

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16567

研究課題名（和文）PD-1遺伝子破壊EGFRvIII特異的CAR-T細胞による膠芽腫治療法の開発

研究課題名（英文）Development of PD-1 gene-disrupted EGFRvIII-specific CAR-T cell-based immunotherapy against glioblastoma

研究代表者

中澤 務（Nakazawa, Tsutomu）

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00772500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、CRISPR/Cas9を用いてPD-1を破壊したEGFRvIII特異的CAR-T細胞を樹立した。設計したsgRNA/Cas9発現ベクターは、PD-1の標的領域を正確に破壊し、EGFRvIII特異的CAR-T細胞におけるPD-1の発現を阻害した。PD-1を破壊したEGFRvIII特異的CAR-T細胞は、T細胞の表現型や他のチェックポイント受容体の発現を変化させることなく、EGFRvIIIを発現する膠芽腫細胞に対してin vitroで増殖抑制効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来的に、PD-1破壊EGFRvIII特異的CAR-T細胞のin vivoにおける抗がん効果解析や3次元培養系を用いた抗がん効果解析を実施し、膠芽腫に対する抗がん効果が認められれば、GBMに対するEGFRvIII特異的vCAR-T細胞を用いた膠芽腫に対するがん免疫治療の有効性を向上させることが可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The present study showed that PD-1-disrupted EGFRvIII-specific CAR-T cells were established using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9). The sgRNA/Cas9 expression vectors designed precisely disrupted the target region of PD-1 and inhibited the expression of PD-1 in EvCAR-T cells. The PD-1-disrupted EvCAR-T cells had an in vitro growth inhibitory effect on EGFRvIII-expressing glioblastoma cells without altering the T-cell phenotype and the expression of other checkpoint receptors.

研究分野：脳腫瘍学、免疫治療学、分子生物学

キーワード：CAR PD-1 CRISPR/Cas EGFRvIII

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(GBM)は未だ予後不良の悪性腫瘍であり、革新的な治療法の開発が切望されている。

がん免疫治療の研究が現在盛んに実施されている。キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor)発現T細胞(CAR-T)を用いた遺伝子免疫細胞治療とprogrammed death (PD)-1抗体等の免疫チェックポイント阻害剤を用いた免疫治療は、種々のがんに対して抗がん効果が確認されている(Hegde UP et al. Cancer Immunol Immunother. 2017)。

CAR-Tは、例えばCD19のようながん関連抗原に対する単鎖抗体(single-chain variable fragment: scFv)と細胞シグナル伝達分子CD28、4-1BB、CD3等を連結させた人工レセプターを発現するT細胞である。急性リンパ性白血病に対するCD19特異的CAR-Tの有用性が報告されており(Lee DW et al. Lancet 2015)、2018年に米国食品医薬品局(FDA)が画期的ながん治療薬として小児・若年成人の急性リンパ性白血病向けに承認した。

PD-1は、T細胞やNK細胞、NKT細胞等に発現し、そのリガンドであるPD-ligand 1(PD-L1)やPD-L2との相互作用によりPD-1発現細胞の活性化を抑制する(Okazaki T et al. Nat Immunol. 2013)。PD-L1は抗原提示細胞だけでなく、がん細胞あるいは感染細胞に発現しており、腫瘍組織においてはINF-等のサイトカインにより発現が誘導される(Rozali E et al. Clin Dev Immunol. 2012)。腫瘍組織内ではPD-1発現キラーT細胞やNK細胞が抗がん効果を抑制する原因細胞の1つとされている。PD-1のシグナル伝達を抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体で阻害することで抗がん効果が増強されることが示され、実臨床においても抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体により抗がん効果が増強されることが報告されている。

GBMに対してもCAR-T療法の研究が進められている。GBMの約40%に発現するepidermal growth factor receptor, transcript variant III (EGFRvIII)特異的CAR-T (EvCAR-T)の臨床研究では、経静脈投与でEvCAR-Tが脳血管関門を超えて脳腫瘍内へ移行し、抗がん効果を発揮することが報告された。ただ、EvCAR-T療法後に、GBM組織内でPD-L1の発現が上昇することも同時に報告された(O'Rourke DM et al. Sci Transl Med. 2017)。このことは、GBM細胞がPD-1のシグナル伝達を利用してEvCAR-Tに対する抵抗性を獲得したことを示唆する。さらなる戦略として抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体の併用が必要となるが、マクロファージが抗PD-1抗体を貪食することでその作用を抑制することが報告されており(Arlaukas SP et al. Sci Transl Med. 2017)、抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体ではEvCAR-T療法の効果が持続的に得られない可能性がある。

