

令和 5 年 4 月 29 日現在

機関番号：14401  
研究種目：挑戦的研究(開拓)  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19H05552・20K20462  
研究課題名(和文) CAR-T細胞療法の最適化に資するCAR機能チューニングテクノロジーの開発

研究課題名(英文) Development of CAR function-tuning technology that contributes to the optimization of CAR-T cell therapy

## 研究代表者

岡田 直貴 (Okada, Naoki)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90312123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 種々のscFv cloneを用いて構築したCARの中には、T細胞膜上に発現するものの抗原結合親和性が非常に乏しい構造体や、細胞内での凝集が認められる構造体が存在した。CDR-graftingは難発現性を示したCARの膜発現効率を著しく改善できた。  
(2) ヒンジ領域(HD)の構造特性はCARの発現効率・シグナル入力閾値を規定し、膜貫通領域の構造特性はCARの発現安定性や細胞内局在を規定した。  
(3) 第二世代CARの細胞内シグナル伝達領域(STD)設計時には、STDのシグナル特性のみならず、CAR細胞内構造変化についても考慮する必要がある。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法が標的とする抗原分子の多くは、量の多寡はあるもののがん細胞のみならず正常細胞にも発現している。抗体療法やワクチン療法といった患者体内の免疫細胞にがん細胞の排除を担わせる免疫療法においては、標的分子のがん細胞/正常細胞発現比の大きいことが主作用と副作用の分離に必須の条件とされてきた。一方、それ自身ががん細胞を傷害するCAR-T細胞医薬においては、CAR機能のチューニングを行うことによって標的分子密度をより厳密に見分けた作用発揮のON/OFFが実現できるかもしれない。本研究の成果たるCARの構造活性相関情報は、有効性増強や副作用低減のための構造情報を導入したCAR設計に貢献する。

研究成果の概要(英文)：(1) Among CARs constructed using various scFv clones, there are structures that are expressed on the T cell membrane but have very poor antigen-binding affinity, or that aggregate in cytosol.  
(2) The hinge domain (HD) defines the expression efficiency and signal input threshold of CAR by its structure (length and flexibility) or complex formation, and the transmembrane domain (TMD) defines CAR expression stability on the cell membrane or subcellular localization of CAR.  
(3) When designing the intracellular signal transduction domain (STD) of the second-generation CAR, it is necessary to consider not only the signal characteristics of STDs, but also CAR intracellular structural changes.

研究分野：細胞療法学・ワクチン学

キーワード：キメラ抗原受容体 構造活性相関 細胞療法 腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

近年、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現させた T (CAR-T) 細胞療法研究は欧米および中国を中心に活況を呈しており、多くの臨床試験が計画・実施されている。特に CD19 を標的とした CAR-T 細胞療法で血液系悪性腫瘍に対する優れた臨床効果が報告されて以降、本療法に対する期待はなお一層高まりを見せている。しかしながら、CAR-T 細胞療法には副作用である On-target Off-tumor Toxicity やサイトカイン放出症候群など種々の問題点も明らかとなっており、CAR の標的分子を適切に選択することはもちろんのこと、CAR の機能を最適化するデザインやチューニングに対する方法論の確立こそが重要であるとの議論がなされるようになってきた。本研究はまさに CAR の構造/機能連関の解析から得られる情報に基づいた CAR 機能チューニングテクノロジーの開発を目指しており、これまで手付かずの領域であった CAR 機能の最適化を志向した構造面からのアプローチを可能とする。

