

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

事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 新規ゲノム編集技術を用いた次世代 CAR-T 細胞療法の開発

(英語) Next generation CAR & T cell therapies with a novel genome editing technology

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) 真下 知士

(英語) Tomoji Mashimo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 東京大学・医科学研究所・教授

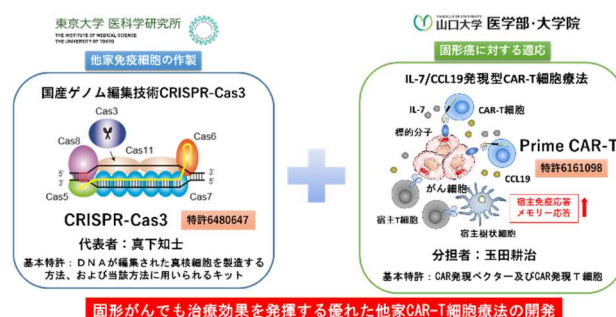
(英語) The University of Tokyo, The Institute of Medical Science, Professor

II 研究開発の概要

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集による遺伝子改変は、その簡便性から、遺伝子の機能解明など基礎研究の発展だけでなく、遺伝子治療や再生医療などの医療分野、新薬の開発などの創薬分野、植物、家畜の品種改良などの農林水産業分野など、幅広い分野での応用、活用されつつある。一方で、ゲノム編集技術においてはオフターゲット変異が懸念されており、これらの現象がしばしば産業応用への障害になっている。我々は、CRISPR-Cas3 がヒト細胞でゲノム編集が可能であることを見出した(図 1 左)。これまでに、CRISPR-Cas3 によるゲノム編集技術が、高い配列特異性を示し、オフターゲット変異を引き起こす可能性が低いことを示している。

近年、キメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor: CAR) -T 細胞療法は、がん治療、特に B 細胞性腫瘍に高い治療効果が発揮され、免疫チェックポイント阻害療法に続く次世代のがん免疫療法として注目を集めている。CAR-T 細胞療法は、患者から採取した T 細胞を使って CAR 遺伝子を導入し、培養した上で患者の体内に戻す自家細胞治療であるため、製造コストが高額になる。また、悪性腫瘍の大部分を占める固形がんに対しては有効性が乏しいことなどの課題がある。最近、玉田らはケモカインやサイトカインを発現させることにより、固形がんに対しても高い抗腫瘍効果を示す PRIME (Proliferation inducing and migration enhancing) CAR-T 技術を開発した (図 1 右)。

本研究課題では、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 と PRIME CAR-T 細



図形がんでも治療効果を発揮する優れた他家CAR-T細胞療法の開発

図 1. 本研究課題の概要

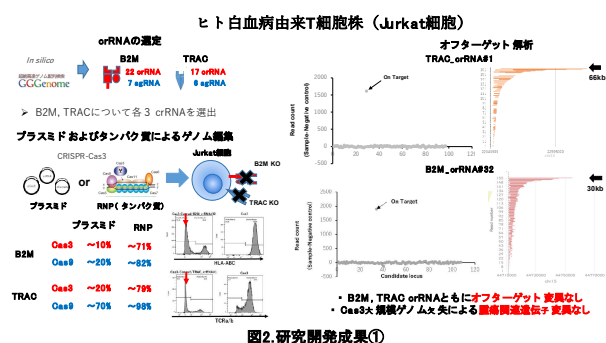
胞作製技術を利用して、固形がんでも抗腫瘍効果が期待できる他家 CAR-T 細胞療法の開発を行い、以下の成果を得ることができた。

