

研究報告書  
平成29年度：A課題

平成31年2月13日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 京都大学医学部附属病院  
輸血細胞治療部

住 所 京都市左京区聖護院川原町 54

研究者氏名 新井 康之



(研究課題)

CRISPR/Cas によるゲノム編集技術を用いた、効果増強型キメラ抗原受容体 (CAR) T細胞の開発

---

平成30年1月24日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたので  
ご報告いたします。

## 研究成果概要

米国国立衛生研究所

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

新井康之

研究課題名：CRISPR/Cas によるゲノム編集技術を用いた、効果増強型キメラ抗原受容体（CAR）T細胞の開発

研究内容：CAR-T 細胞は近年、がん免疫療法分野において長足の進歩を遂げている。我々は、ゲノム編集技術を用いて、CAR-T 細胞の寿命を延ばすことで、現時点では十分な効果を認めていない固形腫瘍にも有効な CAR-T の開発を試みた。

腫瘍細胞モデルは、もともとが免疫抑制状態であることから、CAR-T の機能が修飾されていると考え、免疫不全ではない通常のマウスを用いて、骨髄幹細胞をターゲットとする CAR-T を用いることで、より現実に近いモデルになると考えた。

本研究は、大きく分けて3つのステップに分けられる。(1) 造血幹細胞をターゲットとした CAR-T 細胞の作成、(2) *in vivo* におけるマウス対マウスの同種移植実験、(3) NOD-SCID マウスを用いた、異種グラフト（ヒト造血系）モデルを用いた実験である。

各ステップの詳細な計画は以下の通りである。(1) CAR-T の作成。造血幹細胞の特異的マーカーとして、*ckit*、*sca-1*、*CD34* を設定する。これらの抗体を作り出すハイブリドーマ細胞株を共同研究者から入手する。ハイブリドーマが産生する RNA を元に、抗体可変領域をコードする DNA 配列を決定し、CAR 細胞膜貫通部分、細胞内ドメインと連結させた二重鎖 DNA をレトロウイルスベクター内にクローニングする。複数の塩基配列が得られた場合には、複数個の CAR を作成し、実際に T 細胞を作成し、その機能を評価する。

(2) *In vivo* マウス・マウス間骨髄移植モデルの作成。CAR-T の作成が完了した後、*in vivo* モデルでの検討を行う。この系においてはレトロウイルスを感染させたマウス T 細胞、あるいは mRNA を導入した T 細胞を用いて、同系マウスに注射し、骨髄幹細胞数の動態、末梢血血球数の動きを評価する。また、骨髄における CAR-T 細胞の存在を確認する。

前処置としての有効性が確認できれば、数日後にドナー骨髄を輸注し、生着を確認する。その際には、*CD45.1* あるいは *CD45.2* の異なる表現系を持つマウスを用いる。末梢血ないし骨髄におけるキメリズムを確認し、生着の是非を評価する。これが出来れば、続いて慢性肉芽腫症マウスを用いて、正常骨髄の移植により、活性酸素産生能の回復が見られるかを確認する。

(3) 異種グラフトモデルを用いた検討。最終ステップとして、ヒト造血系を再現した NOD-SCID マウスを用いて、ヒトに対する CAR-T を用いて、前処置・生着が再現でき

るかを確認する。これは、ヒトにおける CAR-T 細胞を用いた骨髄移植治療の前臨床試験データとして、評価する。

このような計画のもと、マウス c-kit に対する CAR-T 作成から実験を開始した。マウス c-kit に対する特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞株 (ACK2) を共同研究者から入手し、そのメッセンジャーRNA を鋳型に、免疫グロブリン可変領域の DNA 塩基配列を RACE-PCR 法を用いて同定した。長鎖および短鎖可変領域を既知のリンカーで接続し、細胞膜貫通部分 (CD8) と、細胞内 T 細胞レセプター (CD28/3 $\zeta$ ) をつなぐことで CAR 構造を完成させ、これを既知のレトロウイルスベクターにクローニングした。

レトロウイルスベクターを作成した後、マウス脾臓から得られた T 細胞に感染させ、CAR の発現をフローサイトメトリーにおいて観察した。その結果、約 90% の細胞で CAR 構造を発現していることを確認した。

このように作成された CAR-T の細胞傷害活性を、in vitro 共培養実験で評価した。マウス ckit を発現する白血病細胞株を準備し、ckit CAR-T と 24 時間共培養した。その結果、ckit 陽性細胞のみが死滅し、CAR-T 細胞が特異的な細胞活性を持って機能していることを確認した。

続いて、in vivo マウス実験を行った。この中で、骨髄間質のケモカインである CXCL12 に対する受容体 CXCL4 を強制発現させることで、CAR-T を最も効率よく骨髄に誘導し、骨髄幹細胞を駆逐できることが分かった。この後、ドナー骨髄細胞を移植し、生着を実現できた。

異種グラフトモデルを用いた検討は、さらに時間を要する大規模な実験系になることから、来年度以降の新規課題とした。