

従来の CAR-T 細胞よりも増殖が良好な CAR-T 細胞を開発！ ～CAR-T 細胞療法の効果増強を期待～

【本研究のポイント】

- ・血液腫瘍患者に対するキメラ抗原受容体(CAR)-T 療法^{*1}後の治療成功には、体内での CAR-T 細胞の増殖と持続性が重要です。
- ・CD19CAR-T 細胞において、ゲノムワイド-CRISPR スクリーニング^{*2}を行い、CUL5 ノックアウト(KO)^{*3}が CAR-T 細胞の増殖を向上させることを見出しました。
- ・マウスモデルにおいて CUL5KOCAR-T 細胞は従来の CAR-T 細胞と比較して良好な抗腫瘍効果を示しました。
- ・CUL5 の shRNA^{*4}を CD19CAR の構造に繋いだ新規のレンチウイルスベクター^{*5}を用いることで、従来と同様の製造工程によって、従来の CAR-T 細胞よりも優れた生存率を示す可能性があります。

【研究概要】

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学分野の安達慶高 大学院生、寺倉精太郎 講師、清井仁 教授、ウイルス学分野の佐藤好隆 准教授、名古屋市立大学医学系研究科 ウイルス学分野の奥野友介 教授らの研究グループは、CUL5 遺伝子がキメラ抗原受容体(CAR)T 細胞の増殖を制御していることを発見しました。この CUL5 遺伝子の欠損を起こすことで、CAR-T 細胞の増殖は良好となり、悪性リンパ腫を有するマウスモデルにおいて従来の CAR-T 細胞と比較して優れた抗腫瘍効果を示しました。

昨今 CD19 を標的とした CD19CAR を発現するように遺伝子を改変した CD19CAR-T 細胞が、再発・難治 B 細胞性悪性腫瘍で有望な結果を示すことが明らかとなり、臨床応用されました。しかし、高い初期奏効率にもかかわらず、多くの患者が最終的には再発しており、CAR-T 細胞の増殖性や生体内での長期持続性が低いことが、不完全な奏効や早期再発と関連していると考えられます。CAR-T 細胞の増殖と持続性に関わる遺伝子を同定するために、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングという遺伝子スクリーニングを行い、CUL5 遺伝子が CAR-T 細胞の増殖を制御していることを見出しました。CUL5 の機能欠失を起こすと、JAK-STAT シグナル経路という T 細胞の増殖に重要なシグナルが増強することが示されました。CUL5 欠損 CAR-T 細胞は、B 細胞リンパ腫モデルにおいて、従来の CAR-T 細胞と比較してがん細胞の増殖を抑制しました。さらに CUL5 に対する shRNA を CD19CAR の構造に繋いだ新規のレンチウイルスベクターを用いることで、従来の CAR-T 細胞製造と同様の工程で作成できる CUL5-ノックダウン(KD)CD19CAR-T 細胞を開発し、この治療法もまた良好な抗腫瘍効果を示しました。CUL5KD-CD19CAR-T 細胞は、B 細胞リンパ腫の寛解を持続させ、最終的には治療成績を向上させる可能性があります。

