

令和 6 年 6 月 20 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：2022～2023

課題番号：22K20821

研究課題名（和文）固形腫瘍への抗腫瘍効果を劇的に向上させる新規因子を導入したiPS細胞由来T細胞の開発

研究課題名（英文）Development of iPS cell-derived T cells with novel factors that dramatically improve anti-tumor efficacy against solid tumor

研究代表者

石川 晃大 (Ishikawa, Akihiro)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：30966049

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）：固形腫瘍内に浸潤したiPS細胞由来T(iPS-T)細胞を回収し、機能的と思われた細胞集団から有用遺伝子の抽出を試みた。その結果、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を向上させる遺伝子の候補を複数見出すことに成功した。続いて当該遺伝子をiPS-T細胞に発現させたところ、従来のiPS-T細胞と比較してその機能性を有意に向上させる遺伝子のさらなる選別に成功した。実際に固形腫瘍マウスモデルを用いた解析で、選別遺伝子発現iPS-T細胞を投与したマウス群では固形腫瘍の増大を有意に抑制したことから、選別遺伝子がiPS-T細胞の機能性に非常に重要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

本研究で選別に成功した遺伝子はこれまでT細胞の機能向上に貢献するよりはT細胞・幹細胞分化に関係していることが多く報告されていた。実際に選別遺伝子を発現したiPS-T細胞はT細胞の抗腫瘍効果が高い集団を保持した細胞であった。選別遺伝子がiPS細胞からのT細胞分化に重大な影響を与える可能性を鑑みて、今後、選別遺伝子をiPS細胞に導入してT細胞分化を行う予定である。本研究によってこれまでになかった機能的iPS-T細胞の作製や、T細胞分化における新しい知見を見出すといった基礎科学的視点での研究の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：iPS cell-derived T (iPS-T) cells infiltrated in solid tumors were analyzed and where useful genes were extracted from the cell populations that were considered functional. As a result, we succeeded in finding several candidate genes that could improve the anti-tumor efficacy against solid tumors. Candidate genes were expressed in iPS-T cells and found that we succeeded in further sorting out the genes that significantly improved the functionality of the iPS-T cells compared to conventional iPS-T cells. In an analysis using a mouse model of solid tumors, progression of solid tumors was significantly suppressed in the group of mice treated with sorted gene-expressing iPS-T cells, suggesting that the sorted genes are very important for the functionality of iPS-T cells.

研究分野：がん免疫分野

キーワード：iPS細胞 iPS細胞由来T細胞 遺伝子改変T細胞療法 固形腫瘍 腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、第4のがん治療法として患者体内の免疫機能を活性化させるがん免疫療法が注目されている。特にがん抗原を特異的に認識する T 細胞がその要となるが、固形腫瘍に対する臨床試験ではその治療効果は芳しくない [Hartmann J. et al., *EMBO Mol Med*, 2017]。固形腫瘍に対する免疫応答を効果的に示すには T 細胞の「遊走能」・「長期生存能」・「細胞傷害活性能」を向上させることが重要と報告されており、機能向上因子を T 細胞へ遺伝子導入することが解決方策の一つとして考えられている [Chen DS. et al., *Immunity*, 2013]。

申請者所属の研究室にて世界で初めて作製に成功した人工多能性幹(iPS)細胞由来 T(iPS-T)細胞はがん免疫療法を広く普及するうえで重要なプラットフォームとして期待されている [Nishimura T. et al., *Cell Stem Cell*, 2013, Stéphane D. et al., *Nat Rev*, 2020]。作製した iPS-T 細胞は CD19 抗原をターゲットにした B リンパ腫マウスモデルでは機能的であったが、固形腫瘍に対する治療効果は初代培養(primary)T 細胞を用いた場合と同様に低く、より一層の工夫が必要と考えられた [Iriguchi S. et al., *Nat. Commun*, 2021]。

申請者が先行研究から、iPS-T 細胞機能を向上させる因子を探索した結果、i 長期生存能の改善・長期にわたる細胞傷害活性能の維持に加え、新たにケモカイン受容体発現向上に伴う遊走能の向上を達成し(データ未公開)、免疫不全 (NSG)マウスの皮下に腫瘍を接種した担癌マウスモデルでも非常に強い抗腫瘍効果を発揮する因子の抽出に成功した(国際誌に論文提出中)。しかし、当該因子を発現することによってなぜ iPS-T 細胞の機能が向上するのか、その分子メカニズムに関しては未解明な状態である。以上から本提案の学術的「問い」は、当該因子を発現した iPS-T 細胞の固形腫瘍に対する強力な抗腫瘍効果に本質的に関与する有用因子は何か、である。本研究の達成によって、最終的には iPS-T 細胞の機能向上に重要なメカニズムを明らかにし、上述した「遊走能」・「長期生存能」・「細胞傷害活性能」といったすべての機能を特異的かつ効率的に発揮した iPS-T 細胞の作製を通じて最終的にがん免疫療法の臨床応用に貢献できると期待している。

2. 研究の目的

本研究では先行研究で見出した因子を発現した iPS-T 細胞の固形腫瘍に対する強力な抗腫瘍効果を発揮する上で本質的に関与する新たな有用遺伝子の探索を行うことで、iPS-T 細胞の抗腫瘍効果増強メカニズムを解明することを目的にした。

