

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 4 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22857

研究課題名（和文）人工白血球幹細胞を用いた新規T細胞免疫療法の開発

研究課題名（英文）Novel adoptive T cell immunotherapy using induced leukocyte stem cell

研究代表者

重廣 司（SHIGEHIRO, Tsukasa）

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：30876058

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）：がん特異的な受容体を遺伝子導入するT細胞による免疫療法は優れた治療成績を上げている。この治療効果を向上させるため、造血幹・前駆細胞から“若く”活発なT細胞を産生する方法が提案されている。我々は、以前に、自己複製能と白血球への分化能をもつ人工白血球幹（iLS）細胞を開発することに成功した。本研究では、このiLS細胞から活性に優れる遺伝子改変T細胞を大量に作製することを目的とした。まず、がん特異的な受容体を遺伝子導入したiLS細胞から大量のT細胞を産生することに成功した。そして、このT細胞は顕著な抗がん活性を示した。したがって、iLS細胞は遺伝子改変T細胞の供給源として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、iLS細胞からがん免疫細胞療法のための遺伝子改変T細胞を作製することに成功した。これまで、造血幹・前駆細胞や人工多能性幹細胞から遺伝子改変T細胞を作製する方法が考案されているが、得られる細胞数、コスト、安全性などの課題があった。本研究で開発したiLS細胞は簡便に作製することができ、一定の条件においてのみ自己複製により増幅することができるので、安全で安価に大量の遺伝子改変細胞が作製できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Genetically engineered T cell therapy has made great strides in cancer therapy. However, there are still some obstacles for the success of the therapy, including T-cell exhaustion/terminal differentiation during manufacturing processes. Hematopoietic stem/progenitor cells have been proposed to generate "young" engineered T cells. We previously investigated a leucocyte progenitor cell called induced Leukocyte stem (iLS) cell which has self-renewal capacity and differentiation potential to leukocytes. In this project, we had developed engineered T cells generated from iLS cells. Cancer-reactive receptor gene was stably transduced into iLS cells. The iLS cells generated tremendous amount of the engineered T cells. The engineered T cells showed significant anticancer activity with antigen-specific manner. Therefore, iLS cell should be a promising cell as a source of the engineered T cells for cancer immunotherapy.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：T細胞免疫療法 人工白血球幹細胞 がん免疫療法 T細胞受容体 キメラ抗原受容体

1. 研究開始当初の背景

がん特異的な T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子改変 T (TCR-T) 細胞とキメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子改変 T (CAR-T) 細胞によるがん免疫療法は臨床試験において優れた治療効果が報告されている (Robbins et al., *Clin. Cancer Res*, 2016)。しかし、現在、その大元の細胞として成熟 T 細胞が用いられ、作製される遺伝子改変 T 細胞の長期増殖による老化・疲弊化が問題である。また、TCR-T 細胞において、内在性 TCR とのミスマッチによる抗原認識能の低下と未知抗原に対する反応性の獲得などが課題となっている。この解決策として、造血幹・前駆細胞 (HSPC) から遺伝子改変 T 細胞を作製する方法が考案されている (Gschweng et al., *Immunol Rev*, 2014)。HSPC を利用すると、成熟 T 細胞よりも高い増殖能と細胞障害活性を有した“若い”T 細胞を得られる上に、TCR-T 細胞では TCR 再構成前に TCR を導入するため対立遺伝子排除により内在性 TCR の発現が抑制される (Najima et al., *Blood*, 2016)。しかし、HSPC は患者から極微量しか得られないため、治療に十分な遺伝子改変 T 細胞を作製することは困難である。従って、遺伝子改変 T 細胞の供給源となる新たな細胞が求められている。

2. 研究の目的

我々は、以前に、白血球 (T, B, ミエロイド系細胞) への分化能を持ち無限に増幅する iLS 細胞を独自に開発することに成功した (Ikawa et al., 2015, *Stem Cell Rep*)。そこで本研究では、iLS 細胞を用いた新規がん免疫治療用細胞を開発することを目的とした。すなわち、iLS 細胞へ、がん特異的受容体を導入し、CD8 陽性 T 細胞へと分化誘導することにより、高い抗がん活性を持つがん特異的 T 細胞を大量に作製する技術を開発する。本方法はがん治療のみならず、他の疾患治療にも応用することが可能であり、汎用性の高い T 細胞免疫療法として発展することが期待される。

