

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20784

研究課題名（和文）全身性エリテマトーデス(SLE)に対するCAR-T療法の治療応用に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic Research for CAR-T Therapy for Systemic Lupus Erythematosus

研究代表者

有富 貴史 (Aritomi, Takafumi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：20907357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、SLE病態に関わる病的B細胞サブセットを選択的に制御するため、T-bet+CD11c+B細胞を標的としたCAR-T療法開発を目的とした。in silico解析により、SLE感受性遺伝子のうち細胞膜に発現、かつB細胞で特異的に発現する遺伝子を選別し、FcRL5はNaive B細胞やDN B細胞など我々が標的として考えているB細胞サブセットに発現することを明らかにした。さらにT-bet+CD11c+B細胞の分化制御機構や病態との関連性の検討を進め、同細胞の分化には細胞内代謝、特に解糖系の亢進が重要であり、機能としてIL-6などの炎症性サイトカイン産生が重要であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はSLEの病態形成において大変重要な役割を果たす病的B細胞サブセットであるT-bet+CD11c+B細胞の分化機構や機能を解析し、病態解明、治療応用を目指す点で学術的意義を有する。また、CAR-T療法の様々標的分子を対象とした治療応用や患者特性に沿った治療開発(precision medicine)の探究は、膠原病以外にも、アレルギー、癌など幅広い疾患にも応用可能であり、社会的意義が高いと考えている。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to investigate CAR-T therapies targeting T-bet+CD11c+ B cells to selectively regulate B cell subsets involved in SLE pathogenesis. In silico analysis revealed that FcRL5 is expressed on a subset of B cells that we consider as targets, such as Naive B cells and DN B cells.

We have also investigated the regulatory mechanism of differentiation of T-bet+CD11c+ B cells and found that intracellular metabolism, especially enhancement of the glycolytic system, is important for the differentiation of these cells, and that the production of inflammatory cytokines such as IL-6 is important for their function.

研究分野：免疫

キーワード：CD11c 全身性エリテマトーデス CAR-T B細胞 T-bet FcRL

1. 研究開始当初の背景

SLE の病態形成において B 細胞は重要な役割を担う。近年、血液疾患で新規治療として注目される CAR-T 療法を、自己免疫疾患の治療に応用する試みとして、SLE モデルマウス、患者において B 細胞を標的とした CAR-T 療法の有用性が報告された(文献 1、2)。キメラ抗原受容体(CAR)は抗体の抗原結合部位と、T 細胞活性化レセプター(TCR)の細胞内ドメインを遺伝子組み換え技術を用いて結合させたものである。この CAR 遺伝子を、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術により細胞に導入したものが CAR-T 細胞となる。CAR-T 細胞は標的抗原を認識し、直接 TCR 細胞内ドメインが刺激され、特異的かつ強力な免疫反応で標的となる細胞を除去する。SLE において重要な分子を標的とした CAR-T 細胞を作成できれば、*in vitro* 研究での分子機能の同定、SLE における新たな分子標的治療の可能性を検証可能となる。さらにはその他の自己免疫性疾患の新規治療開発、将来的には患者特性に沿った治療 (precision medicine)への応用が期待される。

2. 研究の目的

近年、single cell RNA-seq 等の網羅的解析手法の急速な進歩により、B 細胞の中でも T-bet+CD11c+B 細胞が SLE 病態、特に活動性腎炎と関連していることが報告されたが(文献 3,4)、T-bet+CD11c+ B 細胞の機能は検討されていない。今回 CD11c を標的とした CAR-T 細胞を作成し、健康人より誘導、或いは SLE 患者より得た B 細胞 (T-bet+CD11c+B 細胞を含む)と共培養することで、同細胞の機能を明らかにすることを目的とした。同実験系が確立できれば、将来的にその他の様々な分子を標的とした CAR-T 細胞を作成し、*in vitro* で重要な分子の機能解析が可能となり、SLE だけでなく、その他自己免疫性疾患全般に応用できる可能性がある。SLE の病態形成に大変重要な細胞サブセットとして注目される T-bet+CD11c+B 細胞の機能を解析し病態解明や治療応用への可能性を検証するとともに、CAR-T 療法の様々な標的分子を対象とした治療への応用、患者特性に沿った治療開発 (precision medicine)への応用が期待できる。

