日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）遺伝子改変 T 細胞療法の有効性を高めるための選択的制御遺伝子（SRG）の開発
（英語）Development of selective regulatory gene (SRG) for augmenting the efficacy of gene-modified T-cell therapy

研究開発実施期間：令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）Keiya Ozawa
（英語）小澤 敬也

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）自治医科大学・医学部・客員教授
（英語）Jichi Medical University, Department of Medicine, Visiting Professor

II 研究開発の概要

【背景】

近年の遺伝子改変技術の進歩は、がん治療に breakthrough をもたらした。特に患者自身の T 細胞をキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) で人工的にがん抗原特異的 T 細胞に改変した細胞を薬 (いわゆる”Living drug”) として利用する CAR-T 療法の臨床的成功が脚光を浴びている。難治性悪性リンパ腫患者を対象とした CD19 特異的 CAR-T 療法の臨床試験では、高い奏効率が認められた一方で、60~70%の患者が短期間で再発している。しかし、長期フォローアップでは治療成績は決して満足のいくものではなく、さらなる工夫が必要とされている。CAR-T 療法後の再発の主な理由として CAR-T 細胞が体内で長期間存続しないことが指摘されており、国内外を問わず CAR-T 細胞の体内増幅と生存を高めるシグナルを活用する戦略に関する研究が活発化してきている。その多くは CAR-T 細胞の調製法の工夫 (ナイーブ様 T 細胞、メモリ T 細胞の分画が増える培養法の開発)、CAR の構築の改良や他の機能遺伝子の付加 (CAR-T 細胞の体内増幅と生存を高めるシグナルを活用する戦略) であるが、輸注後の CAR-T 細胞の動態を制御することはできない。そこで我々は、新規のアプローチとして、投与した CAR-T 細胞の体内増幅や生存を選択的に制御できる選択的制御遺伝子(SRG: selective regulatory gene)の開発を行った。

【研究開発の意義】

SRG は、エリスロポエチン (erythropoietin: EPO) 応答性の人工キメラ分子をコードする。SRG と CAR を共発現する T 細胞(SRG 搭載 CAR-T 細胞)は、IL-2 非存在下でも EPO 依存性に遺伝子導入細胞を選択的かつ効率的に増殖させることができる。ex vivo における CAR-T 細胞の製造・培養には T 細胞の分化と増殖を促進するサイトカイン IL-2 が広く用いられているが、IL-2 を生体へ全身的に投与すると重篤な副作用が生じるため、リスクを上回る臨床上のベネフィットが得られにくい。細胞の体内動態を EPO で制御する SRG は、IL-2 の投与時に観察される毒性を回避することができる。また、EPO は、医薬品として長年にわたって臨床現場で使用されている実績があり、知識や技術の蓄積のみならず、安全性も十分に評価されている。したがって、適切に EPO を投与することで長期に亘り CAR-T 細胞を体内で存続させることができれば、CAR-T 療法の臨床的有効性が一段と高まると期待される。また、SRG は、CAR とは独立した分子として機能するため、標的分子の異なるさまざまな CAR との併用が可能であることに加え、TCR-T 細胞療法をはじめとする T 細胞を用いた免疫療法の有効性を高める基盤技術として応用可能である。

【研究成果】

1) SRG の構築

SRG は、T 細胞に EPO 依存性増殖能を付与することを目的とした人工受容体分子をコードする。SRG として、EPO 受容体の細胞外領域と IL-2 受容体 γ 鎖 (共通 γ 鎖) の膜貫通領域および細胞内領域を連結したサブユニット①、EPO 受容体の細胞外領域と IL-2 受容体 β 鎖の膜貫通領域および細胞内領域を連結したサブユニット② を 2A ペプチドで連結した分子構造を基本骨格とするものを構築した (基本型 SRG)。さらに、IL-2 受容体 β 鎖のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した FFF 変異体、FFF 変異体の IL-2 受容体 γ 鎖の C 末端に CD40 の細胞内領域を連結した FFF40 変異体を構築した。基本型 SRG を導入した T 細胞は、遺伝子導入後 10 日までの一過性の EPO 依存性増殖を認めた。一方、FFF 変異体および FFF40 変異体 SRG を導入した T 細胞は、遺伝子導入後 3 週間にわたって EPO 依存性増殖を認めた。

