

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07694

研究課題名(和文) iPS細胞技術を用いたヘルパーT細胞の大量調製法の樹立

研究課題名(英文) Development of in vitro culture to generate helper T cells from iPS cells

研究代表者

河合 洋平 (Kawai, Yohei)

京都大学・iPS細胞研究所・特定助教

研究者番号：90623364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroでiPS細胞からヘルパーT細胞を完全フィーダーフリー条件下で誘導することに初めて成功した。このiPS細胞由来ヘルパーT細胞はプライマリーのヘルパーT細胞と同様にヘルパー系列のマスター転写因子であるThpokを高発現し、樹状細胞の成熟に中心的な役割を果たすCD40Lも刺激依存的に高発現した。サイトカイン産生能、増殖能にも優れていた。さらにiPS細胞由来ヘルパーT細胞は成熟直後こそヘルパー形質を強く示す一方、特定の刺激条件で増幅するとキラー形質も併せ持つ事が分かった。この細胞はサイトカイン産生能、増殖能にも優れるため、腫瘍を直接傷害できるキラーT細胞として強い抗腫瘍活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍免疫治療においては腫瘍抗原の発現低下による免疫回避や免疫抑制的な腫瘍微小環境の修正が重要であるが、この問題の解決にはヘルパーT細胞が重要な役割を果たし得る。本件で作製されたiPS細胞由来ヘルパーT細胞はヘルパーT細胞としての機能に加え、フィーダーフリーで作製できるため臨床応用に対応しやすい、iPS細胞をセルソースとしているため大量生産が可能、ゲノム編集が容易、品質管理が容易という強みも併せ持つ。さらにシンプルな操作でフィーダーフリー条件下でiPSCから簡便にヘルパーT細胞を誘導できるため、本研究で樹立された分化培養系は、サンプルの入手が困難なヒトT細胞分化研究にも貢献し得ると考える。

研究成果の概要(英文)：We have developed in vitro culture system which can generate helper T cells from iPS cells in complete feeder-free condition. We found iPS cell-derived helper T cells expressed helper-associated transcription factor Thpok abundantly and induced expression of a central helper effector molecule CD40L, which is involved in dendritic cell maturation, equivalently or more compared with primary helper T cells. Furthermore, we found the iPS cell-derived helper T cells could acquire cytotoxic activity during specific cell expansion culture. This cytotoxic helper T cells showed potent anti-tumor activity with superior cytokine production and proliferation capacity compared with conventional iPS cell-derived killer T cells.

研究分野：Tumor immunotherapy

キーワード：helper T cell iPS cell Tumor immunotherapy

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療における免疫療法の重要性は、免疫チェックポイント阻害剤であるオプジーボの成功により近年急速に高まっている。さらにキメラ抗原受容体 (CAR: Chimeric Antigen Receptor) を導入した T 細胞を投与する CAR-T 細胞療法などの免疫細胞療法が各種血液腫瘍に対して著明な効果を示しており、チェックポイント阻害剤やワクチン療法等との組み合わせも可能な免疫細胞療法への期待は非常に大きい。T 細胞療法の成績には投与する細胞の数だけでなく質が決定的に重要であることが知られている。T 細胞の拡大培養の過程で生じる細胞疲弊や短命なエフェクター細胞への過度な分化は T 細胞の抗腫瘍活性を著しく損なうため (Science 348: 62-68, 2015)、これらを回避しながら大量の機能的な T 細胞を得ることが現在の免疫細胞療法における最大のハードルとなっている。これらの問題を解決するため筆者の研究室は iPS 細胞を用いた T 細胞の大規模調製法を提案してきた。我々は既に親 T 細胞の抗原特異性を保持しながら、iPS 細胞樹立によりテロメア長と増殖生存能を回復した iPS 細胞由来キラー T 細胞の作製に成功している。iPS 細胞を用いたフォーマットは若返った細胞の大量調製を可能にするだけでなく、ゲノム編集の容易さ、品質管理のしやすさにも強みがある。