3. 研究の方法

in vitro で CD11c を標的とした標的とした CAR-T 細胞を作成し、健康人より誘導、或いは SLE 患者より得た B 細胞 (T-bet+CD11c+B 細胞を含む)と共培養し標的細胞の除去を行う。除去前後で B 細胞の多様な機能変化から T-bet+CD11c+B 細胞の機能を確認し、腎炎病態へ関与などを明らかにする。

(1) CD11c を標的とした CAR-T 細胞を作成

抗 CD11c 単鎖抗体遺伝子を人工合成し、CD11c 特異的 CAR を作成する。作成した CAR をレトロウイルスに組み込み、レトロウイルスベクター産生細胞を作成する。レトロウイルスベクターが機能的であるか Jurkat 細胞に遺伝子導入を行い、CAR の発現をフローサイトメトリーで確認する。遺伝子導入効率が良いレトロウイルスベクターストックを健康人末梢血から単離した CD3+T 細胞に遺伝子再構成を行い、CD11c 標的 CAR-T 細胞を作成する。

(2) CAR-T 細胞と共培養させる T-bet+CD11c+B 細胞を健康人末梢血 B 細胞より誘導、機能評価 健康人末梢血の CD19+B 細胞を用いて、どの B 細胞サブセットからいかなる刺激条件で T-bet+CD11c+B 細胞が最も誘導されるか、またその機能を下記の通り評価する。

健康人由来 B 細胞を IgD⁺CD27⁻ を指標として 3 つのサブセット(IgD⁺CD27⁻ naïve B 細胞, IgD⁺CD27⁺ IgM memory B 細胞,IgD⁺CD27⁺CS memory B 細胞)に sorter で分離する。

SLE と関連する刺激(B 細胞受容体, CD40L, IL-21, TLR 7L(Lox), TLR 9L(CpG-B), IFN- γ , IFN- α)を用いて 5 日間培養を行い、T-bet/CD11c および B 細胞分化マーカー(CD27, CD38, IRF4)の発現を Flow cytometry(FCM)にて評価し T-bet+CD11c+B 細胞を最も誘導する条件を同定する。

機能評価として、transcriptome の変化、上清の抗体(IgM, IgG, IgA)産生および各種サイトカインをそれぞれ RNA-seq, ELISA 法, プロテインアッセイ (Meso Scale)で測定する。

(3) CAR-T 細胞と共培養させる SLE 患者由来 B 細胞 (T-bet+CD11c+B 細胞を含む)を sorter で分離する。

(4) CD11c 標的 CAR-T 細胞の機能評価

1.で作成した CD11c 標的 CAR-T 細胞を 2.3 で得た B 細胞と共培養し、transcriptome、抗体(IgM, IgG, IgA)産生、各種サイトカインを RNA-seq, ELISA, protein assay (Meso Scale)で測定。

(5) 同実験系がうまく機能すれば、CD11c 以外の様々な表面抗原を標的とした CAR-T 細胞を作成し、B 細胞あるいはそれ以外の免疫細胞との共培養系を確立し機能解析を進めていく。

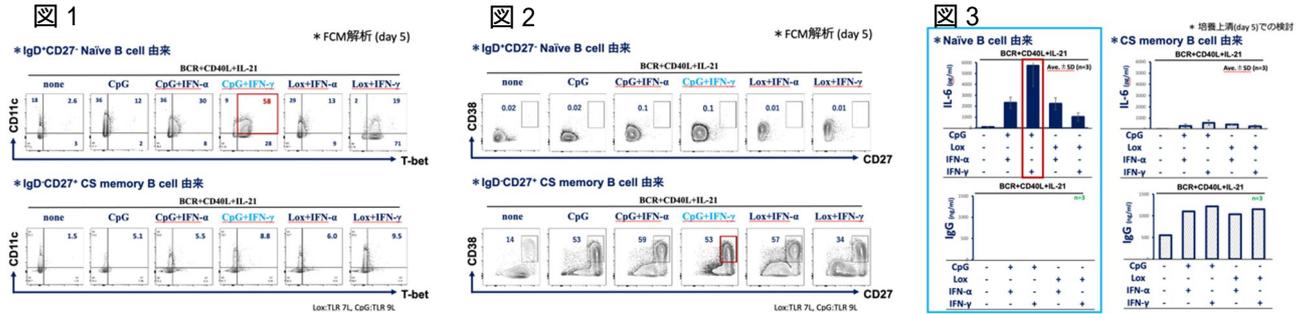
(6) 将来的にはループモデル或いは他の自己免疫疾患モデルマウスを用いて特定分子標的 CAR-T 細胞を移入し、*in vivo* での検証を進め、臨床開発への可能性を探る。

