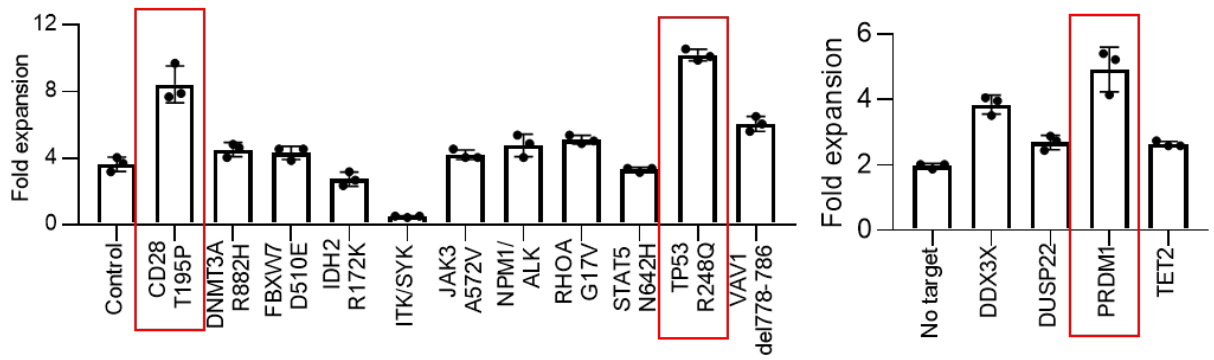
169　遺伝子改変による長期生存能を持つ抗腫瘍T細胞の開発	籠谷　勇紀

【目的】腫瘍抗原を特異的に認識する T 細胞を体外で準備し、患者に輸注することで腫瘍細胞を攻撃させる養子免疫療法は、CD19 に対するキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor：CAR）導入 T 細胞（CAR-T 細胞）療法が B 細胞性腫瘍に著効したことから注目されているが、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法では十分な臨床効果が得られていないのが現状である。これまでの臨床試験データの解析から、輸注した抗腫瘍 T 細胞が体内で長期間生存することが持続的な治療効果と深く関わることがわかっている。本研究では、T 細胞性リンパ腫関連遺伝子に着目して、これらの変異遺伝子を抗腫瘍 T 細胞に導入することにより、優れた長期生存能、抗腫瘍効果を誘導することを目的とした。

【方法】T 細胞性リンパ腫で見られる遺伝子変異はレトロウイルスプラスミドに組み込み、ヒト T 細胞に導入した。またリンパ腫で欠失・機能喪失などが見られる遺伝子は、CRISPR/Cas9 によるノックアウトを電気穿孔法により行った。ヒト T 細胞のソースは、健常人由来の末梢血単核球を用いた。CD19 に対する *CAR* 遺伝子として、クローン FMC63 由来の単鎖可変領域フラグメントに CD28、CD3z の細胞内ドメインを連結した第二世代 CAR を使用した。*In vivo* における T 細胞の生存能評価は、NSG マウスにヒト T 細胞を輸注することにより行った。遺伝子発現プロファイルは RNA シークエンスにより解析した。

【結果】T 細胞性リンパ腫で見られる変異遺伝子・欠失遺伝子をヒト末梢血 T 細胞に個別に導入して、*in vitro* における長期培養下における生存能への影響を評価したところ、変異遺伝子では CD28 T195P、TP53 R248Q、欠失遺伝子については PRDM1 が T 細胞の長期生存能を高める有望な標的遺伝子として同定された。特に *PRDM1* をノックアウトした T 細胞では、長期生存能の指標となるメモリー形質が有意に維持されていた。*PRDM1* ノックアウト T 細胞の性質についてさらに解析を進めた。同遺伝子をノックアウトした CAR-T 細胞を NSG マウスに輸注したところ、コントロール T 細胞と比較して *in vivo* において生存能が優れていることを確認できた。また *PRDM1* ノックアウト T 細胞は移植マウスに xenogeneic GVHD による体重減少を引き起こし、*in vitro* の解析で未分化なメモリー分画を維持していたことと合致する結果であった。次に、*PRDM1* のノックアウトにより起こる遺伝子発現プロファイル変化を、RNA シークエンスにより網羅的に解析した。未分化な T 細胞で発現が亢進している既知の遺伝子群（例えば表面抗原 *CCR7*、*IL7R*、転写因子 *TCF7*、*LEF1*、*BACH2* など）を用いて gene set enrichment analysis（GSEA）を行ったところ、表面抗原解析結果と合致して、*PRDM1* ノックアウト T 細胞で有意な発現上昇が見られた。これらのことから *PRDM1* ノックアウトはゲノムワイドに T 細胞の遺伝子発現変化を起こすことで、T 細胞の機能変容を誘導できることがわかり、抗腫瘍 T 細胞における修飾標的として有望であると考えられた。