CRISPR-Cas3 新規ゲノム編集技術プラットフォームの構築

我々は、ヒト白血病由来 T 細胞株 (Jurkat 細胞) を用いて、細胞培養方法、エレクトロポレーション条件、遺伝子導入方法等を検討した。他家 CAR-T 細胞を作製するためには、TCR α 鎖定常領域 (TRAC) 遺伝子および β 2-microglobulin (B2M) 遺伝子のノックアウト (KO) が必要であるので、はじめに *in silico* 解析により TRAC および B2M 遺伝子を標的とした crRNA をそれぞれ 17 箇所および 22 箇所に設定した。Jurkat 細胞を用いて「Cas3/Cascade/crRNA プラスミド」による TRAC および B2M 遺伝子 KO を実施し、フローサイトメトリーで効率を評価したところ、B2M 遺伝子に対しては KO 効率が最大 11%、TRAC 遺伝子に対しては最大 20% であった。

検討した TRAC および B2M 遺伝子を標的とした crRNA の中から、KO 効率の良い crRNA 候補をそれぞれ 3 つ選び、Cascade/crRNA タンパク質を作製した。「Cas3/Cascade/crRNA タンパク質」によりゲノム編集した結果、B2M 遺伝子に対しては KO 効率が最大 71%、TRAC 遺伝子では最大 79% であった (図 2 左)。

これらの crRNA について、Cas3/Cascade/crRNA タンパク質を用い TRAC と B2M 遺伝子をゲノム編集した Jurkat 細胞において、キャプチャーシーケンス法によりオフターゲット解析を実施した結果、CRISPR-Cas3 による オフターゲット変異は検出されなかった。また、オンターゲット領域における 癌化を促進するような遺伝子変異は見られなかった (図 2 右)。



PRIME CAR-T 細胞療法プラットフォームの構築

CRISPR-Cas3 を用いて他家 PRIME CAR-T 細胞を作製するために、はじめにヒト T 細胞で、CRISPR-Cas9 システムを用いて B2M 遺伝子および TRAC 遺伝子の KO プロトコルを確立した。これらの条件にもとづいて、「Cas3/Cascade/crRNA プラスミド」により B2M 遺伝子および TRAC 遺伝子を KO したところ、B2M 遺伝子については 1% 程度、TRAC 遺伝子については 10% 程度の KO 効率であった。一方で「Cas3/Cascade/crRNA タンパク質」を用いて B2M 遺伝子および TRAC 遺伝子の KO を行った結果、TCR および B2M 遺伝子の KO 効率に関しては、それぞれ ~91% および ~72% を達成することに成功した。しかし、エレクトロポレーションによる細胞へのダメージが強く、生存性が低く、増殖性も失われていた。さらに、「Cas3/Cascade (修飾)mRNA / (末端修飾) crRNA」を追加検討することとし、ヒト T 細胞において B2M 遺伝子および TRAC 遺伝子の KO を行った。その結果、KO 効率はそれぞれの遺伝子に対して 47.5% と 52% の高い効率を実現することができた。また、この条件においては、細胞へのダメージも低く、生存性や増殖能を保っていることを確認した。「Cas3/Cascade (修飾)mRNA / (末端修飾) crRNA」で B2M 遺伝子を KO したヒト T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて CAR を導入したところ、CAR の導入効率は 40% 程度であり、高い導入効率を実現した (図 3A)。

次世代型 CAR-T 細胞療法の強化

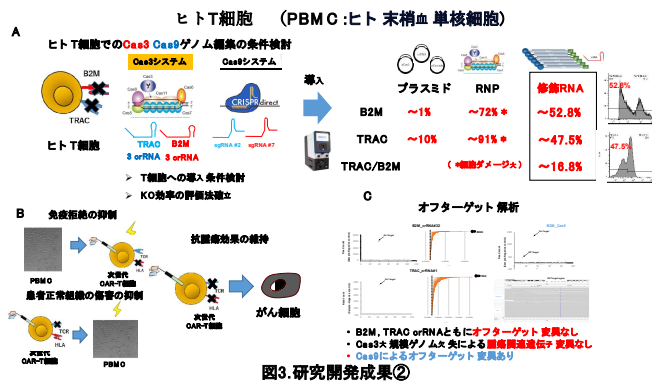
次世代型 CAR-T 細胞を作製するために必要な B2M と TRAC 遺伝子の二重欠失 (DKO) の検討をした。その結果、ヒト T 細胞における B2M と TRAC 遺伝子の DKO 効率は 16.8% であった (図 3A)。このように、次世代型 CAR-T 細胞を作製するために必要な B2M と TRAC 遺伝子の DKO にも成功した。

