

(報告様式4)

【課題管理番号 16cm0106320h0001】

平成29年 5月 30日

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 次世代ゲノム編集技術を用いた次世代がん免疫細胞療法の開発  
(英語) Development of next-generation cancer immunotherapy using novel generation genome editing technique
- 研究開発担当者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院 特任助教 大内 靖夫  
(英語) Department of Mucosal Immunology, School of Medicine, Chiba University, Assistant professor, Yasuo Ouchi
- 実施期間： 平成28年 9月 1日 ～ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) ヒト CD8+T 細胞に対するゲノム編集の確立とがん免疫逃避機構による制御を受けない、高活性なヒトがん抗原特異的細胞障害性 T 細胞の作成
- 開発課題名： (英語) Development of an efficient genome editing technique in human CD8+ T-cells, and efficient generation of tumour antigen-specific CD8+ T-cells that can neutralize the tumour-induced immune suppression.
- 研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院・医学部 粘膜免疫学 特任助教 大内 靖夫  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Mucosal Immunology, School of Medicine, Chiba University, Assistant professor, Yasuo Ouchi
- 分担研究 (日本語) ヒト CD8+T 細胞における高効率ゲノム編集を可能とするゲノム編集ツールの開発
- 開発課題名： (英語) Development of novel genome editing tool that can achieve efficient genome editing in human CD8+ T-cells

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻  
助教 西増 弘志

所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Biological Sciences, Graduate School of Science,  
The University of Tokyo,  
Assistant professor, Hiroshi Nishimasu

分担研究 (日本語) タンパク質立体構造モデリング技術を用いたがん抗原認識機構の評価  
技術の開発

開発課題名 : (英 語) Development of computational protein 3D structure modelling and  
scoring system of TCR/pMHC complex for prediction of immune  
response against tumour antigen

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学医科学研究所・機能解析イン・シリコ分野  
講師 Ashwini Patil

所属 役職 氏名 : (英 語) Human Genome Center, The Institute of Medical Science,  
The University of Tokyo,  
Lecturer, Ashwini Patil

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

ヒト CD8+T 細胞に対する高効率ゲノム編集を実現し、がん抗原特異的 CD8+T 細胞を作成する技術を開発するため、研究代表である大内靖夫 特任助教 (千葉大学大学院医学研究院・医学部 粘膜免疫学) らは、研究計画に従い、ヒト CD8+T 細胞に対して、リコンビナント GFP タンパク質を用いて、電気穿孔法を用いたタンパク質細胞内導入法の条件検討を行った結果、最大 87% の導入効率で GFP タンパク質を導入できる条件を得た。

また、西増 弘志 助教 (東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻) らのグループは、核内移行シグナルを導入したリコンビナント改良型 spCas9 タンパク質を作成し、電気穿孔法での導入に適した純度で改良型 spCas9 タンパク質を精製した。続いて、ヒト TCR 定常領域、PD-1 遺伝子に対する gRNA を作成し、得られたリコンビナント改良型 spCas9 タンパク質を用いて、in vitro での切断実験を行うことで、これらの gRNA により標的遺伝子の切断が行えることを確認した。次にこれらの gRNA とリコンビナント改良型 spCas9 タンパク質の複合体を形成させて、前述の条件にて、ヒト CD8+T 細胞に対して、電気穿孔法を用いて細胞内に導入した結果、TCR および PD-1 遺伝子欠損 T 細胞の作成に成功した。また、遺伝子の knockin に用いる相同性配向型修復 (HDR) ターゲティングベクターを複数、設計、構築した。今後、より詳細な条件検討を行い、ヒト CD8+T 細胞に対して最適な高効率ゲノム編集条件を得る予定である。

一方、CD8+T 細胞のがん細胞に対する免疫反応性を迅速に評価するシステムの実現を目指し、Ashwini Patil 講師 (東京大学医科学研究所・機能解析イン・シリコ分野) とともに、タンパク質立体構造モデリング技術を用いたがん抗原認識機構の評価技術の開発を行った。その結果、ヒト TCR に対する TCR/pMHC I 複合体立体構造モデリングシステムを構築した。続いて国外の研究グループが同定したヒト悪性黒色腫特異的 TCR に対する、高次構造モデリング解析を行った結果、本 TCR は構造に問題があり、十分な免疫反応を惹起できない可能性が示唆された。現在、本モデリングシステムのスーパーコンピューターを用いた自動処理化を進めている。また同時に、既報のがん抗原特異的 TCR に対して、それぞれのがん抗原 HLA 複合体への結合の解析を進めている。

## 英文

In accordance with the initial research plan, to develop efficient genome editing technique in human primary CD8+ T cells, and to generate tumour-antigen specific CD8+T cells, Dr. Yasuo Ouchi's group (Department of Mucosal Immunology, School of Medicine, Chiba University) searched for the best condition for the electroporation-based protein delivery into human CD8+T cells using recombinant GFP protein. From this analysis, Dr. Yasuo Ouchi's group find out an optimal cell and electroporation condition that enables highly efficient protein delivery (Max. 87%) into primary human CD8+T cells.

On the other hand, Dr Hiroshi Nishimasu 's group (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo) generated recombinant spCas9-NLS (Nuclear Localization Sequence) protein and purified the protein at a suitable purity for the electroporation. Next, Dr. Yasuo Ouchi's group design the gRNAs that targeting constant region of TCR $\alpha/\beta$  and PD-1 gene, and generated the gRNA using in vitro transcription reaction. To check the target gene cleavage ability of these gRNAs, recombinant spCas9-NLS protein and gRNA complex were formed in vitro, and mixed with the PCR amplified target DNA fragments. From this result, we confirmed that the genomic region of the constant region of TCR $\alpha/\beta$  and PD-1 gene can be efficiently cleavage by the gRNAs and spCas9-NLS protein. Moreover, using the protein delivery condition mentioned above, these gRNA/spCas9 complexes were delivered into human primary CD8+T cells, and succeeded in the generation of TCR and PD-1 gene knockout CD8+T cells. In addition, Dr. Yasuo Ouchi's group design and developed several types of HDR (Homology-Directed Repair)-mediated gene targeting vector for the gene knock-in. In the future, Dr. Yasuo Ouchi's group will develop a more optimal condition for genome editing in human CD8+T cells from the detailed condition optimization.

To develop a computer-based rapid immune response prediction system for human CD8+T cells against tumour antigen, Dr. Yasuo Ouchi and Dr. Ashwini Patil's group (Human Genome Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo) developed semi-automatic 3D protein structure modelling system for the TCR/pMHC complex that can enables us to provide a structural insight into the recognition of antigen by the TCR. Using this system, Dr. Yasuo Ouchi and Dr. Ashwini Patil's group predicted the 3D protein structure of previously reported melanoma antigen-specific TCR/ pHLA complex, and found some structural errors of this TCR molecule. In the future, Dr. Ashwini's group will automate this modelling system using a supercomputer. In addition, Dr. Ashwini's group is now investigating the structure of other previously reported tumour antigen-specific TCRs.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1. “Crystal Structure of the Minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems.”

Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, Hirano H, Ran FA, Nakane T, Ishitani R, Zhang F, Nishimasu H, Nureki O.

Mol Cell. 2017 Mar 16;65(6):1109-1121.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.007.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “Generation of tumor-specific cytotoxic T cells via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing”, ポスター, Yasuo Ouchi, Patil Ashwini, Satoshi Uematsu, GP フォーラム, 千葉大, 2016/11/14, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし