

令和 3 年 3 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07212

研究課題名(和文) CRISPR/HDRゲノム編集技術を用いた抗原特異的免疫細胞療法の確立

研究課題名(英文) Development of CRISPR/HDR genome editing technology in primary T cells for improved immunotherapy

研究代表者

大内 靖夫 (OUCHI, YASUO)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70553858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、免疫チェックポイント阻害剤、ゲノム編集T細胞、がん抗原特異的TCRまたはキメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入T細胞を用いたがん免疫療法は第四の治療法として注目されている。しかし、これらの治療法は数多くの問題を抱えている。本研究課題ではT細胞に対してCRISPR/HDRを用いた非ウイルス遺伝子導入技術を開発し、免疫細胞療法の基盤技術を構築することを目的とした。その結果、従来の遺伝子導入試薬では不可能であった初代T細胞に対して高効率で遺伝子導入できるナノ粒子を開発した。本ナノ粒子を用いることにより、簡便にゲノム編集T細胞を作成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫チェックポイント阻害剤、ゲノム編集T細胞、がん抗原特異的TCRまたはキメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入T細胞を用いたがん免疫療法は第四の治療法として注目されている。しかし、ゲノム編集技術を用いた免疫細胞療法は国外では臨床試験が進んでいるものの、数多くの技術的な問題を抱えており、幅広い臨床応用は難しい状況である。本研究課題で開発したナノ粒子を利用したゲノム編集技術は従来の遺伝子導入試薬では不可能であった初代T細胞に対する簡便な遺伝子導入およびゲノム編集を可能にする技術である。今後、ゲノム編集T細胞を用いた免疫細胞療法の汎用化において重要なツールになることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, immunotherapies have led to the successful development of novel treatments for cancer, primarily by two strategies, immunologic checkpoint blockade therapy, and adoptive T-cell therapy. Although these immunotherapies have shown promising efficacy in the treatment of cancer, there remain considerable difficulties. In this study, to develop the clinically applicable methodology for the immunotherapies using genome-edited T cells, we aim to develop the technology that allows the one-step generation of antigen-specific T cells using non-viral strategy. From the results obtained in this study, we developed a novel nanoparticle carrying genome editing tool for the primary mouse T cells. This technology allows a novel and easy-to-use methodology to generate the genome-edited T cells for use in clinical settings that have been previously impossible.

研究分野：ゲノム編集技術

キーワード：ゲノム編集 T細胞 がん免疫療法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害剤、ゲノム編集 T 細胞、がん抗原特異的 TCR またはキメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入 T 細胞を用いたがん免疫療法は第四の治療法として注目されている。しかし、これらの治療法は重篤な自己免疫疾患関連副作用 (irAE)、がん免疫逃避機構による輸注細胞の免疫抑制、非常に高額な治療費、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入など非常に多くの問題を抱えている。そこで本研究課題では T 細胞に対して CRISPR/HDR などの技術を用いた非ウイルス性遺伝子導入技術を開発し、1 STEP で抗原特異的 T 細胞を作成し、各種がん、免疫疾患モデルマウスを用いて、その細胞の有効性を評価することで、免疫細胞療法の基盤技術を構築することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究課題では我々が開発した Cas9 タンパク質/gRNA 複合体の細胞内導入による超高効率ゲノム編集技術、および TCR の抗原認識立体構造モデリング技術を駆使し、HDR (相同性配向型修復) を用いた遺伝子導入技術により、がん抗原特異的 CD8+T 細胞および抗原特異的制御性 T 細胞を作成する。また非ウイルス性遺伝子導入技術による簡便な T 細胞遺伝子改変技術の開発を目的とする。得られたゲノム編集抗原特異的 T 細胞の有効性を、各種疾患モデルマウスを用いて検証し、癌及び自己免疫疾患に対する抗原特異的な免疫細胞療法の基盤技術を構築することを最終目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRISPR/HDR 技術を用いたがん抗原特異的 CD8+T 細胞の 1 Step 作成技術の開発

