

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09048

研究課題名(和文) IRF発現調節とステルス化による有効な抗腫瘍T細胞輸注療法の開発

研究課題名(英文) Development of effective T cell therapy by stealth technique and regulation of IRF expression

研究代表者

安井 潔 (Yasui, Kiyoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：50372777

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)：T細胞輸注療法において非自己のT細胞利用を可能とするステルスT細胞(内在性TCRの発現をsiRNAで抑制することにより組織障害を防ぎ、 $\alpha 2$ マイクログロブリン(B2M)をゲノム編集で消去し、内在性TCR/MHCを持たず、宿主に排除されない)を作製し、アロT細胞への刺激が減少すること、それに付随するNK細胞からの攻撃をHLA-Eの発現により抑制できることを示した。さらに、貪食細胞からの攻撃回避に關与するCD47遺伝子、及び、生体内での細胞死誘導への抵抗に關与する遺伝子をクローニングし、それらの発現の影響を検討した。また、培養条件によりIRF4の発現を抑制する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍を認識するT細胞受容体を遺伝子導入したT細胞を用いた輸注療法は、悪性腫瘍に対する有効な新規治療として期待されているが、現在まで患者自身の細胞の利用に限られていた。そのため、採取可能なT細胞におけるメモリー形成能等の質や数の制限、調製から投与までに長期間を要することによる適応患者の限定などの課題が残る。解決方法の一つである、非自己T細胞の利用は、移植片対宿主病や拒絶反応の問題を解決することが必要不可欠であった。

本研究ではMHC Class I分子の発現を抑制しHLA-Eを強制発現することにより、非自己T細胞を輸注療法に用い、多くのがん患者に適用可能で有効な治療が行える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We developed MHC Class I KO T cells and designated these cells as stealth T cells. Stealth T cells stimulated less allo T cells. And the attack from NK cells to stealth T cells can be suppressed by the expression of HLA-E. Furthermore, we cloned the CD47 gene involved in avoiding attacks from phagocytic cells and the gene involved in resistance to cell death induction in vivo, and investigated the effects of their expression. We also developed a method to suppress the expression of IRF4 depending on the culture conditions.

研究分野：がん免疫学、分子生物学

キーワード：がん免疫 T細胞輸注療法 MHC Class I HLA-E

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍を認識する T 細胞受容体(TCR)を遺伝子導入した T 細胞を用いた輸注療法は、悪性腫瘍に対する有効な新規治療として期待されていた。その時点での T 細胞輸注療法は主に患者自身の細胞の利用に限られていたため、採取可能な T 細胞におけるメモリー形成能等の質や数の制限、調製から投与までに長期間を要することによる適応患者の限定などの課題が存在した。その解決方法の一つとして、非自己 T 細胞の利用が望まれていたが、非自己 T 細胞を輸注療法に用いるためには、移植片対宿主病(GVHD)や拒絶反応の問題を解決すること、すなわち T 細胞の「ステルス化」が必要不可欠であった。

2. 研究の目的

腫瘍特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞において、GVHD や拒絶反応の問題を解決し、T 細胞の「ステルス化」を行うとともに、IRF ファミリーや、生体内での細胞死誘導への抵抗に関与する遺伝子の発現を人為的に調節し、メモリー形成能、*in vivo* 生存性に優れ、輸注療法時に有効性が高い腫瘍特異的 T 細胞を作製し、最終的に「Off-the-shelf」製剤として多くのがん患者に適用可能で有効な T 細胞療法を開発することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

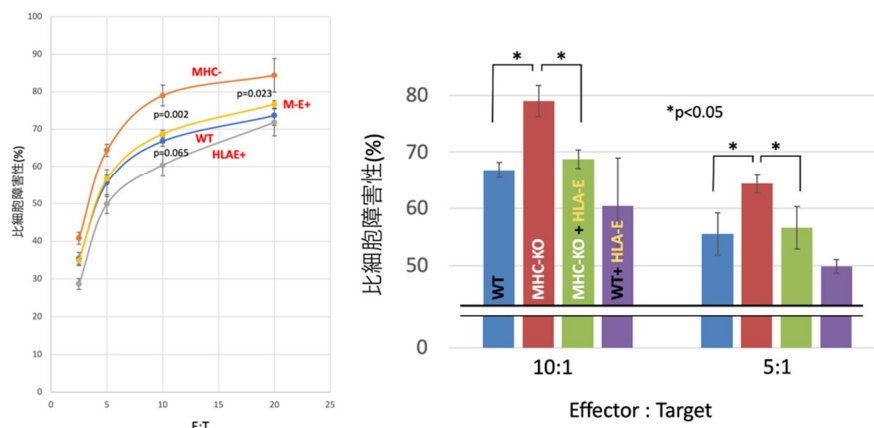
Jurkat 細胞、 $\alpha\beta$ -T 細胞及び、 $\gamma\delta$ -T 細胞で拒絶反応を抑えるため、CRISPR/Cas9 システムもしくは siRNA を用いて 2-マイクログロブリン(B2M)遺伝子の発現量を変化させ、MHC class の発現を抑制した。さらに、NK 細胞からの攻撃を回避するため B2M-HLA-E 融合遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入した。これらの細胞を用いてアロ T 細胞及び NK 細胞との反応について調べた。また、生体内での T 細胞の安定性に関わる遺伝子のクローニング、T 細胞での発現を行なった。

