

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23919

研究課題名（和文）内因性TCRおよびMHC発現を抑制した非自己T細胞によるT細胞輸注療法の開発

研究課題名（英文）Development of TCR gene therapy with allogeneic T cells deficient in endogenous TCR and MHC class I molecules

研究代表者

岡田 怜美（Okada, Satomi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：40849501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞輸注療法は、悪性腫瘍に対する治療法として期待されている。本研究では、より効果的で汎用性の高いT細胞療法の開発を目指すため、内因性TCR発現の抑制とMHC発現の抑制を行い、非自己T細胞を用いたT細胞輸注療法に着目した。がん精巢抗原であるNY-ESO-1抗原をターゲットとし、ヒトリンパ球にNY-ESO-1特異的TCRを遺伝子導入した。同時に、内因性TCR発現抑制と、HLA class Iの発現を抑制した。マウスモデルにおいて、宿主組織傷害を起こすことなく、抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍を認識する受容体を遺伝子導入したT細胞の輸注療法は、悪性腫瘍に対する治療法として期待されている。しかしながら、自己細胞を用いた治療は品質の制限を受け、また投与までに長期間を要するため、有効性と汎用性を阻んでいる。本研究では、より効果的で汎用性の高いT細胞療法の開発を目指すため、非自己T細胞を用いた受容体改変T細胞療法に着目した。非自己T細胞を用いる際に“宿主組織傷害”と“輸注細胞の拒絶”が克服すべき課題であり、内因性TCR発現の抑制とMHC発現の抑制を行い、抗腫瘍効果を確認することができ、非自己T細胞による輸注療法の可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Adoptive immunotherapy using genetically engineered patient-derived lymphocytes to express tumor-reactive receptors is a promising treatment for malignancy. However, utilization of autologous T cells in this therapy limits the quality of gene-engineered T cells, thereby inhibiting the timely infusion of the cells into the patients. In this study, we evaluated the anti-tumor efficacy and the potential to induce graft-versus-host disease (GVHD) in T cell receptor (TCR) gene-engineered allogeneic T cells that downregulate the endogenous TCR and HLA class I molecules. We transduced human lymphocytes with a high-affinity TCR specific to the cancer/testis antigen NY-ESO-1, using a novel retrovirus vector with siRNAs specific to the endogenous TCR and lentivirus-based CRISPR/Cas9 system targeting *HLA-B*2 microglobulin*. In non-obese diabetic/SCID/*cnull* mice, TCR gene-transduced T cells induced tumor regression without development of GVHD.

研究分野：消化器外科学

キーワード：免疫療法 輸注療法 非自己リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

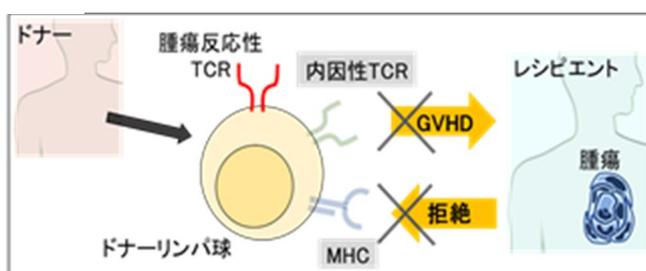
抗原受容体改変 T 細胞療法は腫瘍に対する有効な新規治療として期待される。米国 NCI のグループは癌抗原 NY-ESO-1 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法により進行期悪性黒色腫や滑膜肉腫を対象に著明な有効性を示した(Robbins, J Clin Oncol 2011)。また、急性リンパ性白血病に対する CD19-CAR 導入 T 細胞輸注療法が 90%の完全寛解(CR)率とその後の長期に渡る寛解維持を示し(Maude, N Engl J Med 2014)、画期的な治療法として注目されている。

