

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0189

研究課題名（和文）次世代ゲノム編集技術を用いた抗原特異的免疫細胞療法の確立

研究課題名（英文）Generation of antigen-specific T lymphocytes using genome editing technique

研究代表者

大内 靖夫（Ouchi, Yasuo）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70553858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 45ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究ではがん免疫細胞療法におけるT細胞の遺伝子改変技術において有用となる社会実装可能な非ウイルス性ゲノム編集ツールの開発を行った。その結果、T細胞に対して高効率で遺伝子導入ができるmRNA脂質ナノ粒子の開発に成功し、PD-1、TCR遺伝子に対するCRISPR/Cas9ゲノム編集ツールを封入することでヒトT細胞に対して簡単にゲノム編集ができるゲノム編集脂質ナノ粒子を開発した。またSARS-CoV-2に対するRNA編集ツールを搭載した脂質ナノ粒子を開発し、ヒト肺オルガノイドCOVID-19モデルで高い抗ウイルス効果を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん免疫細胞療法などを中心にゲノム編集技術の臨床応用が進められている。しかし、多くの問題を有しており、社会実装が困難な状況である。本研究ではT細胞を標的としたmRNA脂質ナノ粒子を開発し、ゲノム編集技術を搭載することで簡便かつ迅速にゲノム編集T細胞を得る技術を開発した。また本技術を新型コロナウイルス感染症にも応用することで、高効率でSARS-CoV-2ウイルスを肺上皮細胞から除去できるRNA編集搭載脂質ナノ粒子を開発した。これらの研究成果は今後ゲノム編集技術を用いた治療法の社会実装を進めるうえで重要な基盤技術となると期待している。

研究成果の概要（英文）：In this study, I developed non-viral genome editing tools that can be useful in the genome editing technology of T cells for successful cancer immunotherapy. As a result, we succeeded in developing mRNA lipid nanoparticles(LNPs) that enable highly efficient gene delivery into T cells, and developed genome-editing LNPs carrying CRISPR/Cas9 genome editing tools against PD-1 and TCR genes. Our genome-editing LNPs allows us to easily perform genome editing in human T cells. We have also developed LNPs carrying RNA editing tools against SARS-CoV-2 and confirmed that it showed high antiviral effects in the human lung organoid model of COVID-19.

研究分野：ゲノム編集技術

キーワード：ゲノム編集技術 脂質ナノ粒子 T細胞 免疫細胞療法 COVID-19

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術は 2012 年に開発されて以来、急速に発展し様々な疾患の治療に応用されようとしている。2017 年現在、特にゲノム編集技術を利用した次世代の免疫細胞療法の技術開発が世界的に進められているが、T 細胞などの血球系細胞では、Plasmid Transfection などの一般的な手法によるゲノム編集が不可能であった。研究代表者らの研究成果により、ゲノム編集ツールタンパク質の電気穿孔法による細胞内導入により高効率遺伝子破壊が可能となったが、遺伝子 Knock-in は非常に困難である。研究代表者はこれまで基礎研究課題のもと技術開発を進めた結果、初年度において、末梢血由来 CD8 T 細胞に対して One-step で非ウイルス的に遺伝子導入することに成功した。しかし、本技術を用いた遺伝子 Knock-in は効率が低く、研究目的を達成するためにはさらなる技術的突破口が必要な状況であった。一方、2012 年以降、新たなゲノム編集ツールの探索と開発競争が繰り広げられてきたが、その過程で DNA の修飾状態などを改変する CRISPR エピゲノム編集、高効率 Knock-in 技術などが登場した。我が国も精力的に本技術の基礎研究を進めているが、米国が本技術の臨床応用に向けて世界的に大きく先行している状況である。特に米国サンディエゴに所在する Salk 研究所はゲノム編集技術の世界的権威である Juan Carlos Izpisua Belmonte 教授、Patrick Hsu 博士を有する本研究分野でも世界をリードする研究拠点であり、2017 年現在までに HITI 法による *in vivo* での遺伝子 knock-in 技術 (Suzuki K et al., Nature 2016), CRISPR-TGA 技術による DNA の切断を伴わずに標的遺伝子活性化するトランスエピジェネティック編集技術 (Liao HK et al., Cell 2017), 標的ゲノム領域 CpG island 特異的にメチル化を導入する技術 (Takahashi Y et al., Science 2017), ミトコンドリアゲノム編集技術 (Reddy P et al., Cell 2015) などの技術を発表している。これらの研究成果は今後、様々な疾患の治療に応用されることで画期的な治療法を生み出す可能性のある有益な技術であると考えられる。一方、2017 年、米国 FDA がウイルスベクターを用いた CAR-T 療法製剤 Kymriah、RPE65 遺伝子欠損網膜変性症の遺伝子治療薬 Luxturna を承認したことから、今後より一層、社会実装可能な非ウイルス性の遺伝子導入技術に注力した研究開発を行うことが重要であると考えられる。臨床応用が注目されている非ウイルス性の遺伝子導入技術としては電気穿孔法、脂質ナノ粒子、リポソームなどの技術が注目されており、特に米国 Alnylam Pharmaceuticals 社がトランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチの治療薬として臨床応用を進めている TTR 遺伝子に対する siRNA 搭載脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle, LNP) の動向は今後の非ウイルス性遺伝子導入の方向性を考える上で重要である。