寄生虫による腸内細菌依存的な 1 型糖尿病抑制メカニズム



169. 遺伝子改変による長期生存能を持つ抗腫瘍 T 細胞の開発

籠谷　勇紀

*東京大学 医学部附属病院 血液・腫瘍内科

Key words：養子免疫療法，キメラ抗原受容体，メモリーT 細胞，T 細胞性リンパ腫，遺伝子変異

緒　言

悪性腫瘍に対する養子免疫療法は、腫瘍抗原を特異的に認識する T 細胞を体外で準備し、患者に輸注することで腫瘍細胞を攻撃させる治療法で、CD19 に対するキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor：CAR）導入 T 細胞（CAR-T 細胞）療法が再発・難治性の B 細胞性腫瘍に著効したことから注目を集め、他のがんにおいても臨床試験が進められている。しかし主に固形腫瘍に対するその他の抗原を標的とした CAR-T 細胞療法ではいずれも満足すべき結果が得られておらず、さらなる改良を必要とする。これまでの臨床試験データの解析から、輸注した抗腫瘍 T 細胞が体内で長期間生存することが持続的な治療効果と密接に関わることがわかっているが、これには抗腫瘍メモリーT 細胞の分化状態が大きく影響する。幹細胞様メモリー、セントラルメモリーT 細胞に分類される未分化メモリーT 細胞は長期生存能に優れ、持続的な治療効果を誘導できる［1］。慢性リンパ性白血病に対する CAR-T 細胞を用いた臨床試験において、良好な治療効果が得られた症例を解析すると、レンチウイルスによりゲノムに組み込んだ *CAR* 遺伝子が *TET2* 遺伝子領域に挿入され、同遺伝子の機能が欠失しているクローンが持続的に生存していることが最近報告された［2］。*TET2* 変異はその機能喪失型変異が末梢性 T 細胞リンパ腫の 30～40%程度に見られ、T 細胞の自己複製能・長期生存と深く関わることが推察される。このことから T 細胞性リンパ腫で見られる遺伝子変異は *TET2* 以外にも末梢血 T 細胞の長期生存能に寄与する可能性がある。そこで本研究では、抗腫瘍 T 細胞において T 細胞性リンパ腫関連遺伝子を改変（過剰発現またはノックアウト）することにより、優れた長期生存能、抗腫瘍効果を誘導できるという仮説を立て、以下の研究遂行を計画した。

1. 抗腫瘍 T 細胞の長期生存能に中心的に関わる遺伝子を T 細胞性リンパ腫で報告されている遺伝子変異を網羅的に探索・同定する。
2. 同定した遺伝子を改変した抗腫瘍 T 細胞が *in vivo* において優れた長期生存能、持続的抗腫瘍効果を誘導できることを示す。

本研究によりメモリーT 細胞の長期生存に関する分子メカニズムを明らかにするとともに、あらゆる養子免疫療法においてその抗腫瘍効果を高めるために応用可能な知見を得ることを目標とした。

