

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19510

研究課題名（和文）T細胞分化の特性を利用した新規抗原受容体単離技術の開発

研究課題名（英文）Development of a novel antigen receptor isolation technique using the characteristics of T cell differentiation

研究代表者

知念 孝敏（Chinen, Takatoshi）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：80432912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞培養技術の進歩や遺伝子改変技術の進歩により、細胞の機能を改変する事が可能となり、これを疾患治療に用いる新たな細胞療法の開発が盛んになっている。

キメラ抗原受容体（CAR）を搭載したT細胞（CART）は白血病やリンパ腫に対し有効である事が示されたが、寛解後の再発などいまだ大きな問題が存在し、細胞療法の更なる進化が求められている。

本研究では、キメラ抗原受容体（CAR）を発現させたマウス骨髄細胞がマウス生体内においてどのような分化を遂げるのかの解析を行い、胸腺においてCAR発現細胞が抗原によって選択され、成熟細胞として末梢へ分布するための条件の整理を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血系悪性腫瘍に対してはCART細胞療法が一定の成果を挙げているが、細胞療法の分野そのものがいまだ開発初期の段階にある。CART療法に関しては、治療後の再発、固形腫瘍に対する有効性の低さ、医療経済学的な議論など、様々な問題を抱えており、新たなブレイクスルーが求められている。このような現状において、新たな機能を有する可能性を秘める人工受容体発現細胞の生体内分化の道筋を探る事は、将来への備えとして大きな意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Advances in cell culture and genetic modification technologies have made it possible to modify cell functions, and the development of new cell therapies to treat disease is gaining momentum.

Chimeric antigen receptor (CAR)-conjugated T cells (CART) have been shown to be effective against leukemia and lymphoma, but there are still major problems, such as relapse after remission, and further advances in cell therapy are needed.

In this study, we analyzed the differentiation of chimeric antigen receptor (CAR)-expressing murine bone marrow cells in vivo to determine the conditions under which CAR-expressing cells are selected by antigen in the thymus and distributed to the periphery as mature cells.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

医療技術の発展にも関わらず、治療の困難な疾患がまだまだ多数存在する。低分子化合物製剤やタンパク質製剤の多くは患者個体内の細胞に作用し、酵素活性やタンパク質相互作用を阻害あるいは変更する事で効果を発揮するが、こうしたアプローチでは不十分な場合には別の方法が求められる。悪性腫瘍に対しては生体の持つ免疫力の増強が、慢性炎症性疾患では免疫応答の適度な抑制が、変性性疾患では組織の再生が求められる。これらを可能にする手法として期待されるのが「細胞」そのものの投与を治療の軸とする「細胞療法」である。

古くから、生体内における特定の細胞・組織の喪失や機能的喪失に対しては、他者から提供された細胞や組織を補充・置換するという一種の細胞療法(赤血球輸血、臓器移植、骨髄移植など)が行われ、その有効性が実証されてきたが、培養方法の工夫や遺伝子改変技術の進歩によって機能を強化もしくは変換した細胞・組織を構築する事が可能となり(CART細胞、iPS由来網膜シートなど)これまで治療不能であった疾患領域に新たな光がもたらされた。

CART細胞はB細胞受容体(抗体)の持つ抗原認識部位とT細胞受容体のシグナル伝達部位からなるキメラ抗原受容体(Chimeric antigen receptor; CAR)を発現させたT細胞で、急性リンパ性白血病やB細胞リンパ腫に対する優れた初回治療効果が示された。一方で、約半数の症例に治療後再発が見られる事、固形腫瘍に対する効果が限定的である事など依然大きな課題が残る。また、腫瘍特異的抗原の探索は容易ではなく、安全性の向上も必要である。このような状況において、より機能的に優れた新たな人工受容体を取得する一つの方法として、生体内において直接CART細胞を分化させる事はできないかと考えた。そのためにはCARを発現させた骨髄細胞がどのように分化し、どのような機能を獲得するかを調べる必要があると考え実験計画を策定した。

