

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19900

研究課題名（和文）腫瘍浸潤能の付与による固形がんに対する新規細胞療法の開発

研究課題名（英文）Establishment of the gene engineering T cell therapy enhancing the migration activity to cancer

研究代表者

石田 高司（Ishida, Takashi）

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：80405183

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）：本研究では、*in vitro*において、TGF- $\beta$  受容体の細胞外ドメイン、もしくは抗TGF- $\beta$  一本鎖抗体と、遊走能に関わるタンパク質の細胞内ドメインを融合した人工キメラタンパク質を遺伝子導入して発現させることにより、T細胞にTGF- $\beta$  依存的な遊走能を細胞に付与できることを明らかにした。今後、*in vivo*での検討が必要ではあるものの、本研究成果により、任意の分子に対する遊走活性を細胞に付与できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでほとんど効果が得られていない固形癌に対する遺伝子改変T細胞療法の効果の改善に資する成果である。本研究により、エフェクターT細胞を腫瘍局所へ浸潤させるために、腫瘍特異的な可溶性分子に対する遊走能を細胞に人工的に付与できる可能性が示された。本研究で開発した、細胞を任意の分子に対して遊走させる技術は、CAR-T細胞療法だけでなく、Treg療法や、幹細胞療法などの再生医療にも応用できる可能性があり、学術的にも医学的にも基盤的技術となりうる技術である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that TGF- $\beta$ -dependent migration ability can be conferred to T cells by expressing an artificial chimeric protein that fuses the extracellular domain of the TGF- $\beta$  receptor or an anti-TGF- $\beta$  single-chain antibody with the intracellular domain of a protein involved in migration ability *in vitro*. Although *in vivo* studies will be necessary in the future, this study shows the possibility of conferring chemotactic activity to any cell of interest.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：CAR-T TGF-

1. 研究開始当初の背景

キメラ抗原受容体 (CAR)-T 細胞療法は、遺伝子改変 T 細胞療法として初めて実用化され、一部の血液がんに対して、極めて高い効果を示し、大きな予後の改善をもたらした。しかし、遺伝子改変 T 細胞療法は、現在においても固形癌に対してほとんど効果が得られていない。その原因として、エフェクター T 細胞の腫瘍局所への浸潤が不十分であることが挙げられている。

2. 研究の目的

T 細胞の腫瘍局所への浸潤を亢進させるために、腫瘍特異的な分子に対する遊走能を細胞に付与することができれば、固形癌に対する遺伝子改変 T 細胞療法の効果を大幅に上昇させることができると考えられる。そこで、本研究では、

- (1) 腫瘍特異的な可溶性分子に対する遊走能をもたらす新規人工受容体の開発
- (2) *in vivo* での遊走能評価のための新たな化学発光タンパク質システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) T 細胞に遊走能を付与する新規キメラ受容体発現レンチ・レトロウイルスベクターを作製し、遺伝子導入を行う。
- (2) トランズウェルアッセイにより、細胞遊走能を評価する。
- (3) フローサイトメトリー法により、導入した遺伝子の発現確認を行う。

4. 研究成果

(1) 腫瘍局所からは様々な種類のケモカインが放出されているが、個人差やがん種による差が大きい。一方で、TGF-β 等のサイトカインや、ダメージ関連分子パターン (DAMPs) といった、より腫瘍特異的な可溶性分子には細胞を遊走させる働きは無いことに加え、T 細胞の細胞傷害活性を抑制する機能を持っている。本研究を始めるに当たり、TGF-β 依存的な遊走能を細胞に付与する人工受容体を作製することを目的として、TGF-β 受容体の細胞外ドメインと、遊走能に関わるタンパク質の細胞内ドメイン 3 種類を用いて、人工キメラ受容体を作製した。これらのキメラ受容体をヒト T 細胞性白血球細胞株である Jurkat 細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、トランズウェルアッセイにより、TGF-β に対する遊走能を評価した。その結果、作製した人工キメラ受容体は、TGF-β に対する遊走能をもたらすことが示された。次に、これらのキメラ受容体の細胞外ドメインを抗 TGF-β 一本鎖抗体に置換したキメラ受容体を新たに作製し、同様にトランズウェルアッセイにより、TGF-β に対する遊走能を評価した。その結果、TGF-β 受容体の細胞外ドメインを用いた場合と同様の遊走活性が認められた (図 1)。この TGF-β 依存的な遊走活性は末梢血単核球 (PBMC) 由来ヒト T 細胞を用いた場合においても認められた。これらの結果から、一本鎖抗体等の任意の分子に対する結合ドメインと、遊走活性化ドメインを適切なリンカーを用いて融合させることにより、任意の分子に対する遊走活性を細胞に付与できる可能性が示された。細胞外の免疫抑制因子の捕捉は、免疫抑制機能の阻害による T 細胞療法の効果改善につながるということが報告されており、この人工キメラ受容体も、発現させることにより免疫抑制的な腫瘍微小環境に対する抵抗性を付与することができると考えられる。一方で、TGF-β 受容体以外の受容体の細胞外ドメインや、抗 TGF-β 一本鎖抗体以外の一本鎖抗体を用いた評価を行うことは、今後の極めて重要な検討課題である。

