

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07695
研究課題名(和文) 網羅的遺伝子ノックアウト技術を用いた癌-免疫逃避相を克服する標的遺伝子の探索

研究課題名(英文) CRISPR/Cas9 genome-wide knockout screening for identifying the novel gene to overcome the tumor-immune escape

研究代表者
森本 創世子 (Morimoto, Soyoko)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：10649023
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)：CD27発現低下条件における培養で、CD27高発現を維持するCD8T細胞においてノックアウトされている遺伝子X(仮名)をCRISPR-guide RNA library/Cas9 systemを用いた網羅的スクリーニングにより同定した。遺伝子X発現抑制は、CD8T細胞のCD27発現維持に加え、増殖能亢進に寄与するだけでなく、抗原特異的サイトカイン産生および細胞傷害活性維持にも寄与することが分かった。増殖能亢進のメカニズムを明らかにするために、コントロールCD8T細胞と遺伝子X発現抑制CD8T細胞におけるATAC-seqとRNA-seqを行なった。現在、これら結果について詳細な解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
免疫チェックポイント阻害療法やCAR-T細胞療法は、強力な抗腫瘍効果が期待できる癌免疫療法である。しかしながら、腫瘍攻撃の中核を担う細胞傷害性T細胞の「品質」の低下が原因で、治療を受けた患者のすべてに強い抗腫瘍効果が発揮されるわけではない。強い細胞傷害活性と高い増殖能は、T細胞に本来備わっている性質としては同時に成立しない。そこで、本研究成果で得られた「細胞傷害活性の維持と驚異的な増殖能を発揮する癌抗原特異的T細胞」は、現在の癌免疫療法が直面する最大の課題を解決することが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide knockout screening using CRISPR-guide RNA library/Cas9 system identified the novel gene X to maintain the expression of CD27 in CD8T cells under conditions that reduce CD27 expression. Repression of gene X expression promoted proliferation and remained cytokine production and cytotoxicity in addition to retaining CD27 expression in CD8T cells. To clarify the proliferation mechanism, now we analyze and integrate information of ATAC-seq and RNA-seq between control-CD8T cells and gene X-repressed CD8T cells.

研究分野：癌免疫

キーワード：CRISPR-guide RNA library Cas9 CD8T cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害療法や CAR-T 細胞療法は、強力な抗腫瘍効果が期待できる癌免疫療法として成功を収めている。その一方で、それぞれの治療法において新たな課題が浮き彫りになった。免疫チェックポイント阻害療法を代表する抗 PD-1 抗体療法では、変異抗原を多く持つメラノーマや肺がん、およびマイクロサテライト不安定性を持つ (MSI 陽性) 大腸癌などの「免疫原性の高い」癌に対してのみ有効であるという点である。「免疫原性の低い」癌を T 細胞に認識させ排除させる方法の開発が急務であるが、その戦略は未だない。

また、「免疫原性の高い」癌に対しても抗 PD-1 抗体療法の治療効果は一様ではない。この原因として、癌を認識し攻撃できる T 細胞が存在するにもかかわらず機能が十分でないこと、T 細胞が腫瘍局所に浸潤できないこと、などが腫瘍局所における解析によって明らかになってきている。同様の治療効果のバラツキは CAR-T 細胞療法などの T 細胞輸注療法においてもよく知られており、これには、*in vitro* で作製・拡大培養した抗原特異的 T 細胞が、患者体内で永続的に癌を傷害し、排除できずに、すぐに体内から消失してしまうことが最大の原因として考えられている。

このような免疫チェックポイント阻害療法や T 細胞輸注療法で共通する、「抗原特異的 T 細胞が体内に存在する (もしくは大量に輸注した) にもかかわらず、強力な抗腫瘍効果が認められない現象」は、癌の免疫逃避メカニズムの過程を包括的に捉えた上での T 細胞の「品質」の低下に起因すると考えられる。この、癌-免疫逃避相の克服が、確実に抗腫瘍効果が期待できる新規癌免疫療法の開発に発展すると期待される。

2. 研究の目的

「癌細胞の免疫原性を人為的に高めることが可能か」および「癌免疫逃避に耐性で品質が低下しない永続的に抗腫瘍効果を発揮する T 細胞は作製可能か」という二つの問いに答えることを目的とする。

