

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04655

研究課題名(和文)アカゲザルを用いたiPS細胞からの再生T細胞自家移植、同種移植の安全性評価

研究課題名(英文)Development of regenerative immunotherapy by using rhesus monkey model

研究代表者

金子 新 (Kaneko, Shin)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：40361331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、T細胞を用いたがん免疫療法が有用であることが示され、慢性ウイルス感染症への応用の期待が高まっている。また、iPS細胞技術は抗原特異的T細胞の再生や同種移植を可能にする技術と考えられ、これもまた臨床応用への期待が高まっている。今回我々は、再生T細胞による免疫療法の安全性を解析することを目的として、iPS細胞を介して得られた再生T細胞を2頭のアカゲザルに自家移植した。2頭にのべ5回の投与を行ったところ急性毒性は見られず、最大2年の観察期間で腫瘍の発生も認めなかった。アカゲザルにおいて免疫不全症候群を引き起こすSIV感染をモデルとした同種移植モデル開発への基礎データが得られたと考えられている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞を用いた細胞医薬品について、ヒト細胞を移植できる免疫不全マウスを用いたとしても、ヒトでの体内動態(特に免疫連関)や副作用を予見することは容易でない。本研究で示したアカゲザルiPS細胞からのT細胞誘導と自家移植モデルは、ヒトiPS細胞由来T細胞の自家移植治療における体内動態や副作用を予見するのに有用であることが示唆された。非ヒト霊長類モデルによる非臨床試験は、今後のiPS細胞関連医薬品開発において重要な位置を占めると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent progress of T cell immunotherapy in cancer field enables us to also expect a T cell immunotherapy against fatal viral infections. In addition, iPS cell technology is also expected to realize a regenerative T cell immunotherapy and its further allogeneic application. In the study, as a process for safety development, we have established regenerated T cells from rhesus monkey iPS cells and transplanted them intravenously in autologous setting. Total five injection was performed to two rhesus monkeys. No acute and chronic adverse effects and tumorigenesis were observed during observation period in 2 years. We think that a part of safety data for a next step, allogeneic regenerative T cell transplantation model, has been obtained.

研究分野：細胞治療学

キーワード：iPS細胞 T細胞治療 免疫治療 安全性

1. 研究開始当初の背景

本申請は iPS 細胞から再分化させた抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の in vivo での動態を実験動物を用いて多角的に評価し、その安全性を予見することを目的とした研究計画である。手法として、異種免疫環境であるヒト-マウスメラモデルではなく、アカゲザルで完結するモデルを用いて、ヒト自家および同種移植臨床への外挿性・予見性の高い解析を試みることが最大の特徴である。

T 細胞は生体防御の中核であり、抗原特異的に腫瘍や感染症の制御に重要な役割を果たす。抗原特異的な T 細胞を体外で分離増幅し、再び体内に戻す免疫治療が試みられているが、総じて成果は上がっていない。その理由として腫瘍や慢性感染症を標的とする抗原特異的な T 細胞がそもそも体内に多くない点と、体外での過剰増幅に伴って T 細胞機能 (生存能、増殖能を含む) が著しく低下する点が挙げられる。

研究代表者らは iPS 細胞技術をいわゆる臓器再生医療のみならず、がんやウイルス感染症の治療に応用するという独自の視点から研究を進め、「若返った」抗原特異的な T 細胞を大量に産生する技術を開発した (Nishimura T, Kaneko S et al., Cell Stem Cell, 2013)。具体的には、患者に由来する HIV 抗原特異的な CTL から iPS 細胞を作製し、その抗原特異的な細胞傷害性を保ったまま、優れた増殖能と自己複製能をもつ CTL を誘導することに成功したのである。これまでにヒト幹細胞から十分な T 細胞、特に抗原特異的なメモリー機能を持つ T 細胞を in vitro で誘導することに成功した例はなく、最初の報告となった。

