

令和 2 年 6 月 8 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：18K16113

研究課題名(和文) iPS細胞技術とゲノム編集技術を用いたがん抗原特異的T細胞の再生

研究課題名(英文) Regeneration of T cells specific for cancer antigen using iPSC and genome editing technology

研究代表者

永野 誠治(永野誠治)(Nagano, Seiji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：90618018

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)：がん抗原特異的なT細胞受容体(TCR)遺伝子をゲノム編集技術を用いて汎用iPS細胞に導入し(TCR-KI-iPSC)、そのiPS細胞からT細胞を量産するという新たな免疫細胞療法の開発を行った。具体的戦略として、カセットデッキ構造をiPSCのTCR遺伝子座にノックイン(cKI-iPSC)した後に、外来性TCR遺伝子をCreシステムを用いてそのcKI-iPSC上に入れ替える形式をとった。このように作製された複数のTCR-KI-iPSCを分化誘導することで再生CTLを得ることに成功し、抗原特異的にがん細胞殺傷能力を持つことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞技術を用いてがん細胞に有効なキラーT細胞を量産できることを示してきました。T細胞を細胞製剤として使うという可能性を大きく広げるものです。しかし、そのことが可能な品質のよいiPS細胞株を作製し同定するには長期間を有することも判明しています。ゲノム編集技術を用いて再生医療用のiPS細胞にがんの特異的な受容体遺伝子を導入することで、上記の問題を解決できないか検証し技術的に可能であることがわかりました。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel immuno-cell therapy in which cancer-specific T cells can be mass-generated from iPSC cells that we transduce with cancer antigen-specific T cell receptor (TCR) genes using genome editing technology. In particular, a cassette deck structure was knocked in (cKI-iPSC) at the TCR locus of the iPSC, and then the exogenous TCR genes were replaced on that cKI-iPSC using the Cre system. We succeeded in inducing regenerated CTLs from these TCR-KI-iPSCs, and confirmed that each had antigen-specific killing activity against cancer cells.

研究分野：血液学 免疫学

キーワード：再生T細胞 がん免疫細胞療法 CTL TCR遺伝子 iPS細胞 ゲノム編集技術 再生医療 RMCE

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞技術を用いて T 細胞を量産する新しいがん免疫細胞療法の開発を行っている。これまでに、T 細胞を初期化して樹立した iPS 細胞 (T-iPSC) から抗原特異的な CTL (細胞傷害性リンパ球) を量産できることを報告してきた。この成果は、T 細胞を細胞製剤として使うという可能性を大きく広げるものである。同時に、T-iPSC を臨床で用いるには経済的にも時間的にもコストがかかることが明らかになってきた。患者の末梢血中にはがん抗原 (多くは自己抗原) に対する高親和性の CTL はほとんど存在しないため、iPSC を樹立するために必要な数にまで増幅させることが難しい。また、樹立した複数の T-iPSC から安全性や分化効率について最良のクローンを選択する作業にも数ヶ月を要する。これらを踏まえれば、症例ごとに T-iPSC を樹立することは難しい。

### 2. 研究の目的

患者ごとに iPSC を樹立するのではなく、外来性のがん抗原特異的な T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を汎用性のある iPSC に導入した TCR-iPSC を作製すればこの問題を解決できると考えた。TCR-iPSC から再生させた CTL の増幅能力および細胞傷害活性は、T-iPSC から再生させた CTL と同等の性能を有することがわかっている (投稿準備中)。ただ、当初の TCR-iPSC 法ではレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を用いており、この方法は挿入部位をコントロールできないため、がん化のリスクを完全には否定できないというデメリットがある。本研究では、CRISPR/Cas9 法を用いて、汎用性のある iPSC の TCR 遺伝子座に外来の TCR 遺伝子をノックイン (KI) することによって TCR-KI-iPSC を作製する。がん化の恐れがないだけでなく、TCR 遺伝子座へのノックインであるため、発現レベルや発現のタイミングが安定することも期待できる。さらに、外来 TCR 遺伝子を直接ノックインするのではなく、まずカセットデッキにあたるコンストラクトをゲノム編集技術を用いて挿入し (カセットデッキ KI-iPSC)、その後カセットテープにあたる TCR 遺伝子を Cre/lox システムを用いて挿入する RMCE (Recombinase-mediated cassette exchange) システムを採用する (図 1)。この方法のメリットは、枠型となる iPSC を作製した後は、目的とする TCR 遺伝子を入れ替えるのみで様々な種類の TCR-KI-iPSC の作製が可能となることである。

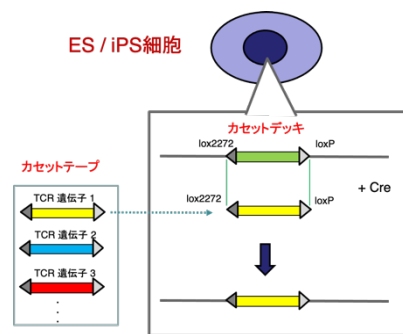


図1 いろいろな TCR に入れ替えが可能なカセットデッキノックイン iPSC 細胞

### 3. 研究の方法

本研究は、将来の臨床応用に向けた開発という位置づけである。そのため、ゲノム編集を施す iPSC として、京都大学 iPS 細胞研究所が進めている iPSC 細胞ストックプロジェクトで樹立された HLA ハプロタイプホモドナー由来の iPSC 細胞株 (以下 iPSC ストック株) を用いた。また、外来 TCR 遺伝子としては、WT1 および NY-ESO1 に特異的な TCR 遺伝子を用いた。具体的な実験の進め方を下記に記す。