方　法

1.　T 細胞性リンパ腫関連遺伝子の導入・ノックアウト

変異遺伝子は、P2A 配列により truncated *NGFR* 遺伝子（遺伝子導入細胞の識別のための表面マーカとして使用）と連結し、レトロウイルスプラスミド pMX に挿入した。これらのプラスミドはパッケージング細胞 PG13 に安定導入した後、同細胞のウイルス上清液をレトロネクチン（タカラバイオ）を用いてプレートにはりつけ、ヒト T 細胞に導入した。また CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトは、Cas9 タンパク質（ThermoFisher）：30 μg と *in vitro* 合成ガイド RNA：5 μg を混合して 37℃で 5 分間静置することでリボヌクレオタンパク（RNP）複合体を合成し、NEPA21（ネッパジーン）を用いた電気穿孔法により T 細胞に導入した。ノックアウト効率は 48 時間後にゲノムを抽出し、標的領域を PCR により増幅し、サンガーシークエンスの波形をコントロールと比較解析する手法（Inference of CRISPR Edits:ICE, https:// www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis）により計算した。

*現在の所属：愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫応答研究分野

2. T 細胞性リンパ腫関連遺伝子の導入・ノックアウト

ヒト T 細胞は、健常人由来の末梢血単核球より刺激増殖させて用いた。T 細胞の刺激は、抗 CD3 抗体（クローン OKT3）の単鎖可変領域フラグメントを CD8α分子の膜貫通・細胞内ドメインと連結して HLA 陰性の白血病細胞株 K562 の細胞表面に発現させ、同時に共刺激分子 CD80 を導入することにより作製した K562-OKT3/80 と共培養することにより行った。細胞培養は RPMI1640、10% fetal bovine serum にサイトカイン IL-2 を 100 IU/ml で添加して行った。CD19 に対する *CAR* 遺伝子は、クローン FMC63 由来の単鎖可変領域フラグメントに CD28、CD3z の細胞内ドメインを連結した第二世代 CAR を用いた。T 細胞の表面抗原及びサイトカイン産生の解析はフローサイトメトリー（LSRFortessa：BD）により行った。*In vivo* における T 細胞の生存能評価は、放射線照射（1.5 Gy）を行った NSG マウス（Jackson Lab）にヒト T 細胞を輸注することにより行った。遺伝子発現プロファイルは RNA シークエンスにより解析した（タカラバイオ）。HISAT2 によりヒトゲノムにマッピングを行った後、HTSeq により各遺伝子ごとのリードカウントを計算した。2 群間の遺伝子の発現変化は、EdgeR により抽出した。Gene Set Enrichment Analysis は、DESeq2 によりリードカウントを正規化したデータについて行った。

結果および考察

1. T 細胞性リンパ腫関連遺伝子変異の末梢血 T 細胞における導入

T 細胞性リンパ腫で報告されている代表的遺伝子既報に基づき抽出した（表 1）[3]。表中、赤字で示す遺伝子は変異遺伝子の過剰発現により導入、黒字の遺伝子は CRISPR/Cas9 によるノックアウトを行った。

表 1. T 細胞性リンパ腫で報告されている主な遺伝子変異

PTCL-NOS

Genes	Freq (%)	Function
TET2	46-49	LoF
DNMT3A	27-36	DN
RHOA	8-18	Complex
VAV1	11	Active
ITK-SYK	17	Fusion

ALK-positive ALCL

Genes	Freq (%)	Function
ALK fusion (NPM1,TPM3)	100	Fusion

ALK-negative ALCL

Genes	Freq (%)	Function
JAK1	15	Active
STAT3	10	Active
TET2	33	LoF
DNMT3A	16	DN
DUSP22	30	Down
PRDM1	56	Deletion
TP53	42	Deletion
ERBB4	24	Truncated
NFKB2(NCOR2)-TYK2(ROS1)	22	Fusion

AITL

Genes	Freq (%)	Function
TET2	76-83	LoF
DNMT3A	26-38	LoF
RHOA	50-71	LoF
IDH2	20-45	Complex
CD28	11	Active

Extranodal NK/T cell lymphoma

Genes	Freq (%)	Function
TP53	18-24	LoF
JAK3	35	Active
DDX3X	20	LoF
STAT3	6	Active
STAT5B	6	Active
PRDM1	20-44	Deletion

過剰発現系については T 細胞に各遺伝子を個別に導入後に NGFR 陽性細胞を単離した。抗 CD3 抗体により再刺激の細胞増殖を観察したところ、14 日後前後をピークにいずれも徐々に T 細胞が減少し、リンパ腫遺伝子導入による不死化は見られなかった。Day 21 の細胞数では CD28 T195P、TP53 R248Q 遺伝子を導入された T 細胞の生存細胞数がコントロールと比較して有意に多かった（図 1B）。また T 細胞の分化状態には有意な差はなかった（図 2）。

