

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16085

研究課題名（和文）他家移植用iPS細胞由来T細胞バンク整備に向けた細胞製造技術の開発

研究課題名（英文）Development of a differentiation method to generate iPSC-derived T cell bank for allogeneic T-cell therapy

研究代表者

入口 翔一（Iriguchi, Shoichi）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50737442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞を使った再生医療は未来の医療として期待されており、近年iPS細胞から作製した組織細胞の有用性が臨床において検証され始めている。免疫細胞の一種であるT細胞もiPS細胞から作製することが可能であり、がんを始めとした様々な疾患治療への応用研究が進められている。応用に際した課題の一つとしてT細胞の作製方法の改善が挙げられる。本課題では様々な培養条件を検討することで、実際に臨床応用可能な材料と手法にてiPS細胞からT細胞を作製する方法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、遺伝子改変したT細胞を用いた新しい癌免疫療法が、特に血液がんで著名な効果をあげている。遺伝子改変T細胞を用いた免疫療法を広く普及させる為に、他人の細胞から遺伝子改変T細胞を予め作製しておき、必要に応じてすぐに投与可能なT細胞製剤を開発する試みがなされている。iPS細胞から作製するT細胞はこの様な目的で使用するT細胞製剤の候補になると考えられる。本研究成果は今後のiPS細胞から作製したT細胞を臨床応用する上で基盤技術となる事から、遺伝子改変T細胞免疫療法の普及に貢献するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：iPSC-based regenerative medicine hold promise for the future medicine and clinical trials testing the efficacy of iPSC-derived tissues are underway. T cells, a type of immune cells, can be generated from iPSCs. Preclinical studies have demonstrated the potential of iPSC-derived T cells to treat cancer and other immunological diseases. However, in order to initiate clinical trials, methods to generate T cells from iPSCs should be adopted to regulatory requirements. In this study, we have tested a number of culture conditions and materials and identified T cell generation methods suitable to clinical applications.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 T細胞 T細胞免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、血液腫瘍に対する遺伝子改変 T 細胞療法の特筆すべき抗腫瘍効果が明らかになりつつある。現行の自家移植での遺伝子改変 T 細胞療法は、今後も標的抗原の抗腫瘍効果判定に必須と考えられるが、費用が高額になるという課題が存在する。例えば、米国 FDA が承認した Novartis 社の Kymriah (CTL019) の薬価は、1 回の投与あたり 475,000 ドルに設定された。自家移植にて抗腫瘍効果が証明された治療標的を、より多くの患者に届けるためには、より安価な細胞製剤の開発が必要である。本課題への解決策として、他家移植による治療戦略が検討され始めている。特に、臍帯血や骨髄バンクに習った遺伝子改変 T 細胞バンクを整備することで、より本治療法に掛かる費用を削減し一般に普及させることが期待される。現在検討されているバンクを構成する細胞ソースとしては、頻度の高い HLA 型を持つ健常人由来末梢血 T 細胞や ES/iPS 細胞 (Pluripotent Cells: PS 細胞) などの多能性幹細胞由来 T 細胞があげられる。申請者らはこれまでに世界に先駆けて、体内から単離した抗原特異的 T 細胞から iPS 細胞を樹立し、再び T 細胞へと再度分化誘導する技術の開発を報告した。(Nishimura, Kaneko, ...Iriguchi *et al.* *Cell Stem Cell*, 2013)。一方で、申請者らが開発した技術を一般に普及させるという観点から考えると、現行の PS 細胞由来 T 細胞を誘導する技術には様々な課題が残っている。例えば、現行の方法は PS 細胞から T 細胞の分化誘導の過程で、4 種類のマウスとヒトのフィーダー細胞と、異なるウシ胎児血清を使用している。臨床応用を考えた際には、各々のフィーダー細胞と血清の品質管理をすると費用が莫大になってしまう。さらに、最近の申請者らの詳細な研究成果より、現行法で誘導した T 細胞は生体内の T 細胞とは異なる性質を持つことも明らかとなった(Kitayama *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2016、平成 27-28 年度若手 B 研究代表者：入口 翔一)。以上より、PS 細胞を同種遺伝子改変 T 細胞バンクの細胞ソースとして開発する上では更なる分化誘導技術の改善が必須であると考えられる。

