

アプリケーションノートエンジニアリング細胞

高性能 CRISPR ガイドと 高感度の時間分解細胞 ベースアッセイの併用

細胞傷害性だけでは十分ではなく、
in vitro アッセイによる持続性と耐久性の評価も必要

免疫細胞ベースの治療法における最大の課題は、天然の免疫細胞と比べて性能特性を増強した細胞を安全に開発することです。この目標を完全に達成するためのプロセスはまだ初期段階にありますが、概念実証では、初めて承認された CAR-T 細胞療法である Kymriah や Yescarta^{1,2} といった代表的な治療法を超える成果が得られています。

CRISPR ゲノム編集システムは、生細胞のゲノムをかつてないほど簡単に書き換えるための非常に有効な精密ツールとして登場しました。しかし、その潜在能力を存分に引き出すためには、活性、安定性、特異性を高めて、きわめて小さな核内で高精度の編集を達成する必要があります。また、最も効果的な遺伝子編集方法を見つけ出すには、遺伝子編集により作製した免疫治療細胞の機能、薬効、そしてその持続性（どれだけ長い間効くか）を評価することができる生細胞解析ツールが必要です。同じウェルから時間依存的なカイネティックレスポンスを定量的に測定できる生細胞アッセイなら、これらの要件を満たすことができます。がんに対する免疫治療の研究が始まって以来、我々は細胞傷害活性が不十分、あるいは長い時間持続しない例を多く経験してきました。安定した薬効を得るには、遺伝子改変細胞は、腫瘍の排除と監視の期間全体を通して耐性的かつ免疫抑制的で常に変化し続ける腫瘍微小環境中で、持続的に効果を発揮し続ける必要があります³。

Additional Info

包括的な CRISPR 技術
ガイドをダウンロード
して読む：



アジレントはこれらの課題に対処するため、一連の革新的なソリューションを統合し、CRISPR 編集における活性と精度を高めました。この遺伝子編集ソリューションと、生細胞プラットフォームによる評価・検証を組み合わせることで、免疫治療細胞の機能や有効性に関する時間依存的なファンクショナルデータを得ることができます。

CRISPR ゲノム編集の未来はこれまでどおり明るいものですが、治療用途の拡大に向けた現在の課題としては、活性、特異性、さまざまな状況への対応力の向上などがあります。特定の遺伝子座を標的にすることができるガイド RNA は、DNA テンプレートを RNA に転写する酵素を用いて作成することができます。しかし、Agilent SureGuide gRNA (アジレント・テクノロジー)⁴に使用されるようなガイド RNA を化学的に合成する方法には、明らかな利点があります。化学合成により、高純度の sgRNA を拡張性の高い方法で確実に製造できるため、sgRNA 設計の独自の機会が得られるとともに、分子機能を高精度に導入することが可能となり、研究、産業、治療アプリケーションにおいて CRISPR-Cas 性能を強化することができます。図 1 は、ガイド RNA 末端近傍に加えた化学修飾によってガイド RNA の安定性と活性が改善されることを示しています⁵。最近の研究では、DNA 認識配列の特異的な部位でガイド RNA に化学的な修飾を取り込み、オンターゲットとオフターゲット