4. 研究成果

(1) Jurkat 細胞にレトロウイルスおよび B2M ノックアウト用のレンチウイルスを感染させて作製した MHC KO 細胞株を用い、MHC 除去でアロ T 細胞への刺激が減少することを示した。続いて、NK 細胞の抑制性受容体のリガンドである HLA-E 分子を B2M 遺伝子をリンカー配列で連結し、レトロウイルスベクターに組み込み融合分子として発現する系を構築した結果、NK 細胞からの攻撃を HLA-E

の発現により抑制できることを示した(図 1、2)。

(図 1) MHC classI ノックアウト Jurkat 細胞への NK 細胞の攻撃は HLA-E の発現で回避できる



(2) $\gamma\delta$ -T 細胞及び $\alpha\beta$ -T 細胞を用いて細胞表面上の MHC class I 分子の発現を欠損させた T 細胞を作製した。

これらの細胞を用いて、アロ T 細胞への刺激が MHC Class I の発現を抑制することにより減少することを明らかにした(図3)。またその際に NK 細胞からの攻撃を受けることを示した。

現在、Jurkat 同様、HLA-E 分子と B2M 遺伝子をリンカー配列で連結したレトロウイルスベクターを用い HLA-E の発現を行い(図4) NK 細胞からの攻撃が HLA-E の発現により抑制できるか確認中である。

(3) 貪食細胞からの攻撃回避に關与する CD47 遺伝子をクローニングした。

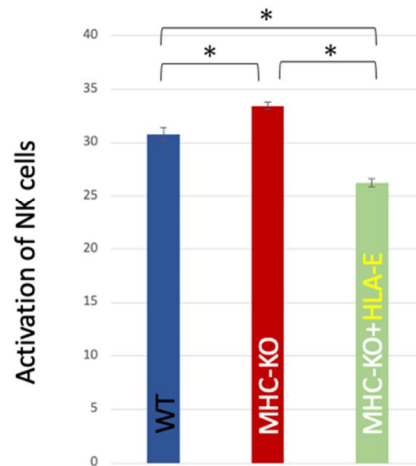
その遺伝子をレトロウイルスを用いて、Jurkat 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞、及び、 $\alpha\beta$ -T 細胞に導入し、貪食細胞からの攻撃を回避できるか調べている。

(4) 生体内での細胞死誘導への抵抗に關与する遺伝子をクローニングした。

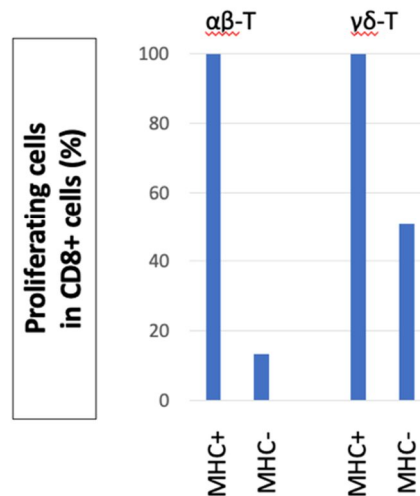
その遺伝子をレトロウイルスを用いてメラノーマ細胞株、Jurkat 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞、及び、 $\alpha\beta$ -T 細胞に導入し、発現による細胞死誘導に対する抵抗性の影響