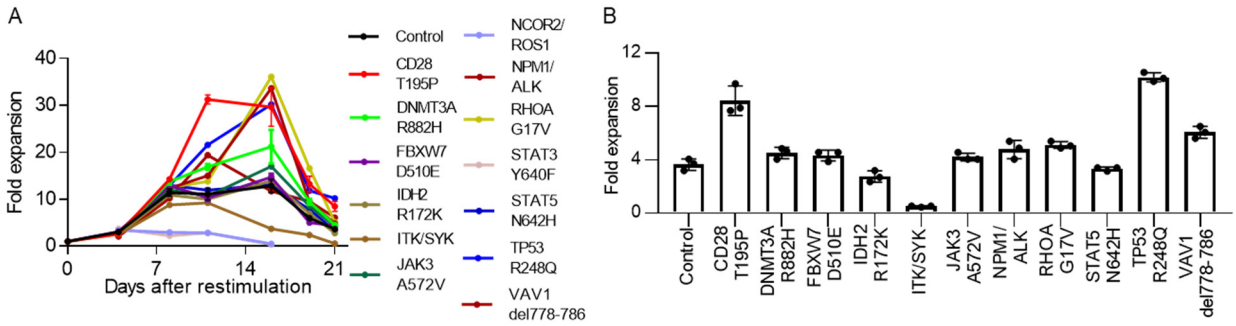


図 1. 各リンパ腫遺伝子を個別に導入後の T 細胞の増殖を解析

a） 再刺激後の細胞増殖の時系列表示。

b） 再刺激後 day21 における細胞増殖。

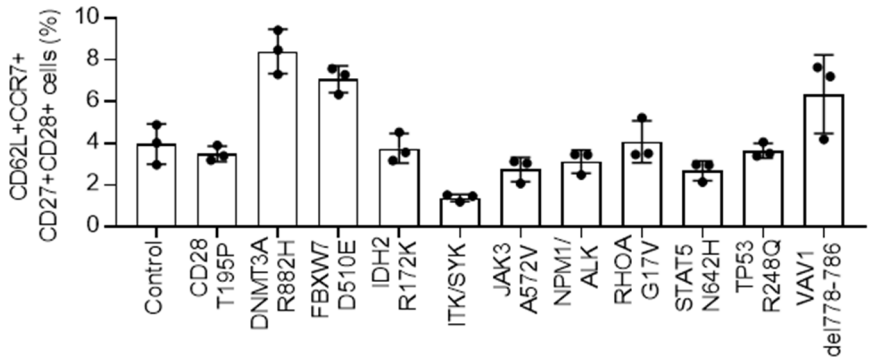


図 2. 各リンパ腫遺伝子を個別に導入後の T 細胞のメモリー形質を day 18 に解析（n＝3）

一方、T 細胞性リンパ腫で欠失や機能喪失型変異が見られる遺伝子（*DDX3X*、*DUSP22*、*PRDM1*、*TET2* ）については、CRISPR/Cas9 によるノックアウトを行い、同様に細胞増殖・メモリー形質を観察した。図 3 に示すように、*PRDM1* 遺伝子のノックアウトにより、長期培養後の細胞生存が維持された（A、B）。またメモリー形質も、*PRDM1* のノックアウトにより、顕著に維持されており、特に CCR7 も発現が高く保たれていた（C、D）。

以上の解析から、過剰発現系については CD28 T195P、TP53 R248Q 変異遺伝子、ノックアウト系については *PRDM1* 遺伝子が T 細胞の長期生存能を高める有望な標的遺伝子として同定できた。

