

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02668

研究課題名(和文)単一の抗原特異的T細胞クローンを用いた自己免疫疾患治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a cell therapy for autoimmune diseases using monoclonal T cells specific for one target antigen

研究代表者

河本 宏(kawamoto, hirosi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00343228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「単一の抗原特異性を持つクローンを用いて自己免疫疾患を治せるか」というテーマに取り組んだ。関節リウマチモデルであるskgマウスの標的抗原に特異的なTCR(R7-39)をだすヘルパーT細胞の単一クローンで関節炎や皮膚炎を誘導できることが報告されている。本研究では、R7-39を発現する制御性T細胞(Treg)を作製し、そのTregがこれらの病態に効果があるかをテストした。結果として、皮膚炎については治療効果が認められた。Tregを用いた「治療法」の、世界初のモデルとすることができる。全体として必ずしも計画通りに進まなかった点はあるが、一定の成果は得られたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患の治療は、免疫抑制剤や抗サイトカイン抗体などで免疫を非特異的に抑制するという方法が現在も主流であり、従って感染症などの副作用が避けられない。このような状況を打開するためには、抗原特異的な治療法で特定の標的抗原に対する免疫反応だけを抑えて病気を治す必要がある。本研究はそのような方法の開発に取り組んだ先進的な取り組みであった。その結果として、単一クローンのヘルパーT細胞で誘導できる皮膚炎が、同じ抗原特異性を持つ単一クローン制御性T細胞の投与により症状を軽減できることが示された。制御性T細胞による発症予防の報告は多くあるが、治療例としては世界初であると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop a new method by which autoimmune diseases can be cured using a monoclonal T cells with single antigen specificity. It has been reported that the monoclonal helper T cells expressing TCR (R7-39) specific for target antigen originally identified as a causative antigen of arthritis and dermatitis in skg mouse. Therefore, in this study, we produced regulatory T cells (Treg) that monoclonally express TCR (R7-39) and tested whether these cells exert therapeutic effect on the disease model described above. We found that, although adaptive transfer of these cells were not effective for arthritis, these cells showed efficacy in reducing the severity of dermatitis. This can be said as a first demonstration in the world that showed treatment of disease by using Treg. Some planned experiments were not necessarily completed as originally designed, but we can say that a significant results were obtained during the study period.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 自己免疫疾患 関節リウマチモデル sk gマウス RPL23a

1. 研究開始当初の背景

免疫学が発展したにもかかわらず、自己免疫疾患の治療法は相変わらずステロイド剤を主軸とした「抗原非特異的」な免疫抑制法である。最近、関節リウマチには抗サイトカイン抗体が著効を示してはいるが、これも「抗原非特異的」な免疫抑制法である。このような戦略は、感染症が起りやすくなるなどの副作用が問題になっている。

自己免疫疾患では、自己抗原が標的となっている。抗原が不明なケースが多いが、中には抗原が明確な疾患もある。例えば、重症筋無力症はアセチルコリンレセプター、グレイブス病は TSH レセプターに対する自己抗体ができることが病因であることがわかっている。それらの自己抗体を作っている B 細胞 (形質細胞) のクローンが存在しているということであり、またその B 細胞を活性化する、アセチルコリンレセプターあるいは TSH レセプターに対するヘルパー T 細胞が存在するということである。従って、同じ抗原を認識できる Treg を患者に投与することができれば、これらの自己免疫疾患を治せる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

上記のような治療法の確立に向けて、本研究では、単一の特異性を示す T 細胞クローンで自己免疫疾患を治すという治療モデルを作製することを目的とする。そのような治療モデルとして、skg マウスが適していると考えた。skg マウスは、坂口志文らによって樹立された関節炎を自然発症するマウスである。ZAP70 に変異があることにより、胸腺で起こる胸腺細胞の選択過程で、T 細胞レセプター (TCR) 由来のシグナルが減弱する。これにより、負の選択で死滅するべき自己反応性 T 細胞が正の選択を受けて成熟し、末梢に出現する。その自己反応性 T 細胞が関節炎を惹起する (2003, Nature) (図 1)。

最近、skg マウスの関節炎で標的となっている自己抗原の一つが同定された (2014, Science)。それは身体中の組織にユビキタスに発現している RPL23a というリボゾームタンパクであった。この抗原に対するヘルパー T 細胞クローン 7-39 が skg マウスより単離され、このクローンが免疫不全マウスに輸注したら関節炎を惹起できることが示された (2014, Science) (図 2)。

そこで、このヘルパー T 細胞クローン 7-39 の発現する TCR (R7-39) を用いた治療モデルを作製しようと考えている。Treg にこの R7-39 を発現させるという方法を使う。

