

主論文の要旨

**Artificial T Cell Adaptor Molecule-Transduced TCR-T  
Cells Demonstrated Improved Proliferation Only  
When Transduced in a Higher Intensity**

人工 T 細胞アダプター分子を遺伝子導入した TCR-T 細胞は、  
より高い表面密度で遺伝子導入した場合にのみ増殖能の向上を示す

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

堺 寿保

## 【緒言】

腫瘍特異的 T cell receptor(TCR)を遺伝子導入した CTL(TCR-CTL)が臨床応用を試みられているが、腫瘍を標的とした臨床試験では十分な効果を上げられていない。その原因の一部は、CTL の細胞増殖が不良であることと、体内での CTL の持続時間が短いことである。これらの問題を解決するために、我々は CD3 $\zeta$ を基本骨格とし CD28 または 4-1BB の intracellular domain(ICD)を内部に組み込んだ artificial T cell adaptor molecule(ATAM)を開発した。TCR が HLA-ペプチド複合体と結合すると、細胞膜の荷電をよりどころにして CD3 $\zeta$ と TCR が複合体を形成し、supramolecular activation クラスターを形成し、いくつかの内在性アダプター分子を介して Lck、ZAP70 などの下流のシグナルを増強する。我々は先行研究において下流の活性化シグナルの増強に注目し、CD3 $\zeta$ -TCR 複合体に含まれる ATAM が、細胞内シグナルを増強させ、細胞増殖能を向上させることを示した。

CAR-T 細胞において、CD28、4-1BB などの共刺激因子を CAR-T 細胞の ICD に導入することで細胞増殖能と持続性の改善が得られ臨床的効果が得られた。本研究の ATAM の着想はこの成功から得られている。当初我々は、CAR-T 細胞の成功事例と同様に TCR  $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の ICD に直接 ATAM を結合させるコンストラクトを構築したが、CTL に発現させた遺伝子改変 TCR は正確な構造をとらず、抗原を認識することができなかった。

我々の先行研究において CD3 $\zeta$ に 4-1BB ICD を組み込んだアダプター分子を細胞膜に導入することで CTL の細胞増殖能を向上させることができることを示した。今回我々は将来の臨床応用を念頭に、実現可能かつ効率的な患者末梢血由来 T 細胞への TCR と ATAM を遺伝子導入する方法の確立を目的として、一度の遺伝子導入で腫瘍特異的 TCR と ATAM を同時に遺伝子導入できる all-in-one の virus vector の確立を試みた。結果として all-in-one の virus vector では期待した ATAM の有用性を観察できなかったが、ATAM の効果を得るためには、より高い表面密度の ATAM 発現が必要であることがわかった。

## 【結果】

TCR, ATAM, 細胞内領域を欠く遺伝子導入マーカーである EGFR(tEGFR)を T2A で結合させた cDNA をデザインした(one-virus-vector method [1vv method])(Fig.1A,B)。本研究では TCR は HLA-A2 に拘束性を持ち多発性骨髄腫、成人 T 細胞白血病／リンパ腫など多数の癌腫でがん抗原として確認されている NY-ESO-1 を標的とする TCR を用いた。TCR-ATAM を遺伝子導入した際に、TCR が正確な構造を構築し抗原を認識することを、SUP-T1(T 細胞性腫瘍細胞株)に遺伝子導入することで確認した(Fig.1C,D)。遺伝子導入マーカーとして用いた tEGFR は作成したコンストラクトすべてでほぼ同等の発現であった。

1vv method による CTL への ATAM 導入の効果を確認するために、healthy donor より分離した CD8 T 細胞に遺伝子導入を行い評価した。CD3/CD28 ビーズで刺激後、

day3-4 で TCR、ATAM を遺伝子導入し、day7 に磁気ビーズを用いた純化を行った。純化前の遺伝子導入効率は約 20%であり、純化後は 73-99%であった(Fig.1E,F)。day11 に凍結保存し、解凍後再刺激を行い下流の実験を行った。腫瘍に対するサイトカイン分泌を評価するために、intracellular cytokine assay、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行ったが、ATAM 導入によるサイトカイン産生の向上は認められなかった(Fig.2 A-C)。腫瘍細胞を用いた単回刺激による細胞増殖を評価したが、ATAM 導入による細胞増殖能の向上は認められなかった(Fig2.D)。CTL と腫瘍を 1:1 または 1:8 で共培養し、CTL と残存する腫瘍の比を経時的に測定することで腫瘍特異的細胞障害活性の評価を行ったが、ATAM 導入による細胞傷害活性の向上は確認できなかった(Fig2E,F)。

