

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659058

研究課題名（和文）抗原特異的 T 細胞由来のヒト iPS 細胞を用いた新しい細胞治療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel immunotherapy by using of human iPS cells of an antigen-specific T-cell origin

研究代表者

中内 啓光 (NAKAUCI HIROMITSU)

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：40175485

研究成果の概要（和文）：

抗原特異的 T 細胞の輸注療法は多くの腫瘍や慢性ウイルス感染症に対して効果的な治療法と考えられている。しかしその効果は、抗原特異性 T 細胞の疲弊現象によって大きく減ぜられることが知られる。我々はその問題を克服するために抗原特異的 T 細胞を初期化し、そこから T 細胞受容体遺伝子再構成（抗原特異性）の保存された iPS 細胞を樹立した。更には、それらの iPS 細胞を T 系譜細胞へ再分化させることに成功した。再分化した T 系譜細胞の抗原特異性は元になった T 細胞と同一と考えられた。本手法を発展させれば、抗原特異的なメモリー T 細胞を体外で無尽蔵に誘導することが可能と考えられ、治療開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Adoptive immunotherapy with antigen-specific T cells expressing a limited TCR repertoire is a promising approach to fighting various types of cancer and chronic viral infections; however, the effectiveness of this therapy declines due to exhaustion of the antigen-specific T cells. To overcome this problem, we have explored the potential of induced pluripotent stem (iPS) cell technology and have generated T cell-derived iPS (T-iPS) cells. Furthermore, we have succeeded in redifferentiating T-iPS cells into T lineage cells. As was expected, the invariance of the antigen specificity was evidenced by the fact that the TCR gene rearrangement patterns in the redifferentiated T lineage cells were identical to those in the original T cell. These findings suggest that regeneration of antigen-specific immune systems using iPS cell technology will shed new light on the field of adoptive immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：抗原特異的 T 細胞、iPS 細胞、幹細胞、T 細胞の分化誘導

1. 研究開始当初の背景

免疫系において中心的役割を持つ T 細胞は通常一種類の抗原受容体を持ち、抗原と MHC の両方を認識し、ヘルパー、キラーなどの機能を発揮する。ウイルス感染や癌免疫の主体となるのが T 細胞であることから、T 細胞をクローナルに増殖し、細胞治療に用いる試みが行なわれてきた。しかし、現実には患者から T 細胞を取り出し、*in vitro* で培養増殖することは意外と難しく、数は得られたとしても機能や寿命を保ったまま治療に役立つ T 細胞を多数得ることは困難である。したがって現状では臨床効果を確実に得ることができる T 細胞による免疫細胞治療を確立することは難しい。一方で、幹細胞生物学や発生工学の技術が進みヒト多能性幹細胞が容易に樹立されることやラット ES 細胞、iPS 細胞の樹立、それによるノックアウトラットの作成が技術的に可能となっている。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究プロジェクトでは患者末梢血からウイルス抗原や腫瘍特異抗原に対する抗原特異的 T 細胞を抗原-テトラマー複合体と FACS を利用して分離し、そこから効率良く iPS 細胞を樹立する技術を確立する。ここで確立された iPS 細胞は患者の T 細胞クローン由来であることから、誘導された T 細胞は全て同一の抗原受容体を発現するはずである。従ってこの iPS 細胞由来の T 細胞は全て同じ抗原特異性・MHC 拘束性を持つことが予想される。

次に樹立された iPS 細胞から T 細胞を誘導する方法を確立する。これについてはこれまでも ES 細胞から T 細胞を誘導

する方法が幾つか報告されているが、ここでは ES 細胞ではなく T 細胞から誘導した iPS 細胞を用いるところが特徴といえる。

Ex vivo の胎仔胸腺 *organ culture* による方法に加えて、NOG マウスや、ラット ES 細胞ならびに iPS 細胞を利用して作製した免疫不全ラットを利用して、*in vivo* でのヒト T 細胞誘導を試みる。得られた iPS 細胞由来の T 細胞についてその抗原特異性や機能を確認し、細胞治療への利用の可能性を探る。

3. 研究の方法

実験 1: 担癌患者、ウイルス感染症患者の細胞障害性 T 細胞由来 iPSC の樹立

癌患者あるいは慢性ウイルス感染症患者から、疾患抗原特異的 T リンパ球を抗原-テトラマー複合体とフローサイトメーターを利用して分離し、T 細胞クローンに由来する iPSC の樹立を試みた。

実験 2: 抗原特異的 TCR 遺伝子再構成を持つ iPSC からの細胞障害性 T リンパ球の誘導

我々が開発したヒト iPSC からの血球誘導系をもとに、monoclonal TCR へのペプチド/HLA-Class I 刺激あるいは HLA トランスジェニックマウス胎仔胸腺での組織培養などを併用して、*in vitro* での monoclonal CTL 誘導を試みた。また、胸腺内成熟に期待して NOG マウスの生体内でも monoclonal CTL 誘導を試みた。

実験 3: 担癌患者、ウイルス感染症患者 iPSC 由来 CTL の HLA 拘束性細胞傷害能の評価

得られた iPSC 由来 CTL が抗原特

異性を保っていることを、*in vitro* の系で評価した。

4. 研究成果

①、細胞障害性 T 細胞由来 iPS (T-iPS) 細胞の樹立

研究初年度である平成 22 年は、基礎実験としてまずマウスの末梢 T 細胞からの iPS 細胞樹立を試みた。レトロウイルスベクターで山中 4 因子を導入しマウス胎児線維芽細胞 (MEF) フィーダーと共培養を行ったが、MEF からの iPS 細胞誘導とは全く異なり、マウス T 細胞から iPS 細胞を得ることはできなかった。誘導時に VPA や GSK3b 阻害剤、MEK 阻害剤、p53 阻害剤などを使用しても効率の改善は認められなかった。マウス末梢血 T 細胞を ground state の iPS 細胞へと初期化することは困難と考え、epiblast タイプの iPS 細胞であるヒト iPS 細胞を末梢血の T 細胞から樹立することを試みた。

