

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08838

研究課題名(和文) TALENを用いたゲノム編集によるユニバーサルな抗原特異的制御性T細胞の開発

研究課題名(英文) TALEN-mediated genome editing facilitates establishing universal genome-edited regulatory T cells for immunotherapy

研究代表者

川瀬 孝和 (Takakazu, Kawase)

藤田医科大学・国際再生医療センター・准教授

研究者番号：30463194

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)：TALENを用いたゲノム編集技術の活用により、T細胞レセプター(TCR)の鎖と鎖のミスペアリングによる予期せぬ免疫反応のリスクを抑えるゲノム編集T細胞作出の検討を行った。内在性のTCRをノックアウトし目的の抗原特異的TCRをノックインする方法を確立し、作出した抗原特異的ゲノム編集T細胞の細胞障害活性をin vitroで検討した。当初検討した方法は、in vitroでの抗原特異的な細胞傷害を確認できたが、細胞のviabilityが悪かった。そこで細胞のダメージ軽減のために遺伝子導入のステップ数を最小化する方法を検討し、2ステップでオンターゲットに目的の遺伝子を導入できる方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をとおして、T細胞への遺伝子導入の際のダメージ軽減のために、2ステップで目的の遺伝子をゲノムの目的の位置に遺伝子導入する方法を確立できた。本方法により、抗原特異的TCRの鎖と鎖を非特異的T細胞に遺伝子導入することにより、養子免疫T細胞療法に活用できる、安全でviabilityの高いTCR-T細胞を作成できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：By utilizing genome editing technology using TALEN, we investigated the production of genome-edited T cells that suppress the risk of unexpected immune reactions due to T cell receptor (TCR) mispairing between introduced and endogenous TCR and chains. We established a method for knocking out the endogenous TCR and knocking in the desired antigen-specific TCR, and examined the cytotoxic activity of the produced antigen-specific genome-edited T cells in vitro. The method initially investigated was able to confirm antigen-specific cytotoxicity in vitro, but the viability of the cells was poor. Therefore, we investigated a method to minimize the number of gene transfer steps to reduce cell damage, and established a method to precisely introduce the desired gene into the targeted genomic site in two steps.

研究分野：血液内科学

キーワード：T細胞受容体 ゲノム編集 養子免疫療法

1. 研究開始当初の背景

新たながん免疫療法、造血幹細胞移植後の再発の際の治療、あるいは再発予防の手段として T 細胞受容体(T-cell receptor, TCR)導入 T 細胞 (TCR-T)の開発が行われているが、より安全で有効性の高い TCR-T の開発のためには多くの課題が残されている。その1つは、内在性の TCR サブユニットと導入した TCR サブユニットのミスペアリングが起こることが知られており、自己反応性 T 細胞の形成を完全に回避することが困難であることである。

2. 研究の目的

ミスペアリングを回避するため内在性の TCR 遺伝子を Platinum TALEN で切断し、ドナー T 細胞に内在する TRA, TRB 遺伝子をノックアウトする技術の開発を試みた。また、実際の TCR-T 製剤作出への応用を想定し、細胞のバイオリティ低下を最小限に留め、できるだけ少ないステップ数で目的の TCR 遺伝子をノックインするための方法を検討した。

3. 研究の方法

予期せぬ免疫反応を惹起する可能性のある TCR のミスペアリングを回避し、安全な養子 T 細胞免疫療法を実現するために、高機能型 TALEN である Platinum TALEN によるゲノム編集の技術を用いて、内在性の TCR をノックアウトし、所望の抗原特異的 TCR を遺伝子導入した。当初検討した方法は、内在性の TCR 鎖、鎖のノックアウト、抗原特異的 TCR 鎖、鎖のノックインを順次行なって行くため、多くのステップ数を要し、細胞の viability が低下することが問題であった。そのため、TAL-PITCh 法を用いて内在性の TCR 鎖のノックアウトと抗原特異的 TCR 鎖のノックインを同時に行うことにより、より少ないステップ数で viability の高い目的の TCR-T 細胞を作成する方法を検討した。