腫瘍免疫においては長らく腫瘍を直接認識して傷害するキラー T 細胞が中心的に研究されてきた。しかしながら近年そのキラー活性を最大化できるヘルパー T 細胞の役割も注目されてきている。がん免疫細胞療法では腫瘍によるがん抗原や HLA の発現低下といった免疫回避が大きな課題である。ヘルパー T 細胞にはキラー T 細胞や NK 細胞など内在性の免疫細胞を広範に活性化させる事で免疫回避に対応できるポテンシャルがある。しかしながら iPS 細胞からのヘルパー T 細胞の分化誘導は Artificial thymic organ (ATO) 培養法において報告されているのみであった。この培養系ではマウスフィーダー細胞が必要であること、また低いヘルパー T 細胞誘導効率が臨床応用上の問題として指摘されている。

2. 研究の目的

キラーとヘルパー T 細胞の大規模な作り分けを実現するには T 細胞コミットメントやキラー/ヘルパー運命決定等の分化チェックポイントを必要最低限の機能因子を動かして通過させる必要がある。さらに iPS 細胞由来 T 細胞が十分な治療効果を発揮するためにはヘルパー系列へのコミットメントに加え、腫瘍微小環境に応じて最適な免疫極性をとる順応性、ヘルパー機能を一定期間発揮し続けるための増殖生存能が求められる。細胞製剤の作製とはこれら必要なスペックを必要なだけ付与する作業と言える。しかしながら従来の T 細胞分化研究ではノックアウトマウスの解析等によりヘルパー T 細胞分化における生理的な「必要因子」が主に検討されてきた一方、ヘルパー T 細胞作製に必要な「十分因子」に対する理解は十分でない。ヘルパー T 細胞の各分化段階にはどのような「必要十分因子」が存在し、各々どのような機能性を付与しているのか。これらの因子の組み合わせによってヘルパー T 細胞の分化は *in vitro* でどこまで再現できるのか。これらが本研究の核心をなす学問的問いである。そしてこれらの知見を用いて、高機能性ヘルパー T 細胞の大規模供給を可能にする分化培養系を樹立する事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

筆者らはプライマリー T 細胞と同等の機能性を持たせるという明確な指標に基づき、必要な機能/形質を細分化し、最少培地の中で培養系の各個改善を進めていった。そのため重要な因子や有効サブリの探索はフィーダーフリー培養条件下で行うことにした。本研究では造血前駆細胞ステージから CD4+CD8- (single-positive: SP) ヘルパー T 細胞ステージに至る T 細胞分化過程の最適化を中心的に行った。具体的にはこの過程でキラー T 細胞誘導にもヘルパー T 細胞誘導にも重要である事が知られている、Notch シグナル、インテグリンシグナル、IL-7 などのサイトカインシグナルの量を各分化段階で独立して調節していった。

また T 細胞分化のモニタリングのために必要な分化マーカーがヒト T 細胞分化では当初大きく不足していた。従来一般的にはヘルパーとキラー T 細胞の分岐はヘルパーは CD4SP、キラーは CD8SP というように補助レセプターの発現パターンによってシンプルに区別されてきた。しかし *in vitro* の培養系においては生理的条件下と異なり、様々な細胞種が様々な効率で分化されるのでこれらでは不十分であった。例えば CD4SP 分画には多様なミエロイド系の細胞が多く含まれる。ヘルパー T 細胞のマスター制御因子としては Thpok が知られているが、転写因子であるため培養系最適化の指標として適していなかった。

4. 研究成果

(ヘルパーT細胞分化過程で有用なマーカーの探索と絞り込み)

CD4 または CD8 と発現が相関または逆相関する表面マーカーを抗体スクリーニングキットを用いて探索した。またマーカーの絞り込みの際には iPS-T 細胞の機能性も同時にモニタリングできるようにするため、治療効果に直結し得る増殖能と相関または逆相関するマーカーも実験的に選択した。その結果、高増殖性ヘルパーT細胞に正に相関する表面マーカーとしてCD5, CD28, CD62L、負に相関するマーカーとしてCD56, Nkp44 を見出した。次にこれらを特に重要な指標として培養系最適化を進めていった。

(iPS由来ヘルパーT細胞誘導のための培養系最適化)