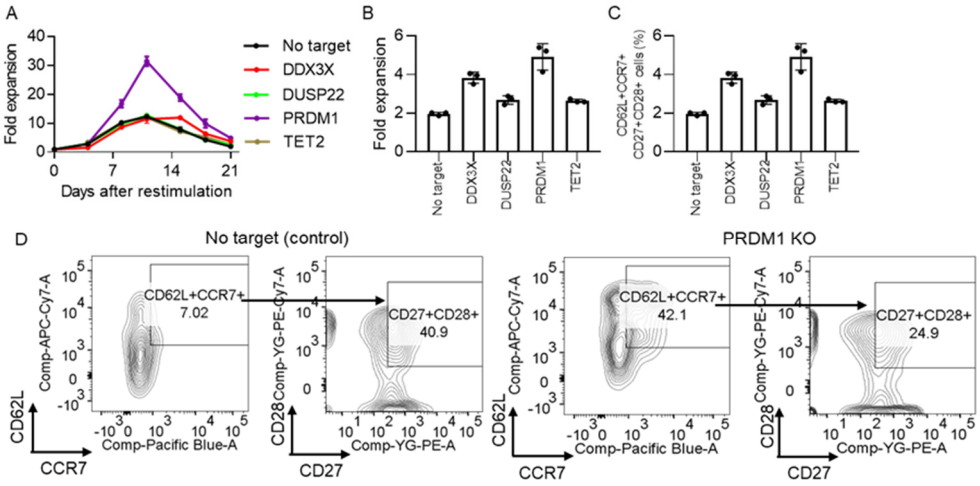


図 3. T 細胞リンパ腫で変異・欠失の見られる遺伝子のノックアウトによる生存能への影響解析

A) T 細胞数を時系列で解析。

B) Day 21 時点での T 細胞数。

C, D) Day 14 で、メモリー形質を解析。D に PRDM1 ノックアウトによる representative plots を示す。

2. *PRDM1* 遺伝子ノックアウトによる *in vivo* における T 細胞生存能への影響を解析

上記の結果を踏まえ、メモリー形質・長期生存能の維持の両指標において最も有望な *PRDM1* ノックアウト T 細胞の性質について、先行して解析を進めた。末梢血 T 細胞において同遺伝子をノックアウト後、免疫不全マウス（NSG マウス）に輸注した。*In vitro* における高い生存能と合致して、*PRDM1* ノックアウト T 細胞は末梢血中、コントロールと比べて高い割合で検出され、*in vivo* においても同様に生存能において優れていることがわかった（図 4A）。また多くのマウスは徐々に体重減少を来し、xenogeneic GVHD を発症した（図 4B、C）。本モデルにおいて、GVHD は T 細胞の未分化性維持に比例して発症が高頻度で起こることが知られている［4］。これらのデータから、*PRDM1* のノックアウトにより T 細胞が *in vivo* においても長期生存能・増殖能を獲得することがわかった。