4. 研究成果

(1) TALEN によるプライマリー T 細胞の内在性 TCR 鎖、鎖のノックアウト

Platinum TALEN の標的遺伝子領域を TRA および TRB 遺伝子の C 領域に設定し、Platinum Gate TALEN Kit (Addgene) を用いて、TRA 切断用 TALEN と TRB 切断用 TALEN 合成用のプラスミドを作製した。TALEN プラスミドを増幅した後、Platinum TALEN mRNA を合成し、Jurkat 細胞株あるいは健康者末梢血由来のプライマリー T 細胞に電気穿孔法で導入した。いずれの TALEN も良好な活性を示し、 $10^6$  細胞あたり mRNA として 1-10  $\mu$ g の範囲で、用量依存的に高い切断効率が得られた。

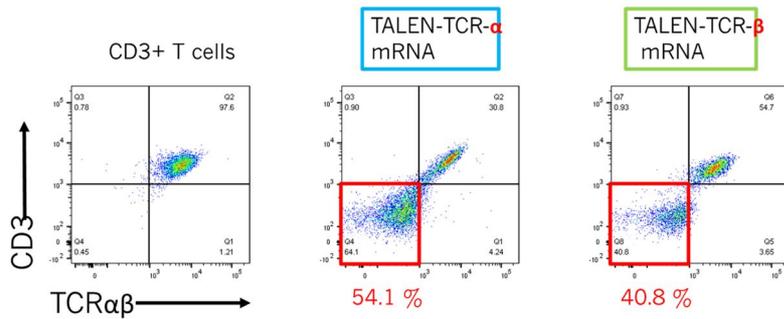


図1 TALENによるプライマリーT細胞の内在性TCR α鎖、β鎖のノックアウト

(2) プライマリー T 細胞および Jurkat 細胞でのターゲットサイトの切断確認

Jurkat 細胞あるいは、プライマリー T 細胞を用いた、T7 endonuclease I assays (図 2(a))、TALEN 標的領域のアンプリコンシーケンシング (図 2(b)) においても on-site の切断が確認された。Platinum TALEN を用いた TCR 遺伝子のゲノム編集は、ミスペアリングの発生しないユニバーサルな抗原特異的 T 細胞の作出を実現するために、非常に有望な技術と考えられた。

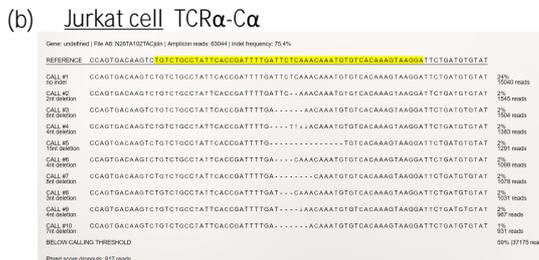
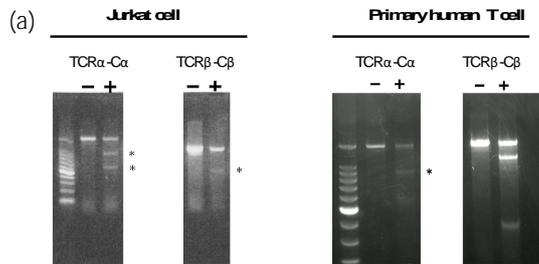


図2 プライマリーT細胞およびJurkat細胞でのターゲットサイトの切断確認

### (3) TCR ノックアウトプライマリーT細胞の細胞増殖アッセイ

Platinum TALENで内在性のTCRをノックアウトしたプライマリーT細胞は、hIL-2の存在下で、anti CD3/CD28 beadsの刺激により、良好な増殖を示した。

