

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15215

研究課題名(和文) iPS細胞技術とゲノム編集を用いた効率のよいがん特異的キラーT細胞の再生

研究課題名(英文) Efficient regeneration of tumor-specific cytotoxic lymphocytes using the iPSC technology and genome editing

研究代表者

縣 保年 (AGATA, YASUTOSHI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60263141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん抗原特異的なT細胞受容体(TCR)遺伝子をiPS細胞の内在性TCR遺伝子座へノックインすることにより、活性の高いT細胞を効率よく再生することを目的とした。まずJurkat細胞をモデルとして、ゲノム編集により薬剤耐性遺伝子カセットを内在性TCR遺伝子座へノックインし、次にCre/loxPシステムを用いたカセット交換法により、TCR遺伝子と交換させ発現させることに成功した。そこでiPS細胞で同様の実験を行ったところ、カセット交換で問題があったが、プロモーターを改良することで再現性よく交換ができるようになった。現在、カセット交換できたiPS細胞を用いてT細胞の再生を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん抗原特異的なTCR遺伝子をiPS細胞の内在性TCR遺伝子座へノックインすることに成功した。このiPS細胞から活性の高いT細胞を再生することができれば、カセット交換法により未知変異抗原に反応するTCR遺伝子をノックインしたiPS細胞を次々に作製することも可能となり、細胞製剤として早期の治療応用も期待できる。またレンチウイルスを用いた遺伝子挿入によるがん化のリスクも回避できることから安全性においても有意義である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to efficiently regenerate highly active T cells from iPSC cells by knocking in tumor antigen-specific T cell receptor (TCR) genes into the endogenous TCR locus. First, we utilized Jurkat cells as a model system and knocked in a drug resistance gene cassette to the endogenous TCR locus by genome editing and then successfully exchanged it with the TCR gene by the cassette exchange method using the Cre/loxP system. When we performed the same experiment in iPSC cells, we had some problems with cassette exchange, but we achieved reproducible exchange by improvement of the promoter. We are currently attempting to regenerate T cells from iPSC cells in which the TCR gene was successfully knocked-in by cassette exchange.

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：がん免疫、がん抗原、T細胞受容体(TCR)、iPS細胞、再生医療、ゲノム編集、CRISPR/Cas9、カセット交換法(RMCE)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

従来のがん免疫細胞療法は、がん抗原特異的なキラーT細胞を刺激して働かせるという戦略を取っているが、その効果は限定的であった。近年、京都大学の河本 宏教授らは、iPS細胞技術を用いて、メラノーマ特異的ながん抗原を認識するT細胞から iPS細胞を作製し大量培養したのち、再度T細胞へ分化誘導することにより、抗原反応性と傷害活性をもつキラーT細胞を再生することに成功した (Cell Stem Cell 12: 31, 2013)。

しかしながら、がん抗原特異的なT細胞を増やし、それから iPS細胞を樹立し (T-iPS細胞)、再度T細胞へ分化させるのには時間と手間がかかることや、得られた T-iPS細胞の品質にばらつきが生じるといった問題があった

(図1)。そこで我々は河本教授らと共同研究を行い、がん抗原特異的なT細胞からT細胞受容体 (TCR) 遺伝子をクローニングし、高品質な iPS細胞にレンチウイルスを用いて直接遺伝子導入を行い、TCR-iPS細胞を作製した。得られた TCR-iPS細胞をT細胞へ分化誘導し、機能的なTCRが発現され、キラー活性を有することを確認している (図1)。一方、TCR-iPS細胞から再生したT細胞では、TCRの発現がやや低く、またウイルスを用いた遺伝子導入では、挿入によるがん化のリスクを否定できないという問題もあった。

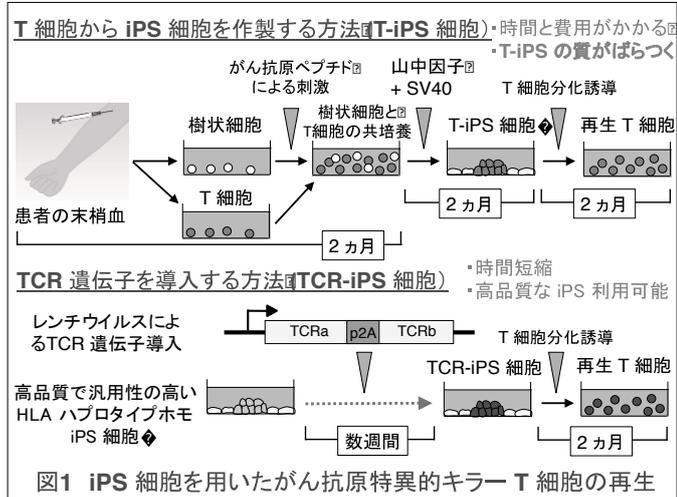


図1 iPS細胞を用いたがん抗原特異的なキラーT細胞の再生

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、がん抗原特異的なT細胞から iPS細胞技術を用いてキラーT細胞を再生する方法をより発展させることを目指した。そのために本研究では、がん抗原特異的なT細胞受容体 (TCR) 遺伝子を、ゲノム編集とカセット交換法を用いて、iPS細胞の内在性TCRβ遺伝子座へノックインすることにより、TCRの発現レベルとキラー活性の高い再生T細胞を、短期間で効率よく作製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

iPS細胞ではT細胞へ分化誘導しないとTCRが発現しないので、実験系を確立するために、まずヒトT細胞性白血病由来のJurkat細胞を用いて、ゲノム編集とカセット交換法によりがん抗原特異的なTCRα/β融合遺伝子を内在性TCRβ遺伝子座へ以下のようにノックインした。

