

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2018～2021

課題番号：16K21751

研究課題名（和文）遺伝子改変制御性T細胞を用いた炎症性疾患治療の実現を目指した基礎的検討

研究課題名（英文）A basic research aimed at realizing the treatment of inflammatory diseases using engineered Treg cells

研究代表者

知念 孝敏（Chinen, Takatoshi）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：80432912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 43,300,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞（regulatory T cells; Treg）は、免疫応答のブレーキ役、調節役として機能するが、この細胞による免疫抑制の基本的な動作メカニズムの全容は未だ解明されていない。本研究では、制御性T細胞上の抗原受容体に着目し、この受容体が果たす役割の解明を目指し、研究を行った。また、この受容体に人為的な改変を加えた、遺伝子改変制御性T細胞を作製し、炎症治療に用いる事ができるかについての検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
炎症の行き過ぎに起因する様々な難治性疾患に対する新規治療法の一つとして、制御性T細胞の持つこの抑制能を活用する事が期待されているが、それを実現する為には、この細胞による免疫抑制の基本的な動作メカニズムを詳細に解明する必要がある。本研究では、制御性T細胞上に発現する抗原受容体の役割を解明すべく研究を行った。制御性T細胞を用いた炎症性疾患治療を実現するにあたり不可欠な有用な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells (Treg) function as modulators of immune responses. The basic mechanism of immunosuppression by these cells has not yet been fully elucidated. In this study, we focused on antigenic receptors on regulatory T cells to elucidate the role of these receptors. We also generated genetically engineered regulatory T cells by artificially modifying the receptor and examined whether they could be used for the treatment of inflammatory disorders.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤や抗体医薬(抗サイトカイン療法)の使用をもってしても治療に難渋する難治性慢性炎症性疾患の症例が多く存在し、新規治療法の開発が切望される。CD4陽性の制御T細胞(Treg)が生体内において免疫系の暴走を抑える必須の役割を果たしていることから、これを炎症性疾患治療に用いようとする試みがこれまでもなされてきた。例えば、薬剤やサイトカインによって生体内のTregの数を増やす、*in vitro*で増殖させたTregを生体に移入する、といった方法が挙げられる。しかしながら、そもそも生体内にはTregが存在し、炎症組織では数も増加している事が多い。にもかかわらず患者体内では炎症が持続しているのであり、Tregを用いて切れ味の鋭い治療を施すには、炎症組織でも機能する抑制活性の高いTregを増やす必要がある。Tregは、抗原受容体を持ったT細胞である。Tregを増やすとしても、単純にポリクローナルな細胞集団を増殖させただけでは目的組織でうまく抗原刺激を得られず免疫抑制が不十分(治療無効)となったり、逆に、目的外の組織で非特異的な免疫抑制を起こし、感染症の増悪や悪性腫瘍の発生等を招くおそれがある。抑制の特異性を上げるには、モノクローナルなTregを増殖させれば良いが、炎症性疾患において炎症細胞が認識し、炎症の発症あるいは増悪に関与していると考えられる抗原を同定する事は容易ではなく、その特定の抗原に対するT細胞受容体を持つTregを選別する事も容易ではない。抗原を同定できたとしても、治療のたびごとに患者のTreg集団を採取し、抗原に対応するTregを体外で増殖させる操作を加えねばならず治療コストがかかり、そのような操作を加えた細胞の安全性も担保されず、良性疾患に対する治療法として障壁が高い。

このような中で、抗体(B細胞受容体)の抗原結合部位とT細胞受容体(TCR)のシグナル伝達部位を直列に結合させた抗原受容体(キメラ抗原受容体; Chimeric Antigen Receptor; CAR)が、T細胞において適切に機能しうる事が示され、CD19を認識するCARを導入したCD8陽性細胞が、B細胞性白血病に対する抗腫瘍免疫療法において絶大な効果を発揮する事が臨床レベルで示された。CARはTCRと異なり、抗原との結合にMHCの介在を必要としないため、患者個人ごとに異なる受容体を用意する必要が無いという、医療コスト的に非常に大きな優位性を持つ。このCAR技術をTreg療法に応用する事も試みられているが、未だ黎明期であり、実用化のために様々な障壁がある。そもそもTregによる免疫抑制がどのように行われているのか、未だ判然としていない部分も多く、Treg上の抗原受容体の変更、抗原特異性の変更が可能であるかも十分には検証されていない。