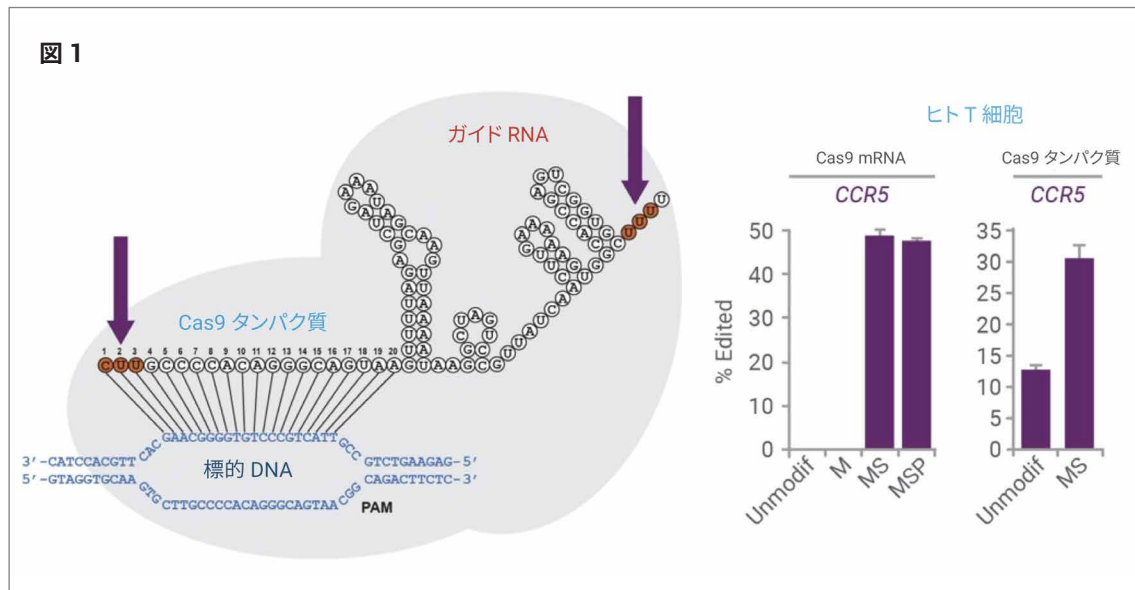


図 1. ガイド RNA の化学合成により、指定した位置に、天然ヌクレオチド、修飾した天然ヌクレオチド、非天然ヌクレオチドの組み合わせを取り込み、CRISPR 効率に影響を与えることができます。CCR5 遺伝子を標的とする修飾した単一のガイド RNA (5'および 3'両末端の 3 つのヌクレオチドを 2'-O-メチル (M)、2'-O-メチル 3'ホスホロチオエート (MS)、または 2'-O-メチル 3'チオ PACE (MSP) で修飾) を、Cas9 の mRNA または精製タンパク質とともに T 細胞へ導入し、その活性を評価しました。MS および MSP で修飾したガイド RNA には、非修飾ガイド RNA よりも有意に高い活性が認められました。図の引用元：A. Hendel et al., Nat. Biotechnol.33(9):985-989 (2015)

活性を系統的に評価することによって CRISPR の特異性の改善が達成されました⁶。この新たなアプローチにより、高いオンターゲット性能を維持しながらオフターゲット切断活性が劇的に低下しました (図 2)。

遺伝子編集した細胞が得られたら、次はその細胞の機能 (細胞傷害活性) を評価し検証する段階に移ります。時間依存的な変化を定量的に解析できる細胞分析プラットフォームの登場によって、細胞障害活性などの細胞機能を高い感度で測定するとともに、長期におけるその活性の持続性を同時に評価することが可能になりました。例えば、遺伝子編集で得られたエフェクター T 細胞の連続的な細胞傷害能を、非常に低い ET 比 (エフェクター細胞 : ターゲット細胞比) によるたった1回の実験で、簡単に知ることができます。この結果は、免疫疲弊や免疫防御など、常に進化する腫瘍やその微小環境との相互作用に起因する回避機構などの阻害効果に関連付けることができます。

その一例が、xCELLigence システム (旧 ACEA Biosciences 社。現在はアジレント社の一部) を用いた最近の研究で発表されました。この研究では、抗原発現の腫瘍不均一性に対処しうる CAR-T 細胞の開発にトライしました⁷。一般的に養子細胞療法では、標的腫瘍抗原を発現するがん細胞は殺されますが、標的抗原を発現しない細胞は殺されずに増殖し続けます。この問題に対処するために、著者らは 2 種類の腫瘍抗原を