本研究成果は、国際科学雑誌「Nature Communications」に 2024 年 12 月 10 日にオンライン掲載されました。

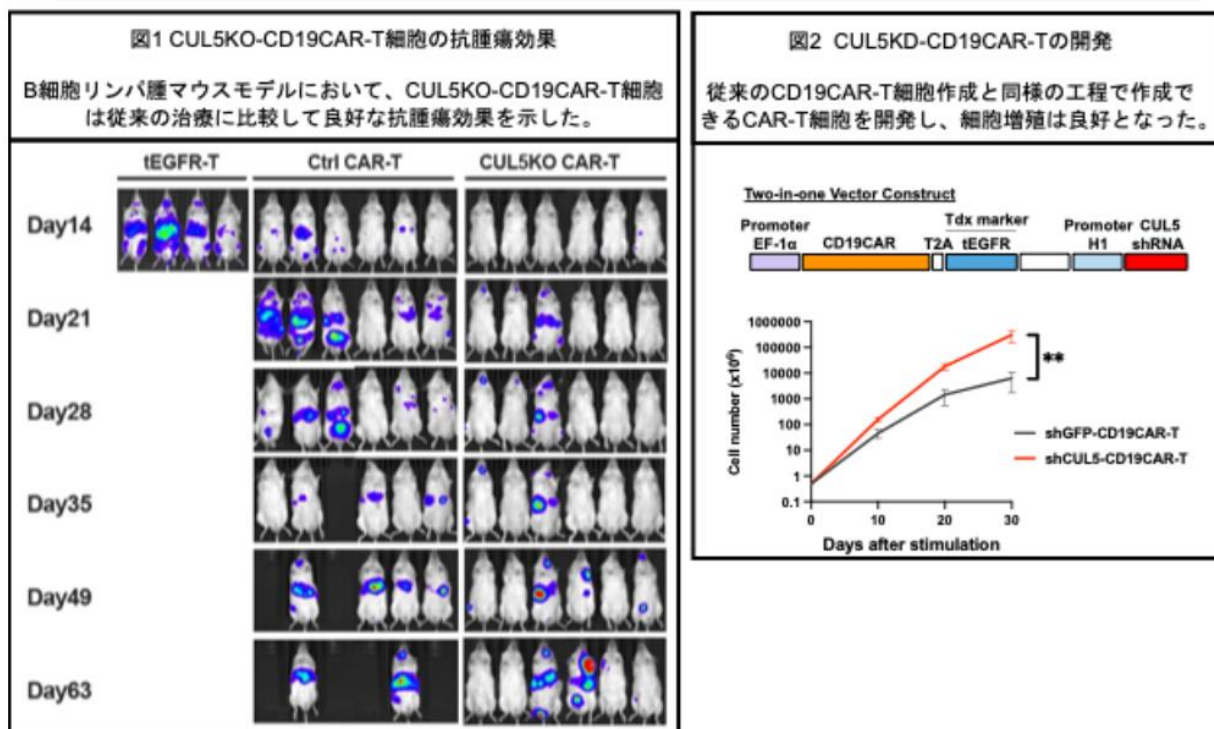
1. 背景

CD19 を標的とした CD19CAR を発現するように遺伝子を改変した CD19CAR-T 細胞が、再発・難治 B 細胞性悪性腫瘍で有望な結果を示すことが明らかとなり、臨床応用されました。しかし、CD19CAR-T 療法単独では、治療反応の良い急性リンパ性白血病患者においても半数は一度寛解に至った後に再発し、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の患者においてはさらに奏効率は低下します。要因の一つは、CAR-T 細胞が、生体内において長期間増殖が維持されないという現象です。本研究グループは、CAR-T 細胞の増殖を制御する未知の遺伝子を探索すべく、ゲノムワイド(GW)CRISPR スクリーニングの手法を用いて、CAR-T 細胞増殖制御に関わる遺伝子の同定を試みました。

2. 研究成果

網羅的に遺伝子をノックアウト(KO)し、遺伝子機能を探索する GW-CRISPR-KO スクリーニングシステムをヒト CAR-T 細胞に応用しました。プール化 KO-CD19CAR-細胞を作成し、CD19 陽性腫瘍細胞による繰り返しの抗原刺激により CAR-T 細胞を *in vitro* で増殖させ、その増殖前後で sgRNA のリード数を比較しました。すると、CUL5 遺伝子を KO することで CD19 抗原の反復刺激に対する CD19CAR-T 細胞の増殖は有意に良好となりました。CUL5KO により CAR-T 細胞はエフェクター・メモリー細胞分画が増加し、抗原刺激後のサイトカイン^{*6} の産生も有意に良好となりました。遺伝子発現解析を行うと CUL5KO-CAR-T 細胞は従来の CAR-T 細胞と比較して JAK-STAT シグナル経路の遺伝子発現亢進を認めました。さらに B 細胞腫瘍を持つ NOG マウスに CUL5KO-CD19CAR-T 細胞の投与を行ったところ、従来の CAR-T 細胞と比較して有意に生存期間を延長させました(図 1)。CUL5KO-CD19CAR-T 細胞では腫瘍と反応後リン酸化 STAT3 の発現が亢進しており、CUL5 ノックダウン KHYG-1細胞では、リン酸化 JAK1 とリン酸化 JAK3 の発現が亢進していました。CUL5 はユビキチン E3 リガーゼであるため、CUL5KO-CD19CAR-T 細胞では JAK 蛋白質の分解が妨げられ、pSTAT3 の発現が亢進したことが示唆されました。