「Tregによる免疫抑制は抗原特異的に行われているのか」という命題は非常に重要な課題であるが、未だ明快な答えが得られていない。Tregは抗原を認識し増殖するため、抗原特異的に増殖し抑制能を上昇させる事は疑いないが、この時に周辺に存在するエフェクターT細胞(non-Treg)を区別なく抑制しているのか、あるいは特定の抗原を認識するnon-Tregだけを特異的に抑えているのか、統一した見解が得られていない。Treg解析にCAR技術を導入する事で、このような疑問にも解を与えられるのではないかと考え、研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、Treg細胞療法(遺伝子改変Tregの生体移入による炎症抑制)を実現させるにあたり、CAR技術の導入が一つの解決策となり得ると考え、CAR導入Tregのふるまいの解析を行った。また、Treg解析にCAR技術を導入する事で「Tregによる免疫抑制は抗原特異的に行われているのか」という未だ未解明の課題についても解が与えられると考え、これを明らかにするための実験を行った。Tregが抗原特異的に炎症制御を行っているのかどうかという非常に重要な疑問が未解明のまま残されている理由の一つに、T細胞受容体解析にまつわる技術的困難がある。解析の困難なT細胞受容体から一旦離れ、より柔軟に抗原および抗原受容体を変更する事のできるCAR技術を用い、CAR導入T細胞のふるまいを多角的に解析する事でT細胞応答における抗原および抗原受容体の特性を探る事ができると考えた。

3. 研究の方法

CAR技術はヒトT細胞を用いた検討が盛んに行われているが、受容体や抗原を自在に変更し、*in vivo*で多角的な検討を行うにはマウスモデルを用いた方法がより効率的であると考え、マウス由来細胞およびマウス生体を用いた解析を行った。

・以下のような項目につき検討を行った。

1. Tregに発現させるCARの基本コンストラクトの選定
2. CARの認識する抗原の選定、抗原結合部位(一本鎖抗体の可変領域 scFv)のベクターへの

組み込みと特異的結合の確認

3. レトロウイルスを用いた CAR コンストラクトの Treg 細胞への導入

4. CAR 導入 Treg の in vitro, in vivo でのふるまいの解析

・これらの検討を行うために以下のようなマウスを用いた。

1. Foxp3-GFP マウス (Treg 特異的に発現する転写因子である Foxp3 のプロモーターの制御下に GFP が発現するマウス。GFP を指標に Treg 細胞を集める事ができる)

2. Trac-flox マウス (T 細胞受容体 鎖定常領域の flox マウス。Cre を作動させる事で内因性の TCR を欠損させる事ができ、CAR 単独の作用を解析する事ができる)

3. Foxp3-DTR マウス (Treg 特異的に発現する転写因子である Foxp3 のプロモーターの制御下に高感受性型のジフテリア毒素受容体が発現するマウス。ジフテリア毒素の投与によりマウス生体から Treg を除去する事ができる)

4. TCRb/d 欠損マウス (T 細胞受容体 鎖および 鎖を欠損するマウス。成熟 T 細胞が存在しないため、T 細胞移入のレシピエントとして有用である)

・CAR 発現 Treg による炎症抑制能の評価

Foxp3-GFP マウスから GFP を指標に Treg を集め、これにレトロウイルスを用いて任意の CAR を発現させたうえで Cre 処理を行い Treg 上の内因性 TCR を欠損させる。Foxp3-DTR マウスには DT を投与し、自己応答性の活性化 T 細胞を取得する。この両細胞を TCRb/d 欠損マウスに移入し、CAR 発現 Treg 細胞が自己応答性のポリクローナルな T エフェクター細胞を抑制しうるかどうかにつき検討を行った。

4. 研究成果

主たる成果については論文発表前であるため、詳細な記載はできないが、現時点の成果の概要を記載する。

1. 複数のハイブリドーマ細胞株から 5' RACE 法を用いて抗体重鎖および軽鎖の可変部の配列情報を取得し、複数の scFv (一本鎖抗体) を作製した。
2. NFAT 活性依存性に tdTomato (蛍光たんぱく) を発現するコンストラクトを組み込んだ BW5147 細胞株を樹立し、scFv および CAR の結合特異性の評価を可能にした。
3. CAR の基本コンストラクト (scFv 部位以外の基本構造) として、マウス由来 CD8a, IgG2c, CD28, CD137, CD3z など複数組み合わせたものを作製し、機能評価を行った。一部のコンストラクトは NFAT 活性化能が非常に低く、逆にあるものは抗原非存在下でも定常的なシグナル伝達 (tonic signaling) が認められ、こうしたものは抗原特異性の評価には不適であった。
4. CAR 発現 Treg の作製にあたり、Foxp3 発現の安定的な維持が大きな問題となった。マウス生体への移入に供する事ができる程度の数の確保のために、CAR 発現 Treg を in vitro で増殖させる必要があったが、マウス Treg の Foxp3 発現の in vitro での長期的維持は困難であり、培養方法に工夫が必要であった。高濃度 IL-2、TGF- β 、レチノイン酸、ラバマイシンなど、Foxp3 発現の安定に寄与するとされる物質を組み合わせる事で一定の改善が認められたが、それでも尚、一週間を越えての培養では不安定性を払拭する事ができなかった。ベクターを用いた Foxp3 の強制発現による Treg 形質の維持も試みたが、Foxp3 の強制発現は T 細胞の強力な増殖抑制を引き起こし、採用する事はできなかった。
5. CAR 単独での働きを正確に評価するため、Trac-flox マウスを用い、内因性の TCR を欠損させて評価を行った。当初は TAT-Cre (細胞膜透過型 Cre) を用いたが、Cre による毒性が Treg 機能を低下させる傾向が見られたため、Foxp3-Cre-ERT2 マウスの使用に切り替え、in vivo でのタモキシフェン処理により内因性 TCR の発現の低下を促すモデルに変更を行った。
6. 作製した多くの CARTreg において、抗原刺激後の細胞数の減少 (細胞死の増加もしくは増殖の抑制)、Foxp3 発現の喪失など、CARTreg として好ましくない事象が観察された。このような CAR であってもエフェクター T 細胞においては問題なく機能し、non-Treg と Treg において適切な CAR の構造は異なると考えられた。生理的な Treg による TCR を介した抗原認識との違いを検証し、CAR に更なる改良を加えた。