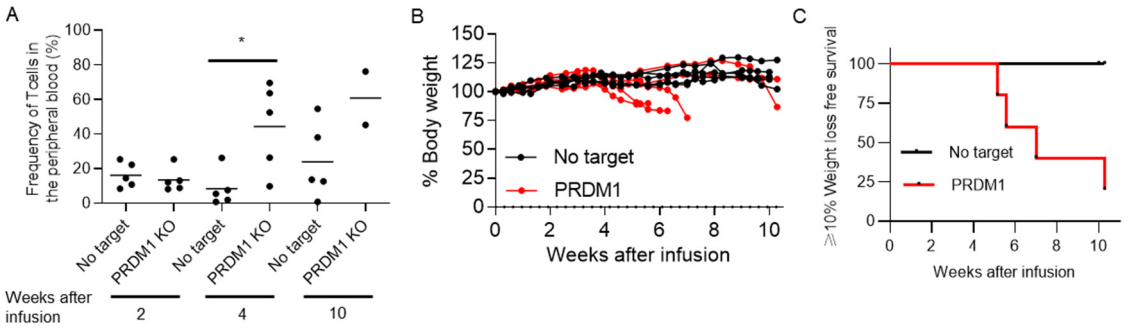


図 4. *PRDM1* ノックアウト CAR-T 細胞の *in vivo* における生存能を解析

A) NSG マウスにコントロール、*PRDM1* ノックアウト CAR-T 細胞を輸注し、末梢血中のヒト T 細胞割合をフローサイトメトリーで解析。

B、C) 移植したマウスの体重をモニターした。

3. *PRDM1* 遺伝子ノックアウトによる遺伝子発現プロファイル変化の網羅的解析

次に、*PRDM1* のノックアウトにより起こる遺伝子発現プロファイル変化を、RNA シークエンスにより網羅的に解析した。各 3 検体について比較解析し、未分化な T 細胞で発現が亢進している遺伝子セットを公開データ（GSE123235）より抽出し、gene set enrichment analysis（GSEA）を行ったところ、*PRDM1* ノックアウトにより未分化性の維持に関わる遺伝子群の有意な発現上昇が見られた(図 5)。個別遺伝子レベルでは、例えば表面抗原 *CCR7*、*IL7R*、転写因子 *TCF7*、*LEF1*、*BACH2* など、メモリー形成に重要な因子の高発現が見られた［5］。このことから *PRDM1* ノックアウトはゲノムワイドに T 細胞の遺伝子発現変化を引き起こすことで、機能変容につながることを確認できた。抗腫瘍 T 細胞の治療効果を高めるために有望な標的候補と考えられ、さらに複数の腫瘍モデルを使って現在検証を進めている。また *TP53* 遺伝子変異についても同様の解析を行う予定である。

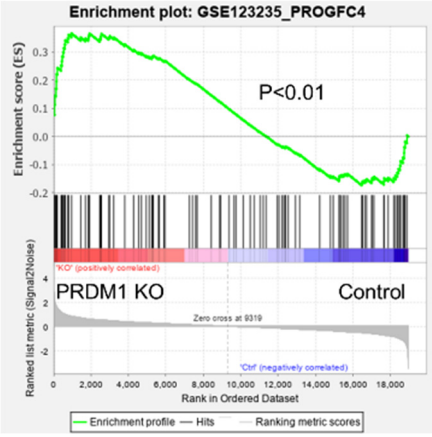


図 5. *PRDM1* ノックアウト CAR-T 細胞の遺伝子発現解析
各 3 ドナーについて RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行った。リードカウントを標準化した後、未分化 T 細胞において発現の高い遺伝子群をセットとして GSEA を行った。

共同研究者・謝辞

本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団の研究奨励金の支援を得て遂行した。

文　献

1） Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat Med. 2011 Sep 18;17(10):1290-1297. PMID: 21926977 DOI: 10.1038/nm.2446.

2） Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, Lundh S, Carty SA, Reich TJ, Cogdill AP, Morrissette JJD, DeNizio JE, Reddy S, Hwang Y, Gohil M, Kulikovskaya I, Nazimuddin F, Gupta M, Chen F, Everett JK, Alexander KA, Lin-Shiao E, Gee MH, Liu X, Young RM, Ambrose D, Wang Y, Xu J, Jordan MS, Marcucci KT, Levine BL, Garcia KC, Zhao Y, Kalos M, Porter DL, Kohli RM, Lacey SF, Berger SL, Bushman FD, June CH. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. Nature. 2018 Jun;558(7709):307-312. PMID: 29849141 DOI: 10.1038/s41586-018-0178-z.

3) Sandell RF, Boddicker RL, Feldman AL. Genetic landscape and classification of peripheral T cell lymphomas. Curr Oncol Rep. 2017 Apr;19(4):28. PMID: 28303495 doi: 10.1007/s11912-017-0582-9.

4) Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provasi E, Bondanza A, Bordignon C, Peccatori J, Ciceri F, Lupo-Stanghellini MT, Mavilio F, Mondino A, Bicciato S, Recchia A, Bonini C. Blood. 2012 Nov 15;121(4):573-584. PMID: 23160470 DOI: 10.1182/blood-2012-05-431718.

5) Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, Yates KB, Lako A, Felt K, Naik GS, Manos M, Gjini E, Kuchroo JR, Ishizuka JJ, Collier JL, Griffin GK, Maleri S, Comstock DE, Weiss SA, Brown FD, Panda A, Zimmer MD, Manguso RT, Hodi FS, Rodig SJ, Sharpe AH, Haining WN. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. Nat Immunol. 2019 Mar;20(3):326-336. PMID: 30778252 DOI: 10.1038/s41590-019-0312-6.