

# 蛋白質連結反応による多様な CAR-T の作製

山形大学大学院理工学研究科

真壁 幸樹

## 目的

キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)によるがん治療はがん組織特異的な免疫反応を誘導し、高い治療効果を持つと期待されている(図1)。本研究では、蛋白質工学技術によって、様々な標的に対する多様なCAR遺伝子を細胞に自在に導入する方法論の確立を目指した(図2)。これが実現すると、がんの転移やステージの変化によって新たに患者からCAR-T細胞を調整する必要がなく、最初に作った組換えT細胞を用いて標的抗原をスイッチさせたり、複数の抗原を認識できるCAR-T細胞を自在な比率で混合したりすることが可能となる。このため、高い治療効果、患者負担の軽減、医療費の削減などが期待できる。具体的には、申請者が開発を進めてきた抗体断片の分離インテインによる連結技術を用いて、モデル細胞上と抗体断片それぞれに分離インテインを融合発現させ、試験管内での連結反応によりCAR-T細胞を作り出す。

## 本研究に関連する国内外の研究動向

CAR-T細胞療法は治療抵抗性のがんに対して有効であることが示され、研究開発が進められている。その中でも、B細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)の患者に対するCD19を標的としたCAR-T細胞療法では今年3月に厚生労働省に薬事承認され「キムリア」として、国内初のCAR-T療法製剤が上市された。この時は患者一人あたり3000万円を超える費用もあり、大きく報道された。

最初のCARは1993年にEshharらが開発したscFvをCD3と鎖の細胞外ドメインに融合させたものである。これはマウスモデルでは良好な治療成績であったが実際の臨床試験では治療効果を示さなかった。そこで、T細胞活性化シグナルを増強させるために、CD28や4-1BBなどを細胞内ドメインにさらに連結し効果を高めた第2世代CARが開発された(キムリアもこの構成)。現在では、さらなるT細胞活性化を誘導するために3種類以上の細胞内シグナル領域を連結した第3世代CARの開発が進められている。

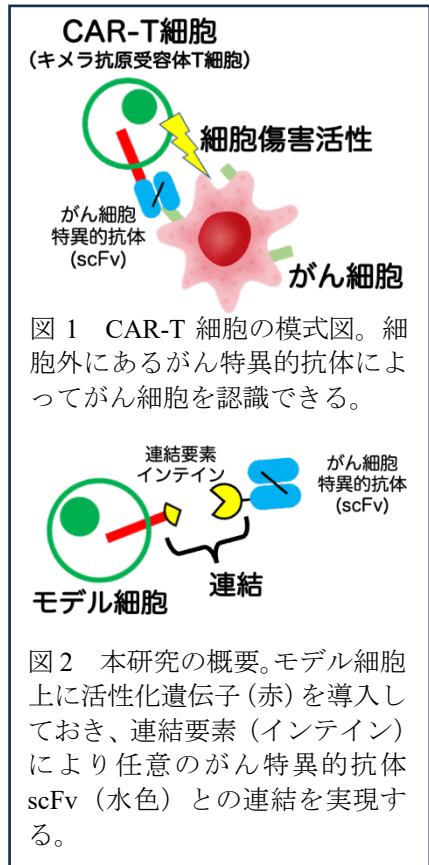
CD19を標的としたCAR-Tの研究が先行しており、問題点として約半数の患者では寛解後の再発が見られ、原因の一つに標的がん細胞からのCD19の消失があることがわかってきた。その場合には、新たに別の標的抗原であるCD22に対するCAR-T細胞を用いることなどが有効であることが示された。固形腫瘍に対するCAR-T療法の研究も進められており、その適用は広がっている。

このようなCAR-T細胞療法の研究に対して、本研究で実現を目指すT細胞遺伝子導入後のがん認識部位の自在な構築は、標的のスイッチングなど様々な現実の課題の克服に貢献できる。

## 結果

### 1. 遺伝子の設計

細胞とがん特異的抗体の連結には、蛋白質連結要素である分離インテインでの連結反応として設計した



(図2)。分離インテインの特徴として、反応後はインテイン部位が脱離するため、医薬品として応用を考えたときに抗原性などの問題が起こらない。分離インテインとして動物細胞での発現と安定性が高いCfaインテイン (*J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 7, 2162–2165) を用いた。がん特異的抗体の抗原認識領域からなるscFvのC末端にCfaインテインのN断片(CfaIntN)を融合し (scFv-CfaIntN)、細胞内活性化ドメインと膜貫通領域を持つ細胞導入遺伝子のN末端にCfaインテインのC断片(CfaIntC)を融合させる構成とした。また、CfaCが細胞表面に発現するときに安定に発現するように、CfaCのN末端側には発現タグとして、小型蛋白質Nanobodyを融合させた (図3)。

さらに、目的細胞に遺伝子が導入されたかを容易に判別できるように、細胞導入活性化シグナル遺伝子にはC末端に緑色蛍光蛋白質EGFRを融合させた。同様にがん特異的抗体scFvのN末端には連結反応の進行を観察するための赤色蛍光蛋白質DsRedを融合させた。

