

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 1 0 月 2 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22776

研究課題名（和文）1型糖尿病に対する免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of immunotherapy for type 1 diabetes

研究代表者

矢野 寿（Yano, Hisashi）

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：80880749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患や造血幹細胞移植後の移植片対宿主病に対しては、免疫全体を弱める治療が行われており副作用が多い。原因抗原に特異的な制御性T細胞（Treg）を移植できれば根治療法となり得るが、初代Tregは増殖しにくく実用化の目処が立っていない。そこで、iPS細胞から再分化誘導したT細胞をTregに転換する方法の確立を目指した。iPS細胞由来T細胞にFOXP3（Tregを特徴付けるタンパク）の発現を誘導する薬剤の組み合わせを検索し、同定した。さらに、FOXP3の発現を誘導されたiPS細胞由来T細胞が、生体外で細胞傷害性T細胞の増殖を抑制し、生体内でもマウスに生じたGvHDを抑制することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患や移植片対宿主病に対しては根治療法が存在せず、免疫全体を抑制する治療が行われているため、易感染性など副作用も多い。原因抗原特異的なTregの治療応用は以前からのアイデアであるが、その増殖のしにくさから実用化できていなかった。旺盛な増殖能を持つiPS細胞由来T細胞をTreg様細胞に転換することに成功した本研究成果は、自己免疫疾患の原因療法の確立に道を開くものである。また、Tregへの転換作用のある薬剤の検索・同定の過程で得られた遺伝子発現や細胞の機能変化に関するデータは、Tregの分化機序や機能の解明に資するものであり、発生生物学にも貢献を果たしたとすることができる。

研究成果の概要（英文）：For autoimmune diseases and graft-versus-host disease (GvHD) after hematopoietic stem cell transplantation, treatments that weaken the entire immune system are used, resulting in many side effects. If regulatory T cells (Tregs) specific to the causative antigen could be transplanted, it could become a curative therapy. However, primary Tregs are difficult to proliferate, and practical application remains out of reach. Therefore, I aimed to establish a method to convert T cells, which were re-differentiated from iPS cells, into Tregs. I screened and identified a combination of drugs that induce the expression of FOXP3, a protein that characterizes Tregs, in iPSC-derived T cells. Furthermore, we confirmed that iPSC-derived T cells, with induced FOXP3 expression, suppressed the proliferation of cytotoxic T cells in vitro and inhibited GvHD in mice in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：制御性T細胞 iPS細胞 自己免疫疾患 GvHD

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患や造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (Graft versus Host Disease; GvHD) に対しては、ステロイドなど免疫全体を抑制する治療が行われており、易感染性など副作用も多い上に治癒が達成できていない。

この状況に対して、抗原特異的な免疫抑制能を有する制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) を治療に応用するアイデアが以前より提案されており、実際に本細胞を用いた臨床試験も行われている。しかし、ヒト生体から採取された初代 (primary) Treg は本質的に不活性な細胞であり、ヒトに移植するのに適当なスケールまで増殖を得ることが非常に難しい。このために自家移植すら広く行われるには至っておらず、まして off-the-shelf の細胞製剤の実用化は目処が立っていない。

研究代表者 (矢野) は本研究課題への応募時点からその実施期間を通して、京都大学 iPS 細胞研究所金子研究室に在籍した。金子研究室では iPS 細胞からの T 細胞分化が研究されており、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte; CTL) の再分化誘導に成功し、この腫瘍免疫療法への応用が進められていた。

折しもアメリカ UCLA の Dr. Gay M Crooks のチームにより、T 細胞分化誘導に必須の NOTCH リガンドを遺伝子導入したマウス骨髄間質細胞と混合してオルガノイド培養することで、ヒト primary 造血幹細胞や iPS 細胞から再分化誘導した造血前駆細胞から、CD4 陽性 T 細胞を再分化誘導できることが報告されたⁱ。

2. 研究の目的

iPS 細胞から CD4 陽性ヘルパー T 細胞を再分化誘導する技術を用いた上で、得られた T 細胞を免疫抑制性の Treg に転換することができれば、臨床的に十分な細胞数の Treg を確保することができる。そうなれば、自己免疫疾患に対する抗原特異的な免疫抑制療法の確立が視野に入る。本研究の最終目的はここにある。

