慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	遺伝子改変により長期生存能を賦与したキメラ抗原受容体導入T細胞療法の開発
Sub Title	Enhancing early memory phenotypes of CAR-T cells with multiple gene editing
Author	伊藤, 雄介(Ito, Yusuke)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	初めに、分化したT細胞に個別にノックアウトスクリーニングを行い、より未分化な状態に戻すことが出来る遺伝子の候補の探索を行った。ヒトT細胞の各分化段階のトランスクリプトームを比較したデータベースを用いて、effector memory T細胞(Tem)に分化するにつれて発現が増加するエピジェネティック因子や転写因子を13種類抽出した。ヒトT細胞をin vitroで分化させた後、これらの候補遺伝子を個別にCRISPR/Cas9でノックアウトし、CD45RA、CCR7、CD62L、CD27、CD28の発現を指標として、central memory T細胞 (Tcm)の割合を経時的にフォローした。その結果、gene AのノックアウトによってccR7、CD62L、CD28の発現が有意に上昇し、Tcmの割合が有意に増加することを示した。続いてBLIMP-1とgene Aのダブルノックアウトを行ったところ、単独のノックアウトに比して、ダブルノックアウトでさらなるTcmの割合増加が確認できた。また、再刺激後の増殖能、サイトカイン産生能もコントロールと比して優れており、Tcmの機能を獲得していると考えられた。 ダブルノックアウトによってTcmの性質を獲得できているかをさらに検証するため、RNAシークエンス解析を施行した。T細胞を起こして1週間後のTcmからstem cell like memory T細胞の状態（1w群）、4週間培養してTemに分化した状態（ctrl群）、3週間後にダブルノックアウトを行い、その1週間後の状態（DKO群）の3群での比較を行った。クラスタリング解析の結果、DKO群は、ctrl群よりも1w群に近い遺伝子発現プロファイルを獲得していることが明らかとなった。個別の遺伝子に着目すると、未分化段階で発現が高いことが知られているTCF7、MYB、BATF3、ID3といった転写因子は1w群よりctrl群で発現が低いが、ctrl群よりもDKO群で発現が回復していた。以上の結果から、BLIMP-1とgene Aのダブルノックアウトによって未分化なmemory T細胞の状態にreprogrammingできる可能性が示唆された。 We performed knockout experiments using CRISPR/Cas9 system to identify genes that can reprogram differentiated T cells into immature early memory T cells. Using transcriptome analysis databases, we extracted 13 candidate genes. Knockout screening showed that the ablation of gene A significantly upregulated the expression of CCR7, CD62L, and CD28 and increased the proportion of central memory T cells (Tcm). Next, we combined the knockout of BLIMP-1 and gene A. The double knockout further increased the proportion of Tcm cells. The proliferation capacity and cytokine secreting ability (IL-2 and TNF-a) were also enhanced after double knockout compared to each single knockout, suggesting that double knockout T cells acquired not only the surface marker expression but also the functionality of central memory T cells. For further analysis, we performed RNA sequencing analysis. The double knockout upregulated the expression of several transcription factors important for memory T cells, such as TCF7, MYB, BATF3, and ID3. These results demonstrate that double knockout of BLIMP-1 and gene A can reprogram differentiated T cells into immature memory T cells to some extent.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230286

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2024年3月9日

2023年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

研究代表者	所属	医学部附属先端医科学研究所	職名	助教（有期・医学部）	補助額	500千円（特Ｂ）
	氏名	伊藤 雄介	氏名（英語）	Yusuke Ito		

研究課題（日本語）

遺伝子改変により長期生存能を賦与したキメラ抗原受容体導入T細胞療法の開発

研究課題（英訳）

Enhancing early memory phenotypes of CAR-T cells with multiple gene editing

１．研究成果実績の概要

初めに、分化したT細胞に個別にノックアウトスクリーニングを行い、より未分化な状態に戻すことが出来る遺伝子の候補の探索を行った。ヒトT細胞の各分化段階のトランスクリプトームを比較したデータベースを用いて、effector memory T細胞(Tem)に分化するにつれて発現が増加するエピジェネティック因子や転写因子を13種類抽出した。ヒトT細胞をin　vitroで分化させた後、これらの候補遺伝子を個別にCRISPR/Cas9でノックアウトし、CD45RA、CCR7、CD62L、CD27、CD28の発現を指標として、central memory T細胞 (Tcm)の割合を経時的にフォローした。その結果、gene Aのノックアウトによって CCR7、CD62L、CD28の発現が有意に上昇し、Tcmの割合が有意に増加することを示した。続いてBLIMP-1とgene Aのダブルノックアウトを行ったところ、単独のノックアウトに比して、ダブルノックアウトでさらなるTcmの割合増加が確認できた。また、再刺激後の増殖能、サイトカイン産生能もコントロールと比して優れており、Tcmの機能を獲得していると考えられた。
ダブルノックアウトによってTcmの性質を獲得できているかをさらに検証するため、RNAシークエンス解析を施行した。T細胞を起こして1週間後のTcmからstem cell like memory T細胞の状態（1w群）、4週間培養してTemに分化した状態（ctrl群）、3週間後にダブルノックアウトを行い、その1週間後の状態（DKO群）の3群での比較を行った。クラスタリング解析の結果、DKO群は、ctrl群よりも1w群に近い遺伝子発現プロファイルを獲得していることが明らかとなった。個別の遺伝子に着目すると、未分化段階で発現が高いことが知られているTCF7、MYB、BATF3、ID3といった転写因子は1w群よりctrl群で発現が低いが、ctrl群よりもDKO群で発現が回復していた。以上の結果から、BLIMP-1とgene Aのダブルノックアウトによって未分化なmemory T細胞の状態にreprogrammingできる可能性が示唆された。

２．研究成果実績の概要（英訳）

We performed knockout experiments using CRISPR/Cas9 system to identify genes that can reprogram differentiated T cells into immature early memory T cells. Using transcriptome analysis databases, we extracted 13 candidate genes. Knockout screening showed that the ablation of gene A significantly upregulated the expression of CCR7, CD62L, and CD28 and increased the proportion of central memory T cells (Tcm).
Next, we combined the knockout of BLIMP-1 and gene A. The double knockout further increased the proportion of Tcm cells. The proliferation capacity and cytokine secreting ability (IL-2 and TNF-a) were also enhanced after double knockout compared to each single knockout, suggesting that double knockout T cells acquired not only the surface marker expression but also the functionality of central memory T cells.
For further analysis, we performed RNA sequencing analysis. The double knockout upregulated the expression of several transcription factors important for memory T cells, such as TCF7, MYB, BATF3, and ID3.
These results demonstrate that double knockout of BLIMP-1 and gene A can reprogram differentiated T cells into immature memory T cells to some extent.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名（著者・講演者）	発表課題名（著書名・演題）	発表学術誌名（著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月（著書発行年月・講演年月）