この再生された抗原特異的な T 細胞

(再分化 T 細胞) は、他の関連技術との融合に適した基盤技術でもあり、多様な臨床応用形態が考え得る。患者自身への自家移植はもちろんであるが、例えば、組織適合性を考慮した iPS 細胞バンク戦略 (Kaneko S, Yamanaka Y. Cell Stem Cell, 2013) との併用などによって、同種移植によるがんやウイルス感染症の治療用細胞ともなり得るし、治療効果や安全性を高めるための様々な遺伝子操作を iPS 細胞の段階で加える事も可能である (Nat Biotech, 2013)。

以上のように、我々は再分化 T 細胞の有用性を in vitro 実験で示したが、さらなる有用性と安全性を in vivo で評価する必要がある。しかし、一般的にヒト免疫細胞の in vivo 機能解析は容易ではない。なぜなら MHC (主要組織適合性複合体) 拘束性かつ抗原特異的な免疫反応は単に標的細胞とエフェクター細胞のみの反応にとどまらないため、ヒトのサイトカインやケモカインネットワーク、ヒトの免疫微小環境などが存在しない免疫不全マウスを「生きた培養フラスコ」として用い、有用性や特に安全性の評価を行うことは必ずしも適切ではないからである。もちろん近交系マウス iPS 細胞を用いれば再分化 T 細胞 in vivo 実験としては完結するが、human immunology への外挿目的としては種差も iPS 細胞の性質の差も大きすぎる。そこで、本申請では非ヒト霊長類であるアカゲザルに着目した。

非ヒト霊長類はワクチン領域、サイトカイン領域といった免疫応答が密接に関連する医薬品の前臨床試験に用いられる (Blood, 2011)。アカゲザルの ES 細胞ならびに iPS 細胞はマウスと異なり、ヒトと同じく primed-type の多能性幹細胞である。アカゲザルから

primed-type の T-iPS 細胞を樹立し、そこから誘導した再分化 T 細胞の自家移植あるいは(同種)など類似したサル MHC を持つ個体への同種移植を行うことで、本来の役者が全て揃った免疫環境における再分化 T 細胞の正確な動態を観察することが可能になると考える。具体的には、再分化 T 細胞の生着と長期の細胞生存、組織への分布、移植後の T 細胞表現型とその変化(形質安定性)、生体内での免疫応答性、そして腫瘍化といった点を大型動物ならではの臨床に近い条件で長期的に評価することが可能である。近年では *in vivo* での細胞イメージング技術が向上してきたこともあり、少ない個体で経時的に複数ポイントのデータを取得することも可能である。

非ヒト霊長類で MHC 解析が最も進んでいるアカゲザルを使用するもう一つの利点として、慢性ウイルス感染症である SIV(サル免疫不全ウイルス)モデルの存在がある。SIV ではサル MHC 拘束性の標的抗原エピトープが共同研究者らによって同定されており、抗原特異的 T 細胞を誘導・刺激するためのペプチドワクチンも存在する。したがって *in vivo* での望ましい抗原特異性の維持や予期しない非特異的免疫反応の惹起をペプチド接種で確認することが可能である。

本申請ではこれらの利点を踏まえて、アカゲザルを用いた研究計画を提案する。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞を介した抗原特異的 T 細胞の再生によって、体外で大量に産生した抗原特異的 T 細胞を使った免疫治療の可能性が示唆された。しかし iPS 細胞に由来するがゆえに、体細胞としての T