## 2. 研究の目的

CAR は、モノクローナル抗体由来の一本鎖抗体 (scFv) と T 細胞活性化シグナル伝達ドメイン (STD) をタンデムに結合させた人工受容体であり、細胞外の scFv が標的抗原と結合することで T 細胞に傷害活性をはじめとする種々の機能を誘発できる。CAR-T 細胞療法の有効性や安全性に関する報告は増加の一途をたどっているが、これらの報告の多くは個々の研究者が独自に設計・構築した CAR を用いた場合に限定される情報であるため、CAR-T 細胞療法を最適化するために必要な科学的・理論的根拠としての価値は乏しい。すなわち現在の CAR-T 細胞療法研究においては、CAR 機能の最適化を志向した構造面からのアプローチは殆どなされておらず、CAR 構造活性相関を体系的に解析するシステムの構築は立ち遅れている。CAR の構造は抗原認識領域 (ARD)、ヒンジ領域 (HD)、膜貫通領域 (TMD)、シグナル伝達領域 (STD) の 4 つに区分され、各領域の構造変化が CAR の「標的分子への親和性・特異性」、「シグナル伝達効率・強度」、「シグナルの種類」を規定する要因となることは想像に難くない。これらは CAR-T 細胞療法研究領域において関心の的でありながら、これまでに体系的な検証・実証実験がなされてこなかった。本研究はこれまで手付かずの領域であった各種 CAR 構造変化体の機能比較を体系的かつ円滑に推進することで CAR 構造活性相関情報を集積し、CAR-T 細胞機能を最適化する CAR 構造チューニングテクノロジーの創出を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ARD 変化を伴った CAR 構造活性相関解析<sup>1)</sup>

CAR-T 細胞の抗原特異性・反応性は ARD である scFv に規定されるものの、scFv の構造最適化に関する基礎情報は未だ乏しい。そこで、scFv 構造の変化が T 細胞膜上における CAR の発現強度や抗原親和性、および CAR-T 細胞機能に及ぼす影響について精査した。ハイブリドーマ法あるいはファージディスプレイ法により単離したアフィニティーの異なる 4 種類の抗ヒト VEGFR2 scFv を ARD にもつ第二世代 CAR 遺伝子 (ARD-CD28 由来 HD/TMD-CD28 由来 STD-CD3 $\zeta$ 由来 STD) を作製し、これらを導入したマウス T 細胞における CAR 発現様式や細胞機能 (細胞傷害活性、サイトカイン分泌能、など) を比較解析した。

### (2) HD/TMD 変化を伴った CAR 構造活性相関解析<sup>2,3)</sup>

CAR の HD/TMD 構造と CAR 機能および CAR-T 細胞機能との連関を明らかにするべく、各種 HD 変化 CAR および HD/TMD 変化 CAR を作出し、それらの遺伝子を導入したマウス T 細胞における CAR 発現レベルおよび抗原特異的な機能強度を体系的に比較解析した。また、膜発現レベルが同等でありながらシグナル入力効率の異なる 2 種類の CAR (CD28 由来 HD/TMD または CD8 $\alpha$ 由来 HD/TMD を導入) をモデルとして、その HD 内のシステイン残基 (複合体形成に関与) や N-結合型・O-結合型糖鎖修飾サイト (発現安定性に寄与) を他のアミノ酸に置換した CAR を作出し、翻訳後修飾が CAR 発現様式や CAR-T 細胞機能 (細胞傷害活性、サイトカイン分泌能、など) に与える影響について精査した。

### (3) STD 変化を伴った CAR 構造活性相関解析<sup>4)</sup>

CAR-T 細胞療法研究において、CD3 $\zeta$ 由来 STD (1st-STD) のみを有する第一世代 CAR では機能面や *in vivo* 生存性において活性が不十分であり、CD28 や 4-1BB などの T 細胞共刺激分子に由来する STD を 2nd-STD として追加した第二世代 CAR を発現させた T 細胞が優れた機能を発揮するとして多用されている。しかし、2nd-STD 挿入による構造面からの CAR 機能への効果・影響については詳細に解析されていない。そこで、TMD 直下に 2nd-STD, 1st-STD の順で連結させた各種第二世代 CAR の解析を行った。さらに安全かつ品質の高い細胞医薬の創出に向けて、第二世代 CAR シグナルの ON/OFF を明確に制御しうる CAR-STD の構造最適化を図るため、2nd-STD 挿入位置の調節について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ARD 改変を伴った CAR 構造活性相関解析<sup>1)</sup>