2) *in vivo* での T 細胞の遊走能を評価するために、*in vivo* dual-luciferase アッセイの改変を試みた。このシステムでは、任意のがん細胞株にホタルルシフェラーゼを遺伝子導入し、エフェクター T 細胞に CyOFP1 と NanoLuc の融合タンパク質である Antares を遺伝子導入することにより、

図 1 抗 TGF-β 一本鎖抗体と遊走ドメインのキメラ受容体発現細胞を用いたトランズウェルアッセイ

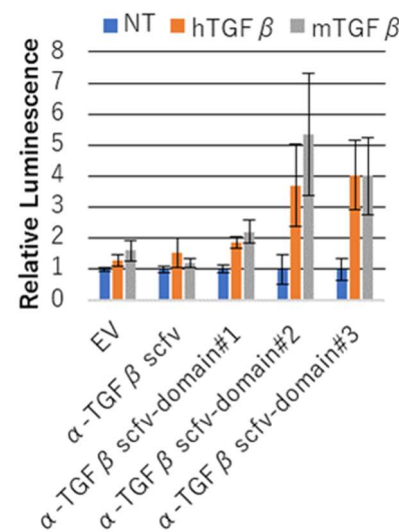
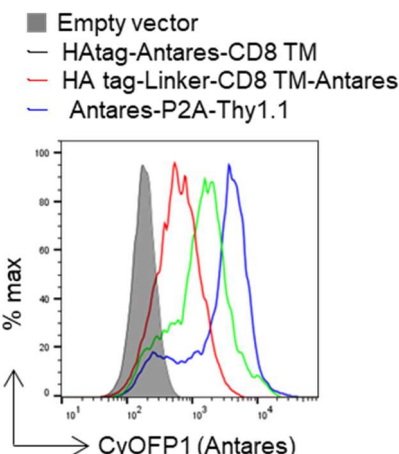


図 2 フローサイトメトリーを用いた Antares およびその派生タンパク質の発現確認



腫瘍の評価と T 細胞の全身動態の解析を同時に行うことが可能である。しかしながら、新規キメラ受容体と Antares を同時に遺伝子導入する必要があるため、ウイルスの二重感染効率が低いことが問題であった。そこで、発現させる遺伝子のサイズを小さくするために

1. HA tag-Antares-CD8 TM
2. HA tag-Linker-CD8 TM-Antares
3. Antares-P2A-Thy1.1

というコンストラクトの発現ベクターを作製し、検討を行った。その結果、1. 2. は 3. と比較して Antares の発現量および発光値が低下しており、細胞外の tag の発現量もビーズを用いた濃縮には十分ではなかった (図 2)。3. の Antares と細胞外マーカー (Thy1.1)、新規キメラ受容体を P2A ペプチドでつないだ遺伝子を導入した条件では高い導入効率を得られ、anti-Thy1.1 磁気ビーズを用いた細胞の濃縮も可能であった。赤色蛍光タンパク質の選択や細胞外マーカーの選択においてはまだ検討の余地が残っているので、今後の検討課題である。