3. 研究の方法

iLS 細胞は、B 細胞分化に必須の転写因子 E2A の働きを阻害する ID3 を HSPC へ強制発現し、B 細胞分化条件下で培養することにより作製・維持される。本研究では、タモキシフェンによる ID3 制御が可能な ID3-ERT2 を用いて iLS 細胞を作製した。

iLS 細胞にがん特異的受容体を遺伝子導入した iLS 細胞を樹立し、オバアルブミン (OVA) 特異的 OTI T 細胞受容体 (OTI-TCR) もしくは CD19 特異的キメラ抗原受容体 (CD19-CAR) を安定発現する iLS 細胞 (それぞれ、OTI-TCR iLS 細胞および CD19-CAR iLS 細胞) の樹立を試みた。樹立した OTI-TCR iLS 細胞および CD19-CAR iLS 細胞を Delta-like 1 (DLL1) を安定発現する OP9/DLL1 細胞上で培養することで T 細胞への誘導を試みた。さらに、生成された T 細胞の抗原特異的な細胞障害活性を *in vitro* および *in vivo* において評価した。

また、近年、CAR 細胞療法は、T 細胞のみならず、NK 細胞やマクロファージを用いても有効であることが報告されている (Liu et al, 2020, *NEJM*; Kichinsky et al., 2020, *Nat Biotechnol*)。そこで、CD19-CAR iLS 細胞から NK 細胞およびマクロファージを生成することも試みた。

4. 研究成果

4-1. がん特異的受容体を安定発現する iLS 細胞の樹立

OTI-TCR 遺伝子および CD19-CAR 遺伝子をレトロウイルスによって iLS 細胞へ導入し、がん特異的受容体を安定発現する iLS 細胞の樹立を試みた。その結果、OTI-TCR また CD19-CAR を安定して発現する iLS 細胞を作製することに成功した。この OTI-TCR iLS 細胞および CD19-CAR iLS 細胞は、導入遺伝子の発現を維持したまま長期に培養できることが確認された。その結果、例えば、OTI-TCR iLS 細胞では、1ヶ月間で数百億倍にも増幅させることに成功した (図1)。

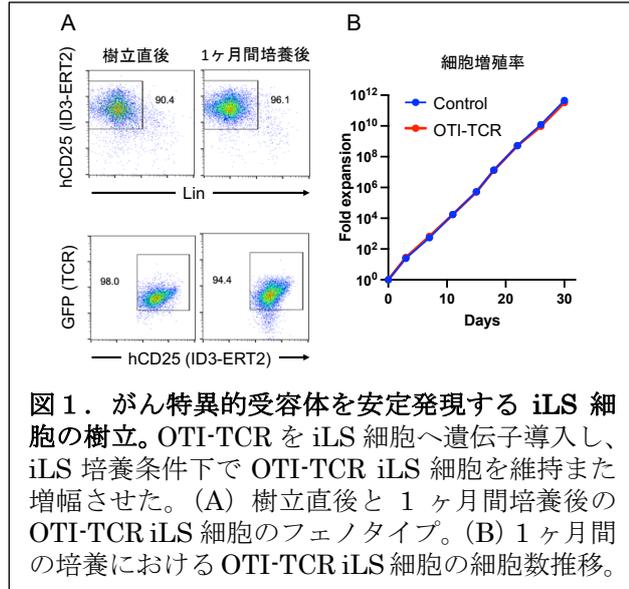


図1. がん特異的受容体を安定発現する iLS 細胞の樹立。OTI-TCR を iLS 細胞へ遺伝子導入し、iLS 培養条件下で OTI-TCR iLS 細胞を維持また増幅させた。(A) 樹立直後と 1ヶ月間培養後の OTI-TCR iLS 細胞のフェノタイプ。(B) 1ヶ月間の培養における OTI-TCR iLS 細胞の細胞数推移。

4-2. iLS 細胞からの CD8 陽性 T 細胞の作製

次に、これらの iLS 細胞を T 細胞への誘導を試みた。iLS 細胞を OP9/Delta-like 1(OP9/DLL1) 細胞上で Notch 刺激下において培養することで、高効率で CD4/CD8 ダブルポジティブ (DP) 細胞へと分化誘導させることに成功した。この DP 細胞を、さらに、OVA ペプチド (OVA₂₅₇₋₂₆₄) を結合する抗原提示細胞と共培養することによって、OTI-TCR を発現する CD8 シングルポジティブ T 細胞を作製することに成功した。この T 細胞誘導過程において、CD8 陽性 T 細胞は分化誘導前の iLS 細胞から 7500 倍も増幅させつつ生成され、大量の免疫細胞療法用 CD8 陽性 T 細胞が iLS 細胞から作製できることが示された。同様にして、CD19-CAR iLS 細胞を T 細胞誘導した結果、DP 細胞を産生させ、抗 CD3/CD28 抗体で刺激することによって、CD8 陽性 T 細胞を作製することに成功した (図4)。

