

CAR 構造改変体の作製と機能解析に資する基盤技術の確立

岡田直貴

大阪大学大学院 薬学研究科

【研究の背景】

近年、キメラ抗原受容体発現 T (CAR-T) 細胞を用いた免疫療法の開発が活況を呈しており、特に血液がんに対する優れた臨床効果が報告されて以降、欧米では本療法の臨床試験が数多く計画・実施されている。しかし、CAR-T 研究の歴史は浅いため、機能発現に最適な CAR の構造や標的分子に関する情報は乏しく、CAR-T 細胞の機能や体内動態に関する解析も進んでいない。すなわち、CAR 構造-機能連関を体系的に解析するシステムの構築、ならびに各種 CAR 構造改変体の作製と機能解析に資する基盤技術の確立が強く望まれている。

【目 的】

我々は、腫瘍新生血管に対して標的指向性と傷害活性を発揮する CAR-T 細胞を創製することによって、固形がんをターゲットした有効性・汎用性・利便性に優れる新規 CAR-T 細胞療法の開発に成功した^{1,2)}。この有望な新規 CAR-T 細胞療法の臨床応用を実現すべく、現在、ヒトにおける安全性・有効性を検証する臨床研究の準備を進めている。しかし、CAR-T 細胞の品質や性能を最適化するための情報は乏しいため、本研究では CAR の構造と機能との連関を解析するために有用な基盤技術・手法の確立、およびそれらを用いた CAR-T 細胞療法の有効性・安全性の理論的根拠となる基礎情報の集積を図った。

【方 法】

1. マウス CAR-T 細胞の作製

各種構造改変 CAR 遺伝子と Puromycin 耐性遺伝子を搭載したレトロウイルスベクター (Rv) を構築した。本研究で使用した構造改変 CAR の表記とコンストラクトを図 1 にまとめた。C57BL/6 マウスから調製した脾細胞・リンパ節細胞に Rv 遺伝子導入を行い、Puromycin 存在下で選択培養することにより各種構造改変 CAR-T 細胞を得た³⁾。

2. CAR 発現解析

各種構造改変 CAR の N 末端側には HA-tag を挿入しており、抗 HA 抗体を用いたフローサイトメトリー解析により CAR 発現強度を評価した。また、各種構造改変 CAR-T 細胞より抽出した total RNA について定量的 RT-PCR を行い、細胞内 CAR-mRNA 量を定量した。

3. CAR-T 細胞の機能解析

遺伝子導入 4 日後の CAR-T 細胞を標的抗原で刺激した際の増殖能を BrdU uptake 法により、サイトカイン分泌能を ELISA によりそれぞれ評価した。抗原特異的な細胞傷害活性については、異なる蛍光試薬で標識した Positive target 細胞と Negative target 細胞を CAR-T 細胞と共培養し、フローサイトメトリー解析における Negative target 生細胞数に対する Positive target 生細胞数の比に基づいて傷害活性を算出した。

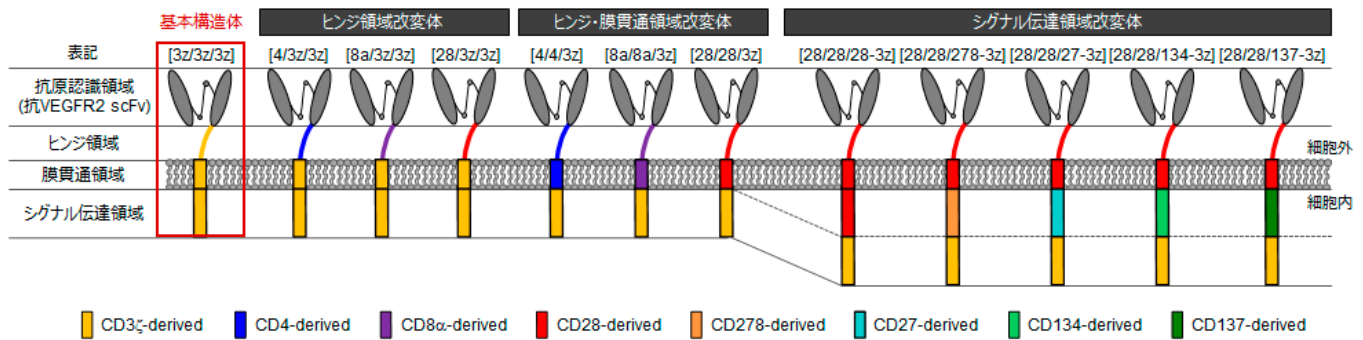


図 1 各種構造改変CARコンストラクト

【結 果】

1. HD 改変 CAR の構造活性相関

基本構造体の CAR [3z/3z/3z] と比較して、HD を CD8 α あるいは CD28 由来のコンポーネントに置換することによって CAR の発現強度はわずかに上昇した。細胞内 CAR-mRNA 量に HD 改変による変化は認められなかった。CAR 分子の機能発現強度は、HD を CD4 あるいは CD8 α 由来のコンポーネントに置換することによって低下し、CD28 に置換した場合には増強された。

2. HD/TMD 改変 CAR の構造活性相関

基本構造体の CAR [3z/3z/3z] と比較して、HD/TMD の改変体はいずれも CAR 発現強度が増加し、その効果は CD8 α あるいは CD28 由来 HD/TMD への置換で顕著であった。HD/TMD 改変は細胞内 CAR-mRNA 量に影響を与えなかった。CAR 分子の機能発現強度は、HD/TMD を CD4 あるいは CD28 由来のコンポーネントへ置換しても変化しなかったが、CD8 α 由来コンポーネントへの置換によって低下した。

3. STD 改変 CAR の構造活性相関

HD/TMD 改変体のなかで最も発現強度に優れた CAR [28/28/3z] に種々の免疫機能分子由来 STD を追加した 5 種類の STD 改変体は、いずれも CAR [28/28/3z] と比較して発現強度がわずかに低下した。細胞内 CAR-mRNA 量は STD 改変によって影響を受けなかった。CAR 分子の機能発現強度は STD 改変体のいずれにおいても増加し、特に CD28 由来 STD を追加した CAR [28/28/28-3z] において顕著であった。

【考 察】

本研究より、CAR の T 細胞における発現レベルと機能発現強度は、CAR 構造の各コンポーネントに使用したオリジナル分子の膜発現様式やシグナル伝達特性を引き継いでいる可能性が示唆された。今後 CAR 構造活性相関解析をさらに推し進めるためには、各種構造改変 CAR の膜発現様式や安定性(ターンオーバー)の精査と、シグナル伝達効率・強度を評価する方法論の導入が不可欠である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CAR 構造活性相関に関する基礎情報の集積は、高い有効性と安全性を兼ね備えた CAR-T 細胞医薬の創製につながる CAR 設計・構築法の基盤になるものと確信している。

【参考・引用文献】

- 1) Kanagawa N., et al., *Cancer Gene Ther.*, **20**, 57-64 (2013)
- 2) Inoo K., et al., *Mol. Ther. - Oncolytics*, **3**, 16024 (2016)
- 3) Kusabuka H., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **473**, 73-79 (2016)