(3) *in vivo* での T 細胞の腫瘍への遊走能を評価する上で、免疫不全マウスとヒトがん由来細胞株、およびヒト PBMC 由来 T 細胞を用いると、細胞の動態が正しく評価できないのではないかと懸念が生じた。そこで、マウス T 細胞を用いた実験を計画したが、レンチウイルスを用いた遺伝子導入法では効率が非常に低かった。そこで、レトロウイルスを用いた同様のベクターを作製し直し、3 種類のマウス T 細胞株 (CTLL-2, EL-4, 2B4) に遺伝子導入を行った後、トランスウェルアッセイを行った。しかしながら、どの細胞株においても遊走能は認められなかった (図 3)。これらの細胞株について、人工キメラ受容体の細胞表面の発現量を抗リンカー抗体を用いてフローサイトメーターで確認したところ、Jurkat 細胞と比べて発現が大きく低下していた (図 4)。これらの結果から、マウス T 細胞を用いた *in vivo* の実験を行うにあたって、レトロウイルス発現ベクターの改変の必要性が示唆された。また、人工キメラ受容体の細胞内ドメインがヒト由来であることも遊走能が付与できなかった原因の 1 つとして考えられるため、細胞膜貫通ドメイン、細胞内ドメインをマウス由来のものに変更して最適化し、遊走能を確認することは、今後の必須の課題である。

(4) 固形癌に対する CAR-T 細胞療法を確立する上で、がん特異的な標的分子の同定は避けては通れない重要な課題である。固形癌に対する有効な標的分子は未だ見つからないが、腫瘍内で既にがん細胞に結合している抗体が存在すれば、その抗体を利用した CAR-T 細胞はがん特異的になりうるのではないかと考えた。そこで、マウス由来がん細胞株を皮下移植したマウス腫瘍部から、がん細胞だけを取り出し、抗マウス IgG 抗体で染色してフローサイトメーターで解析を行った。その結果、腫瘍内の細胞表面には自己抗体が結合していることが確認された (図 5)。この抗体の標的分子を同定するため、非特異的ビオチン化酵素とプロテイン A-G との融合タンパク質を用いて、抗体の標的タンパク質をビオチン化ラベルして回収する手法を確立し、質量分析法による解析を行ったところ、RNA 結合タンパク質が複数同定された。近年、細胞表面に糖鎖修飾された RNA が存在していることが報告されているが、腫瘍細胞での機能は明らかではない。腫瘍内では死細胞から放出された RNA 結合タンパク質が腫瘍細胞表面に結合している可能性が考えられるが詳細は不明である。今後の解析によって、腫瘍結合抗体の標的分子や配列等を明らかにすることができれば、固形癌に対する CAR-T 細胞療法の実現に向けた大きな一歩となることが期待できる。

図 3 人工キメラ受容体を発現させたマウス細胞株を用いたトランスウェルアッセイ

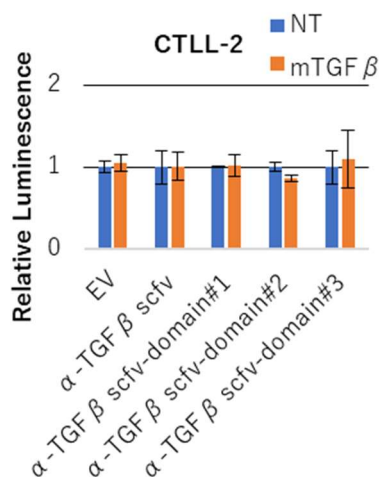


図 4 Jurkat と CTLL-2 の細胞表面での人工キメラ受容体発現量の比較

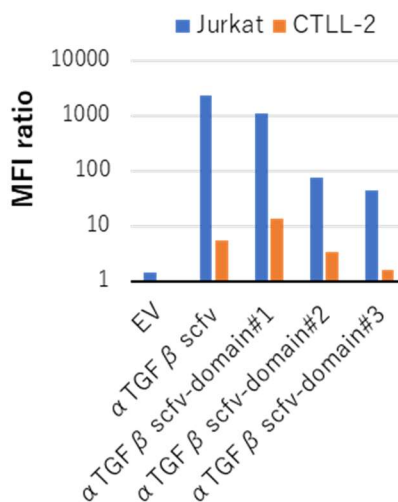
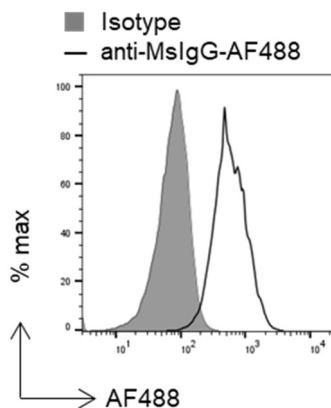