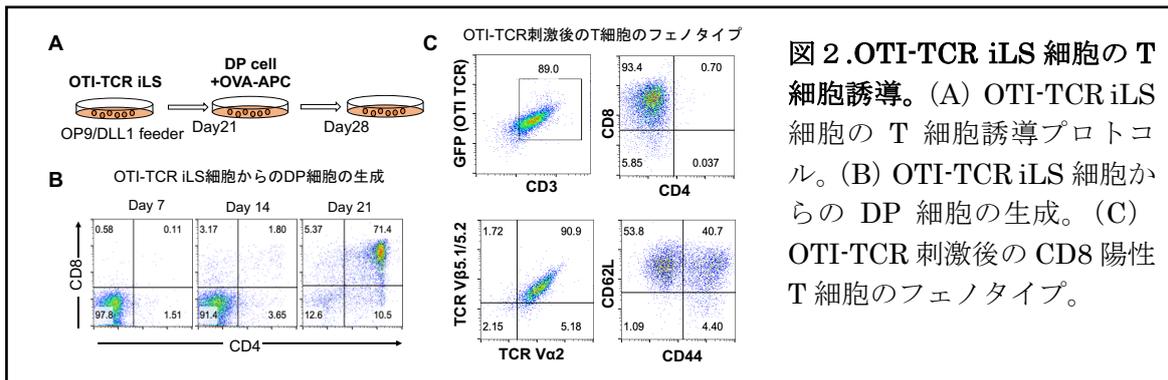
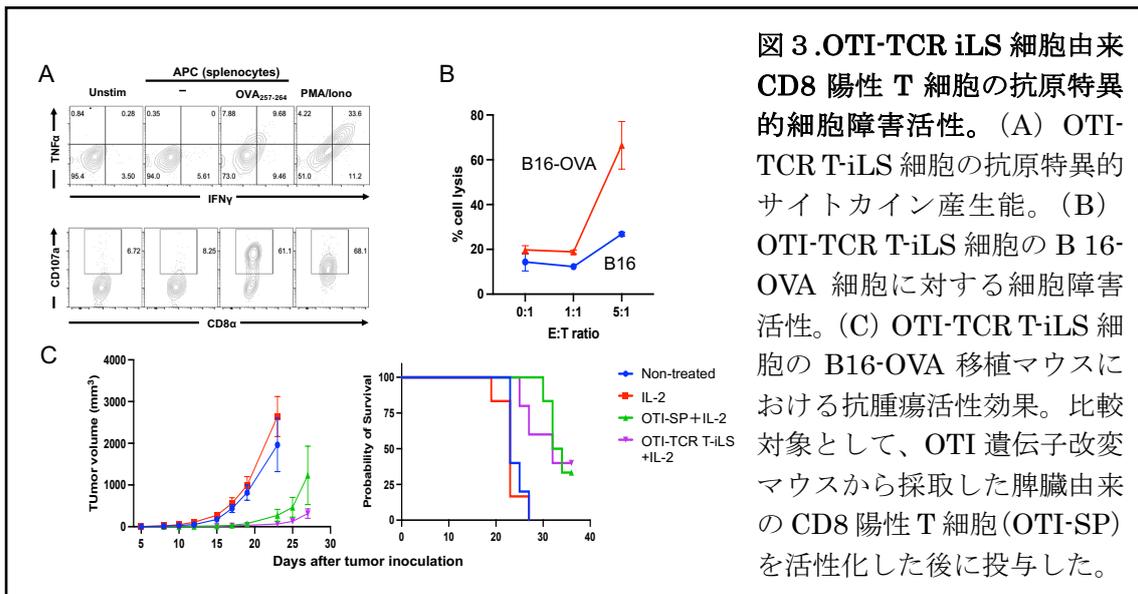


図2. OTI-TCR iLS 細胞の T 細胞誘導。(A) OTI-TCR iLS 細胞の T 細胞誘導プロトコル。(B) OTI-TCR iLS 細胞からの DP 細胞の生成。(C) OTI-TCR 刺激後の CD8 陽性 T 細胞のフェノタイプ。