3. 研究の方法

過去に我々が報告した方法を用いて iPS 細胞から T 細胞へと分化誘導を行い、iPS-T 細胞を作製した。抗原特異性を持たせるために肝臓がんで高発現している GPC3 を認識するキメラ抗原受容体と先行研究で見出した因子を iPS-T 細胞に発現させた。In vitro で GPC3 に対する活性能を評価した後に NSG 皮下担癌マウスモデルを用いて iPS-T 細胞を静脈投与した。投与後腫瘍内に浸潤した iPS-T 細胞を回収し、シングルセル RNA シーケンス法を用いて発現遺伝子の定量と有用クラスターの探索を行った。有用クラスターの選定方法としては上述した「遊走能」・「長期生存能」・「細胞傷害活性能」に関連した遺伝子が発現しているかで評価した。有用クラスターの中で有意に向上している遺伝子を抽出し、当該遺伝子をレトロウイルスベクターにクローニングした。当該ベクターを用いて iPS-T 細胞に遺伝子導入し、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果の向上を評価した。

4. 研究成果

固形腫瘍内に浸潤した有用因子発現 iPS-T 細胞を用いてシングルセル RNA シーケンス法を実

施した結果、mock細胞と比較して特異なクラスターを見出すことに成功した。遺伝子発現の定量、並びにパスウェイ解析を行った結果、当該クラスターには上記した固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を向上させる「遊走能」・「長期生存能」・「細胞傷害活性能」に関連する遺伝子発現・パスウェイが有意に向上した細胞が多く含まれていることがわかった。そこで当該クラスターにて特に有意に発現している遺伝子 top10 を抽出し、レトロウイルスベクターにクローニングした。

レトロウイルスを用いて iPS-T 細胞に抽出遺伝子を発現させ、その機能を in vitro にて評価した。その結果、mock細胞と比較して①ターゲット細胞に対する長期細胞傷害活性能の向上を劇的に向上させる複数の遺伝子の選別に成功した。その原因として、②長期生存に関与する若いメモリーT細胞フェノタイプが維持されていること、③T細胞遊走に関与するケモカイン受容体の発現向上が確認され、選別した遺伝子は「遊走能」・「長期生存能」・「細胞傷害活性能」に関与していることが示唆された。最後に選別遺伝子を発現した iPS-T 細胞を用いて in vivo での評価を行った。NSG皮下担癌マウスモデルに当該 iPS-T 細胞を静脈投与し、固形腫瘍体積の変動を確認した結果、mock細胞と比較して遺伝子 A, B, C を導入した iPS-T 細胞は固形腫瘍の進行を有意に抑制することを見出した(図1)。

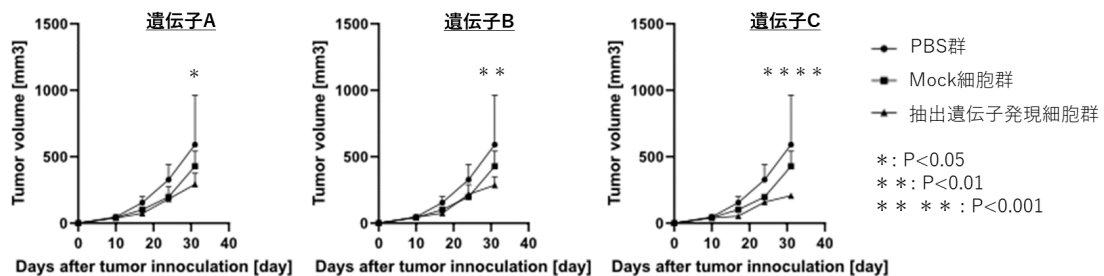


図1. 抽出遺伝子発現iPS-T細胞投与後の固形腫瘍体積の推移
NSGマウス皮下ターゲット細胞を投与した10日目にiPS-T細胞を静脈投与した。
有意差検定はone-way-anova検定を実施し、mock細胞と比較した結果を示した。

本研究で選別に成功した遺伝子はこれまでT細胞の機能向上に貢献するよりはT細胞・幹細胞分化に関係していることが多く報告されていた。実際に選別遺伝子を発現した iPS-T 細胞は mock細胞と比較して若いメモリーT細胞フェノタイプを保持した細胞であった。今後、選別遺伝子を iPS 細胞に直接導入して T細胞分化を行うことで若い T細胞メモリーフェノタイプを維持したこれまでにない機能的 iPS-T 細胞の作製が達成できるのではないかと考えている。選別遺伝子を発現した iPS 細胞研究を用いた研究は iPS-T 細胞を用いた再生がん免疫細胞療法の発展だけでなく、さらには細胞内シグナル・遺伝子解析を通じて T細胞分化における新しい知見を見出すことが考えられ、基礎科学的視点での研究の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川晃大
2. 発表標題 固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を劇的に向上させた遺伝子導入iPS細胞由来T細胞の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川晃大
2. 発表標題 Genetically engineered induced pluripotent stem cell-derived T cells with drastically improved anti-tumor efficacy against solid tumor
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石川晃大
2. 発表標題 腫瘍内浸潤iPS細胞由来T細胞を用いたシングルセル遺伝子発現解析による抗腫瘍効果向上の解明
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 i P S 細胞から誘導された免疫細胞	発明者 石川 晃大	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-157256	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

固形がんにも効果のあるヒト化CARの作製に成功
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/220906-150000.html>

京都大学iPS細胞研究所金子研究室
<https://kaneko.cira.kyoto-u.ac.jp/>

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