2. 研究の目的

本研究では、キメラ抗原受容体(CAR)を発現させた骨髄細胞が、通常のT細胞と同様に胸腺における分化を遂げるのかを調べ、そこで観察される事象から胸腺におけるCAR発現細胞の分化条件を探ること、分化したCAR発現細胞の特性を調べる事を主眼とし研究を行った。

3. 研究の方法

T細胞受容体を欠損するマウスであるTCR^{-/-}TCR^{-/-}二重欠損マウスの骨髄細胞に、レトロウイルスを用いてCAR発現コンストラクトを組み込んだ。この際、生理的なT細胞と同様のタイミングで胸腺内においてCARを発現させるために、CARのコード領域の前に翻訳停止型のSTOPカセットを置き、このSTOPカセットがRAG遺伝子産物の作用で除去されるように工夫を加えた。この手法の陽性コントロールとしてCARの代わりにOT-II TCRトランスジェニックマウス由来のTCR鎖を組み込んだコンストラクトも作成した。CARの認識する抗原として、胸腺内に存在する抗原であるCD45.2と胸腺内に殆ど存在しない抗原であるCD19を選び、これらの抗原と結合する一本鎖可変領域(scFv)をCARに組み込んだ。CARの基本骨格としてはCD28とCD3ζの細胞内領域を組み込んだオーソドックスなものを選択し、さらにいくつかの改変を加えた。このように遺伝子改変を加えた骨髄細胞を、別のTCR^{-/-}TCR^{-/-}二重欠損マウスに移入し、6週間後に胸腺、脾臓、末梢リンパ節におけるCAR発現細胞の出現の有無を調べた。

また、*in vivo*の実験を補強するために、培養細胞株を用いてCARのアフィニティを向上させる技術の開発も並行して行った。

4. 研究成果

*in vivo*の移入実験においては以下のような結果が得られた

1. RAG遺伝子産物の発現によりSTOPカセットが除去されCARが発現するコンストラクトのシステムについては、培養細胞でRAG(RAG1およびRAG2)の強制発現を行い、予定通り動作する事(RAG非存在下ではCARが発現せず、RAG存在下においてのみCARの発現が誘導される事)を確認した。

2. マウスを用いた移入実験に関しては、陽性コントロールとして用いたOT-IIマウス由来のTCR鎖を組み込んだTCR^{-/-}TCR^{-/-}二重欠損マウスの骨髄細胞は、内因性のTCR鎖と会合する事で機能的なTCRを発現し、胸腺において、CD4/CD8 double negative double positive CD4 or CD8 single positive と進み、末梢においてはエフェクターT細胞と制御性T細胞の両者の

出現が認められた。これは TCR 鎖を組み込んだ骨髄細胞が正常な分化を遂げる事を示しており、移入実験のシステムに問題が無い事が確認された。

3. CD19 を認識する CAR を組み込んだ骨髄細胞は、胸腺において CAR を発現した細胞が CD4/CD8 double positive の段階までは進むものの、末梢においては CAR 発現細胞は殆ど認められず、リンパ節も低形成のままだった。CD19 は胸腺に殆ど発現しておらず、正の選択がかからず CAR 陽性細胞が胸腺において死滅している可能性が考えられた。これを裏付けるように、胸腺において RAG 遺伝子産物の作用で CD19 を発現するように改変した骨髄細胞を同時に移入したマウスでは、CAR 陽性細胞の末梢への出現が確認された。一方、胸腺にも豊富に存在する抗原である CD45.2 を認識する CAR を組み込んだ骨髄細胞を移入したマウスでは、胸腺においては負の選択が盛んに起こっている事を反映してか、抗 CD19CAR 発現細胞では見られたような CD4/CD8 double positive の細胞が全く認められず、多くは double negative であり、一部 CD8 single positive が認められた。末梢においてもわずかながら CAR 発現細胞が認められたが、これらの細胞は CD4/CD8 double negative であった。胸腺においてわずかに認められた CD8 single positive が末梢において認められない事を考えると、抗 CD45.2CAR を発現する胸腺細胞は、double positive の段階で負の選択を受けつつ一部が一過性に CD8 を発現し、その後 double negative の状態に戻ったものが末梢へ分布しているものと考えられた。