抗原受容体改変 T 細胞療法はこれまで患者自身の T 細胞に抗原受容体遺伝子を導入し輸注する方法に限られてきた。しかし、治療を重ねたがん患者の多くは末梢血白血球数が低下し十分な輸注細胞作製が困難なことが多い。また、慢性炎症により末梢血白血球が疲弊したフェノタイプを示し、増殖能等の機能が低下していることが明らかとなっている。さらに、患者リンパ球に遺伝子導入後に拡大培養し品質試験を行うと 4-6 週程度を要することが少なくなく、上皮性癌では治療の機会を失う患者も多い。多くの患者に有効な抗原受容体改変 T 細胞療法を届ける方法の確立が課題であり、非自己 T 細胞の利用は効果的な一つの解決法として期待される。その際、宿主組織傷害と輸注細胞の拒絶を一定程度に抑制する技術が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非自己 T 細胞を用いた T 細胞療法確立であり、“宿主組織傷害”と“輸注細胞の拒絶”を抑制した細胞の開発である。すなわち、輸注細胞である非自己 T 細胞の内因性 TCR の発現を抑制することで宿主組織傷害を抑制し、さらに、輸注細胞の MHC 発現を抑制することで拒絶を抑制することを目的とする(図 1)。

図 1



研究代表者らは TCR 遺伝子治療の開発の過程で、T 細胞の内在性 TCR の発現を抑制する siRNA を搭載したベクター (siTCR ベクター) 独自に開発し、導入した腫瘍特異的 TCR の効率良い発現を示した(Okamoto, Cancer Res 2009; Okamoto, Mol Ther-Nucleic Acids 2012)。本ベクターを導入したヒトリンパ球は、内在性 TCR の発現が抑制され、CD3 分子の競合の低下等により導入する腫瘍特異的 TCR の発現を向上させ、抗腫瘍効果の向上を示した画期的なベクターである。さらに拒絶を抑制するために、HLA class I 分子の発現に着目し、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集により HLA class I 分子の発現を抑制したリンパ球を作製する。独自開発した siTCR ベクターを用いるとともに、さらに抗原性の低下を加えることでより汎用性の高い T 細胞作製へと発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 輸注非自己 T 細胞の内因性 TCR 発現を抑え宿主組織破壊を回避する技術に加え、人工ヌクレアーゼ CRISPR によるゲノム編集を用いて輸注 T 細胞の HLA 発現の消去を目指す。TCR/HLA を持たない、宿主に排除されにくい T 細胞を作製し、この T 細胞に抗原受容体遺伝子を導入する。

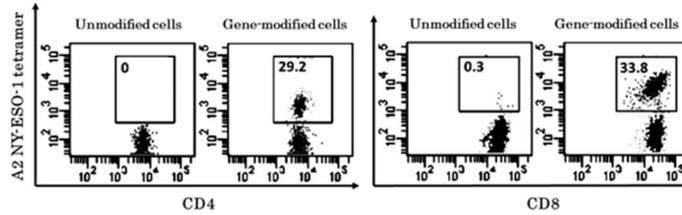
(2) 免疫不全マウスに抗原受容体改変ヒト T 細胞を輸注する系において、T 細胞のマルチファンクショナル性を高感度の指標として用いることにより、非自己排除機構を効率良く解析する。上記(1)で作製する「宿主からの拒絶を回避する非自己 T 細胞」を用いた抗原受容体改変 T 細胞を用いて、輸注療法の際に双方向の非自己排除機構が減弱することを定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) がん精巣抗原である NY-ESO-1 をターゲットとし、NY-ESO-1 特異的 TCR をヒトリンパ球に発現させるべく遺伝子導入を行った。内因性 TCR の発現を抑制する siRNA を搭載したベクターを用いることで、内因性 TCR の発現を抑制し、かつ NY-ESO-1 特異的 TCR を発現したリンパ球を作製した。

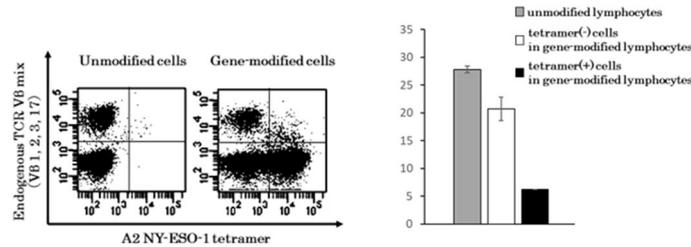
ウイルスベクターを導入したヒトリンパ球の NY-ESO-1 特異的 TCR 発現のフローサイトメトリー解析結果を図 2 に示す。NY-ESO-1 特異的 TCR は CD4 陽性リンパ球の 29.2%、CD8 陽性リンパ球の 33.8%に発現していた。