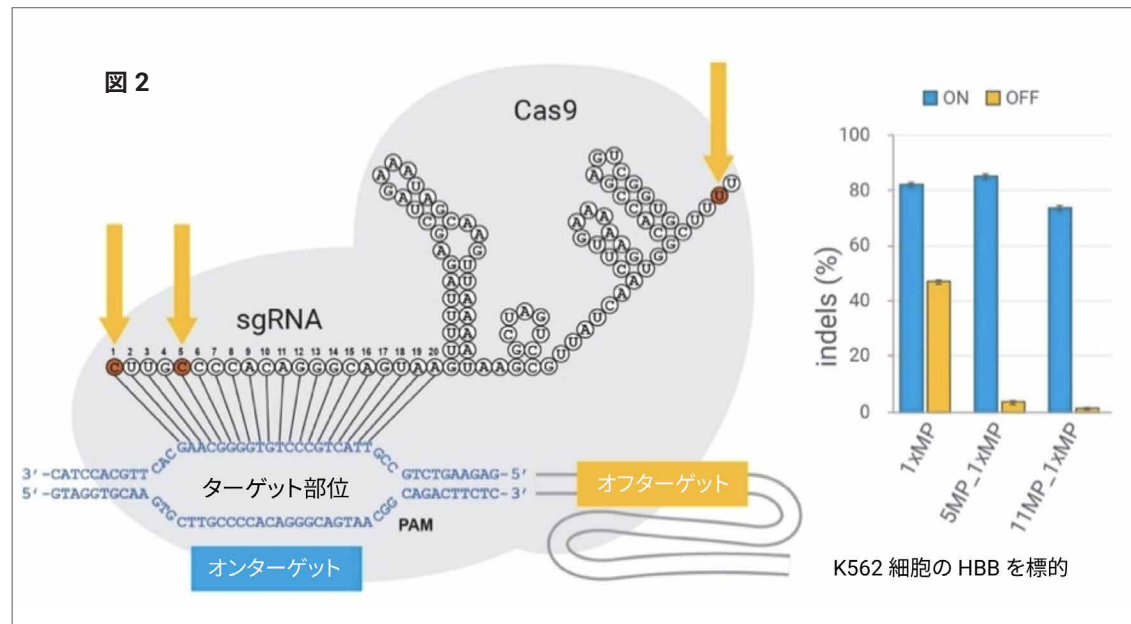


図 2. CRISPR の特異性を改善するために、重要なながらも難易度の高い検証として、鎌状赤血球症を引き起こす変異を含む HBB 遺伝子を用いました。HBB 遺伝子の鎌状赤血球変異を編集するためによく用いられるガイド RNA は、別の遺伝子座でのオフターゲット活性が非常に高いことが明らかになっています。HBB ガイド RNA 配列の 5 番目または 11 番目のいずれかの位置に単一の修飾を加えることで、このグラフの黄色のバーで示されるようにオフターゲット活性が劇的に減少し、オンターゲット部位での高い活性が維持されました。図の引用元 : Ryan et al., Nucleic Acids Res.46(2):792-803 (2018)

同時に認識し攻撃する CAR-T 細胞を開発し、xCELLigence システムを用いて経時的な細胞傷害能を評価しました。さまざまな組み合わせの共刺激ドメインと抗原結合ドメインをもつ CAR-T 細胞を作製し、1:10 という極めて低い ET 比でアッセイを行いました。その結果、図 3a に示すように、最適な CAR-T コンストラクトのセレクションに成功しました (N. Ahmed、未発表の結果)。また、xCELLigence ならではの長時間のリアルタイムアッセイにより、免疫逃避を起こす CAR-T コンストラクトを同定することにも成功しました。図 3b は、HER2 抗原および IL13Rα2 抗原を標的とする CAR を異なるデザインで発現させた CAR-T 細胞の連続的なキリング活性の結果を示しています。2 つの標的抗原に対する CAR 分子を別々の T 細胞 (CARpool) に発現させた場合、同じ T 細胞に別のタンパク質として発現させた場合 (biCAR)、同じ T 細胞に融合タンパク質としてタンデムに発現させた場合の細胞傷害活