抗原非特異的な CD8 T 細胞、各種のがん抗原をソースとして、レトロウイルスベクターによる山中因子導入を行い、CD8 陽性 T 細胞をリプログラミングするために必要な因子と培養条件を絞り込んだ。当初は極めて効率が悪かったが、平成 23 年度には、センダイウイルスベクターを用いる手法を取り入れるなど工夫を重ね、CD8 T 細胞のリプログラミング効率を 0.001% から 0.1% へと約 100 倍向上させた。

②、TCR 遺伝子再構成を持つ iPS 細胞からの細胞障害性 T リンパ球の誘導

平成 22 年度は、抗原非特異的な手法で得られた T-iPS 細胞をソースに、*in vitro* ならびに *in vivo* の双方の系を用いて成熟分化 T 細胞を得ることを試みた。*in vitro* に

おいて、既報では ES 細胞を CD4/CD8 両陽性 T 細胞より先の成熟段階に分化誘導することは困難とされているが、サイトカインとフィーダーの最適化により、CD4 あるいは CD8 陽性の T 細胞分画を僅かに得ることが出来た。また、NOD/JAK3(-/-) マウスをレシピエントとしてヒト T-iPS 細胞由来の奇形腫を作らせることで、ヒト胎児胸腺を用いずに CD4 あるいは CD8 陽性の T 細胞分画を得ることが出来た。平成 23 年には T 系譜へと分化した細胞とフィーダー細胞を *in vitro* で共培養しつつ、サイトカイン存在下に TCR 刺激を繰り返すことによって、再分化 CD8 陽性細胞の出現効率を改善した。

実験 3: ウイルス感染症患者 iPSC 由来 CTL の抗原特異性の評価

上記の方法でウイルス抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞から iPS 細胞を得た。それを再分化させて、CD8 陽性 T 細胞受容体配列を解析したところ、元の細胞と同一であることが確認された。T 細胞誘導に関する現在までの報告では、抗原特異性の確認にまで至っていないものが多く、本課題で開発された手法の有用性が示唆された。

また平成 23 年には再分化 T 細胞の機能を *in vivo* で評価するための免疫不全ラット開発のソースとなる、ラット由来の iPS 細胞の樹立にも成功し、報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Yamazaki S, Sato H, Umino A, Wakiyama Y, Arai M, Sanbo M, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 査読 有, 6:e22008, 2011,

- ② Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*, 査読有, 11:476-71, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.183780
- ③ Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One*, 査読有, 23:e14099, 2010, doi:10.1371/journal.pone.0014099
- ④ Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med*, 査読有, 20:2817-30, 2010, doi: 10.1084/jem.20100844
- ⑤ Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, 査読有, 3:787-99, 2010, DOI 10.1016/j.cell.2010.07.039
- ⑥ Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol*, 査読有, 17:271-5, 2010, doi: 10.1097/MOH.0b013e32833a25ee
- ⑦ Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*, 査読有, 29:4157-69, 2010, doi:10.1038/onc.2010.172

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hiromitsu Nakauchi, Generation of functional organs from pluripotent stem cells, Cold Spring Harbor Conferences Asia & ISSCR,

Oct 26, 2011, Tehran, Iran

- ② Hiromitsu Nakauchi, Generation of functional organs from iPS cells, 12th International Congress on Reproductive Biomedicine & 7th International Congress on Stem Cell Biology and Technology, Sep 7, 2011, Suzhou, China
- ③ Hiromitsu Nakauchi, Non-myelinating Schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-b signaling, The Oklahoma Center for Adult Stem Cell Research (OCASCR), Jun 14, 2011, Oklahoma, USA
- ④ Hiromitsu Nakauchi, Generation of Rat Pancreas in Mouse: toward the next generation of regenerative medicine, ESHG Symposium, May 29, 2011, Amsterdam, Holland
- ⑤ Hiromitsu Nakauchi, Replicative senescence of hematopoietic stem cells after single cell transplantation, 3rd Else Kröner-Fresenius Symposium on Molecular Mechanisms of Stem Cell Aging, May 20, 2011, Ulm, Germany
- ⑥ Hiromitsu Nakauchi, Non-myelinating schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-beta signaling, Keystone Symposia, Apr 1, 2011, Keystone, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- ①名称: 抗原特異的 T 細胞の製造方法
発明者: 中内啓光、金子新、西村聡修
権利者: 東京大学
種類: 米国仮出願
番号: 特願 2012-116639
出願日: 2012 年 5 月 22 日
国内外の別: 国外
- ②名称: 多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法
発明者: 佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内啓光
権利者: 東京大学、テルモ株式会社
種類: PCT
番号: JP2011/070563
出願年月日: 2011 年 9 月 9 日
国内外の別: 国外
- ③名称: 誘導型多能性幹細胞の製造方法
発明者: 中内啓光、大津真、高山直也、安東赫

権利者：東京大学
種類：PCT
番号：JP2011/063650
出願年月日：2011年6月15日
国内外の別：国外

④ 名称：Method for Immunological
Reconstitution using Pluripotent Stem
Cells

発明者：中内啓光、金子新、西村聡修

権利者：東京大学

種類：PCT

番号：JP2011/052260

出願日：2011年2月3日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中内啓光 (NAKAUCHI HIROMITSU)

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：40175485