を調べ、その遺伝子の発現が細胞死抵抗に關与することを示唆する結果を得た。

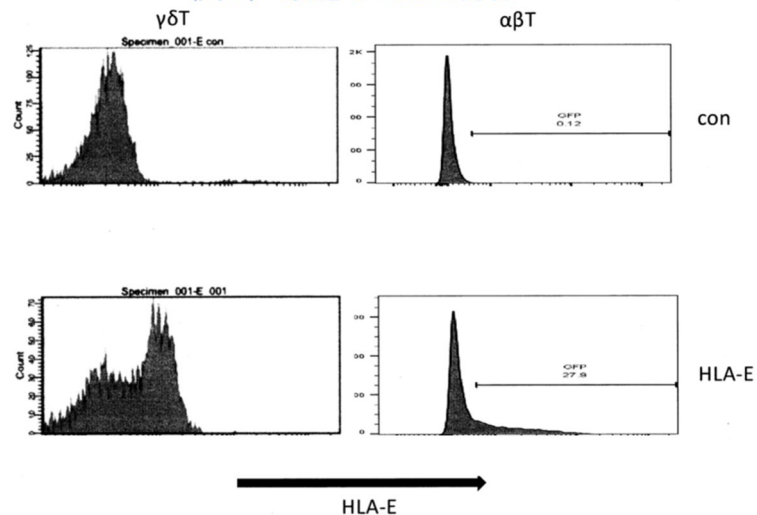
(図2) MHC class I ノックアウト Jurkat 細胞への NK 細胞の攻撃は HLA-E の発現で回避できる



(図3) MHC クラス I 欠損によりアロ T 細胞への刺激が減少する



(図4) T 細胞での HLA-E 発現



(5)培養条件により IRF4 の発現を抑制する方法を開発した。

今後は、(1-5)の結果をふまえ、IRF 発現調節とステルス化による有効な抗腫瘍 T 細胞輸注療法の開発を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 3件）

1. 著者名 安井潔、池田裕明	4. 巻 26
2. 論文標題 がん免疫における新規治療アプローチ 2)TCR-T細胞によるがん治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Ishihara M, Tono Y, Miyahara Y, Muraoka D, Harada N, Kageyama S, Sasaki T, Hori Y, Soga N, Uchida K, Shiraishi T, Sato E, Kanda H, Mizuno T, Webster GA, Ikeda H, Katayama N, Sugimura Y, Shiku H.	4. 巻 69
2. 論文標題 First-in-human phase I clinical trial of the NY-ESO-1 protein cancer vaccine with NOD2 and TLR9 stimulants in patients with NY-ESO-1-expressing refractory solid tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 663-675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02483-1	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 該当する
1. 著者名 Dotsu Yosuke, Muraoka Daisuke, Ogo Naohisa, Sonoda Yudai, Yasui Kiyoshi, Yamaguchi Hiroyuki, Yagita Hideo, Mukae Hiroshi, Asai Akira, Ikeda Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Chemical augmentation of mitochondrial electron transport chains tunes T cell activation threshold in tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e003958 ~ e003958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2021-003958	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 Yoneda Mitsuhiro, Yasui Kiyoshi, Nakagawa Takeya, Hattori Naoko, Ito Takashi	4. 巻 170
2. 論文標題 Nucleosome assembly protein 1 is a regulator of histone H1 acetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 763 ~ 773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab098	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 安井潔、池田裕明	4. 巻 11
2. 論文標題 固形がんを標的としたCAR-T細胞療法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 26～30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安井 潔、Xiangyue Meng、岡田怜美、岡本幸子、峰野純一、村岡大輔、 珠玖 洋、江口 晋、池田裕明
2. 発表標題 独自siRNAベクターによるMHC class 発現抑制「ステルスT細胞」を用いたがん免疫療法の開発
3. 学会等名 がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田裕明
2. 発表標題 遺伝子改変 T 細胞療法の新展開
3. 学会等名 日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安井 潔、岡田怜美、岡本幸子、峰野純一、村岡大輔、珠玖 洋、江口 晋、池田裕明
2. 発表標題 T細胞やNK細胞による拒絶反応、およびGVHDを回避しうる「ステルスT細胞」を用いたがん免疫療法の開発
3. 学会等名 がん免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安井潔、岡田怜美、松村尚美、古賀洋一、岡本幸子、峰野純一、村岡大輔、珠玖 洋、江口 晋、池田裕明
2. 発表標題 非自己T細胞の利用を可能にするステルスT細胞を用いたがん免疫療法の開発
3. 学会等名 がん免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田裕明
2. 発表標題 TCR遺伝子導入T細胞を用いたがん免疫細胞治療
3. 学会等名 日本輸血・細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田裕明
2. 発表標題 新規TCR遺伝子改変T細胞療法の臨床開発
3. 学会等名 第2回 AMED/A*STAR 合同ワークショップ(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田裕明
2. 発表標題 Development of Adoptive Cell Therapy with Allogeneic TCR Gene-modified “Stealth T cells” Deficient in Endogenous TCR and HLA Class I Molecules
3. 学会等名 The 10th JSH International Symposium (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 分担 者	池田 裕明 (Ikeda Hiroaki) (40374673)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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