がん細胞特異的抗体として、様々ながんで広く発現する膜蛋白質である、上皮成長因子受容体 (EGFR) とHer2を標的とする抗体クローン528とHerceptinのscFvを用いた。

このようにして構築した遺伝子について、活性化シグナル遺伝子に関してはモデル細胞上での発現させ、がん特異的抗体scFvでは動物細胞組換え蛋白質として調製・精製を行った。そして、組換え細胞と抗体分子を任意に組み合わせ、溶液中で連結反応を行い、CAR遺伝子を導入したモデル細胞を作り出した。

## 2. がん細胞特異的抗体scFv-CfaIntNの調製

scFv-CfaIntNは前項で作製した、2種類の抗体それぞれの動物細胞発現ベクターをExpi293細胞に遺伝子導入して、組換え体蛋白質として調製した。scFv-CfaIntNにはC末端にポリヒスチジンタグを融合しているためNi-NTAカラムを用いて1ステップで精製を行った (図4)。ゲル電気泳動の結果から目的サンプルが単一バンドで精製されているのが確認できた。

## 3. 活性化遺伝子を導入したモデル細胞の構築

モデル細胞へ活性化遺伝子の導入を行った。本研究は最終的に血中のT細胞への適用を目標としているが、まずは培養が容易なセルラインを用いて本研究手法のProof-of-conceptの確立を行った。用いる細胞として、付着系のHEK-293細胞、CHO-K1細胞、T細胞セルラインとしてJurkat細胞、HPB-ALL細胞を用いた。遺伝子導入方法として、トランスフェクションと電圧ポレーションの2種類の方法を行った。トランスフェクション試薬として、PEIMAX試薬、Lipofectamine™ 3000 試薬、DreamFect™試薬、ViaFect™ Transfection試薬の4種類で遺伝子導入を行い、電圧ポレーションではNeon™ Transfection Systemを用いた。電圧ポレーションでは電圧、パルス長、パルス回数を変化させた24条件を試行した。

CHO-K1への遺伝子導入をトランスフェクションで

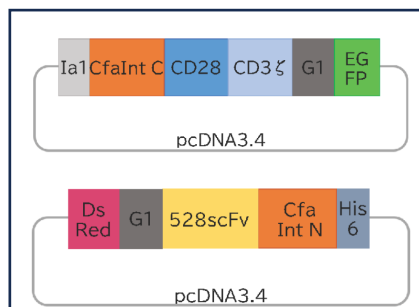


図3 本研究で作製した動物細胞発現ベクター。上: 細胞へ導入する活性化シグナル遺伝子。N末端側に発現タグ Nanobody (Ia1) と CfaIntC が融合している。また、C末端には緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を融合。下: がん特異的小型抗体 scFv に CfaIntN を融合した遺伝子。N末端に検出のための赤色蛍光蛋白質 DsRed が融合している。

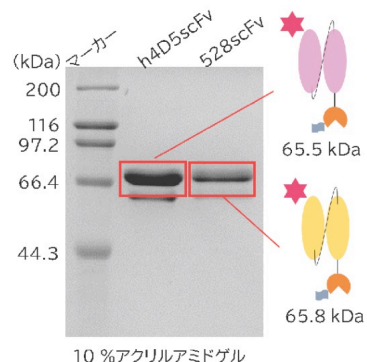


図4 がん特異的 scFv-IntN の組換え体発現。Ni-NTA カラムで精製を行った。

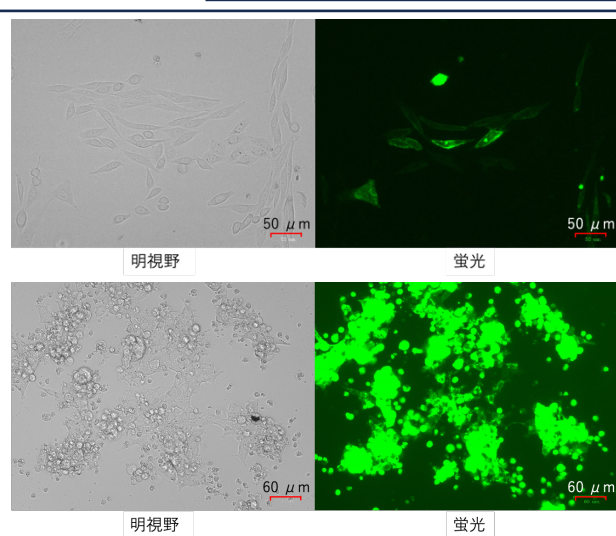


図5 活性化遺伝子の導入。導入は EGFP 蛍光で観察。上: CHO-K1 細胞へ電圧ポレーションで導入。下: HEK293 細胞へトランスフェクションによる導入。

行った結果、遺伝子導入をGFP蛍光で確認できたが、導入率と生細胞率が低かった。エレクトロポレーションによる遺伝子導入では生細胞率が高い状態で遺伝子導入できた(図5上)。さらに高い遺伝子導入効率を実現するために、遺伝子導入が比較的行いやすいHEK293細胞を用いて、トランスフェクションによる遺伝子導入を行ったところ、極めて高い導入効率で高い遺伝子発現に成功した(図5下)。