4. CD19 を認識する CAR を組み込んだ骨髄細胞とともに、胸腺において CD19 の発現誘導がかかる骨髄細胞を同時移入したところ、末梢リンパ節に多数の CAR 陽性細胞の出現が認められた。これらの CAR 陽性細胞は CD4/CD8 double negative であったが、Thy1 陽性であり、PMA/イオノマイシン刺激により IFN を産生し、エフェクター T 細胞様の細胞に分化していると考えられた。制御性 T 細胞への分化は一切認められなかった。

また、in vitro で培養細胞株を用い、CAR のアフィニティを向上させる試みを行った

1. BW5147 T 細胞株の ROSA26 領域 1 アリルに CAR 発現コンストラクトのノックインを行った。ノックインした CAR の scFv 部位へ変異を導入し、アフィニティ向上の結果受容体シグナルが増強した細胞を選択する方法の確立を試みた。

2. scFv 部位への持続的な変異導入のために CRISPR-X と称される base editing の一手法を試みた。この手法の利点は gRNA (ガイド RNA) の外側に変異を導入できるという点であり、これを用いる事で定常部に gRNA を設定し可変部(抗原結合部位)に変異を導入する事が可能と考えたが、変異導入効率が非常に低く、別の方法を用いる必要があった。他の base editing の手法は効率において CRISPR-X を遙かに凌ぐものの、現状 gRNA 内部の塩基置換を起こすものであるため、この塩基置換を gRNA 外側で起こすための Cas9 デザインの変更を試みている。

3. アフィニティの向上した細胞を選択するためのシステムとして、NFAT シグナルの利用を試みた。NFAT シグナル下流で薬剤耐性遺伝子が発現するコンストラクトを組み込み、抗原に高いアフィニティで結合する細胞だけが選択されるシステムを構築した。この方法は開始時の細胞数が多数である場合には有効であったが、数万細胞の中から 1 細胞を選択するという条件ではうまく機能しなかった。NFAT シグナルが BW5147 細胞の増殖を抑制する事が分かり、これを回避する事ができなかったため、別のシグナルを用い改めて検討を行っている。

考察

本研究では、胸腺における CAR 発現細胞の分化条件とそうにして分化した CAR 発現細胞の性質を知る事を主たる目的とした。試みに CD28CD3z 型の CAR を用い、scFv として CD19, CD45.2 を認識するものを用いて検討を行った。今回の検討では 1. 胸腺において scFv の認識する抗原が存在しないと CAR 発現細胞の分化が起こらない 2. 胸腺に対応抗原が存在する場合には分化が見られ、CD4/CD8 陰性のエフェクター T 様細胞に分化するという傾向が見られたが、こうした法則が他の scFv にも当てはまるのか、CAR の基本骨格を変更した場合に異なる現象が見られないのかについて更に突き詰めた実験を行う必要がある。また、分化した CAR 発現細胞の性状評価、機能評価も十分行えておらず、実験の継続が必要である。