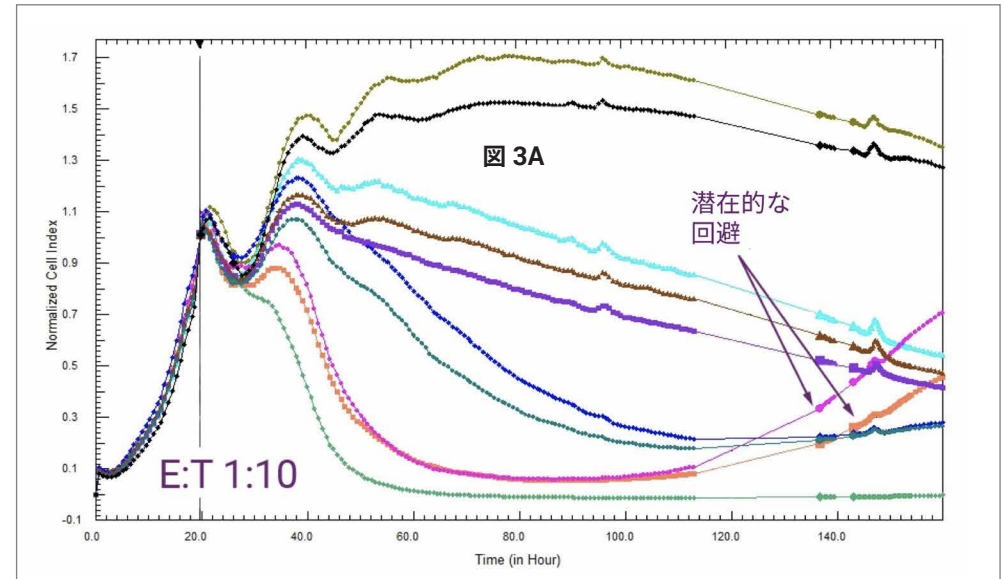


図 3a. 共刺激ドメインと抗原結合ドメインの組み合わせが異なるさまざまな CAR-T 細胞のキリング活性の時間依存的変化を低い ET 比 (1:10) で定量しました。ピンク線とオレンジ線のコンストラクトは潜在的に免疫逃避を起こすことが示唆されました。(N. Ahmed、未公表結果。2019 年 4 月 2 日)。