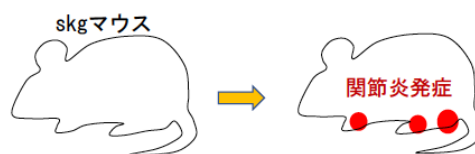


図 1 skg マウスは関節炎を自然発症する

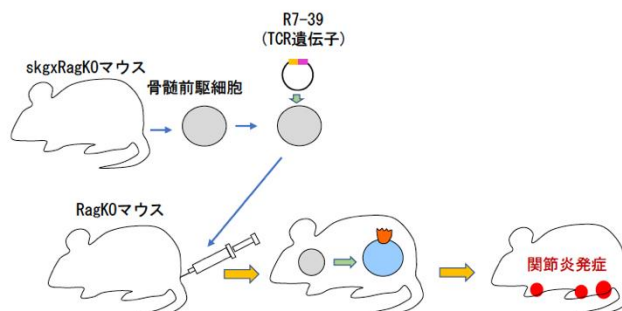


図 2 skg マウス由来 7-39 クローンは関節炎を惹起する

R7-39 を発現した制御性 T 細胞を作成する為に、WT マウス由来制御性 T 細胞 T 細胞を材料にしてゲノム編集技術により内因性 TCR を欠失させ、さらにレトロウイルスで R7-39 を発現させる。もう一つの方法として、IL-2 を欠損しかつ CTLA4 を強制発現させたヘルパー T 細胞を用いる。IL-2KO/CTLA4Tg マウスのヘルパー T 細胞が Treg 様の抑制活性を有していることが坂口研から報告されている (PNAS, 2013)。以下、本来の Treg と区別する為に人工 Treg と呼ぶ。

3. 研究の方法

R7-39 を発現する Treg (R7-39-Treg) を作製し、関節炎を発症したマウスに投与する (治療)、あるいはあらかじめ投与すれば発症を予防できるかを検証する。

(1) R7-39を発現するTregの作成 (図3)

29年度は1-1)と1-2)を主に進め、30年度以後は1-3)と1-4)に移行する。

1-1) Treg を遺伝子改変して作製する

- i) WT マウスより Treg を単離する。
- ii) IL2 存在下に CD3 抗体で刺激し、増幅する。
- iii) ゲノム編集技術により R7-39 遺伝子を TCR・鎖領域にノックインする。

1-2) IL-2KO/CTLA4Tg マウスを用いて作製する (I)

- i) IL-2KO/CTLA4Tg/skg マウスを作製する (すでに交配は開始している)。
- ii) IL-2KO/CTLA4Tg/skg マウスの骨髄前駆細胞に R7-39 を発現させ、RagK0 マウスに移植する
- iii) 生成した CD4T 細胞を人工 Treg として用いる。

1-3) IL-2KO/CTLA4Tg マウスを用いて作製する (II)

- i) IL-2KO/CTLA4Tg/skg/R7-39Tg マウスを作製する
- ii) 末梢血中の CD4T 細胞を人工 Treg として用いる。

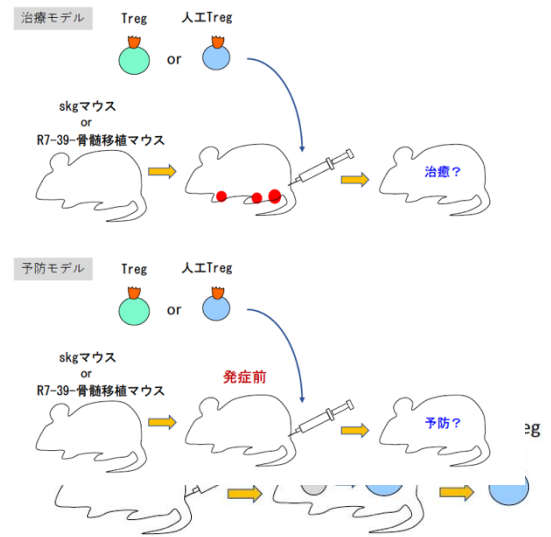
1-4) IL-2KO/CTLA4Tg マウスを用いて作製する (III)

- i) IL-2KO/CTLA4Tg/skg/R7-39Tg マウスを作製する。
- ii) IL-2KO/CTLA4Tg/skg/R7-39Tg マウスの骨髄前駆細胞から iPS 細胞を作製する
- iii) その iPS 細胞から
- iv) 再生した CD4T 細胞を人工 Treg として用いる。

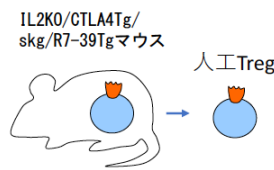
(2) R7-39を発現するTregを用いた関節炎治療/予防モデル (図4)