2. 研究の目的

上述の背景と課題より、本研究では PS 細胞からより生体に近い T 細胞へと分化誘導する技術の開発を目的とした。

PS 細胞の *in vitro* での分化誘導は、目的とする細胞種が生体内で発生する際に迎えるシグナル伝達を模倣する事で達成されると考えられている。PS 細胞は T 細胞へと運命決定する過程で中胚葉前駆細胞、造血性血管内皮細胞、造血幹・前駆細胞、リンパ球前駆細胞という多段階の中間細胞を経由していく (Karagiannis, Iriguchi, and Kaneko, *Seminars in Immunology*, 2016)。これまでの申請者ら及びその他の研究者らの研究結果より、現在の分化誘導系では、表面抗原発現レベルでは T 細胞を特徴付ける細胞が誘導出来ているが、機能面では生体の T 細胞を模倣しきれていないことが明らかとなっている。例えば、iPS 細胞から分化誘導した T 細胞は、生体内の T 細胞を増幅させる際に一般的に使用される CD3/CD28 beads 刺激にて、生体内 T 細胞よりも増幅効率が低い。この原因として申請者は本研究課題において、以下の 2 つの可能性を検討することとした。
仮説 1 : 生体内に近い T 細胞を産生する能力をもつ前駆細胞が濃縮できていない (研究項目)。
仮説 2 : 分化誘導過程で T 細胞へと運命決定するシグナル伝達が最適化されていない (研究項目)。これまで PS 細胞からの造血前駆細胞誘導研究では、多くの研究者が分化誘導過程における遺伝子発現変動解析やフローサイトメーターを用いた前駆細胞の同定研究を実施してきた。その結果、現在では PS 細胞から *in vitro* にてほぼ全ての成熟血液細胞に分化する能力をもつ多能性造血前駆細胞を無フィーダー、無血清培養条件下で組み換えタンパク質を用いて誘導することが可能となっている。しかしながら、造血前駆細胞から T 細胞前駆細胞、そして成熟 T 細

胞への分化誘導過程における同様の解析はなされていない。申請者らは既に、上記の研究課題を進める過程で臨床グレードの培養条件で維持している iPS 細胞から、CD34 陽性 CD45 陽性の造血前駆細胞に近い細胞への無フィーダー・無血清培地での分化誘導に成功している。さらに、所属研究室の研究成果として PS 細胞由来造血前駆細胞を無フィーダーの培養条件にて CD5 陽性 CD7 陽性の T 細胞前駆細胞へと分化誘導することに成功している。しかしながら、血清成分は未知なものが多い上にロット間差があるため、組み換えタンパク質や阻害剤などの影響の評価が困難である。

本研究課題では、以下の3項目について研究を進めていく事で、産業応用に適した培養系にて PS 細胞からより生体に近い T 細胞への分化誘導方法の確立に取り組んだ。

無フィーダー・無血清の合成培地を用いたPS細胞由来T細胞分化誘導培養系の開発

PS由来造血前駆細胞画分におけるT細胞前駆細胞の同定と分化能・機能評価

PS由来造血前駆細胞からT細胞への分化過程におけるシグナル伝達解析

3. 研究の方法

- (1) 本研究ではまず無フィーダーかつ無血清条件下での T 細胞分化誘導系の構築に取り組んだ。具体的には最近報告された無フィーダー・無血清条件での造血幹・前駆細胞の T 細胞前駆細胞の分化誘導系開発の報告 (Shukla *et al.*, *Nature Methods*, 2017) や、StemCell Technologies 社から販売されている製品を参考に検討を進めた。
- (2) マウスと同様にヒト CD34 陽性造血幹・前駆細胞は不均一であることが知られている。近年、ヒト造血幹・前駆細胞画分における成熟血球細胞の前駆細胞マーカーが次々と明らかになっている。例えば、最近 Hussen らは臍帯血中のリンパ球前駆細胞を濃縮するマーカーを同定した (Hussen, *et al.*, *Immunity*, 2017)。そこで、(1) の計画と並行して、PS 細胞由来造血前駆細胞画分における T 細胞前駆細胞の濃縮を目的に、BioLegend 社から発売されている抗体パネルスクリーニングキットを用いて、造血前駆細胞画分にて発現している表面抗原のスクリーニングを実施した。ここで抽出された候補マーカーと先行報告を参考に(1)で確立した分化誘導系もしくは血清含有条件にて、濃縮画分の T 細胞細胞分化能と機能の評価した。
- (3) PS 細胞由来造血前駆細胞から成熟 T 細胞への分化段階毎の細胞を用いて mRNA 発現解析を行い、分化段階における遺伝発現変動を明らかにする。
- (4) 最終的な評価項目は CD3/CD28 beads にて生体 T 細胞と同等の増殖効率 (14 日間で 1,000 倍以上) を示すかとした。