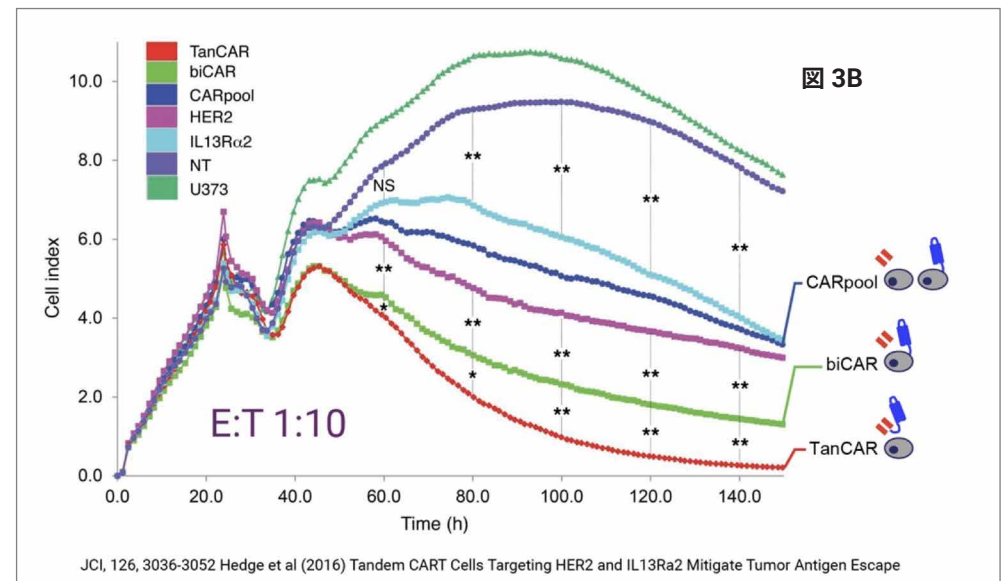


図 3b. HER2 抗原および IL13Rα2 抗原のいずれかまたは両方を標的にする CAR-T 細胞の膠芽細胞腫細胞株 U373 に対するキリング活性を xCELLigence システムでモニタリングしました。図の説明:U373 = ターゲット細胞のみ、NT = 陰性コントロール (CAR を発現しない非遺伝子導入 T 細胞)、IL13Rα2 = IL13Rα2 を標的とする CAR-T 細胞、Her2 = Her2 標的とする CAR-T 細胞。CARpool、biCAR および TanCAR については本文を参照。エフェクター：ターゲット細胞比 (E:T) は 1:10。図の引用元：Hegde et al., J Clin Invest.2016 Aug 1;126(8):3036-52。

JCI, 126, 3036-3052 Hedge et al (2016) Tandem CART Cells Targeting HER2 and IL13Rα2 Mitigate Tumor Antigen Escape

性の違いを比較しています。ターゲット細胞として膠芽腫細胞を用いて ET 比 1:10 で試験を行い、最も優れた細胞傷害活性を示す CAR 分子発現デザインを同定することに成功しました。このような細胞傷害の時間依存的な挙動や連続キリング能は、xCELLigence によるラベルフリーの電気抵抗値モニタリングを用いることで簡単に知ることができます。

機能的なデータを豊富に得られる高感度時間分解プラットフォームには、他にも Agilent Seahorse XF Analyzer (アジレント・テクノロジー) があります。Carl June 博士のグループが発表した重要な研究では、異なる CAR T でエンジニアリングされたコンストラクトが、さまざまな代謝プログラムを駆動することで細胞運命と機能にどのように劇的な異なる効果をもたらすかについて示されました⁸。この研究によって、腫瘍排除、微小環境における持続性、耐久性を最適化する方法が明らかになりました。図 4 は、著者らの結果の要約であり、共受容体シグナルドメインである 4-1BB を含む CAR T 細胞が中枢のメモリー形成および持続性と一致する好気性のプログラムをどのように引き起こすかを示しています。対照的に、