3. 研究の方法

癌の免疫原性を高める標的遺伝子の同定

一般的に、免疫原性が低いと知られている EL4 細胞株の免疫原性を高める標的遺伝子を同定する。具体的には、EL4 細胞に Cas9 と CRISPR-guide RNA library を導入した細胞を、Cas9 恒常発現マウスに移植し、腫瘍塊を形成させる。免疫原性が高い癌細胞は T 細胞によって排除されるため、目的の免疫原性を高める標的遺伝子は、腫瘍塊の guide RNA pool において「消失した遺伝子」として同定される。消失した遺伝子の中には、免疫原性とは無関係の癌の生存や増殖などに関与する遺伝子が含まれるため、生着させた癌細胞によって感作した T 細胞を取り出し、移植した癌細胞と *in vitro* で共培養し、T 細胞の細胞傷害活性によって「消失した遺伝子」も併せて同定し、両者で共通した「消失した遺伝子」を明らかにすることで、免疫原性を高める標的遺伝子を高い確度で突き止める。

永続的に抗腫瘍効果を発揮する T 細胞作製を可能にする標的遺伝子の同定

CAR-T 細胞の生体内での長期生存と良好な予後と有意に相関することが知られている CD27 陽性 CD8T 細胞であるが、CD8T 細胞における CD27 発現メカニズムは明らかでない。そこで、CD27 発現を調節する遺伝子を同定することを目的とした。具体的には、CRISPR-guide RNA library を導入した Cas9 細胞を、CD27 発現を低下させる条件 (anti-CD3/CD28 で繰り返し刺激) で培養し、CD27 発現が低下した細胞に対して CD27 発現を維持している細胞で enrich している guide RNA が標的とする遺伝子群を NGS 解析によって同定する。

4. 研究成果

結果 癌の免疫原性を高める標的遺伝子の同定

初めに、免疫原性が低いことで知られている EL4 細胞株 (マウスリンパ腫) を C57BL/6 マウス腹部に皮下接種し、生着を評価した。しかしながら、腫瘍塊が形成されず、EL4 細胞の生着が認められなかったため、別の細胞株を選出した。EL4 細胞と同様に、免疫原性が低いことで知られている B16 細胞株 (マウスメラノーマ) を選択した。初めに、C57BL/6 マウスへの生着を評価したところ、生着を認めたため、B16 細胞株を用いて実験を進めることとした。次に、B16 細胞株に Cas9 遺伝子をウイルスベクター由来ウイルスによって導入し、Cas9 恒常発現 B16 細胞株を作製した。Cas9 が発現していることを western blotting で評価し、Cas9 恒常発現 B16 細胞株 (B16-Cas9 bulk) を得ることができた。さらに、B16-Cas9 bulk を limiting dilution により、Cas9 発現量の高い B16-Cas9 clone 21-3 を得ることができた (図 1)。次に、MHC class I 分子の発

現を評価したところ、作製した B16-Cas9 clone 21-3 ならびに他の clone すべてで、MHC class I 分子を発現していないことが明らかとなった（データ未掲載）。MHC class I 分子は、抗原提示に必須の細胞表面分子であるため、MHC class I 分子を発現していない腫瘍細胞株は T 細胞からの認識や攻撃を受けないことが想定される。したがって、目的を達成するために、現在、Cas9 恒常発現 MHC class I 分子発現 B16 細胞株の作製を試みている。

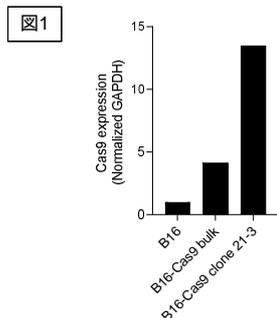


図 1 : B16-Cas9細胞株の作製
Cas9をレンチウイルスベクター由来ウイルスを用いてB16に導入し、Cas9恒常発現B16 (B16-Cas9 bulk) を作製した。さらに、limiting dilutionにより、clone 21-3を得た。Cas9タンパク発現量をWestern blottingで評価した。GAPDH発現で補正したCas9発現量を、B16のCas9発現量を1としてグラフ化した。

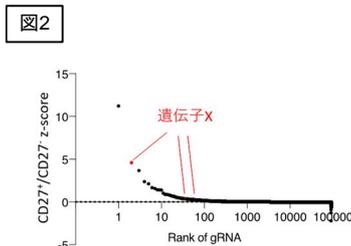


図 2 : CD27高発現細胞でenrichしているguide RNAの標的遺伝子の同定
Cas9発現マウスCD8T細胞をanti-CD3/CD28で繰り返し刺激し、Day 21でCD27を高発現しているCD8T細胞でenrichしているguide RNAの標的遺伝子を同定した。CD27低発現細胞に対するCD27高発現細胞におけるguide RNAの発現量をz-scoreで評価した。