一方で、ゲノム編集技術によりPD-1遺伝子を破壊したEvCAR-T (PD-1破壊EvCAR-T)は、持続的なPD-1遺伝子の発現抑制が可能であり、GBMの新たな治療戦略となるものと考えられる。ゲノム編集技術は遺伝子の狙った場所を短時間に切断や修飾等を施せる技術である。中でもclustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9)は、Cas9を搭載したsingle-guide RNA (sgRNA)発現ベクターに標的遺伝子配列を組込み、目的細胞に導入することで標的配列を切断できる簡便なゲノム編集技術である。CRISPR/Cas9を用いてEvCAR-TのPD-1遺伝子を破壊できれば、PD1リガンド発現によるGBMのEvCAR-T抵抗性を持続的に克服できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PD-1破壊EvCAR-Tを誘導し、そのGBM細胞に対する抗がん効果を中心とした細胞特性解析を行い、臨床応用に向けた基盤的情報を集積することである。

ヒト末梢血T細胞のPD-1遺伝子をCRISPR/Cas9技術を用いて破壊し、レンチウイルスを用いてCD28、4-1BB、CD3を連結した第3世代のEvCARを導入することでPD-1破壊EvCAR-Tの誘導を試みる。誘導した細胞について、EvCAR、PD-1、その他の受容体発現ならびにGBM細胞に対する抗がん効果解析を行う。さらに遺伝子破壊効率と破壊領域の遺伝子配列解析ならびにoff-target効果の解析を実施する。

3. 研究の方法

PD-1遺伝子編集用Cas9搭載ベクターの構築: 自ら設計したCas9、copGFP、Neomycin耐性遺伝子等を搭載したsingle-guide RNA (sgRNA)発現ベクターの作製をGeneCopoeia社に依頼した(図1)。このベクターにCRISPR標的配列を組み込んだ。標的配列はCRISPR/Cas9標的配列予測ウェブツールCHOPCHOPを用いて設計した。

PD-1遺伝子破壊効率と遺伝子配列の確認: 設計した標的遺伝子配列を組み込んだCas9搭載sgRNA発現ベクターをHEK293T細胞にリポフェクション法で導入し、培養した。培養3日後の遺伝子導入細胞よりDNA抽出キットを用いてDNAを単離し、polymerase chain reaction(PCR)で標的配列周辺のDNAを増幅した。増幅後のPCR産物について、再び変性とアニーリングを行い、T7 Endonuclease Iによりミスマッチ配列を切断し、電気泳動を行うことでPD-1遺伝子の破壊効率を確認した。PCR産物はTAクローニングベクターに組み込み、DNAシーケンサーによるM13 primerを用いた遺伝子配列解析を行った。

PD-1 破壊 EvCAR-T の誘導とその特性解析：末梢血単核細胞に標的遺伝子配列を組み込んだ Cas9 搭載 sgRNA 発現ベクターを Nucleofector による電気穿孔法で導入した。末梢血単核細胞は健常者より採取した血液より比重遠心分離法を用いて分離した。遺伝子導入後に、抗 CD3/CD28 抗体を用いて T 細胞を刺激し、自己血漿、IL-2、Neomycin 含有 AIM-V 培地で 3~4 日間培養した。その後に EvCAR 搭載レンチウイルスを加え 21 日間まで拡大培養を行った。培養後に EvCAR、PD-1、その他の細胞表面受容体の発現、Real time cell analyzer (RTCA) を用いた GBM 細胞に対する増殖抑制試験を行った。誘導した細胞について PD-1 遺伝子の破壊効率と off target 効果解析も実施した。Off target 配列については IDT 社のウェブツールを用いて予測した。

4. 研究成果

PD-1 遺伝子編集用 Cas9 搭載ベクターの構築：PD-1 遺伝子に対応する 4 種類の sgRNA を設計し、それぞれ CRISPR/Cas9 発現ベクターを作製した(図 1 左)。

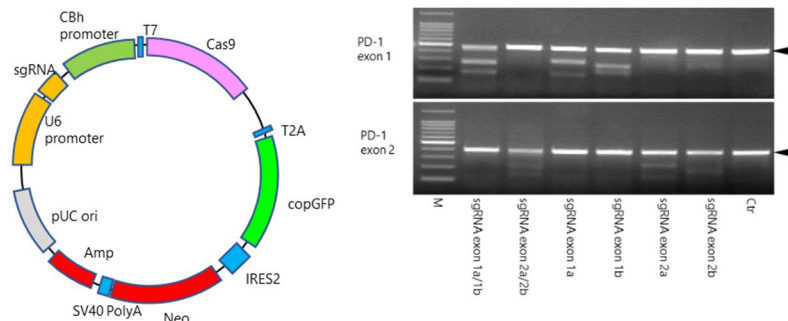


図 1. sgRNA/CRISPR 発現ベクター(左)による PD-1 遺伝子の破壊(右)