ATO 培養法を参考にしてフィーダーフリー化を試みたところ、DP から CD4SP の過渡期における Notch シグナルの調整が決定的に重要である事が明らかとなった。この調整は生理的な T 細胞分化においても見られるものである。さらに T 前駆細胞段階でのインテグリンや IL7 シグナルも重要である事が明らかとなった。各分化段階における総合的な培養系の改変により、iPS 細胞からの CD4 SP ヘルパーT細胞の誘導が完全フィーダーフリー条件で初めて実現した。それと同時に、DP から CD4SP への分化誘導には Notch、IL-7、インテグリンシグナルの調製で十分である事も示された。ヘルパーT細胞の分化効率従来はATO 培養法を上回っていた。またこの改変培養系では CD4+ヘルパーT細胞だけでなく CD8+キラーT細胞の自発的誘導も認められた。これは両系統を用いた細胞療法が iPS 由来 T 細胞においても簡便に行い得る事を意味している。

新たに誘導された CD4SP iPS 由来ヘルパーT細胞はヘルパーT細胞系列のマスター転写因子として知られる Thpok を CD8SP 細胞より多く発現する事がわかった。またその発現レベルはプライマリーのヘルパーT細胞と同レベルであった。一方でキラーT細胞系統のマスター因子として知られる Runx3 の発現は CD8T 細胞に比べて有意に低かった。また樹状細胞の成熟において中心的な役割を果たす事で知られる CD40L の発現を調べたところ、CD4SP iPS 由来 T 細胞での発現は従来の CD8SP iPS 由来 T 細胞に比べて顕著に高く、プライマリーのヘルパーT細胞と同レベルあるいはそれ以上である事がわかった。CD4SP iPS 由来ヘルパーT細胞は IL-2, TNF-a などのサイトカイン産生においても CD8SP iPS 由来 T 細胞より優れていた。さらに iPS 由来ヘルパーT細胞はキラーT細胞に比べ *in vitro*, *in vivo* いずれにおいても高い増殖生存能を示した。

予想外だった事としては、iPS 由来ヘルパーT細胞は特定の拡大培養を経るとヘルパー活性に加えキラー活性も示すようになった事が挙げられる。前述の通り CD4SP iPS 由来 T 細胞は従来の CD8SP iPS 由来 T 細胞より高い増殖生存能も持つため、結果として CD4SP T 細胞は単独であっても CD8SP T 細胞より高い抗腫瘍活性を示すようになった。CD4SP iPS 由来 T 細胞による単独でも高い抗腫瘍活性は *in vitro* だけでなくヒト腫瘍のマウス異種移植モデルにおいても認められた。

近年細胞傷害活性を持つ CD4SP T 細胞はガン患者の腫瘍内でも内在的に認められている。この細胞傷害性ヘルパーT細胞は腫瘍微小環境において腫瘍の免疫原性を高める従来のヘルパー活性に加え、HLA クラス II を発現する腫瘍を直接攻撃する能力を兼備している事が報告されている。また最近 CAR-T 療法によって長期寛解した患者において残存している CAR 陽性細胞の多くが細胞傷害性 CD4 陽性細胞である事も報告されている。免疫系システムを助けるだけでなく、腫瘍を直接攻撃できる能力を長期的に保持し得る細胞傷害性 CD4T 細胞は腫瘍免疫において近年特に注目されている。本件で得られた iPS 由来ヘルパーT細胞の形質は今のところこの細胞に通っている。現在、ガン患者において自発的に誘導される細胞傷害性 CD4T 細胞は数に限りがあり、細胞疲弊の問題も存在する。しかし iPS 細胞からこの細胞を *in vitro* においてほぼ無限に作製し、輸注する事ができれば、この細胞の腫瘍免疫における立ち位置はさらに重要なものになるであろう。さらに iPS 細胞から *in vitro* においてヘルパーT細胞だけでなくキラーT細胞をプールし、棚卸的に患者に届け輸注する事ができれば、免疫療法にさらなる革新をもたらし得るだろう。iPS-T 細胞を用いた免疫細胞療法には大きな臨床応用の可能性がある。また本研究では細胞傷害性ヘルパーT細胞の誘導が完全フィーダーフリー条件で可能になったため、この細胞の特性、分化メカニズムの解明にも寄与し得るであろうと考える。

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 Yohei Kawai, Ai Kawana-Tachikawa, Shuichi Kitayama, Tatsuki Ueda, Shoji Miki, Akira Watanabe and Shin Kaneko	4. 巻 29
2. 論文標題 Generation of highly proliferative, rejuvenated cytotoxic T cell clones through pluripotency reprogramming for adoptive immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 3027-3041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2021.05.016	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1件

1. 著者名 河合洋平その他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 114
3. 書名 腫瘍内科	

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------