

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07714

研究課題名（和文）CAR-T細胞選択的な増殖・生存制御システムの開発

研究課題名（英文）Development of selective regulatory system for proliferation and persistence of CAR-T cells

研究代表者

内堀 亮介（Uchibori, Ryosuke）

自治医科大学・医学部・講師

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、輸注したCAR-T細胞の体内増幅や生存を選択的に制御するための選択的制御遺伝子（SRG: selective regulatory gene）を開発した。SRGを搭載したT細胞は誘導剤（EPO）による刺激を加えると、良好な増殖が誘導された。また、マウスに輸注したSRG搭載T細胞は、EPOを投与している間は体内での細胞増殖が誘導され存続することを明らかにした。SRG搭載CAR-T細胞は、in vitroにおいてCD19陽性標的細胞を特異的に傷害した。担がんマウスの治療実験では、既存のCAR-T細胞ではがん細胞の増殖を制御することができない条件でも、全例が生じた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、in vitroおよびin vivoで、CAR-T細胞の増殖・生存制御を選択的かつ効率よく可能にするSRG技術を開発した。この成果は、CAR-T療法の可能性拡大や有効性の向上に繋がる基盤技術として利用できることだけに留まらず、T細胞を用いたあらゆる免疫細胞療法に対しても広く波及することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a selective regulatory gene (SRG) to selectively regulate proliferation and survival of CAR-T cells in vitro and in vivo. SRG-T cells were selectively expanded upon stimulation with an inducer (EPO). SRG-CAR-T cells showed cytolytic activity against CD19-positive target cells in vitro. In therapeutic experiments with tumor-bearing mice, SRG-CAR-T cells strongly suppressed tumor growth and all mice were survived even under conditions in which conventional CAR-T cells were unable to control tumor growth.

研究分野：免疫遺伝子細胞治療

キーワード：キメラ抗原受容体 CAR 選択的制御遺伝子 SRG

## 1. 研究開始当初の背景

血液系のがんに対して CD19 を標的とした CAR-T 療法が劇的な臨床効果を示したことから、CAR-T 療法の国際的な開発競争が激化している。CAR-T 療法は現時点では完成された治療法ではなく、CAR-T 療法を広く展開するために新たな標的抗原の探索が精力的に行われている一方で、解決すべき課題も数多く残されている。CD19 を標的とした CAR-T 療法においても、治療無効症例や、CAR-T 療法後の再発症例に有効な戦略・技術の開発が課題となっている。CAR-T 療法の成否を握る鍵として、メモリー型 CAR-T 細胞の効率的な体内増幅と持続能の重要性が、米国の研究グループにより指摘されている[Fraietta JA, et al. Nat Med 2018.]。これまでも T 細胞の体内増幅や持続能に関わる分子を CAR と共発現する方法が検討されているが、そのシグナル伝達を制御することは難しく、安全性を確保するためにはさらなる改良が必要である。そこで我々は、CAR-T 細胞選択的に効率よく増殖・生存制御を可能にする技術の開発が、CAR-T 療法の治療有効性を高めるために必要であると考えた。

分化段階の幼若な T 細胞を得るために、CD8 陽性メモリー T 細胞の維持に重要な役割を果たす IL-7 や IL-15 等のサイトカインを利用した培養法が検討されている[Ghassemi S, et al. J Immunol 2016.]。また、CAR-T 細胞の体内持続能を高めるために T 細胞の活性を増強する副刺激分子を発現させる方法を含めいくつか報告されているが[Stephan MT, et al. Nat Med 2007.; Zao Z, et al. Cancer Cell 2015.]、その活性を生体内で制御することは困難である。本研究で開発する SRG は、T 細胞の増殖には関係しない EPO 受容体の細胞外領域と、T 細胞の増殖に関与する受容体の細胞内領域を組み合わせることで、T 細胞選択的な増幅の誘導を可能にする技術である。CAR と併用することで、生体に投与した後も、EPO の投与により CAR-T 細胞選択的な増殖・持続能の誘導を制御することができる。実際、キメラ型 EPO 受容体を用いることで、造血幹細胞の選択的な増幅を可能にした研究例が報告されており [Ito K, et al. Blood 1997.]、利用する細胞内シグナル領域を最適化することで、T 細胞にも応用できると見積もられる。本研究によって得られる成果は、CAR-T 療法の可能性拡大や有効性の向上に繋がる基盤技術だけに留まらず、T 細胞を用いたあらゆる免疫細胞療法に対しても広く波及することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究において、エリスロポエチン (EPO; erythropoietin) 反応型 T 細胞用選択的制御遺伝子 (SRG; selective regulatory gene) を作製し、CAR-T 療法の治療効果を高めるための基盤技術となることを明らかにする。SRG は EPO 受容体の細胞外領域と、T 細胞の増殖・生存シグナル伝達に関わる分子の細胞内領域を連結した人工遺伝子である。SRG の最大の特徴は、EPO の投与により生体内でもシグナル制御が出来るという、従来を試みには無い優れた技術的先進性である。さらに、既に医薬品として認可されている EPO を制御因子に利用することで、高い安全性と信頼性を備えた細胞制御技術として、迅速な実用化を見据えている。また、CAR-T 細胞の作製は一般的にサイトカイン依存的な増殖シグナルを利用して行われるが、CAR-T 細胞の終末分化や疲弊化 (サイトカイン産生能の消失、アポトーシスによる死滅) に加え、制御性 T 細胞の増幅が問題となっていた。SRG はサイトカイン非依存かつ CAR-T 細胞選択的な増幅を誘導できる技術であり、上記の問題を解決するための手段として、CAR-T 細胞製造時にもその特性を活用することができる。こうして作製された CAR-T 細胞は、従来製造方法で作製した CAR-T 細胞とは異なる細胞学的機能を示すことが予想され、CAR-T 療法の新たな可能性を切り開くためのツールとして、更なる発展が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) SRG の構築