CRISPR/HDR 技術は、Cas9/gRNA によるゲノム DNA の切断の際に、その周辺領域と相同性を有するアームを両端に持った HDR ドナー DNA を同時に導入することで、切断部位に非ウイルス的に遺伝子導入を行う技術である。そこで我々がマウス CD8+T 細胞に対して開発したゲノム編集技術を用いて TCR 遺伝子定常領域の切断を行う際に、先行研究から得た hgp100 特異的 TCR 遺伝子または OT-1 TCR 遺伝子をドナー DNA として、同時に導入することで HDR による遺伝子導入を試みた。なお、導入 TCR 遺伝子は PGK プロモーター制御下、2A ペプチドを用いて Polycistronic に TCR $\alpha$ / 遺伝子が発現するように構築し、かつ下流に IRES-EGFP の配列を導入することで、GFP の発現で遺伝子導入を検出できるように構築した。一方、CRISPR/HDR 技術による長鎖の遺伝子導入は、これまでの研究成果から、導入が困難であることが知られており、新しい手法の開発が精力的に進められている。そこで既報の dsDNA 法、Long ssDNA 法、HITI 法、SCR7 阻害剤を用いた方法などを検討することで、T 細胞における CRISPR/HDR を用いた遺伝子導入を検討した。また新規の方法として Gibson assembly を利用した HDR ドナー DNA を同時に導入する方法など複数の方法を考案し検討も行った。得られた細胞に対して、PCR、GFP レポーター遺伝子発現を解析することで遺伝子導入効率を評価した。

#### (2) マウス制御性 T 細胞に対する Cas9/gRNA RNP を用いた高効率ゲノム編集技術の開発

マウス制御性 T 細胞に対して最適な条件の検討を行う。マウス脾臓より単離した Treg に対して、IL-2、CD3/CD28 beads にて刺激を行い、培養開始 24-96 時間において、細胞を回収し、Neon® Transfection System を用いて、リコンビナント GFP タンパク質の電気穿孔法によるタンパク質の細胞内導入を行った。この際、電圧 (V)、パルス幅 (ms)、パルス回数の条件検討を行う。2 時間後に FACS を用いて GFP 陽性細胞、死細胞の割合を解析することで、Treg におけるタンパク質導入に適した電気穿孔法の条件を得た。

#### (3) ナノ粒子を用いた T 細胞に対する新規遺伝子導入技術の開発

近年、我々を始めとした電気穿孔法を用いた Cas9 RNP 導入技術の進歩により、T 細胞における高効率ゲノム編集が可能となった。しかし、依然 T 細胞は遺伝子導入が困難な細胞種であり、高効率で遺伝子を導入できる試薬は存在しない。また T 細胞ではゲノム編集において十分な量の Donor DNA を細胞内に導入できないことから、Knockin ゲノム編集の低下を引き起こしている可能性が考えられる。一方、近年、脂質ナノ粒子 (LNP) 技術を用いた遺伝性トランススチレチン介在性アミロイドーシスに対する低分子干渉 RNA 治療薬である Patisiran が FDA に承認されたことにより、非ウイルス核酸デリバリー技術として注目されている。そこで米国サンディエゴの脂質ナノ粒子のバイオベンチャー企業とともに T 細胞を標的とした新規の遺伝子導入技術の開発を行った。

#### (4) T 細胞に対するゲノム編集ナノ粒子の開発

前述の脂質ナノ粒子に CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール mRNA を封入することにより、ゲノム編集ナノ粒子の開発を行った。得られたゲノム編集ナノ粒子を IL-2、CD3/CD28 beads にて刺激を行ったヒト CD8(+) T 細胞に添加し、5 日後に細胞毒性の評価および T 細胞におけるゲノム編集効率の確認を行った。

### 4. 研究成果

前述の研究方法に従い、マウス脾臓より調整した CD8(+) T 細胞に対して我々が確立した電気穿孔法による Cas9 RNP の高効率細胞内導入によるゲノム編集を利用し、TCR $\alpha$  遺伝子領域に対する