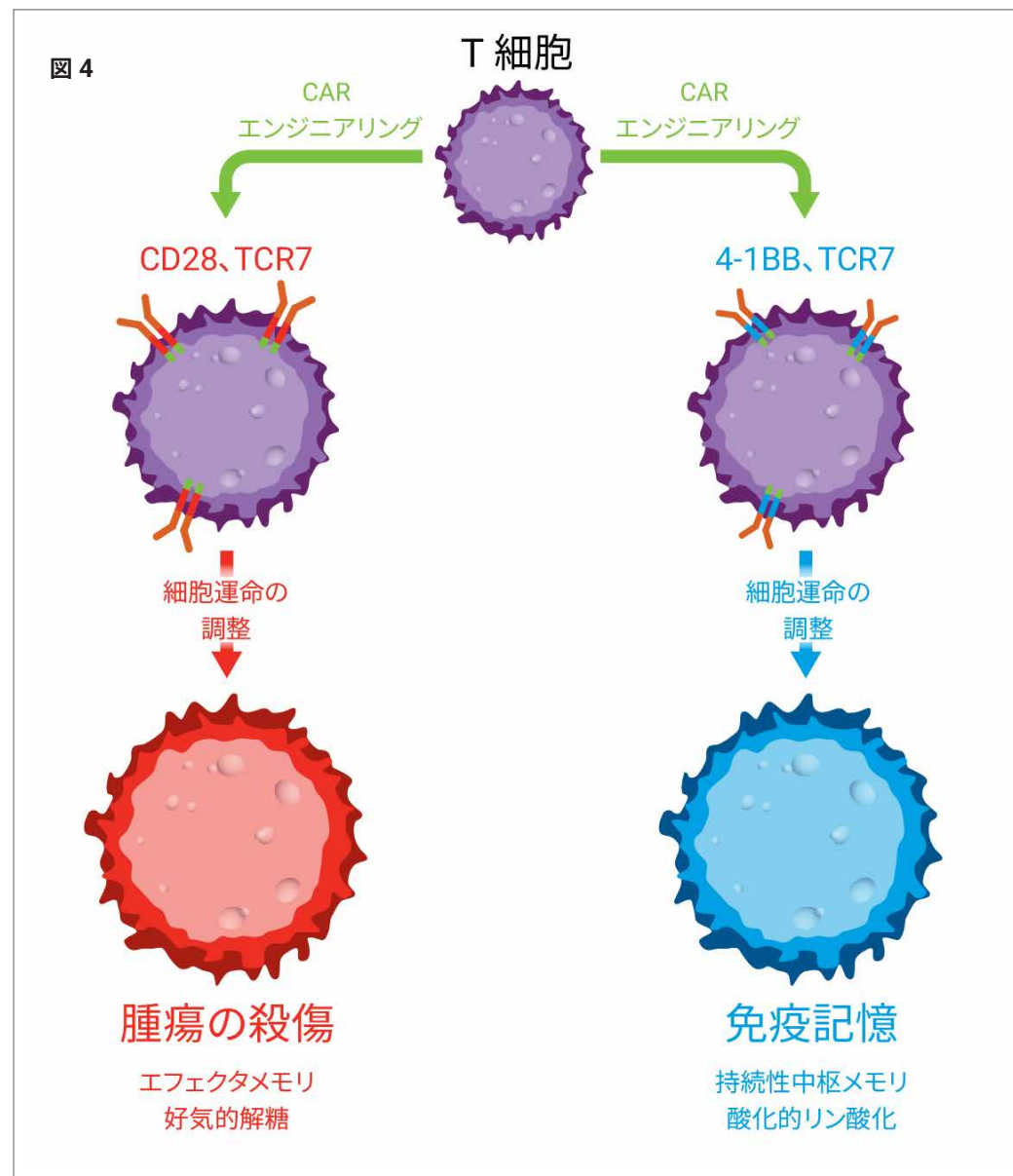


図 4.T 細胞シグナルドメインの選択が代謝プログラミングの違いに影響を及ぼし、細胞ベース療法を微調整できる可能性が示されています。4-1BB を含む CAR T 細胞はミトコンドリアを増殖させることによってさらに好気性となり、in vitro での持続性と中枢でのメモリー細胞の運命の向上につながります。対照的に、CD28 ではより解糖系プログラムに傾くため、エフェクターメモリー細胞の増加につながります。図の引用元：Kawalekar et al., Immunity 44, 380–390 (2016).本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。

CD28 共受容体シグナルドメインでエンジニアリングすることで、好氣的解糖に向かう代謝が再プログラムされ、エフェクターメモリー細胞の運命が向上する結果となりました。この研究は、エンジニアリングした代謝的特性に対する強力な概念実証であり、敵対的な腫瘍微小環境での免疫細胞の疲弊と持続性に対処するためにエフェクター細胞とメモリー細胞の適切なバランスを確立し、耐久性のあるメモリーと免疫監視のための道を開きました。 ■

参考文献

1. FDA (2017) *FDA approval brings first gene therapy to the United States*, [News Release], 30 August 30.
2. FDA (2017) *FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma*, [News Release], 18 October.
3. M.A. Morgan *et al.* Engineering CAR-T Cells for Improved Function Against Solid Tumors. *Frontiers in Immunology*, 9: article 2493 (2018)
4. D.J. Dellinger *et al.* Streamlined Process for the Chemical Synthesis of RNA Using 2'-O-Thionocarbamate-Protected Nucleoside Phosphoramidites in the Solid Phase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(30):11540–11556 (2011)
5. A. Hendel *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*, 33(9):985–989 (2015)
6. D.E. Ryan *et al.* Improving CRISPR–Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(2):792–803 (2018)
7. M. Hegde *et al.* Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(8):3036-52 (2016)
8. O.U. Kawalekar *et al.* Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* 44:380–390 (2016)