ヒト VEGFR2 を認識する種々の scFv clone を用いて構築した CAR の中には、T 細胞膜上に発現して抗原特異的結合能を有する構造体を含んだが、T 細胞膜上に発現するものの抗原結合親和性が非常に乏しい構造体や、膜への発現効率が低く細胞内での凝集が認められる構造体が存在した。CAR の scFv 構造改変を種々試みたところ、CDR-grafting は難発現性を示した CAR の膜発現効率を著しく改善させることが可能であり、CAR-T 細胞療法への応用に有望な scFv を取得したとしても CAR として T 細胞膜上に発現させることができずに開発を断念してきたケースへの打開策になりうると考えられた。

##### (2) HD/TMD 改変を伴った CAR 構造活性相関解析<sup>2,3)</sup>

HD がその構造 (長さや柔軟性) あるいは HD を介した複合体形成により CAR の発現効率やシグナル入力閾値 (効率) を規定すること、TMD が細胞膜上の CAR 発現安定性あるいは CAR の細胞内局在を規定することを明らかにした。CAR-T 細胞の機能強度は HD/TMD に規定される CAR 発現強度と HD に規定される CAR シグナル入力効率に影響を受けたことから、HD/TMD の設計は、標的抗原の分布やがん細胞と正常細胞における抗原発現強度の差を考慮して、適切な CAR の膜発現強度とシグナル入力効率を示す構造 (アミノ酸配列) を選択する必要があると考えられた。

HD のシステイン残基を介したジスルフィド結合や糖鎖修飾などの翻訳後修飾が CAR-T 細胞機能に与える影響の解析を行った。マウス VEGFR2 特異的 scFv に CD28 由来あるいは CD8 $\alpha$  由来の HD・TMD と CD3 $\zeta$ 由来 STD をタンデムにつないだ 2 種類の第一世代 CAR (CAR[V/28/28/3z]および CAR[V/8a/8a/3z]) を基本構造体とし、HD に含まれるシステインをアラニンに置換した改変体と N 結合型糖鎖修飾部位と予想されるアスパラギンをアスパラギン酸に置換した改変体を構築した。CAR[V/28/28/3z]は HD に 1 か所存在するシステインを介して、CAR[V/8a/8a/3z]は HD 内に存在する 2 つのシステインのうち TMD に近い方のシステインを介して、それぞれホモ二量体を形成した。これらの CAR 分子間ジスルフィド結合の欠如は、T 細胞膜上での CAR 発現レベルには影響しなかったものの、抗原特異的なサイトカイン産生能および細胞傷害活性を低下させた。また、CAR[V/28/28/3z]および CAR[V/8a/8a/3z]はともに N 結合型糖鎖修飾部位が 1 か所存在し、さらに CAR[V/8a/8a/3z]は修飾部位が未同定ながら O 結合型糖鎖修飾を大きく受けていることが判明した。CAR[V/28/28/3z]の N 結合型糖鎖修飾は細胞膜上での CAR 発現の安定化に寄与することが示唆された。一方、CAR[V/8a/8a/3z]の N 結合型糖鎖修飾は CAR 発現および CAR-T 細胞機能に明らかな影響を及ぼさなかった。本結果は、CAR の HD 内翻訳後修飾が CAR-T 細胞機能の制御に重要な役割を果たすことを示しており、今後の CAR 設計において貴重な基礎情報を提供するものと考えられる。

##### (3) STD 改変を伴った CAR 構造活性相関解析<sup>4)</sup>

T 細胞での安定な発現が認められた第一世代 CAR (ARD-CD28 由来 HD/TMD-CD3 $\zeta$ 由来 STD) を基本構造として、各種共刺激分子由来 STD を 2nd STD として挿入した第二世代 CAR を構築した。CD28 ファミリー分子由来の STD を挿入した第二世代 CAR-T 細胞は、第一世代 CAR-T 細胞と比較して IL-2 分泌能と細胞傷害活性に増強が認められた。一方、TNF 受容体スーパーファミリー分子由来の STD を挿入した第二世代 CAR-T 細胞のサイトカイン分泌能・細胞傷害活性は減弱傾向を示した。また、第二世代 CAR の細胞傷害活性は共刺激分子由来 STD の種類や追加位置に影響を受けたことから、STD 追加に伴う CAR 細胞内構造の変化が CD3 $\zeta$ -STD のシグナル入力効率に影響を与えることが示唆された。したがって、第二世代 CAR の STD 設計時には共刺激分子由来 STD のシグナル特性のみならず、CAR 細胞内構造変化に基づく CD3 $\zeta$ -STD のシグナル入力効率の変化についても考慮する必要があると考えられた。

