

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15311

研究課題名（和文）遺伝子改変T細胞療法の重大合併症を予防するための革新的技術の開発

研究課題名（英文）Development of an innovative technology to prevent serious complications of genetically modified T cell therapy

研究代表者

盛田 大介（Morita, Daisuke）

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教（特定雇用）

研究者番号：20796726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：キメラ抗原受容体(CAR)-T細胞療法は目覚ましい抗腫瘍効果を示す一方で、重大な副作用であるサイトカイン放出症候群（CRS）のために適応が制限される。そのCRSを未然に防ぐことを目的として、CRSの主な原因であるインターロイキン6（IL-6）の遺伝子をノックダウンしたCAR-T細胞を作製した。この遺伝子組み換えは低価格で製造可能な非ウイルスベクター法(piggyBacトランスポン法)で実現した。健康ドナー由来の末梢血T細胞を用いて作製したIL-6ノックダウンCD19.CAR-T細胞は、CD19陽性白血病細胞を既存のCD19.CAR-T細胞と同等に殺傷し、IL-6の分泌は低下したことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性サイトカインであるIL-6の分泌を制御したCAR-T細胞は、重大な副作用であるサイトカイン放出症候群を未然に防ぐことが期待される。

研究成果の概要（英文）：While chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapies have a remarkable anti-tumor effect, they have limited application due to a serious side effect, the cytokine release syndrome (CRS). To enable the prevention of CRS, we created CAR-T cells that knocked down the gene for interleukin 6 (IL-6), which is the main cause of CRS. We succeeded in this gene modification by a non-viral vector method, the piggyBac transposon method, which can be manufactured cheaper than the viral vector method.

We revealed that IL-6 knock-downed CD19.CAR-T cells generated using peripheral blood T cells derived from healthy donors have the equivalent cytotoxicity to CD19-positive leukemia cells compared with original CD19.CAR-T cells. Furthermore, we have demonstrated that the CAR-T cells have a lower IL-6 secretion capacity than that of the original cells.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：キメラ抗原受容体T細胞療法 CAR-T細胞療法 小児がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CAR-T細胞療法はT細胞に遺伝子改変を加えることで、その標的となる腫瘍を強力に殺傷することのできる、近年注目を集めているがん免疫療法である。しかし、CAR-T細胞が抗腫瘍効果を発現する際には高頻度の高サイトカイン血症が生じ、約30%の患者に急性呼吸窮迫症候群、多臓器不全などの重篤な合併症(サイトカイン放出症候群)が認められ、死亡例も報告されている。そして現在もなお、サイトカイン放出症候群の有効な予防法は未開発である。

2. 研究の目的

本研究では、サイトカイン放出症候群の主たる原因であるインターロイキン6(IL-6)の遺伝子をノックダウンしたCAR発現ベクターを作製し、サイトカイン放出症候群を未然に防ぐことのできるCAR-T細胞を開発する。本研究技術はあらゆる腫瘍に対するCAR-T細胞に応用でき、CAR-T細胞療法における致死的な有害事象を克服することが期待できる。

3. 研究の方法

1) IL-6遺伝子ノックダウンCD19.CARトランスポゾンベクターの作製

サイトカイン放出症候群に対して抗IL-6受容体抗体が最も効果的であった背景から、まずIL-6遺伝子をノックダウンしたCD19CARトランスポゾンベクターを作製する。まず、既報のCD19CAR発現トランスポゾンベクター(Saito S, Nakazawa Y, Cytotherapy. 2014;16:1257-69.)を制限酵素MunIとClaIの両者で切断する。次に、U6プロモーター下でIL-6遺伝子の発現を抑制するshRNA(IL6KD)配列およびその両側に制限酵素認識配列(5'側にMunI認識配列、3'側にClaI認識配列)を有するDNA断片をMunIとClaIの両者で切断する。そして、得られたDNA断片をT4 DNA ligaseを用いてライゲーションする。コンピテントセルを用いて、環状DNAプラスミドを大量増幅する。

2) IL-6遺伝子ノックダウンCD19.CAR-T細胞の大量培養

4D-Nucleofector™装置によるエレクトロポレーション法を用いて、pIRII-CAR.CD19-IL6KDベクターとpCMV-piggyBacベクターを末梢血単核球(PBMC)に遺伝子導入する。

で得られた遺伝子導入細胞を、インターロイキン(IL)-7/IL-15添加無血清培地中で、ウイルス抗原ペプチドでパルスした同一ドナーの照射PBMCを用いて抗原刺激する。

1週間後に同様のウイルス抗原刺激を加え、G-Rex10培養器に移入する。

培養開始2週間後に細胞を回収する。

3) 共培養実験によるCD19 CAR/IL6KD-T細胞の抗腫瘍効果およびIL-6産生抑制の評価

培養プレート上でmock T細胞、CD19 CAR-T細胞、CD19 CAR/IL6KD-T細胞の各々を、B-ALL細胞株SU/SRと(T細胞:腫瘍細胞比=1:5)、10%ウシ胎仔血清含RPMI1640培地下で5日間共培養する。

共培養3日目に培養上清0.5 mlを回収し、新たに0.5 mlの培地を加える。

共培養開始5日目、細胞を回収する。生細胞数をカウントし、FACS法でCAR-T細胞とALL細胞の比率を測定する。

共培養開始3日目に回収した培養上清のIL-6濃度をELISA法で測定する。

4. 研究成果

まず、IL-6遺伝子をノックダウンしたCAR発現ベクターを作製した。既報のCD19 CAR発現piggyBacトランスポゾンベクターを制限酵素MunIとClaIの両者で切断し、U6プロモーター下でIL-6遺伝子の発現を抑制するshRNA (IL6KD) 配列およびその両側に制限酵素認識配列を有するDNA断片をMunIとClaIの両者で切断した。その後、T4 DNA ligaseを用いてライゲーションし、コンピテントセルを用いて環状DNAプラスミドの大量増幅を行った。