細胞モデルを用いた次世代型 CAR-T 細胞の機能評価

がん細胞株やヒト T 細胞を用いて次世代型 CAR-T 細胞療法の抗腫瘍効果および HVG・GVH 反応抑制効果の評価

法の検討を行い、そのプロトコルを確立した。TRAC または B2M 遺伝子を KO したヒト T 細胞に CAR を導入し腫瘍細胞に対する細胞傷害性試験および混合リンパ球反応を行った。その結果、TRAC または B2M KO CAR-T 細胞は腫瘍細胞に対し細胞傷害活性を示し、HVG 反応と GVH 反応も抑えられていた (図 3B)。また、Jurkat 細胞と同様に本細胞のオフターゲット解析を実施した結果、CRISPR-Cas9 によるオフターゲット変異は検出されたが、CRISPR-Cas3 によるオフターゲット変異は検出されなかった。また、CRISPR-Cas3 についてオンターゲット領域における癌化を促進するような遺伝子変異は見られなかった (図 3C)。

我々は、本研究課題期間中に安全で高効率なゲノム編集技術である CRISPR-Cas3 システムを確立し、さらに、本ゲノム編集技術と PRIME CAR-T 技術の二つの技術を融合して、安全で固形癌でも効果を示すより汎用性に優れた他家 CAR-T 細胞療法の基盤技術プラットフォームを開発することができた。本研究成果は、ゲノム編集技術 CRSIPR-Cas3 は、遺伝子治療分野で広く用いられている CRISPR-Cas9 よりも安全で理想的なゲノム編集ツールであることを示している。本研究課題で得られた技術の知財化、製品化および企業への導出を予定していく。



The CRISPR-Cas9 system has been widely applied in agriculture, biotechnology, and medicine. Especially, The CRISPR-Cas9 system exhibits tremendous potential in the field of medicine; however, off-target effects remain a major challenge. Recently, Mashimo *et al.* have reported that the CRISPR-Cas3 system has been shown to induce genome editing in human cells and to have lower off-target activity compared to Cas9. Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy has emerged as a next-generation cancer immunotherapy, especially for hematological malignancies. However, challenges remain, such as high manufacturing costs and limited efficacy against solid tumors. To overcome these issues, Tamada *et al.* have also recently developed a next-generation CAR-T cell therapy that exerts a high anti-tumor effect even in solid cancers by using IL-7/CCL19 expressing CAR-T cells that secrete cytokines and chemokines, which named PRIME (Proliferation inducing and migration enhancing) CAR-T cells.

We combined CRISPR-Cas3 genome editing technology with PRIME CAR-T cell production techniques to develop allogeneic CAR-T cell therapy effective against solid tumors. In this study, we established a novel CRISPR-Cas3 genome editing platform which demonstrated high knockout efficiency with apparently no off-target effects, and generated allogeneic CAR-T cell platform by deleting the endogenous T-cell receptor (*TRAC*) and beta-2 microglobulin (*B2M*) with CRISPR-Cas3. The allogeneic CAR-T cells exhibited reduce activity of graft-versus-host defense and immune rejection. Moreover, no off-target mutations were observed in *TRAC* or *B2M* deleted cells generated with the CRISPR-Cas3 system in human T cells.

These results show that the genome editing technology CRISPR-Cas3 is a safer and more desirable genome editing tool than CRISPR-Cas9 which is widely used in the field of gene therapy. The allo-PRIME CAR-T technology established in this study is planned to be applied for a patent, commercialized, and licensed out to pharmaceutical companies.