#### (I) ゲノム編集技術を用いて枠型 iPSC を作製し、外来 TCR 遺伝子を導入し TCR-KI-iPSC を作製

まず、カセットデッキにあたるコンストラクトとして薬剤耐性遺伝子を Cre 組換え酵素の標的で挟んだターゲティングベクターを、CRISPR/Cas9 法を用いて iPSC ストック株の TCR $\beta$  遺伝子座の D $\beta$ 2 上流に挿入し枠型 iPSC (カセットデッキ KI-iPSC (cKI-iPSC)) を作製する。次に、カセットテープにあたる外来 TCR 遺伝子を Cre 発現ベクターと一緒に transfection することで cKI-iPSC 上で組換えを行い TCR 遺伝子を導入する。それぞれのステップは、薬剤耐性遺伝子を用いて選択する。

#### (II) TCR-KI-iPSC からの CTL 再生と機能評価

樹立した TCR-KI-iPSC から再生 CTL を誘導する。前駆 T 細胞への分化誘導には、OP9/DLL1 ストローマ細胞との共培養により行い、CD4/CD8 共陽性細胞になったところで抗原ペプチドを提示した抗原提示細胞との共培養によって TCR 刺激を行い、CTL にまで成熟させる。その後、再生 CTL の機能評価を行う。

#### 4. 研究成果

i) iPS 細胞へ CRISPR/Cas9 およびガイド RNA の発現ベクターとノックイン用ターゲティングベクターとの混合物を transfection し、その後ハイグロマイシンで薬剤選択後に残存した iPS 細胞コロニーをピックアップし、5つのクローンを樹立した。各クローンから DNA を採取し、目的のクローンを確認するために PCR を行なった。1株でデッキ構造がヘテロ KI、2株でホモ KI されていることがわかった。

ii) カセットデッキ KI-iPSC へ Cre 発現ベクターとともに外来 TCR 遺伝子の搭載したカセット交換ベクターを transfection し、この iPSC の lox サイトで外来 TCR 遺伝子をカセットテープとして入れ替えた。この交換された細胞をピューロマイシンで薬剤選択した。

iii) 最後に、不要なピューロマイシン耐性遺伝子を FLP 発現ベクターを上記の iPSC へ transfection し、ガンシクロビルで薬剤選択し、TCR-KI-iPSC を得た。

iv) このようにして得られた TCR-KI-iPSC の 2 株(WT1-TCR-KI-iPSC と NY-ESO1-TCR-iPSC)用意し、各 T 細胞分化誘導を行った。TCR 遺伝子の発現する前駆 T 細胞状態 (CD4+CD8+細胞) で、各 TCR が適切に発現していることを確認した (図 2)。最後に、これら前駆 T 細胞に各 TCR 刺激を入れ CD8+細胞 (CTL) に誘導し増幅させ、細胞傷害活性を調べた。NY-ESO1-TCR-KI-iPSC は U266 (HLA-A2+, NY-ESO1 抗原陽性の myeloma 細胞株) を殺傷できることを確認した。

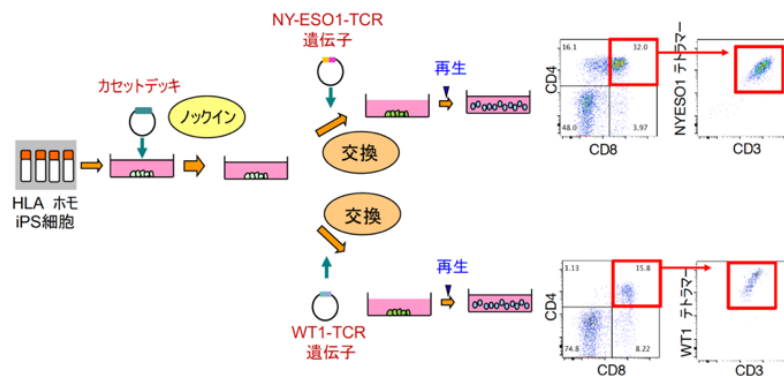


図 2 カセット交換法を用いて作製された各 TCR-KI-iPSC の T 細胞誘導

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 Nagano Seiji, Maeda Takuya, Ichise Hiroshi, Kashima Soki, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Kitawaki Toshio, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi, Masuda Kyoko, Kawamoto Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 High Frequency Production of T Cell-Derived iPSC Clones Capable of Generating Potent Cytotoxic T Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 126 ~ 135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2019.12.006	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野誠治
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的T細胞の再生
3. 学会等名 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野誠治
2. 発表標題 Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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, 縣保年, 永野誠治, 寺田晃士, 増田喬子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/029537	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

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