#### < 引用文献 >

1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 527(2), 350-357, 2020
2. Cells 9(5), 1182, 2020
3. Int. J. Mol. Sci. 23(7), 4056, 2022
4. Int. J. Mol. Sci. 22(5), 2476, 2021

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sachiko Hirobe, Keisuke Imaeda, Masashi Tachibana, Naoki Okada	4. 巻 23
2. 論文標題 The Effects of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Hinge Domain Post-Translational Modifications on CAR-T Cell Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4056 ~ 4056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074056	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 Kento Fujiwara, Masaki Kitaura, Ayaka Tsunei, Hotaka Kusabuka, Erika Ogaki, Naoki Okada	4. 巻 22
2. 論文標題 Structure of the Signal Transduction Domain in Second-Generation CAR Regulates the Input Efficiency of CAR Signals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2476 ~ 2476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052476	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 Kento Fujiwara, Shigemi Sasawatari, Sho Nakai, Keisuke Imaeda, Seina Nagai, Yoshihiro Matsuno, Kanako Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Satoshi Takenaka, Naoki Okada	4. 巻 12
2. 論文標題 Predicting the Efficacy and Safety of TACTICs (Tumor Angiogenesis-Specific CAR-T Cells Impacting Cancers) Therapy for Soft Tissue Sarcoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2735 ~ 2735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102735	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 Kento Fujiwara, Kazuki Shigematsu, Masashi Tachibana, Naoki Okada	4. 巻 72
2. 論文標題 Development and functional analysis of an anticancer T cell medicine with immune checkpoint inhibitory ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUBMB Life	6. 最初と最後の頁 1649 ~ 1658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iub.2280	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 Kento Fujiwara, Mizuki Masutani, Masashi Tachibana, Naoki Okada	4. 巻 527
2. 論文標題 Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 350 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.071	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 Kento Fujiwara, Ayaka Tsunei, Hotaka Kusabuka, Erika Ogaki, Masashi Tachibana, Naoki Okada	4. 巻 9
2. 論文標題 Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1182 ~ 1182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051182	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 抗原親和性の異なる抗Robo4 CAR-T細胞間での抗腫瘍効果の比較
2. 発表標題 長井聖奈, 立花雅史, 岡田直貴
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 第53回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
2. 発表標題 軟部肉腫に対する腫瘍血管障害性CAR-T細胞療法の奏功予測研究
3. 学会等名 中井 翔, 藤原健人, 今枝啓輔, 長井聖奈, 安田直弘, 前 裕和, 王谷英達, 濱田健一郎, 岡田直貴, 竹中 聡
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長井聖奈, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 固形がんに対する抗Robo4 CAR-T細胞療法の開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今枝啓輔, 藤原健人, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 キメラ抗原受容体 (CAR) が受ける翻訳後修飾のCAR-T細胞機能への影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長井聖奈, 藤原健人, 福井麻琴, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 固形がんに対するCAR-T細胞療法におけるROBO4標的化の有用性評価とROBO4特異的CARの構築
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原健人, 中井 翔, 安田直弘, 王谷英達, 濱田健一郎, 竹中 聡, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 軟部肉腫に対する腫瘍血管傷害性CAR-T細胞療法の有効性・安全性予測に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kento Fujiwara, Sho Nakai, Naohiro Yasuda, Hidetatsu Otani, Kenichiro Hamada, Satoshi Takenaka, Masashi Tachibana, Naoki Okada
2. 発表標題 Research to predict the effectiveness of tumor vessel-injuring CAR-T cell therapy for soft tissue sarcoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原健人, 升谷美月, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 CARの細胞外領域に適したscFv構築法の確立に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原健人, 升谷美月, 立花雅史, 岡田直貴
2. 発表標題 キメラ抗原受容体のscFv構造と膜発現強度との連関解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 / 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
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
---------	---------