本研究の最優先課題は、CAR-T 療法と SRG 技術の併用が、治療効果を高める手段として有効であることを明らかにすることである。SRG は EPO 受容体の細胞外領域と、T 細胞の増殖・生存シグナル伝達に関わる分子の細胞内領域を連結したキメラ分子をコードする人工遺伝子である。CAR-T 細胞に SRG を搭載することによって、輸注した CAR-T 細胞を体内で人為的に増幅させる、標的抗原に反応した CAR-T 細胞のアポトーシスや疲弊・老化による消失を阻止して長期持続を図る、という大きく 2 つの戦略が想定される。本研究では、解析の容易性を考慮して、第一段階として EPO 刺激依存的な増幅を誘導する分子の構築を目指す。最終的には、SRG と CAR (CD19-CAR や BCMA-CAR) 遺伝子を 2A 配列で連結して 1 つのウイルスベクター骨格に搭載した発現プラスミドを構築する。

### (2) SRG 搭載 T 細胞および SRG 搭載 CAR-T 細胞の細胞特性の解析

SRG 搭載 T 細胞および SRG 搭載 CAR-T 細胞は、IL-2 非存在下でも EPO 添加によって細胞増殖が誘導されることを明らかにする。また、フローサイトメーター (FCM) を用いた疲弊化および老化分子マーカー (PD-1、TIM-3、LAG3) の発現確認、FCM を用いた T 細胞サブセットの解析、FCM を用いた制御性 T 細胞を解析する。改良型 SRG 搭載 T 細胞の細胞疲弊度、エフェクター T 細胞の割合について、IL-2 で培養した時と比較することにより、現状の CAR-T 細胞作製法で

問題となっている終末分化や疲弊化の誘導に対して、SRG システムを用いた細胞製造の優位点を明らかにする。また、SRG 搭載 CAR-T 細胞の細胞障害活性について、LDH release assay による短期間での評価を行う。サイトカイン産生は、CD19 陽性標的細胞と共培養し、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF の産生を確認する。

### (3) 担がんモデルマウスの治療実験

SRG 搭載 CAR-T 細胞は、担がんマウスに輸注した後も、EPO の投与によってその細胞増殖を制御できることを可能にするシステムである。最初に、SRG 搭載 T 細胞を免疫不全マウスに投与して、EPO の投与で細胞増幅が可能であること、EPO の投与を中断することで細胞増殖も抑制されることを、生体イメージング装置を用いた経時的な観察で明らかにする。また、SRG 搭載 CAR-T 細胞を輸注する治療実験では、EPO の投与によって、通常の CAR 単独での治療と比較して、生存期間が延長する、あるいは治療に必要な T 細胞量が少なくなることを示す。

## 4. 研究成果

本研究では、輸注した CAR-T 細胞の体内増幅や生存を選択的に制御するための選択的制御遺伝子 (SRG: selective regulatory gene) を開発した。SRG は、エリスロポエチン (EPO) 受容体の細胞外領域と、T 細胞の増殖・生存シグナル伝達に関わる分子の細胞内領域を連結したキメラ分子である。EPO 受容体の細胞外領域と IL-2 受容体 鎖の膜貫通領域および細胞内領域を連結したサブユニット 1 と、EPO 受容体の細胞外領域と IL-2 受容体 鎖の膜貫通領域および細胞内領域を連結したサブユニット 2 それぞれを 2A ペプチド配列で連結した SRG (SRG-YYY) を構築した。SRG-YYY では EPO 刺激による増殖が一過性であったため、IL-2 受容体 鎖のチロシン残基 3 箇所をフェニルアラニンに置換してリン酸化が生じないようにした変異体 (SRG-FFF) を構築したところ、EPO 刺激による良好な増殖が誘導された。また、マウスに輸注した SRG-FFF 搭載 T 細胞は、EPO を投与している間は体内での細胞増殖が誘導され存続することを明らかにした。

SRG-FFF 変異体、CD19-CAR を 2A 配列で連結したポリストロニック発現カセット (SRG 搭載 CAR) を作製し、1つのウイルスベクター骨格に搭載した発現プラスミドを構築した。SRG 搭載 CAR-T 細胞は、*in vitro* において CD19 陽性標的細胞を特異的に傷害し、測定したすべてのサイトカインの産生が誘導された。担がんマウスの治療実験では、既存の CAR-T 細胞や、SRG 搭載 CAR-T 細胞のみ (EPO を併用しない) を輸注してもがん細胞の増殖を制御することはできなかったが、SRG 搭載 CAR-T 細胞と EPO を併用すると、観察期間内に全例が生存した。したがって、CAR-T 療法に SRG システムを応用することで、治療有効性を高めることができると結論付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryosuke Uchibori、 Ken Ohmine、 Junichi Mineno、 Keiya Ozawa
2. 発表標題 Analysis of RetroNectin-Mediated T-Cell Activation on Expansion and Phenotype of Chimeric Antigen Receptor T Cells
3. 学会等名 The 10th Meeting of ACTO (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	大嶺 謙  (Ohmine Ken)		

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
---------	---------