

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16301

研究課題名（和文）細胞機能、受容体編集によるT細胞を細胞骨格としたバイオマイクロマシンの開発

研究課題名（英文）Cell function, receptor editing to develop a T-cell cytoskeleton-based biomicromachine.

研究代表者

南川 淳隆（Minagawa, Atsutaka）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90838822

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：新規構造の人工受容体を作成し、機能評価を行う過程で、受容体の細胞外ドメイン切断現象であるシェディングが起こる構造にすると、シグナル伝達の持続期間が延長し、機能増強効果を示すことを発見した。この現象は、近接細胞間の膜蛋白交換現象であるトロゴサイトーシスが、シェディングにより抑制され、標的タンパク質のターゲット細胞上での発現量が維持されることが原因であると、シェディングを抑制する阻害剤や変異導入から示すことに成功した。また人工受容体の細胞内ドメインの構造やサイズが、シェディング、トロゴサイトーシスの調整に密接に関連していることも発見した。本発見は今後の人工受容体設計の基盤原理となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、受容体シェディングによるトロゴサイトーシスの調整法についての基盤理論の構築に成功した。またシェディング構造を導入し、トロゴサイトーシスが抑制されたキメラ受容体は、動物実験にて増強された抗腫瘍効果を持つことを示すことに成功した。この結果はがん治療におけるキメラ受容体の新しい設計概念となるのみならず、シェディングとトロゴサイトーシスの関連は、すべての膜蛋白受容体にて起こっている現象であることが予想され、近接細胞間コミュニケーションを理解する上で重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：In the process of creating artificial receptors with novel structures and evaluating their functions, it was discovered that the duration of signal transduction is prolonged and the function is enhanced when the receptors are structured in such a way that shedding, a phenomenon in which the extracellular domain of the receptor is cleaved, occurs. This phenomenon is due to the fact that shedding suppresses trogocytosis, a membrane protein exchange phenomenon between neighbouring cells, and maintains the expression level of the target protein on the target cell, as shown by inhibitors and mutagenesis that suppress shedding. They also found that the structure and size of the intracellular domain of the artificial receptor is closely related to the regulation of shedding and trogocytosis. This finding is considered to be a fundamental principle for future artificial receptor design.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：人工受容体 トロゴサイトーシス シェディング エンドサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新規の人工受容体を作成し免疫系細胞に導入することで、T細胞を骨格としたバイオマイクロマシンを構築し、将来的な細胞療法に利用することを目指して、さまざまな構造を持つ人工受容体の作成に着手した。当初は、甘味受容体の構造に着目し、さまざまなキメラ構造を組み込み改変するという実験を行っていたが、スクリーニング結果で想定した反応結果を示す人工受容体を取得することができず、難航していた。さまざまな受容体構造についての知見を増やす過程で、受容体のシェディング現象に着目した。シェディングとは、リガンドが膜蛋白受容体に接合した後に、受容体の細胞外ドメインが切断される現象であり、多くのチロシンキナーゼ型受容体において起こることが知られている。しかしその生理学的意義や、受容体シグナル伝達における役割についての詳細はほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

抗がん治療に使用するキメラ受容体(CAR)において、受容体のシェディング構造の有無がどういふシグナル伝達、効果に違いを出すかについての検討を行うことで、受容体シェディングの効果、生理学的意義について調べ知見を得ることで、さらに効果的なCARの構築を目指した。

3. 研究の方法

CD19-CARにおいて、膜貫通部位及びその上部のヒンジをシェディング構造を持つ(Notch蛋白由来構造)Cleavable-CARと、切断されない構造(CD8蛋白由来)Normal-CARを作成し、シグナル伝達、細胞障害性、*in vivo*抗腫瘍実験等の検討を進め、相違点、メカニズムの検証を行った。

4. 研究成果

Cleavable-CARは短時間での反応において、元のコンストラクトと同程度の抗原特異的なシグナル伝達を示した。我々は、前述の通り一定の応答期間があるシグナルの方が、反応性が持続しやすいのではないかと考え、4日間刺激が入り続ける状態での解析を行ったところ、**Cleavable CARの方がより強く反応性が持続している事が分かった(図1)**。この結果をふまえ、*in vivo*での抗腫瘍効果についての検討を行った。CD19発現腫瘍株であるNALM6をiv投与した白血病モデルマウスに、各種CAR-T細胞を静脈投与した結果、**Cleavable-CARは、Normal-CARより*in vivo*でも有意にモデルマウスの生存を延長し、高い治療効果が認められた。**