4. 研究成果

(1) 無フィーダー細胞・無血清培地での T 細胞分化誘導培養法の確立

種々の基礎培地 (MEM-alpha, IMDM, RPMI, DMEM) に血清代替物 (Bovine serum albumin, knock-out serum replacement) とインスリン・トランスフェリンを添加する (以下、BIT) 合成培地と市販の無血清培地 (StemSpan、APEL2) を用いて、iPS 細胞由来造血前駆細胞が Notch シグナル存在下で CD5 陽性 CD7 陽性かつ CD4 陽性 CD8 陽性の T 前駆細胞へと分化するかフローサイトメーターで評価した。その結果、MEM-alpha に BIT を添加した培地と StemSpan の条件にて iPS 細胞由来 T 前駆細胞が高効率に分化誘導できることが分かった。他の条件では T 細胞系細胞 (CD7 陽性) よりも、フローサイトメーターにて SSC^{hi} として検出されるマクロファージ様細胞が培養中の主たる細胞となった。以上より、無フィーダー細胞・無血清培地での T 細胞分化誘導培養系の確立に成功した。

(2) PS 細胞由来造血前駆細胞内のリンパ球/T 前駆細胞の探索

仮説 1 を検証するために、Biolegend 社から販売されている LegendScreen Kit を用いて、iPS 細胞由来造血前駆細胞の計 320 抗体の染色パターンを取得した。得られた染色パターンの中で CD34 陽性細胞画分にて陽性・陰性が分かれる抗体を選抜し、それぞれの細胞画分の T 細胞分化誘導を評価した。その結果、NK/T 前駆細胞マーカーとして知られている CD7 等が陽性マーカーとして同定される一方で、CD102 は陰性マーカーであることが分かった。(2018 ISSCR にて発表)

(3) PS 由来造血前駆細胞から T 前駆細胞における遺伝子発現解析

仮説 2 を検証するために、複数ドナーから樹立された iPS 細胞由来造血前駆細胞と T 前駆細胞、骨髄 CD34 陽性造血幹・前駆細胞とそこから分化誘導した T 前駆細胞を用いて、網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、PS 由来 T 前駆細胞は BCL11B 等早期の T 細胞分化関連遺伝子発現を骨髄由来細胞と同様のレベルで発現していることが分かった。一方で、造血幹細胞の発生関連遺伝子である HOXA 遺伝子などが PS 細胞由来造血前駆細胞と T 前駆細胞ではほぼ発現していない事が明らかとなった。これらの結果は現行の分化誘導系は胚胎外造血を模倣していることを示唆している。以上の結果より、PS 造血前駆細胞から T 細胞への分化誘導系よりも更に上流の PS 細胞から血液分化誘導系への改変が T 細胞の機能向上に必要であると仮説を立てた。現行の PS 由来 T 細胞が生体の T 細胞と異なるのは T 細胞が胎児型であることに起因する事が示唆された。現在得られた仮説を検証するため、PS 細胞から血液分化誘導過程の各段階における細胞の遺伝子発現解析を実施すると同時に T 細胞分化誘導能及び機能を検討している。予備結果ではあるが、血液分化のより早期の細胞を T 細胞分化誘導系にて培養することで、より生体に近い機能を示す T 細胞が誘導できる事が明らかになりつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minagawa Atsutaka, Yoshikawa Toshiaki, Yasukawa Masaki, Hotta Akitsu, Kunitomo Mihoko, Iriguchi Shoichi, et al	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 850 ~ 858.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iriguchi Shoichi, Kaneko Shin	4. 巻 110
2. 論文標題 Toward the development of true "off-the-shelf" synthetic T-cell immunotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 16 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://dx.doi.org/10.1111/cas.13892	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 -
1. 著者名 T. Ueda, A. Kumagai, S. Iriguchi, Y. Yasui, T. Miyasaka, K. Nakagoshi, K. Nakane, K. Saito, M. Takahashi, A. Sasaki, S. Yoshida, N. Takasu, H. Seno, Y. Uemura, K. Tamada, T. Nakatsura, S. Kaneko	4. 巻 111
2. 論文標題 Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1478 ~ 1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/cas.14374	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shoichi Iriguchi, Yutaka Yasui, Yohei Kawai, Suguru Arima, Mihoko Kunitomo, Tatsuki Ueda, Atsutaka Minagawa, Yuta Mishima, Nariaki Yanagawa, Yuji Baba, Yasuyuki Miyake, Tokuyuki Shinohara, Tetsuya Nakatsura, Masashi Yasukawa, Yoshiaki Kassai, Akira Hayashi, and Shin Kaneko,
2. 発表標題 Highly efficient and scalable method to generate cytotoxic T cells from induced pluripotent stem cells for T-cell immunotherapy
3. 学会等名 2019 CiRA international Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入口翔一、安井裕、河合洋平、有馬寿来留、國友美穂子、佐藤崇之、安川正貴、中面哲也、金子新
2. 発表標題 同種他家T細胞免疫療法の臨床応用へ向けたiPS細胞由来T細胞製造方法の開発
3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoichi Iriguchi, Tokuyuki Shinohara, Keiko Koga, Akira Hayashi, Yoshiaki Kassai, and Shin Kaneko
2. 発表標題 Characterization of prognitor T cells derived from human pluripotent stem cells under feeder-free conditions
3. 学会等名 ISSCR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----