PD-1 遺伝子破壊効率と遺伝子配列の確認：HEK293T 細胞に各々 4 種類 (sgRNA exon 1a, 1b, 2a, 2b) および 2 種類ずつ (sgRNA PD1-exon 1a/1b, 2a/2b) を導入し、遺伝子破壊効率を確認した。遺伝子導入効率はおおむね 50% 程度であった。遺伝子導入細胞より DNA を抽出し、PCR 法で標的配列付近を増幅し、T7 Endonuclease I を用いて遺伝子破壊効率を確認した。その結果、すべての sgRNA について PD-1 遺伝子が破壊されていることが確認できた。さらに PD-1 の翻訳開始点に近い 2 種類の sgRNA を同時に導入する方法が最も破壊効率が高いことが確認できた(図 1 右)。

PD-1 破壊 EvCAR-T の誘導とその特性解析：設計した sgRNA/Cas9 発現ベクターは、PD-1 の標的領域を正確に破壊し、EGFRvIII 特異的 CAR-T 細胞における PD-1 の発現を阻害した(図 2 左)。PD-1 を破壊した EGFRvIII 特異的 CAR-T 細胞は、T 細胞の表現型 (CD4/8、CD45RA/CCR7 発現細胞頻度) や他のチェックポイント受容体 (TIM-3、LAG-3、TIGIT) の発現を変化させることなく、EGFRvIII を発現する GBM 細胞 (EGFRvIII 低発現および高発現 DK-MG 細胞) に対して in vitro で増殖抑制効果の増強を示した(図 2 右)。

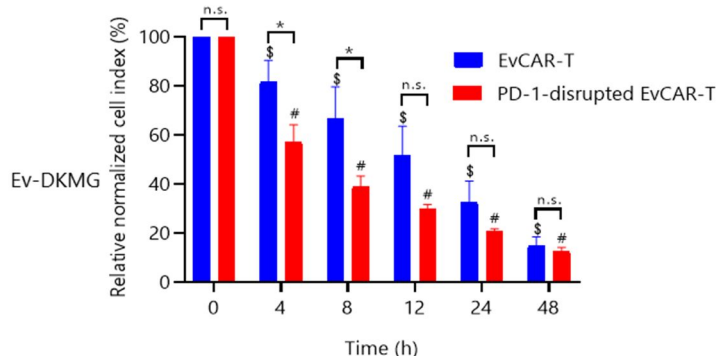
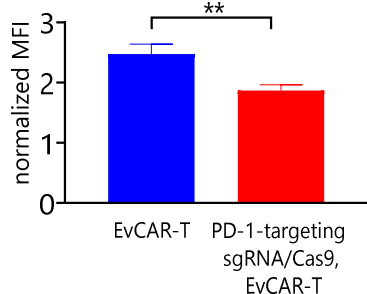


図 2. sgRNA/CRISPR 発現ベクターによる EvCAR-T の PD-1 発現抑制(左)と EGFRvIII 発現 GBM 細胞の増殖抑制効果(右)

た、EGFRvIII 非発現 U-251MG ではその効果は認められなかった。sgRNA の off-target 効果については、各 sgRNA について 5 種類の標的遺伝子配列を予測し、遺伝子破壊効果を評価した。その結果、予測配列に対しては明らかな off-target 効果は認められなかった(図 3)。