4-3. OTI TCR-iLS 細胞由来 CD8 陽性 T 細胞の抗がん活性評価

次に、OTI-TCR iLS 細胞由来 CD8 陽性 T (OTI-TCR T-iLS) 細胞の抗原特異的な細胞障害活性を *in vitro* にて評価した。OTI-TCR T-iLS 細胞は抗原特異的にサイトカイン産生し (図3A)、OVA 安定発現 B16 (B16-OVA) 細胞に対して高い細胞障害活性を有することが認められた (図3B)。これらの結果をもとに、*in vivo* 抗腫瘍活性効果試験を B16-OVA 細胞を皮下移植した担がんモデルマウスを用いて行った。OTI-TCR T-iLS 細胞は、OTI 遺伝子改変マウスの脾臓から

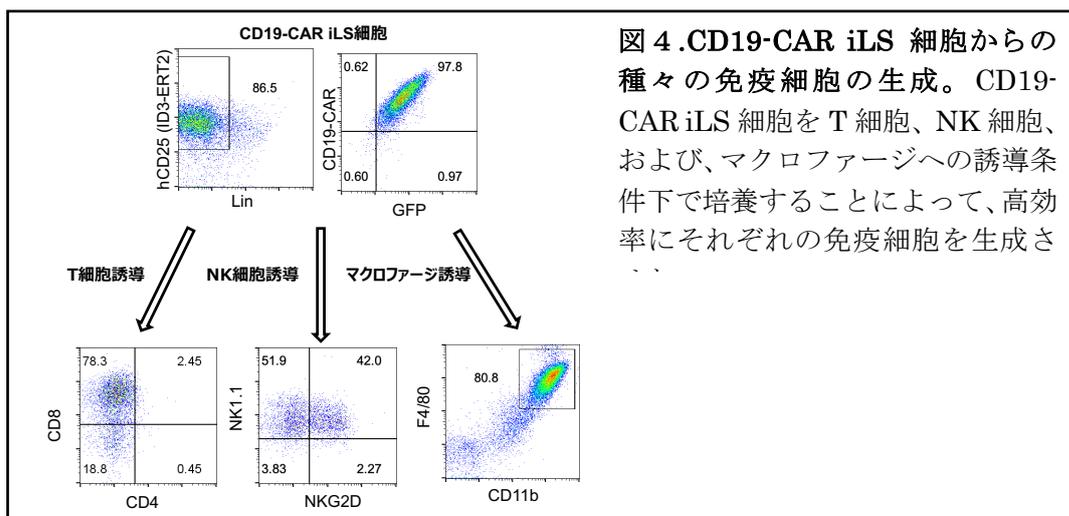
採取した T 細胞と同程度の非常に高い抗がん活性を示した (図 3 C)。したがって、がん特異的 TCR を安定導入した iLS 細胞から抗原特異的な細胞障害性 T 細胞が産生できることが明らかとなった。



4-4. CD19-CAR iLS 細胞の T 細胞および NK 細胞への分化誘導

我々は、以前に iLS 細胞が NK 細胞への分化能も有することを報告している (Ikawa et al., 2015, Stem Cell Rep)。そこで、樹立した CD19-CAR iLS 細胞から CAR-NK 細胞を作製できるかを検証した。その結果、インターロイキン (IL) -2 および IL-15 を添加し培養することによって、効率的に CAR-NK 細胞を作製することに成功した (図 4)。

また一方で、我々は、CD19-CAR iLS 細胞からマクロファージを誘導することができるかどうかを検証した。その結果、報告されているマクロファージ誘導条件下で (Richardson et al., 2015, Plos One)、CD19-CAR iLS 細胞から効率的にマクロファージを作製することに成功した (図 4)。これらの結果から、iLS 細胞は、T 細胞のみならず、がん免疫細胞法に用いる様々な免疫細胞を大量に作製する供給源として有望であることが示された。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shigehiro Tsukasa	4. 巻 34
2. 論文標題 FUT8-mediated Aberrant <i></i>-glycosylation of B7H3 Suppresses Antitumor Immunity in Triple-negative Breast Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E39 ~ E40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2202.6E	査読の有無 無
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 Shigehiro Tsukasa	4. 巻 33
2. 論文標題 Detection of Cancer-reactive T Cells Using (1,3) Fucosyltransferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E45 ~ E46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2103.6E	査読の有無 無
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 -

〔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 重廣司、鈴木藍彩、Gu Fangbing、平川真弓、高木正稔、犬飼岳史、伊川友活
2. 発表標題 人工白血球幹（iLS）細胞を用いたTCF3融合遺伝子陽性B-ALL発症モデルの確立
3. 学会等名 第83回日本血液学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木藍彩、重廣司、伊川友活
2. 発表標題 人工白血球幹（iLS）細胞を用いた、TCF3融合型B細胞性急性リンパ性白血病の発症機序の解明
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------