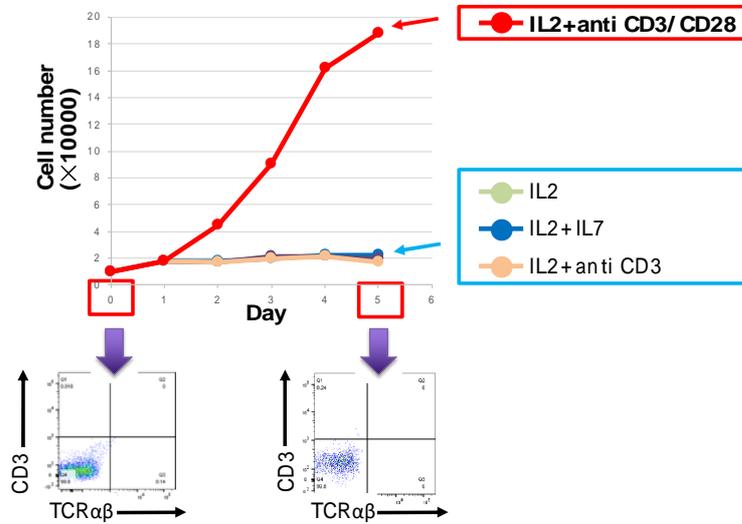


図3 TCRノックアウトプライマリーT細胞の細胞増殖アッセイ

### (4) TAL-PITCh法による抗原特異的TCR遺伝子のターゲットサイトへのノックイン

抗原特異的 *TRA-TRB* gene cassetteと *TRA-Platinum*

TALENs (*TRA-pTALENs*) のターゲットサイトの配列を含む TAL-PITChベクターを作成した。*TRA-pTALENs*によりこのベクターが切断されると、*TRA*遺伝子の *TRA-pTALEN* ターゲットサイトと相補的なマイクロ

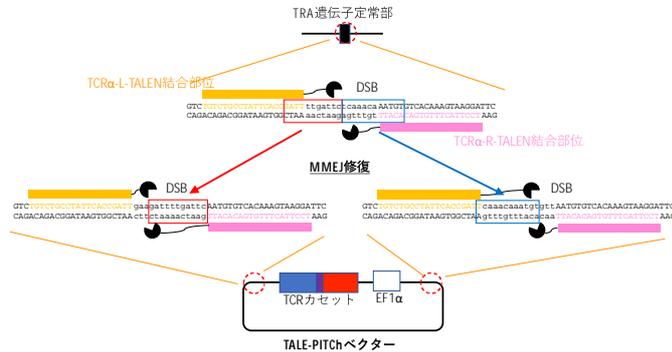


図4 TAL-PITCh法による抗原特異的TCR遺伝子のターゲットサイトへのノックイン

ホモロジー配列が形成される。そのため、TAL-PITChベクター上の抗原特異的 *TRA-TRB* gene cassetteは、ユニークなDNA二重鎖切断修復機構であるマイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)により、ゲノムの切断部に正確に組み込まれる。

### (5) TAL-PITCh法を用いたゲノム編集抗原特異的T細胞の作成

(1) 電気穿孔法により *TRB-pTALENs*をJurkat細胞に導入し、*TRB*遺伝子ノックアウト細胞として、CD3陰性Jurkat細胞をフローサイトメトリーにて分取した。(2) この *TRB*遺伝子ノックアウトJurkat細胞に *TRA-pTALENs*と抗原特異的 *TRA-TRB* gene cassetteを含むTAL-PITChベクターを電気穿孔法により同時に導入した。この2段階の遺伝子操作により、内在性のTCRをノックアウトし、NY-ESO-1由来のがん抗原であるSLLMWITQC特異的ゲノム編集Jurkat細胞を作成した。同様の方法でプライマリーT細胞でもSLLMWITQC特異的ゲノム編集T細胞を作成した。