造血系悪性腫瘍に対しては CART 細胞療法が一定の成果を挙げているが、細胞療法の分野そのものがいまだ開発初期の段階にある。CART 療法に関しては、治療後の再発、固形腫瘍に対する有効性の低さ、医療経済学的な議論など、様々な問題を抱えており、新たなブレイクスルーが求められている。炎症制御への応用に関しては制御性 T 細胞の利用が一つの主軸となりうるが、良性疾患に対する細胞療法の展開そのものの障壁が高く、臨床応用には至っていない。このような現状において、新たな機能を有する可能性を秘める人工受容体発現細胞の生体内分化の道筋を探る事は、将来への備えとして十分な臨床的意義を有するものと考えられる。本研究は未だ基礎研究初期の段階であるが、今後も研究を継続し、ヒト疾患治療の展開にあたり有益となりうる知見を蓄積したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Minoda Yosuke, Ihara Eikichi, Fujimori Nao, Nagatomo Shuzaburo, Esaki Mitsuru, Hata Yoshitaka, Bai Xiaopeng, Tanaka Yoshimasa, Ogino Haruei, Chinen Takatoshi, Hu Qingjiang, Oki Eiji, Yamamoto Hidetaka, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficacy of ultrasound endoscopy with artificial intelligence for the differential diagnosis of non-gastric gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-20863-8	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 Hata Yoshitaka, Ihara Eikichi, Wada Masafumi, Tsuru Hirotsuka, Muta Kazumasa, Minoda Yosuke, Bai Xiaopeng, Esaki Mitsuru, Tanaka Yoshimasa, Chinen Takatoshi, Ogino Haruei, Sakamoto Ryuichi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Improved esophagography screening for esophageal motility disorders using wave appearance and supra-junctional ballooning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 838 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01913-4	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 Igarashi-Hisayoshi Yoko, Ihara Eikichi, Bai Xiaopeng, Higashi Chika, Ikeda Hiroko, Tanaka Yoshimasa, Hirano Mayumi, Ogino Haruei, Chinen Takatoshi, Taguchi Yasushi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Determination of Region-Specific Roles of the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor in Gastrointestinal Motility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 439 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-022-07637-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 Hamada Shohei, Ihara Eikichi, Muta Kazumasa, Wada Masafumi, Hata Yoshitaka, Ikeda Hiroko, Tanaka Yoshimasa, Ogino Haruei, Chinen Takatoshi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Onigiri esophagography as a screening test for esophageal motility disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurogastroenterology and Motility	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5056/jnm20138	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 -

1. 著者名 Ihara Eikichi, Ogino Haruei, Muta Kazumasa, Hamada Shohei, Wada Masafumi, Hata Yoshitaka, Ikeda Hiroko, Bai Xiaopeng, Minoda Yosuke, Esaki Mitsuru, Tanaka Yoshimasa, Chinen Takatoshi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 19
2. 論文標題 The treatment effects of acotiamide in esophagogastric outflow obstruction: a prospective longitudinal observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 332 ~ 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-021-00887-1	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 Otsuka Yoshihiro, Bai Xiaopeng, Tanaka Yoshimasa, Ihara Eikichi, Chinen Takatoshi, Ogino Haruei, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 910
2. 論文標題 Involvement of interstitial cells of Cajal in nicotinic acetylcholine receptor-induced relaxation of the porcine lower esophageal sphincter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174491 ~ 174491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.174491	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 Nishioka Kei, Ogino Haruei, Chinen Takatoshi, Ihara Eikichi, Tanaka Yoshimasa, Nakamura Kazuhiko, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Mucosal IL23A expression predicts the response to Ustekinumab in inflammatory bowel disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 976 ~ 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01819-7	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 Nishihara Yuichiro, Ogino Haruei, Tanaka Masaru, Ihara Eikichi, Fukaura Keita, Nishioka Kei, Chinen Takatoshi, Tanaka Yoshimasa, Nakayama Jiro, Kang Dongchon, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Mucosa-associated gut microbiota reflects clinical course of ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92870-0	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 Okuno Hiroaki, Ogino Haruei, Ihara Eikichi, Nishioka Kei, Tanaka Yoshimasa, Chinen Takatoshi, Kohjima Motoyuki, Oono Takamasa, Tanaka Masatake, Goya Takeshi, Fujimori Nao, Iboshi Yoichiro, Gotoda Takuji, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Discriminant equation using mucosally expressed cytokines and transcription factor for making definite diagnosis of inflammatory bowel disease unclassified	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-01656-1	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
---------	---------