#### ①CRISPR/Cas9を用いた薬剤耐性遺伝子カセットの内在性TCRβ遺伝子座へのノックイン

まず、活性の高いVβ20-1遺伝子のプロモーターとHygromycin耐性遺伝子、Puromycin耐性遺伝子-チミジンキナーゼ (TK) 融合遺伝子から構成される薬剤耐性遺伝子カセットを作製し、その前後に内在性TCRβ遺伝子の相同領域を5'アームと3'アームとして付加したターゲティングベクターを構築する。次にDβ2遺伝子断片の上流にDNA切断を導入するCRISPRガイドRNAとCas9nを共発現するベクターを構築し、ターゲティングベクターとともにiPS細胞へ遺伝子導入する。Hygromycinで選択し、正しい相同組換えが起きたクローンを得る。

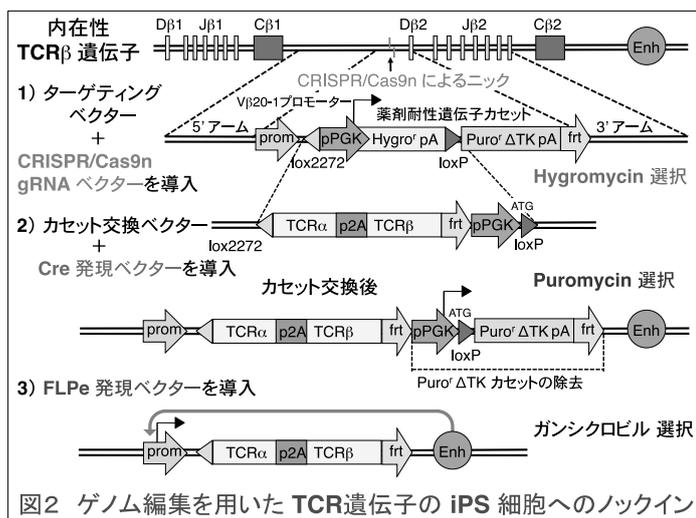


図2 ゲノム編集を用いたTCRβ遺伝子のiPS細胞へのノックイン

#### ② Cre/loxPによる薬剤耐性遺伝子カセットとTCRα/β融合遺伝子の交換

がん抗原特異的なTCRα/β融合遺伝子の前後にlox2272とloxP配列を付加したカセット交換ベクターを構築し、Cre発現ベクターとともに上記のiPS細胞へ遺伝子導入する。lox2272とloxP配列はそれぞれの間でのみ組換えが起こるため、同様にlox2272とloxP配列で挟まれたHygromycin耐性遺伝子と、TCRα/β遺伝子が交換されるとともに、PGKプロモーターの付加によりPuro-TKが発現する。Puromycinで選択しクローンを得る。

#### ③ FLP組換え酵素によるPuro-TK遺伝子の欠失

正しくTCRα/β遺伝子が交換されたiPS細胞にFLP発現ベクターを導入し、frt配列で挟まれたPuro-TK遺伝子が欠失した細胞をガンシクロビルで選択する。

#### 4. 研究成果

まず Jurkat 細胞を用いて、ゲノム編集により薬剤耐性遺伝子カセットを正しく内在性 TCR $\beta$  遺伝子座へノックインすることに成功した。次に Cre/loxP システムを用いたカセット交換法により、がん抗原特異的な TCR 遺伝子を薬剤耐性遺伝子カセットとカセット交換反応で挿入することができた。さらに FLP の発現により、Puro-TK 遺伝子を欠失させ、内在性のエンハンサーがプロモーターに作用し外来性 TCR 遺伝子を効率よく発現させることに成功した(図3)。

そこで iPS 細胞でも同様の実験を行ったところ、薬剤耐性遺伝子カセットのノックインはできたが、カセット交換ができなかった。カセット交換が起きると Puromycin 耐性遺伝子が PGK プロモーターにより発現するが、そのプロモーター活性が iPS 細胞では低い可能性が考えられた。そこで PGK プロモーターを、iPS 細胞で活性が高いことが知られている EF-1 $\alpha$  プロモーターと交換したところ、再現性よくカセット交換ができるようになった。現在、カセット交換できた iPS 細胞において Puromycin 耐性遺伝子を欠失させたのち、T 細胞へ分化誘導することで導入した TCR 遺伝子を発現させることができるか、引き続き解析を行っている。