例えば 1 型糖尿病は GAD65 に対する自己抗体が診断マーカーとして同定されており、この自己抗体は疾患の原因でもある。この抗体産生を促進すると見られる GAD65 特異的ヘルパー T 細胞が 1 型糖尿病の患者から単離され、その特異的な抗原のアミノ酸配列まで同定されているⁱⁱ。この T 細胞から iPS 細胞株を樹立し T 細胞受容体 (T Cell Receptor; TCR) の再構成を生じさせる RAG2 をノックアウトした上で T 細胞に再分化誘導すれば、GAD65 特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞が得られる。このままでは疾患の原因である炎症性ヘルパー T 細胞そのものであるが、もしこの細胞を免疫抑制性の Treg に転換できれば、これを用いた養子免疫療法は 1 型糖尿病の根治療法となる可能性がある。

また、T 細胞の抗原特異性は TCR やキメラ抗原受容体 (Chimeric Antigen Receptor; CAR) の遺伝子導入によっても付与することができる。この方法であれば、Treg をその性質を保ったまま大量に拡大培養することさえできれば、特異的抗原については疾患に合わせてカスタマイズできる。

そこで、増殖能の旺盛な iPS 細胞由来 CD4 陽性 T 細胞をソースとして用い、これを免疫抑制性の Treg に転換する方法を確立することを具体的目標とした。

3. 研究の方法

iPS 細胞から造血前駆細胞を経て CD4 陽性 T 細胞を得る方法は既に確立されていたので、まずそれら細胞の内部に Treg のマスターレギュレーター（細胞を特徴付ける転写因子）である FOXP3 が発現しているか、そしてそれら細胞が炎症性サイトカインを発現しているかを細胞内染色フローサイトメトリーの手法で検証した。

その結果、iPS 細胞由来の CD4 陽性 T 細胞は FOXP3 を発現せず、IFN- γ や IL-4 といった炎症性サイトカインを発現する炎症性のヘルパー T 細胞であることがわかった。そこで、これら細胞を FOXP3 発現を誘導することが報告されている薬剤を単独または複数添加した条件で拡大培養し、FOXP3 発現が誘導されるかをスクリーニングすることにした。

FOXP3 の発現誘導に成功した場合には、それら細胞における遺伝子発現パターンを RNA-Seq の手法を用いて primary Treg と比較し、その異同を検証することとした。

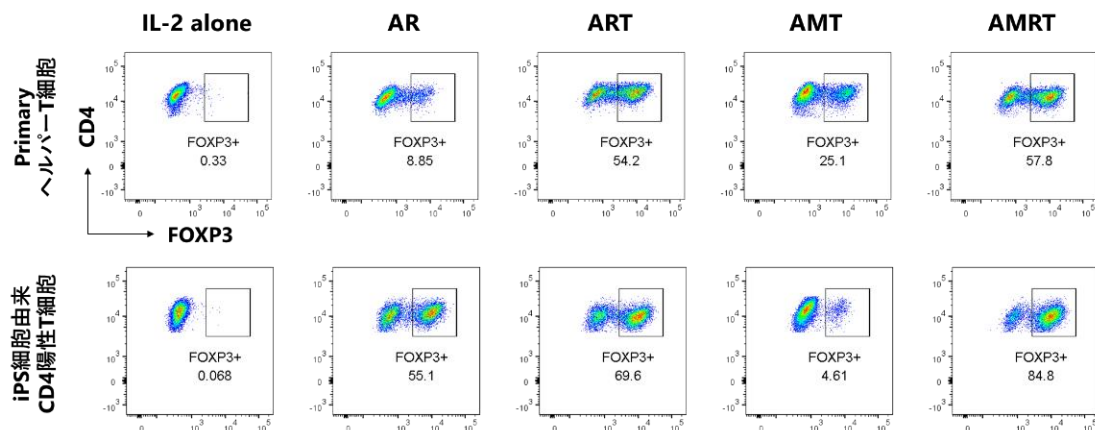
なお、抗原特異的免疫抑制能を評価するに当たり、当初は抗原特異的 TCR を介した 1 型糖尿病モデルマウスの病勢制御を検討した。それは現在なお理想的な評価法であるけれども、患者由来の病因 T 細胞によるマウス *in vivo* での病態の再現と、同一の抗原特異性を持つ Treg の投与による病態の抑制とを達成しなくてはならず、短期間での成果は得られ難い。

