

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08797

研究課題名(和文)再生胸腺微小環境によるT細胞誘導と治療への応用

研究課題名(英文) Induction of T cells by regenerative thymic microenvironment and the application for therapy

研究代表者

保坂 直樹 (HOSAKA, Naoki)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30388459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：患者の末梢血からex vivoでT細胞を増やし、再び体内に戻す免疫療法が行われている。しかし抗腫剤や放射線治療等で免疫機能が低下している患者には難しい。本研究は骨髄細胞と人工性多能性幹(iPS)細胞から分化させた胸腺上皮細胞と相互作用させる事により、T細胞の産生を試みるものである。最終的に、骨髄細胞由来の T細胞を誘導する事に成功した。誘導された T細胞はin vivoにて腫瘍発生や自己免疫疾患等の明らかな副作用は見られず、悪性腫瘍に対しても効果が見られた。以上の結果は、新たなT細胞の誘導法を開発した事を意味する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在 T細胞療法は癌免疫治療の一型として、患者末梢血を用い多数の臨床試験が行われている。今回の研究は T細胞産生法の一型となる。また T細胞は感染症にも効果があり、抗菌薬の効きにくい感染症への治療法の一つとなる可能性もある。今回得られた細胞は体性幹(骨髄)細胞由来であり、iPS細胞由来ではない為移植後の腫瘍化の危険性は低いと考えられる。代表的な幹細胞である胚性幹(ES)細胞やiPS細胞は、特定の細胞に分化させて体内に移植或いは創薬の効果を調べる為に使われるが、本研究では目的とする細胞を得るための支持細胞に分化させた。本方法は、第3の幹細胞使用方法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ex vivo proliferated T cells have been used for immunotherapy in human disease using peripheral blood. However, this is difficult in immunosuppressed patients, such as during chemotherapy and/or irradiation therapy. Here, we developed T cells from bone marrow cells (BMC) interacted with induced thymic epithelial cells (iTEC) differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) in vitro. The T cells showed no tumorigenesis and few side effects and effected on inhibition of malignant tumor in vivo. These findings suggested that we have developed a new method for induction of T cells.

研究分野：病理学

キーワード： T細胞 胸腺 移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

患者末梢血中のリンパ球を *ex vivo* で増やし体内に戻す免疫細胞療法が開発されつつある。その中でも $\gamma\delta$ T細胞はT細胞の中で数%しか存在しないが腫瘍や感染症に高い効果を示し、多数の臨床試験が行われている(1)。また $\gamma\delta$ T細胞は自然免疫(innate immunity)と獲得免疫(acquired immunity)の中間的な機能を有し(2)、主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex, MHC)非拘束性に作用する(3)。しかし患者の抗癌剤や放射線療法等で免疫機能が低下している場合は施行できない。また人工性多能性幹(induced pluripotent stem, iPS)からのリンパ球の産生も開発されているが(4)、移植すると腫瘍が発生する危険が否定はできない。我々は以前、胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法(Bone marrow transplantation + thymus transplantation, BMT+TT)を開発した(5,6)。本方法は胸腺機能の増強・改善から自己免疫疾患、老齢化宿主、過致死量放射線宿主、癌等に幅広く効果が示されたが、胸腺組織を臨床の場にて入手する事は容易ではない。よって他の方法を開発する必要がある。近年iPS細胞からT細胞を産生する胸腺上皮細胞(Thymic epithelial cells, TEC)の誘導が報告された(7)。

### 2. 研究の目的

マウスiPS細胞から誘導されたTECと、非iPS細胞由来の骨髄細胞(bone marrow cells: BMC)との相互作用により、T細胞の誘導を試みる。また誘導されたT細胞の*in vivo*での副作用や抗腫瘍効果も調べる。

### 3. 研究の方法

- 1) iPS細胞から各種サイトカインを加えTECへ誘導させる(induced TEC, iTEC)。
- 2) 骨髄細胞を、造血幹細胞(hematopoietic stem cells: HSC)に濃縮させる(HEC-enriched BMC, HEC-eBMC)。
- 3) これらの誘導したiTECとHEC-eBMCを*in vitro*にて相互作用させる。
- 4) 誘導されたリンパ球を正常マウスに移植し、副作用を調べる。
- 5) 誘導されたリンパ球を担腫瘍マウスに移植し、効果を調べる。