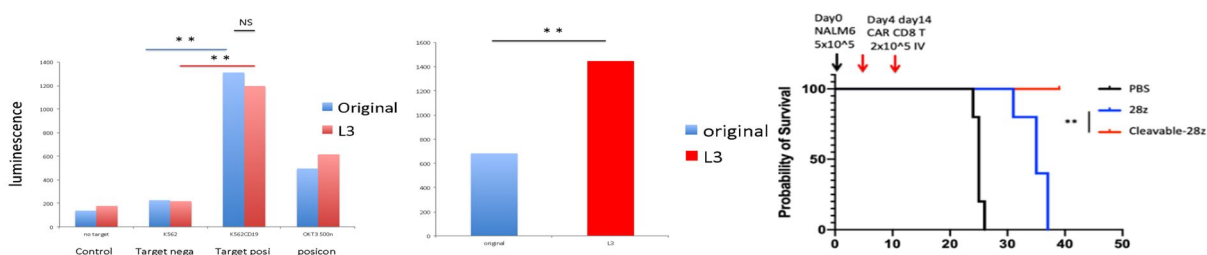


図1 Cleavable コンストラクトを使用したCARの反応性

リガンド発現細胞との共培養での、T細胞刺激シグナルをNFAT-luc細胞で検出した所、膜貫通領域をマウスNotchタンパク由来のものに変えたCleavable CAR(L3)では、3hでは同等の反応性を認め(左)、day4まで長期培養した所、元のCARより高い反応性を認めた(中央)。さらに、血液腫瘍モデルでの*in vivo*でも有意な抗腫瘍活性を認め、臨床承認CARであるイエスカルタ(Gilead Science 28zで表記)の同等CARと比較しCleavable-28zは有意に生存を延長した(右)。

次に、シェディング構造が CAR の長期反応性を高め、マウスモデルでの効果を増強するメカニズムを検証した。様々な細胞内ドメイン構造をもつ CAR を用いたところ、Cleavable CAR ではないがん細胞上の抗原発現の減少が少なく、**シェディング構造を付加した Cleavable CAR では、通常の CAR と比較してトロゴサイトーシスが抑制されることが明らかになった(図 2)**。また、シェディング阻害薬を使用すると Cleavable CAR でも抗原が減少してしまうことから、CAR のシェディングがトロゴサイトーシスを抑制するという現象を証明した。さらに、マウス Notch 配列以外のシェディング構造を用いた Cleavable CAR でもトロゴサイトーシスが抑制されたことから、**シェディング構造がトロゴサイトーシスを抑制するのは、普遍的な現象であることが示唆された。**

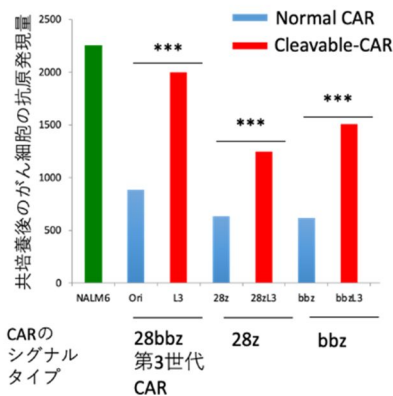


図2 Cleavable CAR はトロゴサイトーシスを抑制する

様々な細胞内ドメインタイプの CAR において、膜貫通部位にシェディング構造を組み込むと、トロゴサイトーシスを起こしにくくなることが示された。通常の CD19 発現がん細胞株 NALM6 は左端(緑)レベルの抗原発現があるが、通常の CAR-T と共培養すると青まで発現低下を認める。Cleavable CAR では低下が抑制される(赤)。つまり、様々な構造の CAR において、本 Cleavable CAR 技術が活用できることが示唆される。

Cleavable CAR の最適化による CAR-T の細胞の抗腫瘍効果増強

受容体のシェディングがトロゴサイトーシスを抑制し、シグナルの持続時間を延長することは、これまで全く報告されていない現象である。我々は、トロゴサイトーシスとシェディングの関連について、さらに研究を進め、トロゴサイトーシスとはなぜ起こるのかについて考察を深めた。その結果、**細胞内のシグナルドメインの個数を増やすことで、Cleavable CAR のトロゴサイトーシス抑制効果を高められることが明らかとなった(図 3)**。現在、シグナルドメインの個数とトロゴサイトーシスの抑制を繋げているメカニズムの解明を進めており、論理的に Cleavable