CUL5機能欠損がCAR-T細胞の増殖を高める

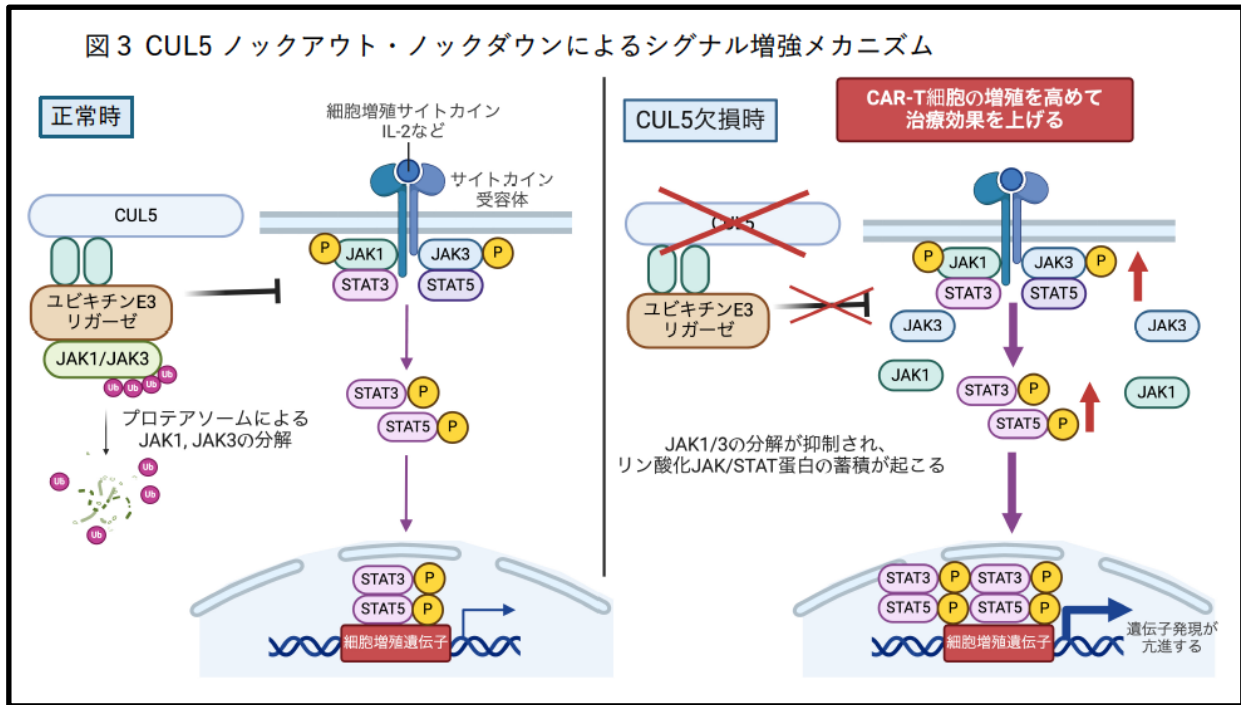


CUL5KO-CD19CAR-T細胞の作成には、電気穿孔法が必要ですが、その毒性や、十分な細胞数が確保できないことから、臨床応用は困難です。そのため、本研究グループは、CD19CARにCUL5のshRNAを繋いだレンチウイルスプラスミドを作成し、すでに製品化されているCAR-T細胞作成と同様の1回のレンチウイルスベクター遺伝子導入法によるCUL5ノックダウン(KD)-CD19CAR-T細胞の作成を試みました。その結果、CUL5KD-CD19CAR-T細胞は、*in vitro*で極めて増殖能力が高く(図2)、*in vivo*におけるマウスの腫瘍モデルにおいても皮下腫瘍の増殖をコントロールと比べて有意に抑制しました。これらの知見については特許出願を行っております(国際公開番号: WO2023/228968, 公開日: 2023年11月30日)