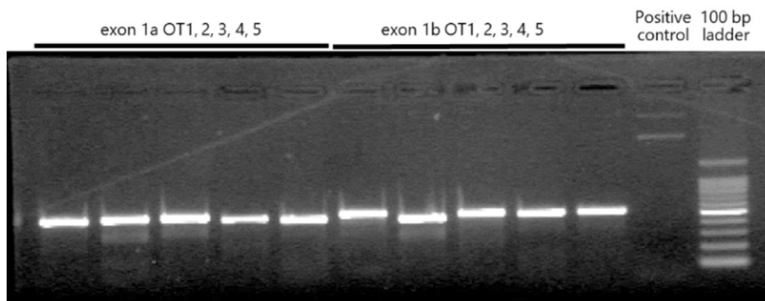


図 3. sgRNA/CRISPR 発現ベクターの off-target 効果解析

以上の結果より PD-1 遺伝子を破壊した EvCAR-T の樹立に成功した。将来的に動物体内や 3 次元培養系を用いた PD-1 破壊 EvCAR-T の抗がん効果解析を実施し、その効果が認められれば、GBM に対する EvCAR-T を用いたがん免疫治療の有効性を向上させることが可能となるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Y, Nakazawa T(corresponding author), Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Omoto K, Shida Y, Murakami T, Nakagawa I, Motoyama Y, Morita H, Tsujimura T, Nakase H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Ex vivo-expanded highly purified natural killer cells in combination with temozolomide induce antitumor effects in human glioblastoma cells in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0212455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0212455. eCollection 2019.	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 Omoto K, Matsuda R, Nakai Y, Tatsumi Y, Nakazawa T, Tanaka Y, Shida Y, Murakami T, Nishimura F, Nakagawa I, Motoyama Y, Nakamura M, Fujimoto K, Hiroyuki N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Expression of peptide transporter 1 has a positive correlation in protoporphyrin IX accumulation induced by 5-aminolevulinic acid with photodynamic detection of non-small cell lung cancer and metastatic brain tumor specimens originating from non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photodiagnosis Photodyn Ther	6. 最初と最後の頁 309-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2019.01.009.	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 Murakami T, Nakazawa T(equally contribution), Natsume A, Nishimura F, Nakamura M, Matsuda R, Omoto K, Tanaka Y, Shida Y, Park YS, Motoyama Y, Nakagawa I, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Takamura Y,	4. 巻 38
2. 論文標題 Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5049-5056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12824.	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 Motoyama Y, Nakajima T, Takamura Y, Nakazawa T, Wajima D, Takeshima Y, Matsuda R, Tamura K, Yamada S, Yokota H, Nakagawa I, Nishimura F, Park YS, Nakamura M, Nakase H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Risk of brain herniation after craniotomy with lumbar spinal drainage: a propensity score analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosurg	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2017.12.JNS172215.	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 Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, Morimoto T, Matsuda R, Nakamura M, Yamada S, Nakagawa I, Motoyama Y, Park YS, Wakabayashi T, Tsujimura T, Nakase H	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of CRISPR/Cas9-Mediated PD-1-Disrupted Primary Human Third-Generation CAR-T Cells Targeting EGFRvIII on In Vitro Human Glioblastoma Cell Growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/cells9040998	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Nakazawa T, Tanaka Y, Shida Y, Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Murakami T, Nakagawa I, Motoyama Y, Tsujimura T, Nakase H.
2. 発表標題 Establishment of an efficient ex-vivo expansion method for highly purified human natural killer cells and evaluation of their antitumor activity on glioblastoma.
3. 学会等名 Keystone Symposia: Innate and Non-Classical Immune Cells in Cancer Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakazawa T, Nishimura F, Matsuda R, Yamashita Y, Nakamura M, Nakagawa I, Motoyama Y, Tsujimura T, Nakase H.
2. 発表標題 Capability of dendritic cells loaded with induced-pluripotent stem cells to induce cancer-responsive T cells from a donor with HLA class I-A33 alleles in vitro.
3. 学会等名 European Association for Cancer Research: Defence is the Best Attack: Immuno-Oncology Breakthroughs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murakami T, Nakazawa T, Nishimura F, Natsume A, Wakabayashi T, Nakase H
2. 発表標題 Novel human NK cell line carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces antitumor effects in glioblastoma cells
3. 学会等名 European Association for Cancer Research: Defence is the Best Attack: Immuno-Oncology Breakthroughs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上敏春、中澤 務、夏目敦至、西村文彦、中村光利、松田良介、至田洋一、朴永銖、本山 靖、中川一郎、山田修一、田村健太郎、竹島靖浩、高村慶旭、若林俊彦、中瀬裕之
2. 発表標題 Novel human NK cell line carrying CAR targeting EGFRvIII induces antitumor effects in glioblastoma cells in vitro
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 至田洋一、中澤務、中村光利、辻村貴弘、森本堯之、田中祥貴、村上敏春、尾本幸治、松田良介、中川一郎、西村文彦、本山靖、朴永銖、中瀬裕之
2. 発表標題 膠芽腫に対する高純度NK細胞と免疫チェックポイント阻害薬併用による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田良介、中澤務、田中祥貴、至田洋一、中村光利、西村文彦、村上敏春、中川一郎、本山靖、辻村貴弘、中瀬裕之
2. 発表標題 Establishment of highly purified human natural killer cells and evaluation of their antitumor activity on glioblastoma
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 Morimoto T, Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, Matsuda R, Nakamura M, Yamada S, Nakagawa I, Motoyama Y, Park YS, Wakabayashi T, Tsujimura T, Nakase H
2. 発表標題 Characterization of a novel type NK cell line KHYG-1 carrying EGFRvIII-specific CAR in glioblastoma cells
3. 学会等名 American Association of Immunology (AAI) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, Matsuda R, Nakamura M, Yamada S, Nakagawa I, Motoyama Y, Park YS, Wakabayashi T, Tsujimura T, Nakase H
2. 発表標題 Effect of CRISPR/Cas9-mediated PD-1-disrupted primary human third-generation CAR-T cells targeting EGFRvIII on human glioblastoma cell growth
3. 学会等名 American Association of Immunology (AAI) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----