研究会学術集会 2015年

⑫ 酒村玲央奈 Critical Effect of scFv Affinity to Chimeric Antigen Receptor Functions. 第6回日本血液学会(JSH)国際シンポジウム 2015年

〔図書〕

該当無し

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：T細胞機能向上のためのアダプター分子

発明者：寺倉精太郎、宮尾康太郎、清井仁

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2016-122958

出願年月日：2016年6月21日

国内外の別：国内

名称：キメラ抗原レセプター遺伝子発現システム

発明者：寺倉精太郎、酒村玲央奈、清井仁

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2015-099592

出願年月日：2016年5月15日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺倉 精太郎 (TERAKURA, Seitaro)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40625141

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

奥野 真吾 (OKUNO, Shingo)

Jakrawadee Julamanee (JULAMANEE, Jakrawadee)

宮尾 康太郎 (MIYAO, Kotaro)

酒村 玲央奈 (SAKEMURA, Reona)