PGK-GFP レポーター遺伝子の Knockin 導入の条件検討を進めてきた結果、既報の dsDNA 法、Long ssDNA 法、HITI 法、Gibson assembly を利用した HDR ドナーDNA を用いた方法では Knockin ゲノム編集 T 細胞が得られなかった。一方、新規に我々が開発した CRISPR/Staple 法を用いることで約 3% の効率で Knockin ゲノム編集 T 細胞を得ることができた。続いて OT-I TCR 遺伝子をドナー DNA として、本手法を用いて Knockin 遺伝子導入を試みた結果、同様に OT-I TCR Knockin ゲノム編集 T 細胞を得ることに成功した。しかし、TCR 遺伝子の Knockout 効率は 80% 以上であったものの、Knockin 効率は低い状況であり、本細胞を用いての *in vivo* での細胞機能評価を行うには抗原刺激による細胞増幅が必要な状況であった。一方、マウス脾臓より単離した Treg に対して、IL-2, CD3/CD28 beads にて刺激を行い、培養開始 24-96 時間において、細胞を回収し、Neon® Transfection System を用いて、TCR 遺伝子を標的とした Cas9 RNP の電気穿孔法によるタンパク質の細胞内導入によるゲノム編集の条件検討を行った。その結果、刺激後 48 時間 1700V, 10ms, 3 回の電気刺激の条件にて約 70% の効率で TCR 遺伝子の Knockout することに成功した。続いて本条件のもと、PGK-GFP レポーター遺伝子の Knockin 導入を試みたが、CD8(+)T 細胞と同様に遺伝子 Knockin は効率が低い状況であった。T 細胞は一般的に遺伝子導入が困難な細胞種であることから、Knockin ゲノム編集において十分な量の Donor DNA を細胞内に導入できていないことが低効率であった原因として考えられた。一方、近年、脂質ナノ粒子 (LNP) 技術を用いた低分子干渉 RNA 治療薬である Patisiran が FDA に承認されたことにより、非ウイルス核酸デリバリー技術として注目されている。そこで米国サンディエゴの脂質ナノ粒子のバイオベンチャー企業とともに T 細胞を標的とした新規の遺伝子導入技術の開発を行った。脂質ナノ粒子の構成成分の詳細な条件検討を行い、GFP mRNA を封入した 10 種の脂質ナノ粒子を作成し、マウス脾臓より調整した CD8(+)T 細胞を IL-2, CD3/CD28 beads にて刺激を行い、培養開始 0, 24, 48, 72 時間にて脂質ナノ粒子を添加し、24 時間後に GFP 遺伝子の発現を解析した結果、脂質ナノ粒子 #6 を用いることで細胞の生存に影響を与えずに 50% 以上の細胞に遺伝子を導入することに成功した。またヒト凍結 CD8(+)T 細胞を用いて同様の検討を行った結果、90% 以上の効率で GFP 遺伝子、CD19CAR 遺伝子を導入できることが確認された。続いて TCR, PD-1 を標的とした CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール mRNA を合成し、本脂質ナノ粒子 #6 に封入することでゲノム編集ナノ粒子を作成した。本ゲノム編集ナノ粒子をヒト CD8(+)T 細胞に添加することで TCR 遺伝子に対するゲノム編集効率を解析したところ 40% の効率で TCR 遺伝子欠損 T 細胞を得ることに成功した。本技術は従来の技術では不可能であった T 細胞に対する簡便かつ高効率の遺伝子導入とゲノム編集を可能とする画期的な技術であり、今後、ゲノム編集 T 細胞、CAR-T 細胞を用いた免疫細胞療法において有用な基盤技術になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto T, Endo Y, Onodera A, Hirahara K, Asou HK, Nakajima T, Kanno T, Ouchi Y, Uematsu S, Nishimasu H, Nureki O, Tumes DJ, Shimojo N, Nakayama T	4. 巻 9
2. 論文標題 DUSP10 constrains innate IL-33-mediated cytokine production in ST2hi memory-type pathogenic Th2 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 4231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-06468-8	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 Usui Y, Kimura Y, Satoh T, Takemura N, Ouchi Y, Ohmiya H, Kobayashi K, Suzuki H, Koyama S, Hagiwara S, Tanaka H, Imoto S, Eberl G, Asami Y, Fujimoto K, Uematsu S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of long-term intake of a yogurt fermented with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 and <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131 on mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 319-331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy035	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 Ouchi Y, Patil A, Tamura Y, Nishimasu H, Negishi A, Paul SK, Takemura N, Satoh T, Kimura Y, Kurachi M, Nureki O, Nakai K, Kiyono H, Uematsu S	4. 巻 30
2. 論文標題 Generation of tumor antigen-specific murine CD8+ T cells with enhanced anti-tumor activity via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 141-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy006	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuo Ouchi, Ashwini Patil, Hiroshi Nishimasu
2. 発表標題 Generation of tumor-specific CD8+ T-cells via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing
3. 学会等名 XVI KI Cancer-StratCan retreat
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuo Ouchi, Ashwini Patil, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Kenta Nakai, Satoshi Uematsu
2. 発表標題 Generation of tumor-specific cytotoxic T cells via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuo Ouchi, Ashwini Patil, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Kenta Nakai, Satoshi Uematsu
2. 発表標題 Generation of tumor-specific cytotoxic T cells via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔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
---------------------------	-----------------------	----