3. 今後の展開

CAR-T細胞においてCUL5の機能を明らかにし、CUL5の機能欠損がCD19CAR-T細胞療法の増殖を高めることが示されました(図3)。CUL5KD-CD19CAR-T細胞は、従来のCD19CAR-T細胞の製造工程と同様に簡便に製造可能であり、B細胞リンパ腫患者の寛解を持続させ、生存期間を延長させる可能性があります。さらに、現在は治療効果が乏しい固形がんに対するCAR-T細胞療法にも同様の治療効果改善が見られる可能性があり、他の標的抗原に対するCAR-T細胞にも応用するため、研究開発を継続しています。

図3 CUL5 ノックアウト・ノックダウンによるシグナル増強メカニズム



【用語説明】

*1 キメラ抗原受容体(CAR)-T 療法:

Tリンパ球にキメラ抗原受容体と呼ばれる蛋白を発現させることによって、腫瘍表面に出ている抗原蛋白を T リンパ球に認識させる治療のことです。これによって CAR-T 細胞は腫瘍細胞に結合・傷害し、ついでサイトカインと呼ばれる蛋白を放出して免疫を活性化したり、自己増殖してさらに CAR-T 細胞を増やしたりするなどの働きがあります。これまで治癒が望めなかったリンパ腫患者さんに 50%程度の長期寛解をもたらす画期的な治療として注目されています。

*2 ゲノムワイド-CRISPR スクリーニング:

細胞に発現するおよそすべての遺伝子に対して一つの遺伝子あたり 3-5個程度のガイド RNA を用意して発現させることによって、一つ一つの細胞においておよそ一つの遺伝子の働きが失われるようにさせます。その後何らかの細胞選択を行って前後のガイド RNA の数を比べれば、増えているガイド RNA が細胞選択に有利であったものということになります。今回の場合には CAR-T 細胞を腫瘍細胞で繰り返し刺激して、前後で比較していますので、増えているガイド RNA が標的とした遺伝子がわかれば、それがないことが CAR-T 細胞にとって有利であったことがわかります。

*3 CUL5 ノックアウト(KO) :

今回のスクリーニングで明らかになったのは CUL5 という遺伝子を KO して働かなくさせてしまうことによって、CAR-T 細胞がよく増えるようになったということでした。

*4 shRNA:

Short hairpin RNA(shRNA)は短い RNA 配列で、これが遺伝子の発現を調節することが知られていますので、今回我々は KO に代わる方法として shRNA を用いて CUL5 の発現を大きく抑えることで KO と同様の効果をもたらすことを示しました。

*5 レンチウイルスベクター:

レンチウイルスベクターはレトロウイルスベクターと並んで、現在 CAR 遺伝子を T リンパ球に遺伝子導入することに用いられる一般的なウイルスベクターです。

*6 サイトカイン:

免疫細胞などが用いるタンパク質であり、免疫細胞に指令を与えるためのタンパクです。T リンパ球が刺激を受けると放出されます。

【論文情報】

雑誌名:Nature Communications

論文タイトル:Cullin-5 deficiency promotes chimeric antigen receptor T cell effector functions potentially via the modulation of JAK/STAT signaling pathway

著者:Yoshitaka Adachi¹, Seitaro Terakura¹, Masahide Osaki¹, Yusuke Okuno², Yoshitaka Sato³, Ken Sagou^{1,3}, Yuki Takeuchi¹, Hirofumi Yokota¹, Kanae Imai¹, Peter Steinberger⁴, Judith Leitner⁴, Ryo Hanajiri¹, Makoto Murata¹, and Hitoshi Kiyoi¹

¹ Department of Hematology and Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

² Department of Virology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

³ Department of Virology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

⁴ Division for Immune Receptors and T Cell Activation, Institute of Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

DOI: [10.1038/s41467-024-54794-x](https://doi.org/10.1038/s41467-024-54794-x)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Nat_241210en.pdf