

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591413

研究課題名(和文)造血器疾患関連抗原特異的T細胞に由来するiPS細胞を用いた免疫再生治療の開発

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

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：抗原特異的T細胞は腫瘍やウイルス感染症の制御において極めて重要な働きをしている。それらの細胞を患者体外へと取り出して増幅し再び輸注する試みが数多く行われているが、T細胞の細胞老化のために期待した効果を得ることは容易ではない。我々はiPS細胞技術を利用してヒト免疫不全ウイルス(HIV)抗原特異的CD8T細胞をiPS細胞化し、そこから細胞老化を起こしていない抗原特異的CD8T細胞を大量に誘導することに成功した。またそれらのT細胞が細胞障害性T細胞としての機能を備えていることを明らかにした(Nishimura T et al., Cell Stem Cell 12;114-126,2013)。

研究成果の概要(英文)：Antigen-specific T cells play a central role for protecting a host against various type of pathogen including neoplastic tumor and viral infections. There are many cell therapeutic approaches using ex vivo expanded immune cells including antigen-specific T cells of cancer or chronic viral infection patients, however, expansion related T-cell senescence causes severe decrease of therapeutic efficacy. To overcome the problem, we have focused on iPS cells as source of antigen specific T cells and successfully we have developed a method to obtain rejuvenated CD8 single positive T cells preserving antigen-specificity of original T cells by using of pluripotent reprogramming technology. Such rejuvenated CD8 T cells were revealed to have enough function as cytotoxic T cells (Nishimura T et al., Cell Stem Cell 12;114-126, 2013).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 血液内科学

キーワード：抗原特異的T細胞 iPS細胞 T細胞分化 免疫再生治療

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍や慢性難治感染症に関連する抗原に対して特異的な TCR を発現するナイーブ T 細胞を大量に誘導し、細胞治療に用いることができれば、それらの疾患の治療成績は劇的に向上する可能性がある。現状では、腫瘍浸潤リンパ球の拡大培養やナイーブ T リンパ球への抗原特異的 TCR 遺伝子導入などが試みられているが、培養操作に伴う末梢 T リンパ球の細胞老化や内在性 TCR 遺伝子との mis-pairing による非標的抗原 TCR の誤誘導など、解決すべき多くの問題がある。

我々は、がん遺伝子 *c-MYC* を用いることなく、一個の健常ヒト末梢血 T 細胞から人工多能性幹細胞 (T-iPSC) を誘導することに成功し、またその T-iPSC を *in vitro* で再分化させて T 系譜細胞を得ることに成功した。それらの再分化 T 系譜細胞は、元の末梢血 T 細胞由来の TCR 配列と全く同一の TCR-CD3 複合体をモノクローナルに発現する T 細胞 “クローン” であり、胚性幹細胞 (ESC) や皮膚あるいは臍帯血由来の iPSC をソースとする場合よりも早期から、効率よく T 細胞分化を起こして行くことが明らかになった。本法を用いれば、末梢の抗原特異的 T 細胞から T-iPSC を介して抗原特異的モノクローナル TCR を発現する T 系譜細胞を無尽蔵に効率よく得られる可能性が出てきたのである。一方で、①末梢血 CD8 T 細胞や抗原特異的 T 細胞クローンからの T-iPSC 樹立は極めて効率が悪い、② *in vitro* 誘導では、ダブルネガティブ胸腺細胞 (DN) からダブルポジティブ胸腺細胞 (DP) への分化効率が悪く最終的に得られる T 系譜細胞数も多くない、③ ESC あるいは他の組織由来の iPSC を用いた最新の報告でも同様であるが、*in vitro* 誘導では DP からシングルポジティブ胸腺細胞 (SP) への分化が認められず、ヒト T-iPSC が十分に機能的 T 細胞へと分化する能力を持つのか評価できない、などの問題点も明らかとなり、一層の工夫が必要とされている。

そこで我々は上記の研究を継承・発展し、抗原特異的 T 細胞から樹立した T-iPSC から治療効果の期待できる再分化 T 細胞を得ることを目的とし、先行研究から明らかになった T-iPSC 樹立、既にリアレンジした TCR 遺伝子の影響と対策、機能的再分化 T 細胞誘導の各相における問題点の解決に焦点を合わせて研究を進める。