結果 永続的に抗腫瘍効果を発揮する T 細胞作製を可能にする標的遺伝子の同定

Cas9 恒常発現 CRISPR-guide RNA library 導入 CD8T 細胞を、anti-CD3/CD28 で繰り返し刺激後、CD27 低発現細胞分画と比較し、CD27 高発現細胞分画で enrich されていた guide RNA の標的遺伝子を複数同定した。中でも、遺伝子 X (仮名) を標的とする guide RNA は上位に 3 つ挙がっていることが分かった (図 2)。遺伝子 X は T 細胞における機能が明らかではないため、遺伝子発現抑制実験によって、遺伝子 X の T 細胞における機能解明を行なった。遺伝子 X 発現抑制 CD8T 細胞は、コントロール CD8T 細胞と比較し、anti-CD3/28 による繰り返し刺激後に CD27 発現が高いこと (図 3) また、高い増殖能を獲得することが明らかになった (図 4)。さらに、増殖後もサイトカイン産生能 (図 5) や細胞傷害活性を発揮する (図 6) ことが分かった。

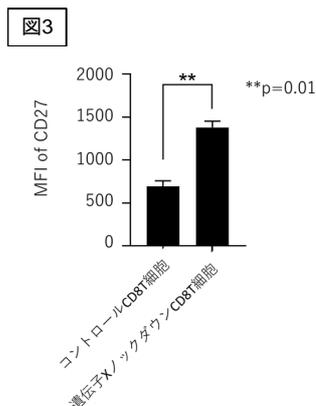


図 3 : 遺伝子X発現抑制CD8T細胞はCD27高発現である
遺伝子X発現抑制CD8T細胞およびコントロールCD8T細胞をanti-CD3/CD28で繰り返し刺激し、Day 21のCD27発現をフローサイトメーターで評価した。** p=0.01

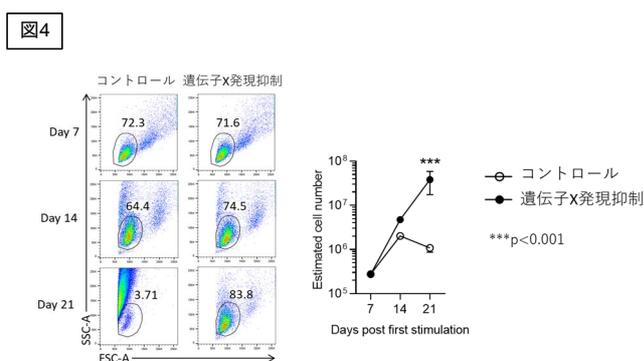


図 4 : 遺伝子X発現抑制CD8T細胞は高い増殖能を発揮する
(左) 遺伝子X発現抑制CD8T細胞およびコントロールCD8T細胞をanti-CD3/CD28で繰り返し刺激し、7日ごとにFSC、SSCをフローサイトメーターで評価した。
(右) 7日ごとの積算細胞数を評価した。*** p<0.001

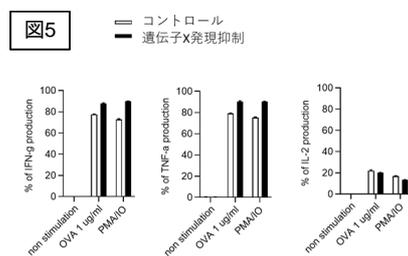


図 5 : 遺伝子X発現抑制CD8T細胞はサイトカイン産生能を持つ
anti-CD3/28で7日ごとに2回刺激後8日目 (最初の刺激から15日目) のOVA抗原特異的サイトカイン産生能をIFN- γ 、TNF- α 、IL-2産生細胞の割合で評価した。

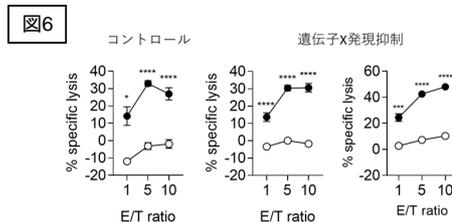


図 6 : 遺伝子X発現抑制CD8T細胞は細胞傷害活性を持つ
anti-CD3/28で1回刺激後9日目および12回刺激後8日目のOVA抗原特異的細胞傷害活性を⁵¹Cr releasing assayで評価した。(左) コントロールsh導入CD8T細胞の1回刺激後9日目、(中) sh遺伝子X導入CD8T細胞の1回刺激後9日目、(右) sh遺伝子X導入CD8T細胞の12回刺激後8日目。*p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------