

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) エピジェネティクス修飾によるキメラ抗原受容体導入幹細胞様メモリーT細胞の自己複製増殖方法の開発

(英語) Development of self-renewal expansion of chimeric antigen receptor-engineered stem cell memory T cells through epigenetic manipulation

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 籠谷 勇紀

(英語) Yuki Kagoya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 学校法人慶應義塾・慶應義塾大学医学部・教授

(英語) 籠谷 勇紀

II 研究開発の概要

【和文】

本研究では、エピジェネティック因子群の遺伝子改変を通じてキメラ抗原受容体 (CAR) 導入 T 細胞の自己複製能を高めることで、未分化メモリー状態を維持した CAR-T 細胞の大量増幅を達成し、同治療法の効果改善につなげることを目標とした。これまでの検討で、PRDM1 ノックアウトにより未分化メモリー形質が高度に維持されることに立脚して、同遺伝子と関連する因子群に特に着目して、複数因子の修飾による最適な改変方法を探索した。治療効果の in vivo 実験系での確認に加えて、遺伝子修飾により変化する下流転写ネットワークの解明を進めた。

まず初年度は、PRDM1 ノックアウトに伴う CAR-T 細胞機能の詳細な解析を行った。抗 CD19 CAR-T 細胞で同遺伝子を CRISPR/Cas9 によりノックアウトすることで、RNA シークエンス及び ATAC シークエンスで遺伝子発現、エピゲノムプロファイルで広範な変化を来すことを確認していたが、固形がんに対する標的抗原として代表的

なメソテリン、GD2 に対する CAR-T 細胞においても同様の機能変化を確認した。さらに、これらの抗原について複数の腫瘍モデルで試験し、コントロール CAR-T 細胞と比較して優れた長期生存能、持続的な抗腫瘍効果を示したほか、CAR-T 細胞のみならず、TCR-T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte: TIL) でも同様の機能向上を示した。以上の知見は学術論文として発表した (Yoshikawa et al. Blood 2022)。

一方、固形がんモデルにおける腫瘍局所における PRDM1 ノックアウト CAR-T 細胞の解析を通じて、疲弊形質が高まることを確認した。特に転写制御因子 TOX の発現がコントロールよりもむしろ上昇していたことから、特に固形がんに対する治療局面では PRDM1 ノックアウトに加えて疲弊耐性を付与するための修飾が必要であることが示唆された。そこで、PRDM1 (Blimp-1) が関与するエピジェネティック因子複合体に着目して、構成因子の追加修飾 (ノックアウト) による効果を個別に調べたところ、幹細胞様メモリーの維持増幅に寄与するとして遺伝子 A を同定した。同因子と PRDM1 を同時に CRISPR/Cas9 によりノックアウトすることで、さらに T 細胞の未分化形質維持が亢進すること、細胞増殖には有意な変化がないことを確認した。さらに意外なことに、細胞傷害活性は PRDM1 ノックアウトにより低下するが、遺伝子 A のノックアウトによりコントロールと同等のレベルまで回復することを確認した。CD19 を標的とした *in vivo* 治療モデルで遺伝子修飾による治療効果の改善を示した (図 1A)。その際、二重ノックアウト CAR-T 細胞は末梢血中に経時的に高い割合で検出され、上記の *in vitro* での結果を客観的に裏付けることができた (図 1B)。転写ネットワーク解析については網羅的な遺伝子発現プロファイル RNA シークエンスにより取得した。既に PRDM1 ノックアウトにより広範な遺伝子発現変化が起こることを報告しているが、Gene A のノックアウト、及びダブルノックアウトにより、さらに異なる遺伝子発現プロファイルを獲得することが示唆された (図 2A)。メモリー関連の遺伝子セットを用いてエンリッチメント解析を行うと、PRDM1 ノックアウトと比較しても同遺伝子群の発現上昇傾向が示された (図 2B)。エピゲノム変化について、ATAC シークエンスを行ったところ、興味深いことに gene A のノックアウトでは顕著なクロマチン開閉状態の変化は起こらなかった。すなわち gene A はエピゲノムレベルでの変化よりも、むしろ転写因子として遺伝子発現プロファイルを変化させることが主要な働きであることが示唆された。