細胞とは異なる危険性を認識する必要がある。最終分化 T 細胞としての生体内での安定性、造腫瘍性、抗原特異性の変化や喪失、特に標的抗原に暴露した結果として起き得る過剰な免疫反応や再生 T 細胞そのものの性質変化など、こういった安全性に関する事項は免疫不全マウスへの異種移植による短期観察では正確な評価が困難である。そこで本研究では、ヒトに近縁の霊長類モデルを用いた自家移植、発展的には iPS 細胞の有力な臨床応用法の一つである MHC 近似同種移植の系で評価を行い、ヒト臨床における問題点を予見・抽出することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞と類似の性質を示すアカゲザル iPS 細胞をソースに、正常免疫環境での再分化 T 細胞の動態、形質安定性や造腫瘍性、投与様式による細胞毒性、特異抗原に対する免疫応答と副反応などの安全に関する事項を明らかにし、ヒト再分化 T 細胞療法のリスクを正確に予測する。また、HLA 型別 iPS 細胞バンクの臨床応用として、iPS 細胞に由来する同種 T 細胞を用いた移植治療が実現する可能性がある。その評価モデルとして、発展的に再分化 T 細胞の MHC 一致同胞間移植を行い、同種再分化 T 細胞についても体内での動態、形質安定性と造腫瘍性、特異抗原負荷による免疫応答と副反応、免疫原性、細胞毒性、自殺遺伝子によるコントロールの可能性などを明らかにする。

## 4. 研究成果

iPS 細胞由来の抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(再生 CTL)を用いた新規免疫細胞療法の安全性を評価することを主な目的とする実験を行った。2頭の非感

染サルから iPS 細胞を樹立した後に再生 T 細胞へと分化させ、自家移植を行った。それらの自家移植サルにおいて特筆すべき急性症状は認められず、移植後最大 1 年以上経過した時点で解剖を行ったが、調べたいずれの組織においても（肝,胆,脾,腎,心,肺,膵,小腸,胸腺,腸間膜リンパ節,骨髄,脳）病理学的な異常所見はみられず、iPS 細胞由来 T 細胞が安全に移植可能であることが示唆された。今回の実験は非特異細胞を移植したものであるため、サル個体内での抗原刺激による移植細胞の増殖は期待されなかった。今回の研究では非感染ザル由来の再生 T 細胞自家移植の基礎データを得るにとどまったが、今後、SIV 感染サルへの SIV 特異的再生 T 細胞移植実験において、個体での抗原依存的な移植細胞の有効性並びに安全性が確認できると考える。

#### 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 14 件)

上田樹、金子新、多能性幹細胞の T 細胞研究への応用、日本臨床免疫学会雑誌、38(2)、2015、101-108

Kitayama S, Zhang R, Liu TY, Ueda N, Iriguchi S, Yasui Y, Kawai Y, Tatsumi M, Hirai N, Mizoro Y, Iwama T, Watanabe A, Nakanishi M, Kuzushima K, Uemura Y, Kaneko S. Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity of redifferentiated Vα24 invariant human NKTlike cells from iPS cells. 査読有. Stem Cell Reports. 6(2). 2016. 213-227

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.005>.

Karagiannis P, Iriguchi S, Kaneko S. Reprogramming away from the exhausted T cell state. 査読有. Seminar in Immunology. 28(1). 2016. 35-44

<https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.007>

Ueda N, Zhang R, Tatsumi M, Liu TY, Kitayama S, Yasui Y, Sugai S, Senju S,

Kuzushima K, Kiyoi H, Kaneko S, Uemura Y. BCR-ABL-specific CD4+ T helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. 査読有. Cellular and Molecular Immunology. 2016. Epub

<https://doi.org/10.1038/cmi.2016.7>.

Ishii H, Matsuoka S, Nomura T, Nakamura M, Shiino T, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Mizuta K, Sakawaki H, Miura T, Koyanagi Y, Naruse T.K, Kimura A, Matano T. Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model. 査読有. Sci. Rep. 6. 2016. 30153

<https://doi.org/10.1038/srep30153>.

Kaneko S. In Vitro Generation of Antigen-Specific T Cells from Induced Pluripotent Stem Cells of Antigen-Specific T Cell Origin. 査読有. Methods Mol Biol. 1393. 2016. 67-73

[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3338-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3338-9_6).