2-1) ヘルパーT細胞クローンを用いて関節炎を惹起するモデル

- i) ヘルパー T 細胞クローン (7-39) (R7-39-Th) を RagK0 マウスに移入して関節炎を惹起する
- ii) このマウスに、(1) で作製した様々なタイプの R7-39-Treg を移入し、治療効果を見る
- iii) 治療効果が認められなかった場合は、R7-39-Treg を先に移入し、その後 R7-39-Th を移入し、



1-3)



1-4)

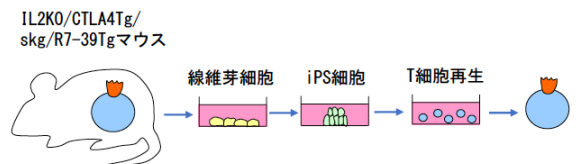


図3 方法: R7-39を発現する治療用 Treg の作り方

予防効果の有無を調べる。

2-2) skg マウス関節炎治療モデル

i) skg マウスにアジュバントを投与して関節炎を惹起する

ii) このマウスに、(1) で作製した様々なタイプの R7-39-Treg を移入し、治療効果を見る

iii) 治療効果が認められなかった場合は、R7-39-Treg

を先に移入し、その後 R7-39-Th を移入し、予防効果の有無を調べる。

図4 R7-39 を発現する治療用 Treg を用いた治療モデルと予防モデル

4. 研究成果

元の計画では、1) 人工的な Treg として IL2K0/CTLA4Tg/skg/R7-39Tg マウスを作製し、その CD4T 細胞を用いる、2) 再生医療への応用を見据えて IL2K0/CTLA4Tg/skg/R7-39Tg マウスから iPS 細胞を作製し、その iPS 細胞から再生した CD4T 細胞の治療効果もテストする、とされていた。

しかし、IL2K0/CTLA4Tg/skg/R7-39Tg マウス作製の遅れから、代わりに R7-39 を発現する人工的な Treg として、R7-39 を nTreg に強制発現させる系を用いた。R7-39 の導入にはレトロウイルスの系を用いた。内因性の TCR との競合が問題になるので、ゲノム編集法により内因性 TCR を欠失させた。R7-39-TCR が安定して発現していたため、これを用いて実験を行った。

最終年度である 2020 年度には R7-39 発現ヘルパー T 細胞の単一クローンで誘導された関節炎と皮膚炎のモデルに対し、R7-39-TCR 発現 Treg を投与したところ、皮膚炎については治療効果が認められた。すなわち、この人工 Treg を用いて、skg 皮膚炎の症状を軽減させることに成功した。Treg を用いた予防法ではなく「治療法」の、世界初のモデルとすることができる。全体として計画通りに進まなかった点はあるが、一定の成果は得られたと考えている。

今後もこの研究を続けて、単一抗原を標的にした自己免疫疾患の治療法の開発を継続したいと考えている。

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 Kawamoto, H., Masuda, K., Nagano, S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Cloning and expansion of antigen-specific T cells using iPS cell technology: Possible use of regenerated T cells in personalized medicine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Personalized Medicine Universe	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 河本宏	4. 巻 100
2. 論文標題 特別寄稿2018年度ノーベル生理学・医学賞解説 免疫チェックポイント阻害剤の作用機序と開発過程	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物の科学遺伝	6. 最初と最後の頁 4-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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12件（うち招待講演 12件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞の再生 -他家移植の系で使える即納T細胞製剤の開発-
3. 学会等名 第28回日本サイトメトリー学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたWT1抗原特異的キラーT細胞の作製 -他家移植の系で使える即納T細胞製剤の開発-
3. 学会等名 日本免疫・細胞治療セミナー2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞の再生 -他家移植の系で使える即納T細胞製剤の開発-
3. 学会等名 第5回神戸血液疾患症例検討会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞の再生 -他家移植の系で使える即納T細胞製剤の開発-
3. 学会等名 再生医療エキスパートレクチャー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawamoto, H.
2. 発表標題 Regeneration of antigen-specific T cells using the iPS cell technology
3. 学会等名 The 1st International Symposium on NEO-SELF（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞の再生 -他家移植用“off-the-shelf”T細胞製剤の開発-
3. 学会等名 第18回神戸がん研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的CTLの量産 -即納型T細胞製剤の開発に向けて-
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 腫瘍免疫学の基礎と臨床-即納型T細胞製剤の開発-
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会ウィンターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 よくわかる免疫学：獲得免疫編
3. 学会等名 第2回日本免疫不全・自己炎症学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 再生医療とがん免疫療法の現状と問題点 -再生T細胞を用いたがんの免疫細胞療法の開発-
3. 学会等名 第37回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawamoto, H.
2. 発表標題 Regeneration of antigen-specific T cells using the iPSC technology.
3. 学会等名 第2回AMED-A*STAR合同ワークショップ-Stem Cell & Immune Cell Therapy- (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河本宏
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的CTLの量産-即納型T細胞製剤の開発に向けて-
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019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