以前の研究では、4-1BB-ATAM を導入することで CTL の細胞増殖能の向上を認めたが、今回の 1vv method ではその効果を再現できなかった。1vv method で効果を得られなかった理由を深く探求するために、1vv method と先行研究で用いていた TCR-eGFP と ATAM-tEGFR の二つの virus vector を用いて遺伝子導入する two-virus-vector method (2vv method)を比較した(Fig.3A)。Jurkat に対し 1vv method、2vv method を用いて遺伝子導入を行い、1vv method では磁気ビーズを用い EGFR 陽性細胞を純化し、2vv method では cell sorter を用いて EGFR、eGFP の二重陽性細胞を分取し純化した。純化後の細胞を比較すると、ATAM と遺伝子として等量導入されている tEGFR の MFI は 1vv method で導入した CD28/CD3 $\zeta$  ATAM、4-1BB/CD3 $\zeta$  ATAM で低値であった(Fig.3B)。実際に蛋白発現している ATAM を抗 CD3 $\zeta$ 抗体を用いた Western blotting で比較すると、1vv method は 2vv method よりも一貫して発現が弱く、特に 4-1BB/CD3 $\zeta$  ATAM で顕著であった(Fig.3C)。これらのデータから、2vv method では 1vv method と比べより高い細胞表面密度の ATAM が導入できることがわかった。細胞表面の ATAM の濃度が転写因子活性に与える影響を評価するために、Jurkat reporter 細胞に遺伝子導入し、ATAM と等量遺伝子導入されている EGFR の発現量で分取した(Fig.4A)。分取した細胞の NY-ESO-1 TCR の発現は同等であった(Fig.4B)。LCL で刺激し転写因子活性を評価した。この実験で用いた Jurkat reporter 細胞は NF-kB が活性化されると CFP が発光するように遺伝子改変されており、CFP の発光を経時的に評価すると最も ATAM の細胞表面濃度が多い細胞が最も NF-kB の活性が強かった(Fig.4C)。LCL 刺激後 1 時間の細胞内リン酸化を flow cytometry を用いて評価すると、同じく最も ATAM の細胞表面濃度が多い細胞が、最も Erk、p53 のリン酸化が強いことが示された(Fig.4D)。

1vv method、2vv method の両方で TCR-CTL を作成し比較した。Jurkat における実験結果と同様に、2vv method を用いて産生された TCR-CTL の方が 1vv method と比べ、ATAM と等量遺伝子導入している EGFR の発現が高かった。(Fig.5A,B)。NY-ESO-1 TCR の発現は同等であった(Fig.5A)。腫瘍を用いた単回刺激を行い IL-7、IL-15 存在下での CTL の細胞増殖能の評価を行ったところ、ATAM の細胞表面濃度の低い 1vv method ではコントロールと比べ細胞増殖の向上は認められなかったが、ATAM の細胞表面密度が高い 2vv method では有意に細胞増殖能が向上した(Fig.5C)。

## 【考察】

本研究で 1vv method を用いて TCR と ATAM を一度に遺伝子導入することができたが、ATAM 導入による抗原刺激後の細胞増殖能の向上は確認できなかった。先行研究では 2vv method を用いており、1vv method で ATAM の効果が得られなかったメカニズムを解明するために 1vv method と 2vv method を比較した。

両者を比較した場合、Jurkat、CTL いずれにおいても 2vv での ATAM の細胞表面密度が 1vv と比べ高値であった。さらに Jurkat reporter 細胞では抗原刺激後のシグナル強度と ATAM の細胞表面密度の間には相関関係があった。1vv method において TCR と ATAM は T2A で結合され、2vv method においては TCR と ATAM が別々に遺伝子導入されている。遺伝子の長さは両者で異なっており、1vv method では 3.6kb、2vv method では 2.6kb と 1.7kb である。遺伝子導入効率とその導入後の密度は遺伝子導入される遺伝子の長さに大きく依存することが知られており、遺伝子の長さがより短い 2vv method は有利であった。しかし本研究で ATAM の効果が観察された 2vv method は、細胞純化に長時間が必要であり、得られる細胞数も少数であることから将来の臨床応用には不適であると考えている。ATAM の効果を得、さらに将来の臨床応用に有効な手法として、導入を目指す遺伝子の長さが遺伝子導入効率と相関しないと考えられている transposon 法などのウイルスを用いない遺伝子導入法や、二つのプロモーターを用いたベクターシステムが挙げられる。

ATAM の表面密度が低い 1vv method で ATAM の効果が観察できなかった理由の一つとして、内在性の CD3 $\zeta$  の存在が挙げられる。T 細胞表面には多数の内在性 CD3 $\zeta$  が発現しており、ATAM の効果が観察されるためには相当量の ATAM 導入が必要であった可能性がある。ATAM が細胞内シグナルを増強していても、その効果が内在性 CD3 $\zeta$  により希釈、干渉されその効果を観察することが難しかった可能性がある。Jurkat reporter 細胞を用いた実験で ATAM の細胞表面密度は直線的に高くなると推測されるが、実際に ATAM の効果が観察され細胞内シグナルが増強されたのは ATAM の細胞表面濃度がある閾値を超えた場合のみであった。したがって 2vv method ではより高い表面密度の ATAM が発現した細胞を作成できたゆえに、2vv method のみで ATAM の効果が観察できた可能性がある。内在性 CD3 $\zeta$  の希釈、干渉の可能性を除外するために、CRISPR-Cas9 などのゲノム編集技術を用いて CD3 $\zeta$  を knock out を検討しているが、ゲノム編集された T 細胞は生体内での安全性の担保が困難であり将来の臨床応用には課題が残っている。

## 【結語】

CTL に ATAM がより高い表面密度で遺伝子導入された場合に、その細胞増殖能の向上が認められる。1vv method と 2vv method を比較した場合、2vv method のみ高い ATAM の表面密度が得られるため ATAM の効果が観察される。