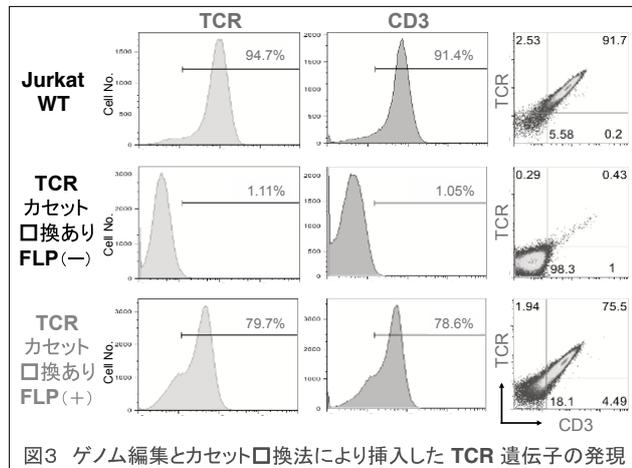


図3 ゲノム編集とカセット交換法により挿入した TCR 遺伝子の発現

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Miyai T, Takano J, Endo TA, Kawakami E, Agata Y, Motomura Y, Kubo M, Kashima Y, Suzuki Y, Kawamoto H, Ikawa T. Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells. **Genes & Development** 32, 112-126, 2018, 査読有, DOI: 10.1101/gad.309575.117.

② Kobayashi K, Maezawa T, Tanaka H, Onuki H, Horiguchi Y, Hirota H, Ishida T, Horiike K, Agata Y, Aoki M, Hoshi M, Matsumoto M. The identification of D-tryptophan as a bioactive substance for postembryonic ovarian development in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. **Sci Rep.** 7:45175, 2017, 査読有, DOI: 10.1038/srep45175.

③ Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program. **Genes & Development** 30, 2475-2485, 2016, 査読有, DOI: 10.1101/gad.290593.116.

④ Tomita K, Tanaka H, Kageyama S, Nagasawa M, Wada A, Murai R, Kobayashi K, Hanada E, Agata Y, Kawachi A. The Effect of D-Aspartate on Spermatogenesis in Mouse Testis. **Biol Reprod.** 94(2): 30, 1-7, 2016, 査読有, DOI: 10.1095/biolreprod.115.134692.

[学会発表] (計 8 件)

① 縣 保年. PD-1 研究における「点と点」～iPS 細胞を用いたがん特異的 T 細胞の再生. 第 26 回大阪母子医療センターシンポジウム (2019 年 2 月 6 日, 大阪)

② 寺田晃士, 近藤遼平, 永野誠治, 増田喬子, 河本 宏, 縣 保年. がん抗原特異的な TCR 遺伝子を内在性 TCR 遺伝子座へ効率よく導入する方法の確立. 第 41 回日本分子生物学会 (2018 年 11 月 28 日, 横浜)

③ 縣 保年. iPS 細胞を用いた効率のよいがん抗原特異的キラー T 細胞の再生. 第 49 回京阪泌尿器腫瘍セミナー (2018 年 9 月 3 日, 京都)

④ 寺田晃士, 我妻慶祐, 永澤誠之, 田中裕之, 門田健明, 伊川友活, 増田喬子, 河本 宏, 縣 保年. E2A 転写因子と CBP/p300 の核内構造体による TCR $\beta$  遺伝子の染色体ダイナミクス. 第 64 回日本生化学会近畿支部例会 (2017 年 5 月 27 日, 大阪)

⑤ 門田健明, 我妻慶祐, 寺田晃士, 永澤誠之, 田中裕之, 内田誠一, 縣 保年. 画像処理技術を用いた核内蛋白質構造体の間隙空間容量測定プログラムの作成. 第 64 回日本生化学会近畿支

部例会 (2017年5月27日, 大阪)

⑥ Agata, Y, Wagatsuma K, Terada K, Tanaka H, Ikawa T, Masuda K, Kawamoto H, Kimura H, E2A and CBP/p300 regulate chromosome dynamics of the TCR $\beta$  locus. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (March 15, 2017, Kyoto, Japan)

⑦ 寺田晃士、我妻慶祐、田中裕之、伊川友活、増田喬子、河本 宏、縣 保年. 転写因子 E2A と CBP/p300 が形成する核内構造体を足場とした TCR $\beta$  遺伝子再構成の制御機構. 第26回 Kyoto T Cell Conference (2016年5月21日, 京都)

⑧ 縣 保年、我妻慶祐、寺田晃士、安齋悠樹、田中裕之、伊川友活、増田喬子、河本 宏、木村 宏. E2A 転写因子 foci を足場とした T 細胞受容体遺伝子座の染色体ダイナミクス. 第10回 日本エピジェネティクス研究会年会 (2016年5月20日, 大阪)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 外来抗原レセプター遺伝子導入細胞の製造方法

発明者: 河本 宏、永野誠治、増田喬子、縣 保年、寺田晃士

権利者: 河本 宏、永野誠治、増田喬子、縣 保年、寺田晃士

種類: 特許

番号: 2018-140523

出願年月日: 2018年7月26日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

滋賀医科大学 生化学・分子生物学講座 分子生理化学部門

[http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch1/public\\_html/publish.html](http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch1/public_html/publish.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 河本 宏

ローマ字氏名: Kawamoto Hiroshi