吉田信介、金子新. iPS細胞ストック. 65(6). 臨床免疫・アレルギー科. 65(6). 2016. 315-320

上田格弘、金子新. がん免疫療法 - がん完治に向けての新たな治療法の探索 -. 日本臨床. 75(2). 2017. 317-322

入口翔一、金子新、ES 細胞、iPS 細胞ってどんな細胞ですか？主な違いは何ですか？ - ダイレクトリプログラミングを含めて -、小児内科、49(7)、2017、918-921

三嶋雄太、金子新、iPS 細胞の応用研究 - これまでの応用例と課題、最新の応用例、生物の科学「遺伝」、71(5)、2017、425-430

南川淳隆、金子新、ラボ必携 フローサイトメトリー Q&A ~正しいデータを出すための 100 箇条 ~、実験医学、別冊、2017、278-279

金子新、iPS 細胞技術を応用したがん免疫療法 - 幹細胞生物学、腫瘍免疫学、遺伝子治療学の融合が生み出しつつあるもの -、最新医学、73(2)、2018、92-97

富岡亮作、金子新、供給体制と臨床試験拠点病院、Clinical Neuroscience、36(3)、2018、338-341

Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S,

Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito MK. Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors. 査読有. Biochem Biophys Res Commun. 497(2). 2018. 719-725  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.139>

〔学会発表〕(計 51 件)

河合洋平、Generation of adaptive and innate-like lymphoid killer cells from a single T-iPSC. Kyoto T Cell Conference. 2015

Minagawa A. Making anti cancer effector cells derived from iPSCs by T-cell receptor transfer. International Society for Stem Cell Research. 2015

Yasui Y. Optimization of Xeno-Free culture system for in vitro induction of T cells from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research. 2015

金子新. PS 細胞技術のがん治療への応用. 第 13 回ペシエント・アクティブ・フォーラム. 2015 (招待講演)

安井裕. PS細胞を活用した抗原特異的 T 細胞療法の開発. 第 7 回血液疾患免疫療法研究会学術集会. 2015

上田格弘、植村靖史、張エイ、喜多山秀一、安井裕、巽美奈子、劉天懿、須貝詩織、葛島清隆、清井仁、金子新. iPS 細胞由来 BCR-ABL 特異的 CD4 陽性 T 細胞による CML 新規免疫療法の開発. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015

安井裕. Optimization of Xeno-Free culture system for in vitro induction of T cells from human iPSCs. 第 77 回日本血液学会学術集会. 2015

上田格弘. Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation. 第 77 回日本血液学会学術集会. 2015

金子新. iPS 細胞を介した抗原特異的 T 細胞の再生. 第 43 回日本臨床免疫学会スイーツセミナー. 2015 (招待講演)

Ueda N, Uemura Y, Rong Z, Kitayama S, Yasui Y, Tatsumi M, Liu T, Y, Kuzushima K, Kiyoi H, Kaneko S. Generation of

BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation. 第 44 回日本免疫学会学術総会. 2015

金子新. Reprogramming and redifferentiation of antigen specific T cells by iPS cell technology. Tsukuba Hematology Seminar. 2015 (招待講演)

金子新. iPS 細胞に由来する再生 T 細胞療法の開発. 千里ライフサイエンスセミナー「がん免疫療法の進展と将来展望」. 2015(招待講演)

Ueda N, Uemura Y, Rhong Z, Kitayama S, Yasui Y, Tatsumi M, Liu T, Y, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S. Generation of BCR-ABL Reactive CD4+ T Helper Cells By Reprogramming and Redifferentiation. The 57th ASH Annual Meeting and Exposition 2015

金子新. iPS 細胞を利用したがん免疫治療の開発. 第 6 回筑波大学附属病院茨城県地域医療臨床教育センター講演会. 2015 (招待講演)

金子新. 新たながん免疫療法 - T 細胞の再生. 第 86 回日本呼吸器学会・第 116 回日本結核病学会近畿地方会. 2015 (招待講演)

金子新. iPS 細胞を介した T 細胞の再生と治療開発. 第 31 回新潟血液免疫疾患研究会. 2016 (招待講演)

金子新. iPS 細胞を介した抗原特異的 T 細胞の再生. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016 (招待講演)

南川淳隆. ゲノム編集を利用した、iPS 細胞よりの抗原特異的免疫細胞の再生. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016