研究開始当初に既にごく少数ながら CARTreg 作製の既報が存在したため、Treg に CAR を導入し機能させる事自体は困難ではないと考えていたが、実際には様々な障壁が存在し、最適化に非常に長い時間を要した。in vivo での CARTreg のふるまい、抗原特異性の有無については、予定した研究期間内に明確な答えを出す事ができなかったが、試行錯誤の過程で非常に多くの知見を蓄積する事ができた。このため今後も研究は継続し、当初の疑問を追求する方針とした。in vivo における CARTreg のふるまい (抑制活性、遺伝子発現パターン等) のデータを追加し、近日中に論文として発表する事を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Campbell Clarissa, Dikiy Stanislav, Bhattarai Shakti K., Chinen Takatoshi, Matheis Fanny, Calafiore Marco, Hoyos Beatrice, Hanash Alan, Mucida Daniel, Bucci Vanni, Rudensky Alexander Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Extrathymically Generated Regulatory T Cells Establish a Niche for Intestinal Border-Dwelling Bacteria and Affect Physiologic Metabolite Balance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1245 ~ 1257.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2018.04.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukaura Keita, Iboshi Yoichiro, Ogino Haruei, Ihara Eikichi, Nakamura Kazuhiko, Nishihara Yuichiro, Nishioka Kei, Chinen Takatoshi, Iwasa Tsutomu, Aso Akira, Goto Ayako, Haraguchi Kazuhiro, Akiho Hirotada, Harada Naohiko, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Mucosal Profiles of Immune Molecules Related to T Helper and Regulatory T Cells Predict Future Relapse in Patients With Quiescent Ulcerative Colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammatory Bowel Diseases	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ibd/izy395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bai Xiaopeng, Ihara Eikichi, Otsuka Yoshihiro, Tsuruta Shinichi, Hirano Katsuya, Tanaka Yoshimasa, Ogino Haruei, Hirano Mayumi, Chinen Takatoshi, Akiho Hirotada, Nakamura Kazuhiko, Oda Yoshinao, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 857
2. 論文標題 Involvement of different receptor subtypes in prostaglandin E2-induced contraction and relaxation in the lower esophageal sphincter and esophageal body	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172405 ~ 172405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2019.172405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuno Hiroaki, Ogino Haruei, Ihara Eikichi, Nishioka Kei, Iboshi Yoichiro, Chinen Takatoshi, Ochiai Toshiaki, Akiho Hirotada, Nakamura Kazuhiko, Gotoda Takuji, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 102
2. 論文標題 Interleukin-1 as a Predictor of Glucocorticoid Response in Ulcerative Colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 357 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000507435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogino Haruei, Fukaura Keita, Iboshi Yoichiro, Nagamatsu Yousuke, Okuno Hiroaki, Nishioka Kei, Nishihara Yuichiro, Tanaka Yoshimasa, Chinen Takatoshi, Ihara Eikich, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Role of the IL-23-T-bet/GATA3 Axis for the Pathogenesis of Ulcerative Colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 592 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-020-01358-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishioka Kei, Ogino Haruei, Chinen Takatoshi, Ihara Eikichi, Tanaka Yoshimasa, Nakamura Kazuhiko, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Mucosal IL23A expression predicts the response to Ustekinumab in inflammatory bowel disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 976 ~ 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01819-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishihara Yuichiro, Ogino Haruei, Tanaka Masaru, Ihara Eikichi, Fukaura Keita, Nishioka Kei, Chinen Takatoshi, Tanaka Yoshimasa, Nakayama Jiro, Kang Dongchon, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Mucosa-associated gut microbiota reflects clinical course of ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92870-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuno Hiroaki, Ogino Haruei, Ihara Eikichi, Nishioka Kei, Tanaka Yoshimasa, Chinen Takatoshi, Kohjima Motoyuki, Oono Takamasa, Tanaka Masatake, Goya Takeshi, Fujimori Nao, Iboshi Yoichiro, Gotoda Takuji, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Discriminant equation using mucosally expressed cytokines and transcription factor for making definite diagnosis of inflammatory bowel disease unclassified	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-01656-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center		