また、本研究の遂行過程では、T 細胞における CRISPR/Cas9 によるノックアウトを多用した。培養 T 細胞において効率的なノックアウトを行える最適な標的配列の決定方法について確立された方法がないが、T 細胞のエピゲノムプロファイルがノックアウト効率に影響することを見出した。同プロファイルと既存の予測アルゴリズムを組み合わせることで、効率良い標的決定方法を技術的知見として確立した (図 3; Ito et al. Nucleic Acid Res 2024)。

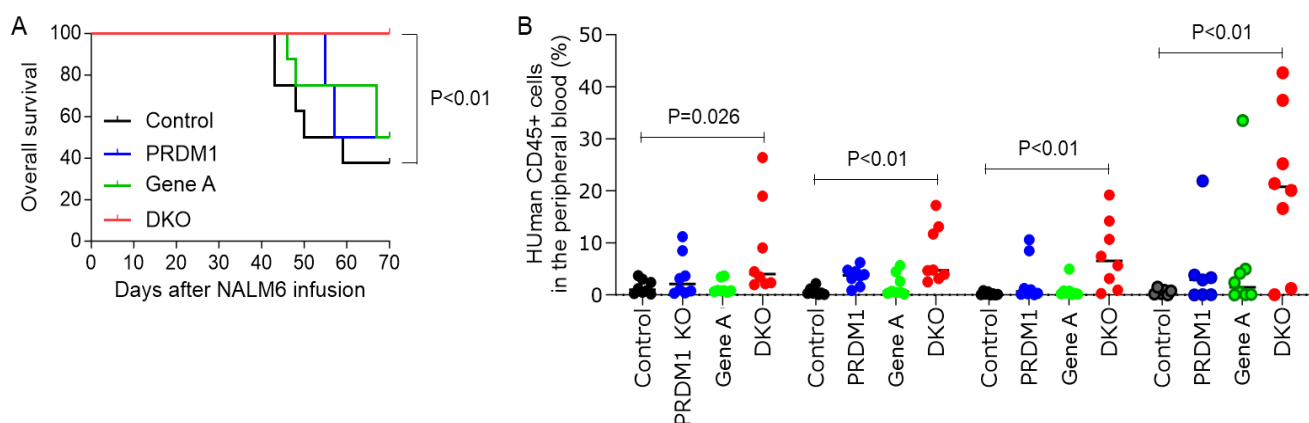


図 1. CD19 陽性白血病細胞株 NALM-6 を CD19 に対する CAR-T 細胞で治療するモデル。(A) PRDM1, Gene A を同時にノックアウトすることで(DKO)、高い治療効果が示された。(B) 末梢血中の CAR-T 細胞の存続を見ると、DKO CAR-T 細胞で高い生存能が確認された。

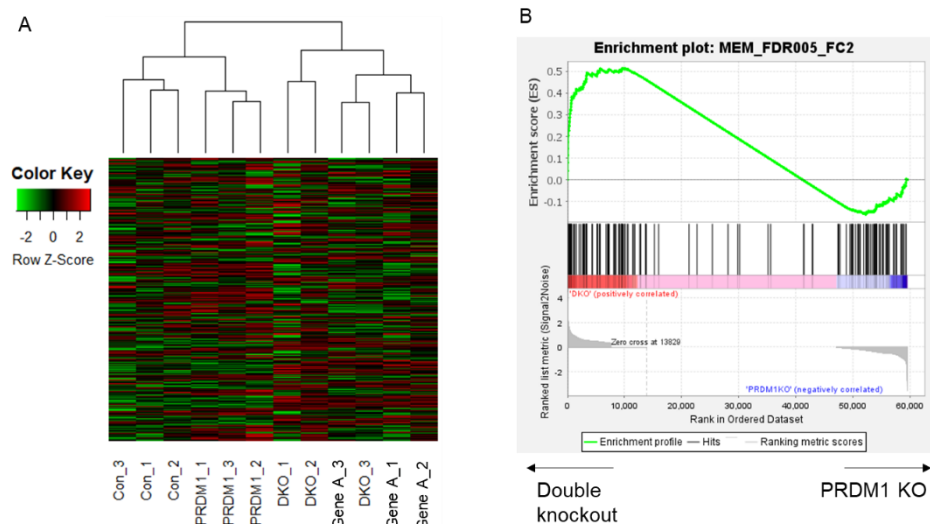


図 2. RNA シーケンス解析で、遺伝子発現プロファイルを取得した。二重修飾 CAR-T 細胞は元の PRDM1 単独ノックアウトと比較してドナーの違いによらない異なる遺伝子発現プロファイルを獲得し (A)、特に未分化メモリー形質に特徴的な遺伝子群の上昇を来すことが示唆された (B)。