2) 培養条件の指摘化

IL-2 含有培地で 2×10^5 cells/mL に濃度調整した PBMC を抗ヒト CD3 抗体と RetroNectin をコーティングしたプレートに 6.5mL 播種し、インキュベータ内で静置培養して活性化を 4 日間行った。Day0 に、RetroNectin をコーティングしたプレートに SRG 発現レトロウイルスベクター (1×10^4 copies/cell 相当) を吸着させ、次に IL-2 含有培地で 4×10^5 cells/mL に濃度調整した活性化 PBMC を 4mL 播種し、1 回目の遺伝子導入を実施した。Day1 に PBMC を回収して IL-2 含有培地で洗浄し、ウイルスベクターを吸着させた新しいプレートに再播種して 2 回目の遺伝子導入を実施した。翌日に遺伝子導入細胞 (SRG 搭載 T 細胞) を IL-2 不含培地で洗浄して IL-2 を除去し、遺伝子導入後の拡大培養時には EPO を添加した IL-2 不含培地 20mL に細胞を懸濁した。等量の培地による希釈と 9.0 IU/mL の EPO 添加 (Day4、7、9、11、14、16、18) によって、一回だけ遺伝子導入を行った場合と比較して遺伝子導入効率が改善しただけでなく、ZsGreen1 陽性細胞の効率的な増殖を得た。また、EPO 濃度の違い (0、0.3、0.9、3.0、9.0、15 IU/mL) による増殖比較では、EPO 濃度依存的な細胞増殖が観察されたが、0.9 IU/mL では増殖が一過性だったが、3.0 IU/mL では増殖が継続し、9.0 IU/mL 以上では増殖率がほぼ変わらなかった。

3) SRG 搭載 T 細胞の特性解析

In vivo における FFF40 変異体 SRG 搭載 T 細胞の EPO 依存性増殖試験では、レポーター遺伝子にルシフェラーゼを利用した SRG 搭載 T 細胞を輸注すると、EPO を投与しない条件では、輸注した SRG 搭載 T 細胞の増殖は認められなかった。一方、EPO を投与する条件(週 3 回 x2 または週 2 回 x3)では、EPO の投与期間は発光強度が維持されるが、EPO の投与を止めると徐々に発光強度は低下したため、週 2 回 x3 のタイムコースの方が、発光強度は劣るものの輸注した SRG 搭載 T 細胞の体内増殖と存続をより長期に渡って維持することができた。マウスの血液を経時的に回収して、血中の FFF40 変異体 SRG 搭載 T 細胞の動態をフローサイトメーターで解析した結果でも同様に、EPO を投与している間は、血中の SRG 搭載 T 細胞数を維持できることが示された。このことから、SRG 搭載 T 細胞は *in vivo* においても EPO 依存性に増殖を制御できることがわかった。また、IL-2 非存在下で EPO 刺激により増殖させた FFF40 変異体 SRG 搭載 T 細胞の疲弊は、IL-2 で培養した遺伝子非導入細胞 (NGMC) と同程度であった。サブセットの比較試験では、FFF40 変異体 SRG 搭載 T 細胞はエフェクターサブセットの割合が多かった。また、制御性 T 細胞については、検出できなかった。

4) SRG 搭載 CAR-T 細胞の作製と特性解析

FFF40 変異体 SRG と CD19-CAR を 2A ペプチドで連結した SRG と CAR を共発現した T 細胞 (SRG 搭載 CAR-T 細胞) の細胞特性を評価した。SRG 搭載 CAR-T 細胞は、遺伝子導入後の拡大培養時に EPO 刺激のみで細胞増殖を誘導することができた。また、CAR-T 細胞と同様に CD19 陽性細胞を特異的に傷害した。さらに、抗原刺激によって既存の CAR-T 細胞と同等のサイトカイン (IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF) を産生した。SRG 搭載 CAR-T 細胞は、IL-2 で培養した従来型の CAR-T 細胞と比較すると CD8 陽性細胞の増殖が有意に増加した。また、サブセット解析では、ナイーブサブセットの割合が CD4 陽性細胞では有意に高かったが、CD8 陽性細胞ではやや高い傾向を認めた (統計的な有意差はない)。細胞疲弊について、SRG 搭載 CAR-T 細胞および従来型 CAR-T 細胞共に PD-1 陽性細胞の存在比はそもそも数%と非常にマイナーな集団であったが、SRG 搭載 CAR-T 細胞は、CAR-T 細胞と比較すると存在比は高かった。Tim-3 と LAG-3 の陽性細胞は、CAR 遺伝子を導入していない T 細胞と比較すると、CAR-T 細胞および SRG 搭載 CAR-T 細胞の両方で存在