### 4. 研究成果

結果: iPS細胞から上皮様細胞が分化し、TECに発現する転写因子も誘導された。よって、TECが

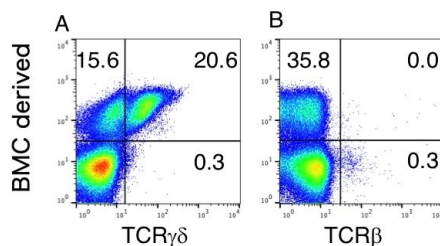


図1. iTECとHSC-eBMCとの相互作用。BMC由来のTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞が誘導されたが(A)、TCR $\beta$ 陽性細胞は殆ど見られなかった(B)。数値は%を示す。

誘導されたと考えられた(iTEC)。iTECとHSC-eBMCを相互作用させると、BMC由来の $\gamma\delta$ T細胞が誘導された(図1A)。CD3の発現や複数の $\gamma\delta$ T細胞receptorレパトリーも認められたが、他のリンパ球であるTCR陽性T細胞(図1B)、B細胞、NK細胞は殆ど見られなかった。これらの $\gamma\delta$ T細胞は骨髄移植を行った同系のマウスに移植可能であった。移植マウスには腫瘍発生や自己免疫疾患等の明らかな副作用は見られなかった。さらに担白血病マウスに移植すると、腫瘍の増大が抑えられ、生存率が改善した(図2)。

まとめ: 以上の結果より、BMCとiPS細胞を使った新たな $\gamma\delta$ T細胞の誘導法を開発した。 $\gamma\delta$ T細胞はiPS細胞ではなくBMC由来にて、腫瘍化の危険は少ない。さらに抗腫瘍効果も見られ、安全性と有効性が示唆された。またiPS細胞の使用法は主に今まで分化した細胞を移植或いは病態の解析や創薬の開発に使われてきたが(8,9)、本方法は目的とする細胞を得る為の支持細胞として用いており、第三の方法になる可能性もある。今後はヒトへの応用も視野に入れる。本法は現在特許申請中である。

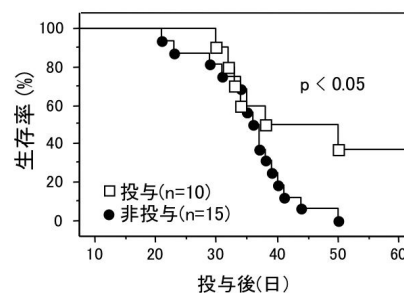


図2. 担白血病マウスへの $\gamma\delta$ T細胞を含む誘導リンパ球の投与効果。投与群は非投与群に比べ有意に生存率が改善した。

1, Pauza CD, Liou M-L, Lahusen T, et al. Gamma Delta T Cell Therapy for Cancer: It Is Good to be Local. *Front. Immunol.* 2018;9:1-11.

2, Porcelli S, Brenner MB, Band H. Biology of the Human  $\gamma$  T-Cell Receptor. *Immunol. Rev.* 1991; 120:137-183.

3, Kato Y, Tanaka Y, Miyagawa F, et al. Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens. *J. Immunol.* 2001;167:5092-5098.

- 4, Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, et al, Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. *Cell Stem Cell* 2013;12: 31-36.
5. Hosaka N, Review Article: New allogeneic hematopoietic stem cell transplantation method: Hematopoietic stem cell transplantation plus thymus transplantation for intractable diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 2013 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/545621>
- 6 保坂直樹 総説 胸腺移植併用による新しいアロ造血幹細胞移植法の開発 - その機構と難治性疾患への応用 - 日本臨床免疫学会会誌 2014;37:42-47.
- 7, Inami Y, Yoshikai T, Ito S, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells to thymic epithelial cells by phenotype. *Immunol. Cell Biol.* 2011;89:314–321
- 8, Barker RA, Parmar M, Studer L, Takahashi J. Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell* 2017;21:569–573.
- 9, Heilker R, Traub S, Reinhardt P, Schöler HR, Sternecker J. IPS cell derived neuronal cells for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2014;35:510–519.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Hosaka	4. 巻 10.1155/2018/7271097
2. 論文標題 Role of Regulatory T Cells in Tumor-Bearing Mice Treated with Allo-Hematopoietic Stem Cell Transplantation Plus Thymus Transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/7271097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 T細胞受容体 陽性細胞の誘導方法	発明者 保坂直樹	権利者 関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-134543	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下 埜 敬 紀 (SHIMONO Takaki) (40632625)	関西医科大学・医学部・助教  (34417)	
研究分担者	神 田 靖 士 (KANDA Seiji) (70295799)	関西医科大学・医学部・准教授  (34417)	
研究分担者	神 田 晃 (KANDA Akira) (70375244)	関西医科大学・医学部・講師  (34417)	