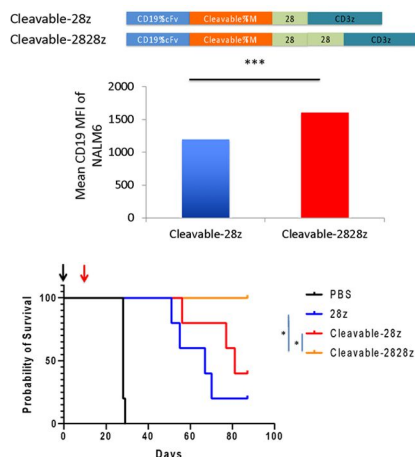


図3 シグナルドメインのエンジニアリングによるトロゴサイトーシス効果の最適化手法

法

シェディング構造を組み入れた CAR において、細胞内のシグナルドメインの個数を増やすと、さらにトロゴサイトーシスが抑制されることがわかった。Cleavable-2828z の方が Cleavable-28z より抗原発現量が増え、トロゴサイトーシスが抑制されていることがわかる(上)また、細胞内ドメインを増やした CAR(Cleavable-2828z)は、より抗腫瘍効果が増強されることが *in vivo* 試験で示された(下)。

CAR の最適化を行うことを可能にすることで、**標的や T 細胞に合わせた Cleavable CAR 設計技術の開発が期待できると考えている。**

Cleavable CAR-T の固形がん治療への展開

前述の通り、既存の CAR-T では固形がんに対する薬効が十分ではないことが、プログラムが上市に至っていない理由の一つとして考え、CAR-T 療法における大きな課題であると考えられる。固形がんにおいて標的とされる表面マーカーには HER2、MSLN、MUC16 など、それ自身がシェディング構造を有する膜タンパク質が多いため、CAR による抗原引き抜きによる抗原量減少が生じやすく、CAR-T の殺傷効果が低下することで腫瘍の再発や免疫逃避の一因になる事が報告されている。そこで、固形がん抗原を標的とする CAR に Cleavable CAR を適用することで、標的の固形がんにおける抗原量低下を抑制し、抗腫瘍効果を高めることができるのではないかと考えた。

標的として、卵巣がんをはじめとする固形がん抗原である HER2 を選定した。HER2 は CAR-T 両方において抗原発現低下が報告されており、CAR によるシェディングやトロゴサイトーシスが生じていると考えられる。HER2 に対する Cleavable CAR-T を構築したところ、細胞実験において HER2 の発現減少を抑制することが示され、マウス腫瘍モデルにおいても Cleavable-BBBBzCAR は、トロゴサイトーシスの抑制に相関して有意に効果が増強されることが示された。(図 4)

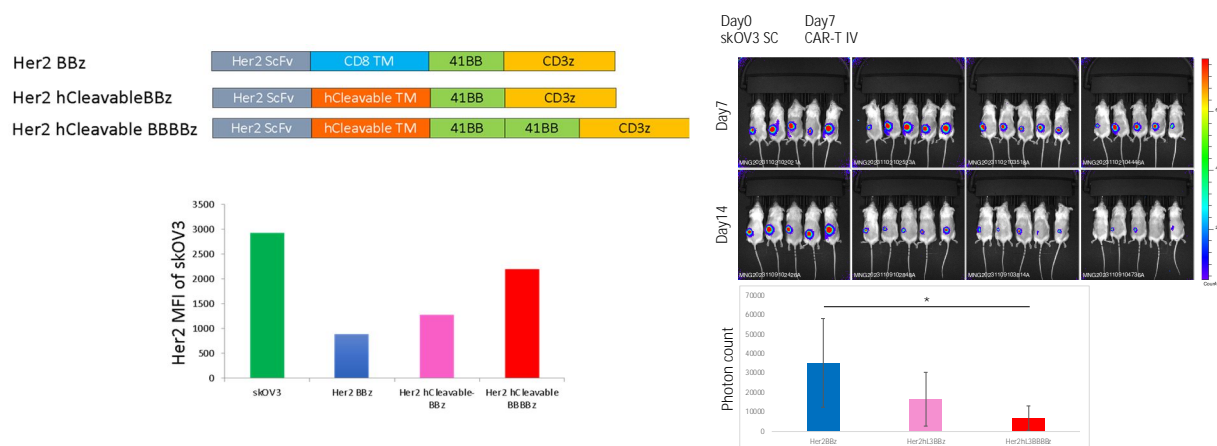


図 4 Her2 抗原での CleavableCAR のトロゴサイトーシス抑制

抗原認識部位を Her2ScFv に変更した CAR-T と、Her2 発現腫瘍 skOV3 を共培養し、skOV3 の Her2 発現量を定量化したものの。ターゲットを変えても、Cleavable CAR 及びシグナルドメインを増やした場合のトロゴサイトーシスコントロールは問題なく働くことが確認できている。また、skOV3-Luc を免疫不全マウスに皮下移植し、Day7 に 各種 CAR-T 細胞を IV した in vivo 腫瘍実験のデータでは、トロゴサイトーシスの抑制データと相関するように、Cleavable-BBBBz は有意に CAR-T 治療 1week 後の腫瘍量が減少していることが示された。

