

人工受容体研究によって挑む炎症と腫瘍の制御

知念孝敏

九州大学 病態制御内科学

【研究の背景】

化学療法の進歩や新たな免疫調整薬の登場にも関わらず悪性腫瘍を完治せしめる事は現状極めて困難である。腫瘍を攻撃する性質を持つ免疫細胞である CD8 陽性 T 細胞やナチュラルキラー細胞に人為的な改変を加え、人工受容体を発現させ腫瘍への集積効率を高め、もしくは抗腫瘍活性を強化し、これを患者体内に戻すという新たな細胞療法 (CART 細胞療法) が開発され、一定の成果を収めている。しかしながら、有効な癌腫には限りがあり、治療抵抗性や高頻度の再発にどう対処するかを含め、新たな課題が山積の状況である。

一方で、自己免疫疾患や炎症性腸疾患などの難治性炎症性疾患においても、従来の免疫抑制療法では対処困難な症例に対し、免疫抑制能を有する細胞を用いて同様の細胞療法を展開できないかという考えがある。このような現状において、より高機能、高活性の人工受容体発現細胞を取得する新たな工夫が求められている。

【目 的】

本研究の目的は、マウス骨髄細胞もしくは T 前駆細胞に、任意のキメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor; CAR) 遺伝子を組み込み、マウス胸腺において CAR 発現 T 細胞を分化させる事を試みるものである。胸腺における CAR 発現細胞の分化条件を探ること、分化した CAR 発現細胞の特性を調べる事を主眼とし研究を行う。

【方 法】

T 細胞受容体を欠損するマウスである TCR β TCR δ 二重欠損マウスの骨髄細胞に、レトロウィルスを用いて CAR 発現コンストラクトを組み込んだ。この際、生理的な T 細胞と同様のタイミングで胸腺内において CAR を発現させるために、CAR のコード領域の前に翻訳停止型の STOP カセットを置き、この STOP カセットが RAG 遺伝子産物の作用で除去されるように工夫を加えた。この手法の陽性コントロールとして CAR の代わりに OT-II マウス由来の TCR β 鎖を組み込んだコンストラクトも作成した。CAR の認識する抗原として、胸腺内に存在する抗原である CD45.2 と胸腺内に殆ど存在しない抗原である CD19 を選び、これらの抗原と結合する一本鎖可変領域 (scFv) を CAR に組み込んだ。CAR の基本骨格としては CD28 と CD3z の細胞内領域を組み込んだオーソドックスなものを選択した。このように遺伝子改変を加えた骨髄細胞を、別の TCR β TCR δ 二重欠損マウスに移入し、6 週間後に胸腺、脾臓、末梢リンパ節における CAR 発現細胞の出現の有無を調べた。

【結 果】

RAG 遺伝子産物の発現により STOP カセットが除去され CAR が発現するコンストラクトのシステムについては、培養細胞で RAG (RAG1 および RAG2) の強制発現を行い、予定通り動作する事 (RAG 非存在下では CAR が発現せず、RAG 存在下においてのみ CAR の発現が誘導される事) を確認した。マウスを用いた移入実験に関しては、陽性コントロールとして用いた OT-II マウス由来の TCR β 鎖を組み込んだ TCR β TCR δ 二重欠損マウスの骨髄細胞は、内因性の TCR α 鎖と会合する事で機能的な TCR を発現し、胸腺において、CD4/CD8 double negative \rightarrow double positive \rightarrow CD4 or CD8 single positive

と進み、末梢においてはエフェクターT細胞と制御性T細胞の両者の出現が認められた。これは TCR β 鎖を組み込んだ骨髄細胞が正常な分化を遂げる事を示しており、移入実験のシステムに問題が無い事が確認された。CD19 を認識する CAR を組み込んだ骨髄細胞は、胸腺において CAR を発現した細胞が CD4/CD8 double positive の段階までは進むものの、末梢においては CAR 発現細胞は殆ど認められず、リンパ節も低形成のままだった。CD19 は胸腺に殆ど発現しておらず、正の選択がかからず CAR 陽性細胞が胸腺において死滅している可能性が考えられた。これを裏付けるように、胸腺において RAG 遺伝子産物の作用で CD19 を発現するように改変した骨髄細胞を同時に移入したマウスでは、CAR 陽性細胞の末梢への出現が確認された。

一方、胸腺にも豊富に存在する抗原である CD45.2 を認識する CAR を組み込んだ骨髄細胞を移入したマウスでは、リンパ節の発達が認められ、CAR 陽性細胞の出現も認められた。これらの CAR 陽性細胞は CD4/CD8 double negative であったが、Thy1 陽性であり、PMA/イオノマイシン刺激により IFN γ を産生し、エフェクターT細胞様の細胞に分化していると考えられた。制御性T細胞への分化は一切認められなかった。胸腺においては負の選択が盛んに起こっている事を反映してか、抗 CD19CAR 発現細胞では見られたような CD4/CD8 double positive の細胞が全く認められず、多くは double negative であり、一部 CD8 single positive が認められた。末梢においてはこの CD8 single positive が認められない事を考えると、抗 CD45.2CAR を発現する胸腺細胞は、double positive の段階で負の選択を受けつつ一部が一過性に CD8 を発現し、その後 double negative の状態に戻ったものが末梢へ分布しているものと考えられた。

【考 察】

本研究では、胸腺における CAR 発現細胞の分化条件とそうにして分化した CAR 発現細胞の性質を知る事を主たる目的としているが、試みに CD28CD3z 型の CAR を用い、scFv として CD19, CD45.2 を認識するものを用いて検討を行った。今回の検討では 1. 胸腺において scFv の認識する抗原が存在しないと CAR 発現細胞の分化が起らない 2. 胸腺に対応抗原が存在する場合には分化が見られ、CD4/CD8 陰性のエフェクターT細胞様に分化するという傾向が見られたが、こうした法則が他の scFv にも当てはまるのか、CAR の基本骨格を変更した場合に異なる現象が見られないのかについて更に突き詰めた実験を行いたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

造血系悪性腫瘍に対しては CART 細胞療法が一定の成果を挙げているが、細胞療法の分野そのものがいまだ開発初期の段階にある。CART 療法に関しては、治療後の再発、固形腫瘍に対する有効性の低さ、医療経済学的な議論など、様々な問題を抱えており、新たなブレイクスルーが求められている。炎症制御への応用に関しては制御性T細胞の利用が一つの主軸となりうるが、良性疾患に対する細胞療法の展開そのものの障壁が高く、臨床応用には至っていない。このような現状において、新たな機能を有する可能性を秘める人工受容体発現細胞の生体内分化の道筋を探る事は、将来への備えとして十分な臨床的意義を有するものとする。本研究は未だ基礎研究初期の段階であるが、今後も研究を継続し、ヒト疾患治療の展開にあたり有益となりうる知見を蓄積したい。

【参考・引用文献】

- 1) Genetic engineering of T cells for immunotherapy
Gavin I. Ellis, Neil C. Sheppard, and James L. Riley. Nat Rev Genet. 2021 July ; 22(7): 427–447.
- 2) Mechanisms of resistance to chimeric antigen receptor–T cells in haematological malignancies
Marco Ruella, Felix Korell, Patrizia Porazzi, Marcela V Maus. Nat Rev Drug Discov . 2023 Dec;22(12):976–995.
- 3) CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn
Steven M Albelda. Nat Rev Clin Oncol. 2023 Oct 30.