2. 研究の目的

本研究課題では再生研究、ゲノム編集技術の世界的権威である米国サンディエゴ Salk 研究所 Juan Carlos Izpisua Belmonte 教授と国際共同研究を行い、同教授が開発している様々な革新的なゲノム編集技術を免疫細胞療法に応用することを検討することで、非ウイルス的に簡便に遺伝子 Knock-in 導入できる技術など社会実装可能な次世代のゲノム編集技術のツールを開発することを目指した。また Salk 研究所の所在する米国サンディエゴのバイオ産業クラスターの地の利を活かして積極的に情報収集を行い、世界の医薬開発の動向に即した社会実装可能な技術形態で開発した技術の応用研究を進める。これらの研究活動を通じて、国際的な研究ネットワークを形成すると同時に最終的には社会実装可能な非ウイルス性の遺伝子導入法を活用したゲノム編集技術の開発をすることを目的とした。

3. 研究の方法

Juan Carlos Izpisua Belmonte 教授は、ゲノム編集技術、幹細胞生物学、発生学の世界的な権威であり、2013 年にゲノム編集技術が報告されて以降、世界に先駆けて iPS 細胞、ES 細胞、T 細胞、神経細胞などの様々な細胞に対するゲノム編集を実現し、これらの技術の研究成果を一流誌に報告している。特に CRISPR/Cas9 を利用した HITI 法による *in vivo* での遺伝子 Knock-in 技術は従来法より 10 倍ほど高い遺伝子 Knock-in 効率があると報告されており、本技術を T 細胞に応用することで申請者の基礎研究課題で直面していた問題を克服し、ゲノム編集による高効率な抗原特異的 T 細胞の作成技術につながると期待される。さらには Salk 研究所に在籍する Patrick Hsu 博士が開発中であるとされる CRISPR/Cas13 RNA 編集技術は DNA の切断を伴わず標的 mRNA を分解する技術であり、本技術はより安全な細胞改変技術に活用できる可能性がある。そこで本研究課題ではこれらのゲノム編集技術を積極的に T 細胞に対して取り入れ、抗原特異的 T 細胞を作成し、癌、自己免疫疾患などに対する次世代免疫細胞療法の基盤技術を構築すること試みた。またこれらの様々な CRISPR 関連技術を社会実装可能な形態にする為に、ゲノム編集ツール搭載脂質ナノ粒子などの非ウイルス性の遺伝子導入技術を開発に積極的に取り組んだ。

4. 研究成果

2018 年度、本研究課題の遂行のため渡米し、共同研究先である Salk 研究所においてマウス、ヒト T 細胞に対するゲノム編集研究に必要な研究環境を整備した。まず研究計画に即して T 細胞に対して CRISPR/Cas9 を利用した HITI 法による knock-in 技術の検討を行う為、ヒト AAVS1 ゲノム領域、マウス ROSA26 ゲノム領域を標的とした HITI 法を搭載した dsDNA GFP レポータードナーとコントロールの dsDNA GFP ドナーを開発した。得られた各種遺伝子 knock-in ドナーを spCas9 タンパク質と各種ゲノム領域を標的とした gRNA で調整した Cas9 RNP 複合体と共にヒトまたはマウス T 細胞に対して電気穿孔法で細胞内に導入し、得られた細胞に対して FACS を用いて knock-in 効率の解析を行った。その結果、ヒト初代 CD8(+) T 細胞における HITI 法を搭載し

た dsDNA ドナーでの knock-in 効率は約 4% であり、電気穿孔法の条件を検討したものの従来法に対して大きな改善は得られなかった。これまでの研究代表者の検討結果から dsDNA ドナーの T 細胞への導入効率に大きな問題があると考えられた。そこで FDA が同年夏に承認した脂質ナノ粒子を核酸のデリバリーとして、T 細胞を標的としたゲノム編集ツール mRNA を搭載したゲノム編集脂質ナノ粒子の開発を着想し研究を開始した。