以上のように我々は、シェディング構造を持つ CAR がトロゴサイトーシスを抑制することで強力な抗腫瘍効果を示すこと、さらにトロゴサイトーシスをコントロールすることで最適化する原理手法を確立し (Minagawa, *submitted*)、Cleavable CAR 技術として 2022 年に特許出願を行った。トロゴサイトーシスの抑制法を理論化した報告はこれまで存在せず、CAR の効果増強において全く新しい概念である。さらに、CD19 抗原に対する Cleavable CAR は、現在世界的に利用されている製剤と比較し強い抗腫瘍効果を示しており、次世代の CAR として期待される。また、HER2 抗原に対する固形がんモデルにおいても、効果の増強が確認出来ており、その高い抗腫瘍活性から、現状治療が難しい固形がんの治療に用いる CAR-T 細胞の開発が期待される。シグナル因子の選択、サイトカインやケモカインの発現など様々な CAR-T の活性増強法は報告されているが、本技術はどの方法とも共存できることから、併用による相乗的な抗腫瘍効果の向上も可能であると考えられる。このように、今後発展していくと考えられる全ての CAR 療法に適応で

きる技術であり、他の技術と競合しないことから、**プラットフォーム技術としての将来性が大きい**。

このように、シェディング構造とトロゴサイトーシスの関連は、CAR の機能向上という実用方向においても有用な知見であるが、チロシンキナーゼ型受容体の多くがシェディング構造を持つことを考えると生理的意義の大きい発見であると考えられる。膜蛋白受容体は、トロゴサイトーシスにより近接細胞よりリガンド蛋白質を取り込み、その取り込み量がシェディングによりコントロールされていることが予想される。シェディング現象は、チロシンキナーゼ型受容体、Notch 蛋白、アミロイド前駆体蛋白など、体内で普遍的に発現し様々な機能を持つ受容体で起こっている現象であり、それぞれで、シェディングがどのようなメカニズムで調整されているかを調べることは、シグナルコントロール、近接細胞間コミュニケーションの解明といったこれまで未知のメカニズムに関わる研究になると考えており、今後の発展に期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Ueda Tatsuki, Shiina Sara, Iriguchi Shoichi, Terakura Seitaro, Kawai Yohei, Kabai Ryotaro, Sakamoto Satoko, Watanabe Akira, Ohara Kohei, Wang Bo, Xu Huaigeng, Minagawa Atsutaka, Hotta Akitsu, Woltjen Knut, Uemura Yasushi, Kodama Yuzo, Seno Hiroshi, Nakatsura Tetsuya, Tamada Koji, Kaneko Shin	4. 巻 7
2. 論文標題 Optimization of the proliferation and persistency of CAR T cells derived from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 24 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-022-00969-0	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 Takayanagi Shin-ichiro, Wang Bo, Hasegawa Saki, Nishikawa Satoshi, Fukumoto Ken, Nakano Kohei, Chuganji Sayaka, Kato Yuya, Kamibayashi Sanae, Minagawa Atsutaka, Kunisato Atsushi, Nozawa Hajime, Kaneko Shin	4. 巻 31
2. 論文標題 Mini-TCRs: Truncated T cell receptors to generate T cells from induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods& Clinical Development	6. 最初と最後の頁 101109 ~ 101109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2023.101109	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Atsutaka Minagawa, Shin Kaneko
2. 発表標題 Trogocytosis controlled CAR-T cells show enhanced anti-tumor activity
3. 学会等名 JSH international symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsutaka Minagawa, Shin Kaneko
2. 発表標題 rogocytosis controlled CAR-T cells show enhanced anti-tumor activity
3. 学会等名 日本免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 シェディング構造を持つキメラ受容体	発明者 南川淳隆 金子新	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、学内7751	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 シェディング構造を持つキメラ受容体	発明者 南川淳隆 金子新	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/026123	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------