図 2



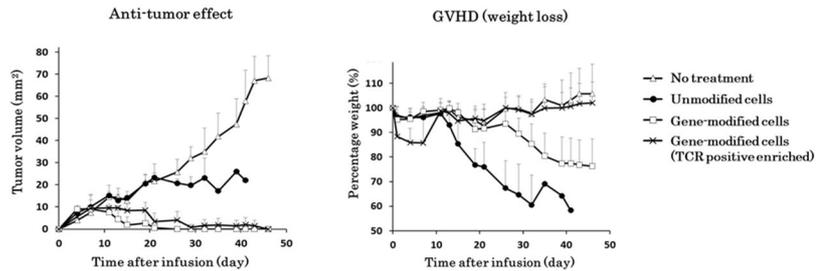
遺伝子導入ヒトリンパ球の内因性 TCR の発現の解析結果を図 3 に示す。コントロール群では内因性 TCR 陽性細胞は約 30%であったのに対し、遺伝子導入リンパ球では約 20%であった。さらに、NY-ESO-1 特異的 TCR 陽性リンパ球では 6%まで低下していた。

図 3



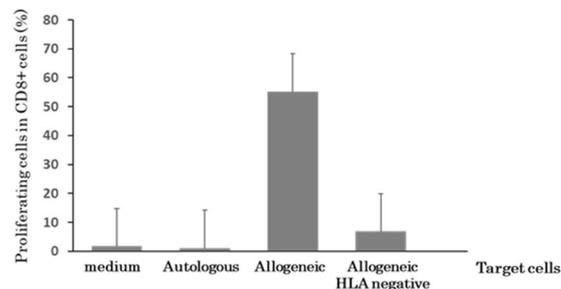
(2) NY-ESO-1 特異的 TCR を発現させたヒトリンパ球の抗腫瘍効果を確認するために、免疫不全マウスに遺伝子導入ヒトリンパ球の輸注療法を行った。免疫不全マウスに NY-ESO-1 発現する腫瘍株である NW-MEL-38 を皮下投与し、遺伝子導入リンパ球を投与した。遺伝子導入していないヒトリンパ球の投与では、腫瘍増大は抑制できず、また致死性 GVHD が発症した。一方で遺伝子導入したヒトリンパ球の投与では、GVHD を発症することなく、抗腫瘍効果を示した(図 4)。

図 4



(3) HLA class I の発現を抑制するために、 β -2 ミクログロブリンをターゲットとし、ウイルスベクターを用い遺伝子導入を行った。遺伝子導入後のヒトリンパ球をフローサイトメトリーにて解析し、HLA class I 発現が抑制されたリンパ球は約 15%であった。ビーズセレクション法にて HLA class I 発現抑制リンパ球を回収し、99%と高純度とした。このように作製した HLA 発現抑制ヒトリンパ球がアロリンパ球に認識されるかどうかを評価するために、リンパ球混合試験を行った。HLA 発現抑制リンパ球をターゲットとすると、エフェクターリンパ球の反応性は低下し、HLA class I 発現抑制リンパ球は抗原性の低下を示した(図 5)

図 5



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Okada Satomi, Muraoka Daisuke, Yasui Kiyoshi, Tawara Isao, Kawamura Ayumi, Okamoto Sachiko, Mineno Junichi, Seo Naohiro, Shiku Hiroshi, Eguchi Susumu, Ikeda Hiroaki	4. 巻 114
2. 論文標題 T cell receptor gene modified allogeneic T cells with siRNA for endogenous T cell receptor induce efficient tumor regression without graft versus host disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4172 ~ 4183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15954	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satomi Okada, Mitsuhsa Takatsuki, Daisuke Muraoka, Kiyoshi Yasui, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Hiroshi Shiku, Hiroaki Ikeda, Susumu Eguchi
2. 発表標題 Possibility of future clinical application of adoptive cell therapy with allogeneic T cells deficient in endogenous TCR and HLA class I molecules for digestive cancer patients
3. 学会等名 APDW2019(Asian Pacific Digestive Week)（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
---------------------------	-----------------------	----

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