そして、2例の健常ドナー血を用いてIL-6ノックダウンCD19.CAR-T細胞の培養を行った。IL-6ノックダウンCD19.CARプラスミドと、piggyBacトランスポザゼプラスミドを、ドナー末梢血単核球にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入した。その後、遺伝子導入細胞をインターロイキン(IL)-7/IL-15添加無血清培地中で、ウイルス抗原ペプチドでパルスした同ドナーの照射PBMCを用いて抗原刺激して14日間培養した。2ドナー共にIL-6ノックダウンCD19.CARは元のCD19.CARと同等の細胞増殖(図1)、CAR遺伝子導入率(図2)を示した。CD19陽性細胞に対する抗腫瘍効果も同等の結果が得られた(図3)。

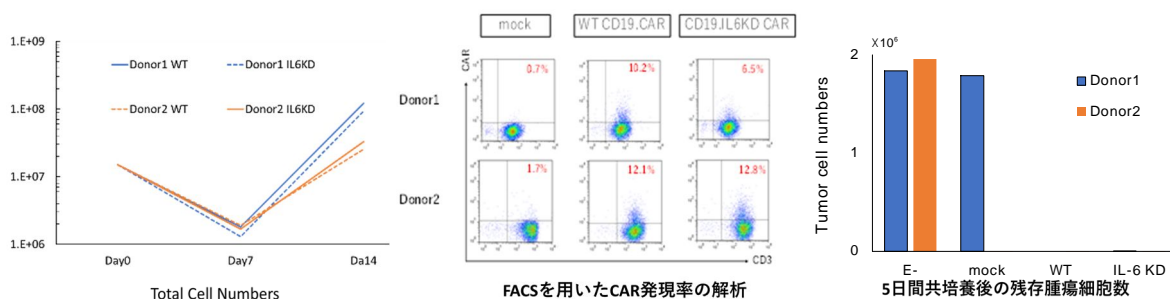


図1 細胞増殖. 注)WT=元のCD19.CAR, IL6KD=IL-6ノックダウンCD19.CAR

図2 CAR導入率. 注)WT=元のCD19.CAR, IL6KD=IL-6ノックダウンCD19.CAR

図3 抗腫瘍効果. 注)WT=元のCD19.CAR, IL6KD=IL-6ノックダウンCD19.CAR

そして、2例ともにIL-6ノックダウンCD19.CAR-T細胞のIL-6分泌は元のCD19.CAR-T細胞よりも減少したことを認めたが、ドナー2では大きな差は見られなかった(図4)。

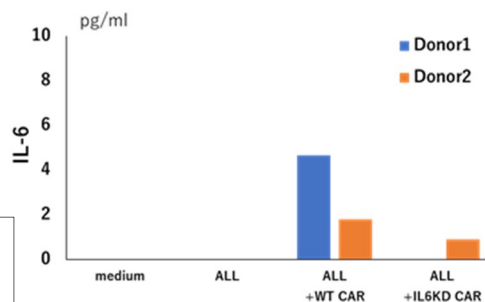


図4 CAR-T細胞のIL-6産生能. 注)WT=元のCD19.CAR, IL6KD=IL-6ノックダウンCD19.CAR

IL-6ノックダウンCD19.CAR-T細胞のIFN γ 及びTNF α 分泌は維持していることを確認した(図5,6)。共培養の結果と併せて、CD19陽性細胞に対する抗腫瘍効果は元のCD19.CARと同等を維持することが示唆された。(N=2)。

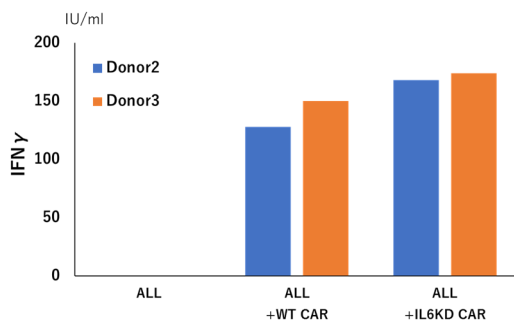


図5 CAR-T細胞のIFN γ 産生能. 注)WT=元のCD19.CAR, IL6KD=IL-6ノックダウンCD19.CAR

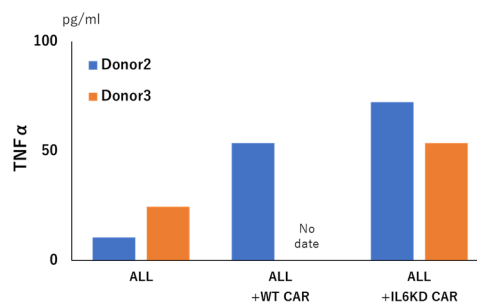


図6 CAR-T細胞のTNF α 産生能. 注)WT=元のCD19.CAR, IL6KD=IL-6ノックダウンCD19.CAR

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuniaki Tanaka, Itaru Kato, Miyuki Tanaka, Daisuke Morita, Kazuyuki Matsuda, Yoshiyuki Takahashi, Tatsutoshi Nakahata, Katsutsugu Umeda, Hideo Hiramatsu, Souichi Adachi, Junko Takita, Yoza Nakazawa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Direct delivery of piggyBac CD19 CAR T cells has potent anti-tumor activity against ALL cells in CNS in a xenograft mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy Oncolytics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.05.013	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
---------------------------	-----------------------	----