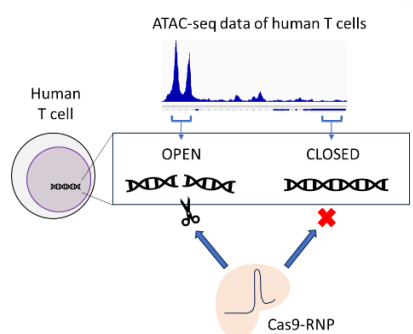


図 3. CAR-T 細胞の ATAC-seq データから標的配列のアクセスしやすさを定量し、スコアとして算出した。同スコアを既存のアルゴリズムと組み合わせることで、効率良いノックアウトが可能な標的配列の同定方法を確認した (Ito et al. Nucleic Acid Res 2024)。

CD19 以外の標的としては、固形腫瘍における有望な標的抗原の 1 つである GD2 に対する CAR-T 細胞での試験を行った。図 4 に示すように、CD19 に対する CAR-T 細胞で見られた NALM6-GD2 細胞に対する顕著な改善効果はなかったが、二重ノックアウト CAR-T 細胞において、コントロールと比較すると有意な治療効果の改善を確認した (図 4A, B)。再発した NALM6-GD2 細胞を解析すると、GD2 の発現がなく、antigen escape による CAR-T 細胞による逃避機構が働いていることが再発原因として示唆された。TOX などの疲弊関連分子の発現は gene A ノックアウトにより改善しており、固形癌モデルにおいても持続的効果を誘導し得ることが示された。

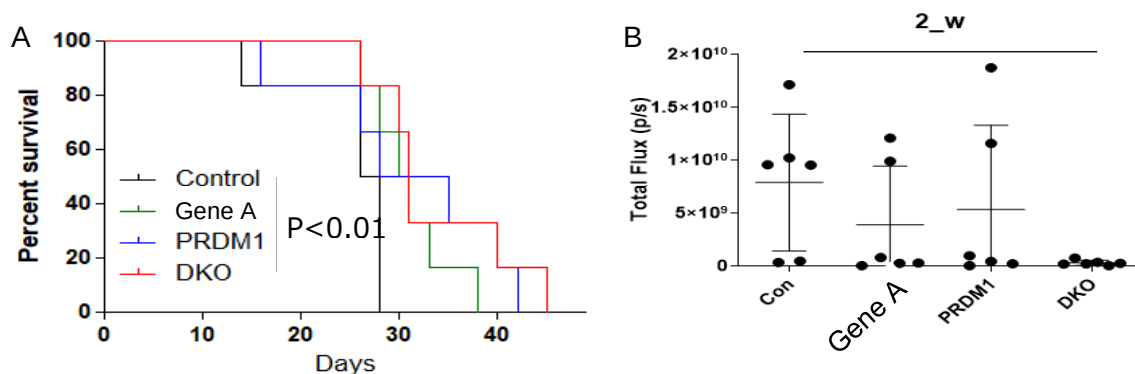


図 4. GD2 を発現するよう改変した NALM6 を GD2 に対する CAR-T 細胞で治療するモデルで、二重改変 CAR-T 細胞は有意な改善効果を示した (A)。 (B) ルシフェラーゼ遺伝子を導入した NALM6-GD2 の腫瘍量を in vivo imaging によりモニターしたところ、治療経過中は二重ノックアウトにより高い抗腫瘍効果が見られた。

【英文】

In this study, we aimed to improve the efficacy of chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cell therapy by enhancing the self-renewal ability of CAR-T cells through genetic modification of epigenetic factors, thereby achieving massive amplification of CAR-T cells while maintaining the undifferentiated memory state. We have recently identified that genetic ablation of the PRDM1 gene helps to maintain an undifferentiated memory phenotype. Based on this finding, we further focused on the PRDM1-related factors to find an optimal combination for genetic modification.