2019 年度、ヒト T 細胞への遺伝子導入に最適な脂質ナノ粒子の外装組成を得る為、GFP mRNA を封入した 10 種類の脂質ナノ粒子を米国サンディエゴの Arcturus 社の協力のもと調整し、ヒト T 細胞に対する遺伝子導入効率の解析を行った。その結果、LNP #6 を用いることでヒト CD8(+)T 細胞に対して約 90% の効率で遺伝子導入ができることが確認できた。続いてヒト PD-1、TCRa 遺伝子に対する CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツールの gRNA および spCas9 mRNA を本 LNP #6 に封入することで T 細胞に対するゲノム編集脂質ナノ粒子を開発した。得られたゲノム編集脂質ナノ粒子を CD3/CD28 刺激したヒト CD8(+)T 細胞に対して添加して、標的遺伝子の発現を FACS で解析した結果、約 40% のノックアウト効率で標的遺伝子の発現抑制ができた。さらには CD19-CAR 遺伝子 mRNA を封入した脂質ナノ粒子を開発し、ヒト CD8(+) T 細胞に対して添加することで 90% 以上の細胞で CD19-CAR 遺伝子の発現が確認できた。また 2018 年に Saik 研究所の Patrick Hsu 博士が CRISPR/CasRx RNA 編集技術を発表した (Konerman S et al., Cell 2018)。本技術は従来の RNA 干渉技術とは異なり、標的 RNA を高効率で切断する画期的な技術であることから本技術を用いた T 細胞の改変技術の開発を進めた。まず CRISPR/CasRx RNA 編集ツールの簡便かつ迅速な評価を実施するため CasRx-2A-GFP、標的配列 mCherry 遺伝子を用いた CasRx 用 Dual Reporter system を構築し、PD-1, TCR 遺伝子に対する RNA 編集ツールの開発を行った。その結果、PD-1, TCRa 遺伝子の発現を高いノックダウン効率で発現抑制できる CasRx RNA 編集ツールを開発した。一方、2019 年 12 月、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 中国の武漢市で報告された。研究代表者が開発を進めている CRISPR/CasRx 搭載 RNA 編集脂質ナノ粒子は SARS-CoV-2 ウイルスの除去にも活用できると考えて研究開発を開始した。その結果、約 90% の高いノックアウト効率で SARS-CoV-2 標的 RNA ゲノムを分解できる RNA 編集ツールを開発した。

2020 年度、共同研究先である Saik 研究所は COVID-19 によるロックダウンにより、COVID-19 研究以外の研究活動に関して大幅な制限が指示された。そこで T 細胞に対して開発を進めてきた RNA 編集、脂質ナノ粒子の技術を活用し、SARS-CoV-2 に対する CRISPR/CasRx RNA 編集技術搭載脂質ナノ粒子の開発を進めた。まず Arcturus 社の協力を得て、肺上皮細胞を標的とした LNP の開発を進めた結果、in vivo で肺上皮細胞に高い効率で遺伝子導入できる脂質ナノ粒子を得ることに成功した。続いて本脂質ナノ粒子に対して、前述の研究代表者が開発した RNA 編集ツールの RNA を封入することで SARS-CoV-2 に対する CRISPR/Cas13 RNA 編集技術搭載脂質ナノ粒子を開発した。SARS-CoV-2 N-mCherry レポーターを搭載した脂質ナノ粒子をマウス肺に投与した疑似 SARS-CoV-2 感染モデル構築し、in vivo における本レポーターの発現抑制効果の検証を行った結果、マウス肺組織において効率的に標的 SARS-CoV-2 RNA を分解できることが確認できた。

2021 年度、実際の SARS-CoV-2 ウイルス感染に対する効果を検証するため、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の高山和雄先生に共同研究を打診して、ヒト肺オルガノイドに対する SARS-CoV-2 デルタ、カッパ、ガンマ変異株の感染モデルを用いて抗ウイルス効果の検証を行なった。その結果、我々の開発した抗 SARS-CoV-2 RNA 編集技術搭載脂質ナノ粒子は期待通りヒト肺オルガノイドにおいて SARS-CoV-2 デルタ、カッパ、ガンマ変異株の RNA ゲノムを高効率で分解し、高い効率でこれらの SARS-CoV-2 変異株の感染を抑制できることが明らかとなった。