付着系のセルラインへの遺伝子導入に成功したため、CAR-T細胞と同じT細胞セルラインでの遺伝子導入を行った。T細胞セルラインとしてJurkat細胞、HPB-ALL細胞を用いた。トランスフェクションでは効率的な遺伝子導入ができなかったが、エレクトロポレーションによって、遺伝子の導入とその発現に成功した。Jurkat細胞における遺伝子発現による蛍光発光をフローサイトメトリーによって測定した結果を図6に示す。現在、遺伝子導入細胞のクローン化を進めている。

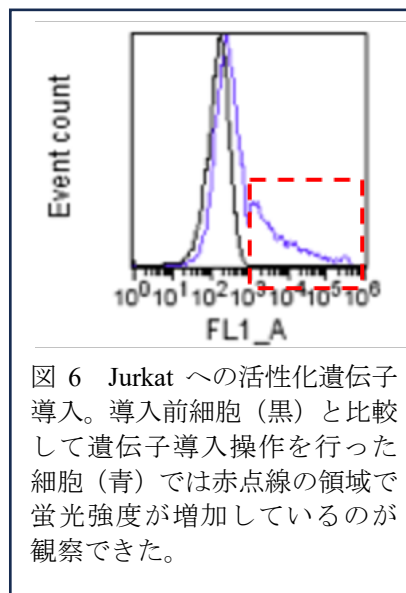


図6 Jurkat への活性化遺伝子導入。導入前細胞(黒)と比較して遺伝子導入操作を行った細胞(青)では赤点線の領域で蛍光強度が増加しているのが観察できた。

#### 4. モデル細胞上での連結反応

上記2.でがん特異的抗体scFv-CfaIntNの発現に成功し、3.にて活性化遺伝子にCfaIntCを融合させた遺伝子のモデル動物細胞上での発現に成功した。そこで、これらを混ぜ合わせて、細胞表面上に任意のがん特異的抗体scFvを連結させたCAR細胞の作製を行った。

活性化遺伝子を導入したモデル細胞として、最も効率よく遺伝子導入できた、トランスフェクションによる遺伝子導入HEK293細胞を用いて、がん特異的抗体scFvとして528およびHerceptinの2種類を用いた。

図7に結果を示す。2種類の抗体についてどちらも、活性化遺伝子を導入したHEK293細胞上で連結させることに成功した。

#### 考察と今後の展望

本研究によって、モデル細胞表面に活性化遺伝子とつながった蛋白質連結要素CfaIntCを発現させることを実現し、**任意のがん特異的抗体scFvと細胞表面上で連結させることに成功した**。モデル細胞として、遺伝子の導入しやすいHEK293細胞を用いて連結実験を進めたが、CAR-Tを実現するT細胞セルラインでのエレクトロポレーションによる活性化遺伝子の遺伝子導入にも成功した。今後は、本研究を継続し、T細胞セルライン上でのがん特異的抗体scFvとの連結を成功させたい。本研究を進めることで、本手法が確立し、一度患者からT細胞を取得すれば、自在に抗体分子を変化させたCAR-T細胞を創り出せるようになる。そこから、より効果の高い治療法の確立を実現したい。

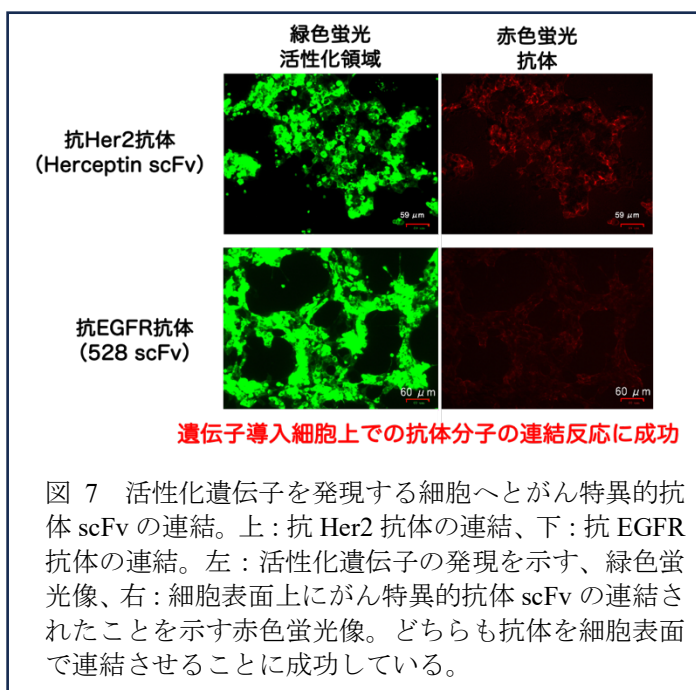


図7 活性化遺伝子を発現する細胞へとがん特異的抗体scFvの連結。上:抗Her2抗体の連結、下:抗EGFR抗体の連結。左:活性化遺伝子の発現を示す、緑色蛍光像、右:細胞表面上にがん特異的抗体scFvの連結されたことを示す赤色蛍光像。どちらも抗体を細胞表面で連結させることに成功している。