First, in the first year, we conducted a detailed analysis of CAR-T cell function following PRDM1 knockout. We have confirmed that PRDM1 knockout by CRISPR/Cas9 in anti-CD19 CAR-T cells leads to extensive changes in gene expression and epigenomic profiles by RNA sequencing and ATAC sequencing. We also found similar effects of PRDM1 knockout in CAR-T cells against mesothelin and GD2, which are representative target antigens for solid tumors. In addition, we investigated the therapeutic efficacy of PRDM1-knockout CAR-T cells in multiple tumor models targeting the above antigen and showed their superior long-term survival capacity and sustained anti-tumor effects compared to control CAR-T cells. Moreover, we also confirmed similar functional improvements upon PRDM1 knockout in TCR-T cells and tumor infiltrating lymphocytes (TILs). These findings were published in a peer-reviewed paper (Yoshikawa et al. Blood 2022). On the other hand, through analysis of PRDM1-knockout CAR-T cells at the tumor site in solid tumor models, we found that PRDM1 knockout did not prevent CAR-T cell exhaustion. The expression levels of the transcriptional regulators TOX and TOX2 were elevated in PRDM1-knockout CAR-T cells compared to those in control CAR-T cells, suggesting that further modifications to confer resistance to exhaustion are necessary in addition to PRDM1 knockout, especially in the context of the solid tumor treatment. Focusing on the epigenetic factors involving PRDM1 (Blimp-1), we examined the effects of individual gene knockout of the component factors. We demonstrated that the knockout of gene A contributed to the maintenance and amplification of stem cell-like memory T cells. Simultaneous knockout of PRDM1 and gene A by the CRISPR/Cas9 system further enhanced the maintenance of the undifferentiated memory phenotype in CAR-T cells without affecting T-cell proliferation. Surprisingly, we also confirmed that the cytotoxic activity, which is reduced by PRDM1 knockout, is rather restored to levels comparable to the control CAR-T cells by additional knockout of the gene A. An *in vivo* model to treat CD19⁺ leukemia cells using anti-CD19 CAR-T cells demonstrated improved therapeutic efficacy of the double-knockout (DKO) CAR-T cells. The DKO CAR-T cells persisted in the peripheral blood significantly better than control or single-knockout CAR-T cells.

We also analyzed gene expression profiles orchestrated by DKO CAR-T cells. RNA sequencing analysis revealed that the knockout of gene A formed distinct gene expression profiles from control and PRDM1 single-knockout CAR-T cells. Gene set enrichment analysis (GSEA) using the memory-associated gene set showed a trend toward increased expression of the memory genes in DKO CAR-T cells compared to PRDM1-knockout CAR-T cells. We also analyzed epigenetic profiles by ATAC sequencing. Interestingly, the gene A knockout did not induce a marked change in chromatin accessibility compared to control CAR-T cells. These results suggest that the primary consequence of the gene A ablation is to alter gene expression profiles rather than to remodel the epigenetic architecture.

Throughout this study, we extensively used CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in cultured T cells. Although there is no established method for determining the optimal guide RNA sequence for efficient knockout in cultured T cells, we found that the epigenomic profile of T cells significantly affects the knockout efficiency. By combining this epigenetic score with the available prediction algorithms based on the sequence patterns, we established a novel algorithm to identify efficient guide RNA sequences for optimal gene editing (Ito et al. Nucleic Acid Res 2024).

We also examined the effect of double knockout in CAR-T cells against GD2, one of the promising target antigens in solid tumors. DKO CAR-T cells against GD2 did not show a marked therapeutic advantage compared to control CAR-T cells when analyzed in the NALM6-GD2 tumor model. Nevertheless, we observed a significant reduction of the tumor burden in

the mice treated with DKO CAR-T cells compared to those treated with control CAR-T cells. Autopsy analysis of relapsed NALM6-GD2 cells showed diminished GD2 expression, suggesting that the escape mechanism by CAR-T cells through downregulation of the target antigen was the main cause of the relapse. These results indicate that the gene A and PRDM1 knockout can enhance the antitumor efficacy of CAR-T cells against solid tumors.