石井洋、城森萌、関紗由里、松岡佐織、俣野哲朗. SIV 感染サルエイズモデルにおいて逃避変異に対して交差反応性を示す CTL 応答の解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会. 2016

Yasui Y, Iriguchi S, Nakauchi H, Kaneko S. In vitro differentiation of T cells from human ES cell and induced pluripotent stem cell with feeder-and FBS-free culture condition. International Society for Stem Cell Research. 2016

②Kitayama S, Zhang R, Iriguchi S, Iwama T, Mizoro Y, Watanabe A, Kuzushima K, Uemura Y, Kaneko S. Cellular Adjuvant, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated

iNKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016

②金子新. iPS 細胞を介した T 細胞の再生. 第 64 回染色体工学研究センターセミナー. 2016 (招待講演)

③Shin Kaneko. Regeneration or immune cells from iPSC. special lecture of CHA university. 2016 (招待講演)

④ Shin Kaneko. Regeneration of antigen-specific T cells via iPSC. Takeda Pharmaceutical International, Co. 2016(招待講演)

⑤金子新. 再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクトの現状と展望. 平成 28 年度第 2 回ライフサイエンスセミナー. 2016 (招待講演)

⑥金子新. iPS 細胞誘導の培養工程と免疫細胞誘導工程について. 治療・創薬応用に向けた幹細胞の品質評価と安定的培養技術について. 2016 (招待講演)

⑦金子新. iPS 細胞技術による T 細胞の再生. iPS 細胞・再生医学研究会. 2017 (招待講演)

⑧入口翔一、三宅康之、川名愛、三浦智之、俣野哲朗、金子新. iPS 細胞由来再生 T 細胞の臨床応用に向けた霊長類前臨床モデルの開発. 第 16 回日本再生医療学会. 2017

⑨上田樹、入口翔一、河合洋平、南川淳隆、寺倉精太郎、三好浩之、中面哲也、植村靖史、玉田耕治、児玉裕三、瀬尾浩、金子新. iPS 細胞由来キメラ抗原受容体発現再生 T 細胞療法の開発. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017

⑩三宅康行、入口翔一、三浦智行、立川愛、上田樹、田谷かほる、今井映里、石井洋、尾上浩隆、寺倉精太郎、俣野哲郎、金子新. iPS 細胞由来再生 T 細胞の臨床応用に向けた霊長類前臨床モデルの開発. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017

⑪河合洋平、喜多山秀一、金子新. iPS 細胞技術を用いた細胞傷害性 T 細胞の大量調製法の樹立. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017

⑫金子新. 再生医療・細胞治療における特定細胞加工物の製造. 第 16 回日本再生医療学会総会共済セミナー. 2017 (招待講演)

{ 図書 } (計 2 件)

吉田信介、一阪朋子、建田幸子、金子新、シーエムシー出版、再生医療のための細胞製

造ハンドブック、2015、9

大迫洋平、金子新、シーエムシー出版、再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術、2016、11

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 3 件)

名称: 多能性幹細胞から免疫細胞療法用 T 細胞を誘導する方法

発明者: 金子新、南川淳、隆、堀田秋津、河本宏、増田橋子、島津裕、一瀬大志

権利者: 国立大学法人京都大学、アストリム株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/070608

出願年月日: 2015 年 7 月 17 日

国内外の別: 国外

名称: CD4 陽性細胞の製造方法

発明者: 金子新、上田格弘、植村靖史

権利者: 国立大学法人京都大学、国立研究開発法人国立がん研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2015-203482

出願年月日: 2015 年 11 月 13 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

{ その他 }

ホームページ等

京都大学 iPS 細胞研究所

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/>

京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 金子研究室

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/kaneko/index.html>

提言書: PMDA 科学委員会 CPC 専門部会(編)「再生医療等製品の品質確保における基本の考え方に関する提言」2015 年 8 月発出

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 新 (KANeko, Shin)

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号: 40361331

(2) 研究分担者

俣野 哲朗 (Matano Tetsuro)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・センター長

研究者番号: 00270653

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者