まずは iPS 細胞由来 FOXP3 陽性細胞が抗原特異的な免疫抑制能を有するかどうかの判定こそ重要であるので、CAR を介した抗原特異的免疫抑制現象を通してそれを評価することとした。特定の HLA が陽性のヒト PBMC により超免疫不全系統マウスに生じた異種間 GvHD を、その HLA に特異的な CAR を導入した Treg でどれだけ抑制できるかを試験する方法は、primary Treg や各種の CAR コンストラクトの性能評価に広く用いられているⁱⁱⁱ。これを採用した。

4. 研究成果

FOXP3 を誘導する作用が報告されている薬剤を組み合わせ、ヘルパー T 細胞拡大培養時の培地に添加し、FOXP3 の発現誘導効率をスクリーニングした。サイクリン依存性キナーゼ（Cyclin-Dependent Kinase; CDK）8/19 の阻害薬である AS2863619、2 型 Tumor Necrosis Factor 受容体（TNFR2）のアゴニスト抗体クローンである MR2-1、mTOR の阻害薬である Rapamycin、免疫抑制性のサイトカインである TGF-beta について、これらの組み合わせの効果を検証した。

その結果、上記の 4 種を全て添加することで primary ヘルパー T 細胞についても、iPS 細胞由来 CD4 陽性 T 細胞についても高頻度に FOXP3 を誘導できることがわかった（下図；添加した薬剤の組み合わせを薬剤名の頭文字で示した）。



FOXP3 発現誘導処理を施した iPS 細胞由来 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現パターンを、RNA-

Seq の手法を用いて primary Treg や同様の処理で FOXP3 の発現を誘導した primary ヘルパー T 細胞集団と比較したところ、これら細胞が互いに近い遺伝子発現パターンを示していることがわかった。

iPS 細胞由来 FOXP3 陽性 T 細胞が機能的にも免疫抑制性の細胞であるかを確かめるため、primary Treg と iPS 細胞由来 CD4 陽性 T 細胞とに HLA-A2 特異的な CAR を遺伝子導入し、iPS 細胞由来 CD4 陽性 T 細胞について FOXP3 発現を誘導する処理を加えた上で、HLA-A2 陽性の primary CTL と共培養する実験を行った。すると、primary Treg、iPS 細胞由来 FOXP3 陽性 T 細胞はともに CAR 発現の有無によらず HLA-A2 陽性 CTL の増殖を抑制した。

さらに、超免疫不全系統マウスである NSG マウスに HLA-A2 陽性ヒト PBMC を移植して異種間 GvHD を生じさせたモデルに、これら HLA-A2 CAR を遺伝子導入した primary Treg または iPS 細胞由来 FOXP3 陽性 T 細胞を同時投与し、GvHD 発症が抑制されるかを検証した。すると、両細胞はともに CAR を発現している場合にのみ GvHD を抑制する効果を示した。その効果の程度は同等であった。

以上のように、FOXP3 の発現が誘導された iPS 細胞由来 T 細胞が、実際に免疫抑制能を有し、それを生体内においても発揮することが確かめられた。

自己免疫疾患の根治療法となり得る、off-the-shelf の Treg 細胞製剤の開発の第一歩を踏み出した成果であると考えている。

ⁱ Montel-Hagen A, Seet CS, Li S, *et al.* Organoid-Induced Differentiation of Conventional T Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2019; **24**(3): 376-389.e8.

ⁱⁱ Uemura Y, Senju S, Maenaka K, *et al.* Systematic analysis of the combinatorial nature of epitopes recognized by TCR leads to identification of mimicry epitopes for glutamic acid decarboxylase 65-specific TCRs. *J. Immunol.* 2003; **170**(2): 947-60.

ⁱⁱⁱ Dawson NAJ, Rosado-Sánchez I, Novakovsky GE, *et al.* Functional effects of chimeric antigen receptor co-receptor signaling domains in human regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 2020; **12**(557): eaaz3866.

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 Yano Hisashi, Koga Keiko, Sato Takayuki, Shinohara Tokuyuki, Iriguchi Shoichi, Matsuda Atsushi, Nakazono Kazuki, Shioiri Maki, Miyake Yasuyuki, Kassai Yoshiaki, Kiyoi Hitoshi, Kaneko Shin	4 . 巻 31
2 . 論文標題 Human iPSC-derived CD4+ Treg-like cells engineered with chimeric antigen receptors control GvHD in a xenograft model	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Cell Stem Cell	6 . 最初と最後の頁 795 ~ 802.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2024.05.004	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 Yano Hisashi
2 . 発表標題 iPSC-Derived HLA-A2 CAR Tregs Showed Suppression of GvHD in a Xenograft Model
3 . 学会等名 2022 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting
4 . 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------