4. 研究成果

(1) T-bet+CD11c+細胞を標的とした CAR-T を作成するにあたり、in vitro で T-bet+CD11c+B 細胞の分化誘導系の確立を試みた。

健康人由来 B 細胞のサブセット毎に SLE に関連する様々な刺激条件下で培養を行い、T-bet+CD11c+ B 細胞が最も発現する最適な条件を見出した(図 1)。IgD+CD27- naïve B 細胞に対する BCR+sCD40 Ligand+IL-21+TLR9 Ligand+IFN- α で最も T-bet+CD11c+ B 細胞が誘導された(図 2)。

この条件下では Naïve B 細胞からは形質芽細胞への分化が全く見られず、培養上清において高度の IL-6 産生がみられることがわかった(図 3)。

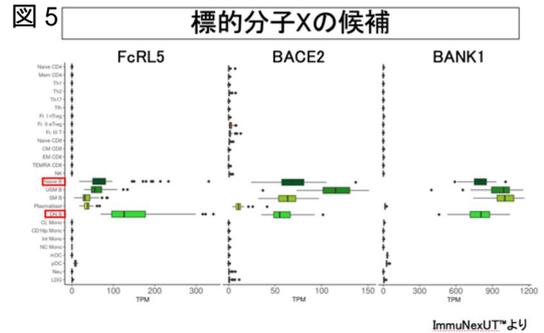
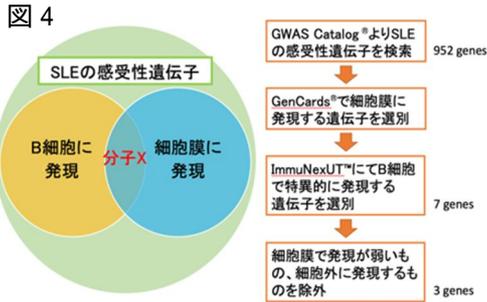


以上より、-bet+CD11c+ B 細胞の IL-6 産生が SLE 病態に関わっている可能性が示唆された。

(2) 2) CD11c は B 細胞以外にも樹状細胞等に発現されることが知られ、CD11c を CAR-T 療法の標的とした場合、B 細胞以外の細胞が障害される可能性があると考えられたことから CD11c 以外の分子で CAR-療法の標的因子を *in silico* 解析を行い、抽出することとした。

SLE 感受性遺伝子のうち、B 細胞で特異的に発現する遺伝子、かつ細胞膜に発現する遺伝子を選別した(図 4)。

FcRL5, BACE2, BANK1 が抽出され、特に FcRL5 に関しては、CD11c と同様に Naïve B 細胞や DN B 細胞で強く発現されることがわかった(図 5)。



今後は、FcRL5 が SLE 患者 T-bet+CD11c+B 細胞において実際に発現しているのか、他の免疫担当細胞に発現はみられないか(B 細胞特異的か)、B 細胞機能発揮における重要性、SLE 病態との関連性などについて、順次検討を進めていく。その上で、標的として有用であることが確認されれば、CAR-T 細胞の作成に向けて、さらに検討を進める方針である。

<参考文献>

Kansal R, Richardson N, Neeli I, et al. Sustained B cell depletion by CD19-targeted CAR T cells is a highly effective treatment for murine lupus. *Sci Transl Med.* 2019;11. doi:10.1126/scitranslmed. aav1648

Mackensen A, Müller F, Georg Schett, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2022. doi:10.1038/s41591-022-02091-9

Arazi A, Rao DA, Berthier CC, et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis. *Nat Immunol.* 2019;20: 902-914.

Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 2018;49: 725-739.e6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------