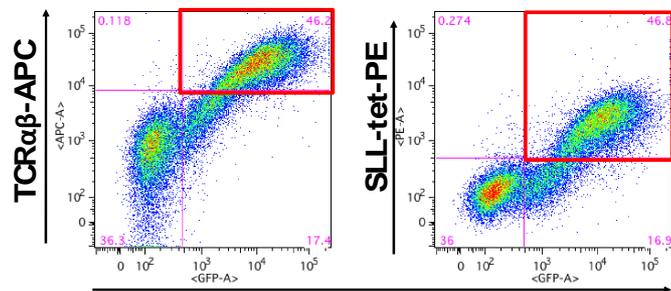


図5 TAL-PITCh法を用いたゲノム編集抗原特異的T細胞の作成

このような安全でviabilityの高い抗原特異的ゲノム編集T細胞が、今後養子免疫T細胞療法に応用されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawase Takakazu, Tanaka Hidenori, Kojima Hiroto, Uchida Naoyuki, Ohashi Kazuteru, Fukuda Takahiro, Ozawa Yukiyasu, Ikegame Kazuhiro, Eto Tetsuya, Mori Takehiko, Miyamoto Toshihiro, Hidaka Michihiro, Shiratori Souichi, Takanashi Minoko, Atsuta Yoshiko, Ichinohe Tatsuo, Kanda Yoshinobu, Kanda Junya	4. 巻 25
2. 論文標題 Impact of High-Frequency HLA Haplotypes on Clinical Cytomegalovirus Reactivation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 2482 ~ 2489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2019.07.042	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 Kanda Junya, Kawase Takakazu, Tanaka Hidenori, Kojima Hiroto, Morishima Yasuo, Uchida Naoyuki, Nagafuji Koji, Matsuhashi Yoshiko, Ohta Takanori, Onizuka Makoto, Sakura Toru, Takahashi Satoshi, Miyakoshi Shigesaburo, Kobayashi Hikaru, Eto Tetsuya, Tanaka Junji, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Morishima Satoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of Haplotype Matching on Outcomes after Adult Single-Cord Blood Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 509 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2019.09.035	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 Takasu Miyuki, Kondo Shota, Akiyama Yuji, Takahashi Yuji, Maeda Shogo, Baba Yasutaka, Kawase Takakazu, Ichinohe Tatsuo, Awai Kazuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Assessment of early treatment response on MRI in multiple myeloma: Comparative study of whole-body diffusion-weighted and lumbar spinal MRI	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229607	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 Edahiro Taro, Kawase Takakazu, Nagoshi Hisao, Fujino Keita, Toishigawa Kayo, Miyama Takahiko, Mino Tatsuji, Yoshida Tetsumi, Morioka Takehiko, Hirata Yuji, Noma Mitsunori, Fujii Teruhisa, Nishizawa Masatoshi, Fukushima Noriyasu, Ichinohe Tatsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 Allogeneic hematopoietic cell transplantation using fludarabine plus myeloablative busulfan and melphalan confers promising survival in high-risk hematopoietic neoplasms: a single-center retrospective analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hematology	6. 最初と最後の頁 186 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/16078454.2021.1881228	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 Kawajiri Akihisa, Kawase Takakazu, Tanaka Hidenori, Fukuda Takahiro, Mukae Junichi, Ozawa Yukiyasu, Eto Tetsuya, Uchida Naoyuki, Mori Takehiko, Ashida Takashi, Kondo Tadakazu, Onizuka Makoto, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Morishima Satoko, Kanda Junya	4. 巻 57
2. 論文標題 Human leukocyte antigen (HLA) haplotype matching in unrelated single HLA allele mismatch bone marrow transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 407 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-021-01552-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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nanaho Hasegawa, Takakazu Kawase, Nao Yoshida, Misaki Kobayashi, Kisa Tanabe, Yasuko Honjo, Kayo Toishigawa, Taro Edahiro, Hiroyuki Sato, Kenta Magoori, Ryuji Suzuki, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Masatoshi Nishizawa, Tatsuo Ichinohe
2. 発表標題 Targeted knock-in of desired genes by use of Platinum TALEN for safer genome-edited T cell therapy.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土石川佳世, 川瀬孝和, 美山貴彦, 西澤正俊, 枝廣太郎, 本庶仁子, 馬郡健太, 佐藤 寛之, 鈴木隆二, 佐久間哲史, 山本卓, 一戸辰夫
2. 発表標題 より安全で効果的な制御性 T 細胞 (Treg)療法を見据えたゲノム編集抗原特異性 Treg 作出の試み
3. 学会等名 第 43 回日本造血細胞 移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土石川佳世, 川瀬孝和, 本庶仁子, 佐藤寛之, 鈴木隆二, 佐久間哲史, 山本 卓, 一戸辰夫
2. 発表標題 Platinum TALENによる遺伝子改変T細胞作出の試み
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田奈央, 田辺季佐, 川瀬孝和, 小林美咲, 長谷川七穂, 北浦一孝, 鈴木隆二, 一戸辰夫
2. 発表標題 高い自己複製能とメモリー機能を持つ新たなT細胞サブセットの網羅的T細胞受容体 (TCR) 解析
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takakazu Kawase, Yasuko Honjo, Takahiko Miyama, Hiroyuki Sato1, Ryuji Suzuki, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Tatsuo Ichinohe
2. 発表標題 Two step strategy for establishing T-cell receptors engineered T cells for safer T cell adoptive immunotherapy
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 七穂, 川瀬 孝和, 吉田 奈央, 本庶 仁子, 土石川 佳世, 美山 貴彦, 佐藤 寛之, 鈴木 隆二, 佐久間 哲史, 山本 卓, 一戸 辰夫
2. 発表標題 TALENによるゲノム編集技術を用いた内在TCR遺伝子のノックアウト及び目的遺伝子の導入
3. 学会等名 第42回日本造血幹細胞移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川瀬 孝和
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症に対する他家T細胞輸注療法の開発
3. 学会等名 日本動物細胞工学会 2021 年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021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

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