比が有意に高かった。しかし、CAR-T 細胞と SRG 搭載 CAR-T 細胞の比較では、差が認められなかったため、これは、CAR 遺伝子の導入に伴う特性変化であり、SRG 遺伝子の導入や EPO 刺激によるものではないと考えた。担がんマウスを用いた治療実験では、SRG 搭載 CAR-T 細胞は EPO の併用により有意に生存期間を延長した。マウスの血液を経時的に回収して、血中の CAR-T 細胞または SRG 搭載 CAR-T 細胞の動態をフローサイトメーターで解析した。治療開始後 10、21 日の時点において EPO を併用した SRG 搭載 CAR-T 細胞投与群では、CAR-T 細胞投与群や EPO を併用しなかった SRG 搭載 CAR-T 細胞投与群と比較して、有意に血中の細胞数が多かった。以上の結果から、SRG 搭載 CAR-T 細胞は、EPO 依存性に効率的に体内で増殖して存続することによって治療効果を高めていると結論づけた。

【今後の展望】

CAR-T 療法は、B 細胞性腫瘍に対する驚異的な治療効果を発揮し、大きな注目を浴びている。しかしながら、長期フォローアップでは治療成績は決して満足のいくものではなく、さらなる工夫が必要とされている。我々は、CAR-T 細胞の動態を制御する方法として EPO を用いる SRG を開発したが、国外では人工合成した合成したリガンドを用いる orthIL-2 システムや long-acting IL-7 といった競合技術の開発が進められている。しかし、合成したリガンドの安全性や動態についての理解はまだ不十分であるため、その点では医薬品として安全性が確立されている EPO を用いる SRG システムに優位性があると考えているが、今後は SRG システムの早期実用化に向けた動きを加速化する必要がある。

Recent advances in genetic modification technologies have resulted in breakthroughs in cancer therapy. In particular, the clinical success of CAR (chimeric antigen receptor)-T therapy, which uses artificially modified cancer antigen-specific T cells as a drug (so-called “living drug”), is attracting attention. Clinical trials of CD19-specific CAR-T therapy in patients with refractory malignant lymphoma have shown high response rates. However, the long-term follow-up was not satisfactory (60-70% of patients relapsed within a short period), and further studies are needed. This has stimulated research on strategies to utilize CAR-T cell signaling to amplify and enhance the survival of CAR-T cells in the body. Many of these strategies include the development of new methods for preparing CAR-T cells (development of culture methods that increase the fraction of naïve T cells and memory T cells), improvement of CAR construction, and addition of other functional genes (strategies that utilize signals to increase the amplification and survival of CAR-T cells). However, it has not been possible to control CAR-T cell dynamics after infusion. Therefore, as a novel approach, we developed a selective regulatory gene (SRG) that could selectively control the amplification and survival of infused CAR-T cells *in vivo*. SRG encodes an erythropoietin (EPO)-responsive engineered chimeric molecule, and T cells co-expressing SRG and CAR (SRG/CAR-T cells) can selectively and efficiently proliferated in an EPO-dependent manner in the absence of IL-2. IL-2 is a crucial component of immune activation and is commonly used to stimulate T cell proliferation. In early immunotherapy studies, IL-2 was administered systemically to patients, but adverse side effects and low response rates made this approach unacceptable. SRG encodes a novel engineered receptor consisting of the extracellular domain of EPO receptor and the intracellular signaling domain of a receptor that regulates T-cell proliferation and persistence. Therefore, instead of IL-2, EPO activates intracellular signaling in SRG-expressing T cells. The most significant feature of SRG-expressing CAR-T (SRG/CAR-T) cells is that the signaling of infused SRG/CAR-T cells can be controlled *in vivo* by EPO administration. Moreover, unlike methods that optimize the structural design of CAR, SRG is expressed independently of CAR and can therefore be applied as a fundamental technology for enhancing the effectiveness of any T cell-based immunotherapy, not just for CAR-T therapy. SRG-expressing T cells showed EPO-dependent expansion and persistence both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, SRG/CAR-T cells prolonged the survival of tumor-bearing mice after EPO administration compared to conventional CAR-T cells.