本研究課題により T 細胞に対して簡便にゲノム編集ができる画期的なゲノム編集脂質ナノ粒子の開発に成功した。また本技術を活用することで SARS-CoV-2 に対する CRISPR/CasRx RNA 編集技術搭載脂質ナノ粒子を開発した。新型コロナウイルス感染症パンデミックの影響により、これらの技術の T 細胞に対する応用研究は一時中断することを余儀なくされた。しかし、これらの本研究から得られた研究成果はがん免疫細胞療法、COVID-19 の治療薬として活用できる画期的な基盤技術である。また本研究課題で構築された国際的な研究ネットワークは本研究課題に関連した研究課題だけではなく、研究代表者が携わっている様々な研究課題の発展に大きく貢献しており、今後の研究発展にもつながるものであると確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ouchi, Y., Sahu, S.K. & Izpisua Belmonte, J.C.	4. 巻 2
2. 論文標題 FOXO1 delays senescence and extends lifespan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 373-374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-022-00222-y	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 該当する
1. 著者名 Kato H, Maezawa Y, Takayama N, Ouchi Y, Kaneko H, Kinoshita D, Takada-Watanabe A, Oshima M, Koshizaka M, Ogata H, Kubota Y, Mitsukawa N, Eto K, Iwama A, Yokote K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Fibroblasts from different body parts exhibit distinct phenotypes in adult progeria Werner syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging (Albany NY).	6. 最初と最後の頁 4946-4961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.202696.	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 該当する
1. 著者名 Kato H, Maezawa Y, Ouchi Y, Takayama N, Sone M, Sone K, Takada-Watanabe A, Tsujimura K, Koshizaka M, Nagasawa S, Saitoh H, Ohtaka M, Nakanishi M, Tahara H, Shimamoto A, Iwama A, Eto K, Yokote K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of disease-specific and CRISPR/Cas9-mediated gene-corrected iPS cells from a patient with adult progeria Werner syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 102360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102360.	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 該当する
1. 著者名 Kanno T, Nakajima T, Yokoyama S, Asou HK, Sasamoto S, Kamii Y, Hayashizaki K, Ouchi Y, Onodera T, Takahashi Y, Ikeda K, Hasegawa Y, Kinjo Y, Ohara O, Nakayama T, Endo Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 SCD2-mediated monounsaturated fatty acid metabolism regulates cGAS-STING-dependent type I IFN responses in CD4+ T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02310-y.	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 Usui-Ouchi A, Eade K, Giles S, Ideguchi Y, Ouchi Y, Aguilar E, Guoqin W, Marra K, Berlow R, Friedlander M	4. 巻 -
2. 論文標題 Deletion of Tgf signal in activated microglia prolongs hypoxia-induced retinal neovascularization enhancing Igf1 expression and retinal leukostasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 GLIA	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24218	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 該当する

1. 著者名 Kitamoto K, Taketani Y, Fujii W, Inamochi A, Toyono T, Miyai T, Yamagami S, Kuroda M, Usui T, Ouchi Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Mouse model of TGFBI-R124C corneal dystrophies established using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58876-w	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 該当する

1. 著者名 Yamamoto Takeshi, Endo Yusuke, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Asou Hikari K., Nakajima Takahiro, Kanno Toshio, Ouchi Yasuo, Uematsu Satoshi, Nishimasu Hiroshi, Nureki Osamu, Tumes Damon J., Shimojo Naoki, Nakayama Toshinori	4. 巻 9
2. 論文標題 DUSP10 constrains innate IL-33-mediated cytokine production in ST2hi memory-type pathogenic Th2 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06468-8	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 Usui Yuki, Kimura Yasumasa, Satoh Takeshi, Takemura Naoki, Ouchi Yasuo, Ohmiya Hiroko, Kobayashi Kyosuke, Suzuki Hiromi, Koyama Satomi, Hagiwara Satoko, Tanaka Hirotoshi, Imoto Seiya, Eberl Gerard, Asami Yukio, Fujimoto Kosuke, Uematsu Satoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of long-term intake of a yogurt fermented with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 and <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131 on mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 319 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy035	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 老化の評価方法	発明者 大内靖夫、加藤尚也、横手幸太郎、江藤浩之、金子ひより	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-097552	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アンチセンスオリゴマー	発明者 大内靖夫、加藤尚也、横手幸太郎、江藤浩之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-81389	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	イズピシア・ベルモンテ ファン・カルロス (Izpisua Belmonte Juan Carlos)	ソーク研究所・Gene Expression Laboratory・Professor	

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			
シンガポール	Nanyang Technological University			
米国	Salk institute for biological studies			