図 5 マウス腫瘍から単離したがん細胞表面に結合している IgG の検出



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 5件）

1. 著者名 Tanaka N, Mori S, Kiyotani K, Ota Y, Gotoh O, Kusumoto S, Nakano N, Suehiro Y, Ito A, Choi I, Ohtsuka E, Hidaka M, Nosaka K, Yoshimitsu M, Imaizumi Y, Iida S, Utsunomiya A, Noda T, Nishikawa H, Ueda R, Ishida T	4. 巻 107
2. 論文標題 Genomic determinants impacting the clinical outcome of mogamulizumab treatment for adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 2418 ~ 2431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2021.280352	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 Nosaka K, Kusumoto S, Nakano N, Choi I, Yoshimitsu M, Imaizumi Y, Hidaka M, Sasaki H, Makiyama J, Ohtsuka E, Jo T, Ogata M, Ito A, Yonekura K, Tatetsu H, Kato T, Kawakita T, Suehiro Y, Ishitsuka K, Iida S, Matsutani T, Utsunomiya A, Ueda R, Ishida T	4. 巻 196
2. 論文標題 Clinical significance of the immunoglobulin G heavy chain repertoire in peripheral blood mononuclear cells of adult T cell leukaemia/lymphoma patients receiving mogamulizumab	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 629 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17895	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 Sakamoto Yuma, Ishida Takashi, Masaki Ayako, Takeshita Morishige, Iwasaki Hiromi, Yonekura Kentaro, Tashiro Yukie, Ito Asahi, Kusumoto Shigeru, Iida Shinsuke, Utsunomiya Atae, Ueda Ryuzo, Inagaki Hiroshi	4. 巻 113
2. 論文標題 Clinicopathological significance of CD28 overexpression in adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 349 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15191	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 Ong Jolynn Zu Lin, Yokomori Rui, Wong Regina Wan Ju, Tan Tze King, Ueda Ryuzo, Ishida Takashi, Iida Shinsuke, Sanda Takaomi	4. 巻 36
2. 論文標題 Requirement for TP73 and genetic alterations originating from its intragenic super-enhancer in adult T-cell leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2293 ~ 2305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01655-5	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 Sakamoto Yuma, Ishida Takashi, Masaki Ayako, Murase Takayuki, Ohtsuka Eiichi, Takeshita Morishige, Muto Reiji, Iwasaki Hiromi, Ito Asahi, Kusumoto Shigeru, Nakano Nobuaki, Tokunaga Masahito, Yonekura Kentaro, Tashiro Yukie, Iida Shinsuke, Utsunomiya Atae, Ueda Ryuzo, Inagaki Hiroshi	4. 巻 40
2. 論文標題 CCR7 alterations associated with inferior outcome of adult T cell leukemia/lymphoma under mogamulizumab treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 876 ~ 884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.3072	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 Sakamoto Y, Ishida T, Masaki A, Murase T, Takeshita M, Muto R, Iwasaki H, Ito A, Kusumoto S, Nakano N, Tokunaga M, Yonekura K, Tashiro Y, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Inagaki H.	4. 巻 195
2. 論文標題 Clinical significance of TP53 mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 571-584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17749	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 Sakamoto Y, Ishida T, Masaki A, Takeshita M, Iwasaki H, Yonekura K, Tashiro Y, Ito A, Kusumoto S, Utsunomiya A, Iida S, Ueda R, Inagaki H.	4. 巻 192
2. 論文標題 Clinical significance of CD28 gene-related activating alterations in adult T-cell leukaemia/lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 281-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17211	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 Fujii K, Sakamoto Y, Masaki A, Murase T, Tashiro Y, Yonekura K, Utsunomiya A, Ito A, Kusumoto S, Iida S, Ueda R, Ishida T, Inagaki H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Immunohistochemistry for CCR4 C-terminus predicts CCR4 mutations and mogamulizumab efficacy in adult T-cell leukemia/lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pathol Clin Res.	6. 最初と最後の頁 52-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cjp2.180	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 -

〔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
研究 分 担 者	平松 寛明  (Hiramatsu Hiroaki)  (70827253)	名古屋大学・医学系研究科・研究員    (13901)	

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
---------	---------