2. 研究の目的

本研究では 3 年の研究期間中に、抗原特異的 T 細胞再生治療の実現に不可欠な次の 2 点を明らかにすることを目的とした。

抗原特異的な CD4 および CD8 T 細胞から T-iPSC を誘導することができるのか

抗原の種類、抗原刺激条件や培養条件を最適化して、ナイーブから “疲弊” T 細胞までの分化段階別あるいは CTL、ヘルパー、Treg、Th17 などの細胞種別に抗原特異的 T 細胞からの T-iPSC 誘導を試みる。抗原特異的 T-iPSC 細胞誘導に有用な細胞ソースと手法を定めることは、実際の臨床応用に先立って極めて重要である。

抗原特異的 T-iPSC は、機能的 T 細胞へと終末分化することができるのか

in vitro、*in vivo* (免疫不全マウスへの異種移植あるいは非ヒト霊長類での自家移植) 誘導の系を用いて、機能的 CD4 あるいは CD8 陽性細胞を得ることを目指す。特定の細胞種への誘導を目的としたサイトカイン刺激や転写因子遺伝子導入の併用を試み、最終的には *in vivo* での機能評価を行う。このステップに成功すれば、再分化 T 細胞を用いた細胞治療の実現が具体化すると考える。

3. 研究の方法

抗原特異的な CD4 および CD8 T 細胞から T-iPSC を誘導することができるのか

研究開始時までの実験により、CD8 は CD4 に比べて極めて iPSC 化されにくいことが明らかになっている。また CD4、CD8 のいずれであっても完全にクローン化された株を用いると我々の従来の手法ではほとんど iPSC 化が起らない。他の体細胞の iPSC 化同様、クローン化に伴う長期培養や過度の反復刺激に伴う細胞疲弊がその原因の一つと考えられるので、

新鮮 T 細胞にあらかじめ山中因子を遺伝子導入し、その後に抗原刺激を加えて培養し、抗原反応性の高い細胞をなるべく早期に分取して iPSC 化する実験を行う。

また、表面抗原の発現をもとにナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、エフェクター、“疲弊” T 細胞に分け、どの段階まで抗原特異的 T 細胞の iPSC 化が可能か検討する。

CD8 T 細胞は特に T-iPSC 化が困難と考えられるため、iPSC 化因子の追加 (Nanog, LIN28) 遺伝子導入率の向上 (センダイウイルスベクターの併用) メチル化の解除 (HDAC 阻害剤、DNA メチル化酵素阻害⁴) 分化シグナル阻害 (GSK3b 阻害剤、MEK 阻害剤)、細胞死阻害 (Rho キナーゼ阻害剤、p53 阻害剤)、低酸素培養などの各種条件の最適化を行い、

および から得られる知見と合わせて、抗原特異的な CD8 T 細胞由来 T-iPSC の誘導に有効な手法を見出す。

CD4 T 細胞に関しては、いわゆるヘルパー T のみならず純化した Treg を標的細胞とした iPSC 化も試みる。

抗原特異的 T-iPSC は、機能的 T 細胞へと終末分化することができるのか

DP から SP への分化には TCR が HLA Class I もしくは Class II 分子とペプチド複合体へ結合し、適切な分化シグナルを受け取る必要がある。T-iPSC のモノクローナル TCR は胸腺における選択を終えて末梢に出現した T 細胞から得られたものであり、全くランダムに発生した TCR と異なり、*in vitro* でも有効な分化シグナルを受けることが可能と推測される。

抗原特異的 T-iPSC 由来の DP を、標的ペプチドをパルスした HLA 適合フィーダーとともに刺激する。必要に応じて SP 分化誘導に必須の転写因子群の構成的な発現誘導や、添加サイトカインの組み合わせで、*in vitro* の各種 SP 分化誘導を目指す。

これらがうまくいかない場合は、標的ペプチドをパルスしたヒト HLA トランスジェニックマウス胸腺に T-iPSC から分化誘導した DN を移植する胸腺器官培養法を併用する。更には、その培養胸腺を NOG マウスに移植し、T-iPSC 由来 SP の末梢への移行を観察する。また、あらかじめ胸腺移植した NOD マウスへの T-iPSC 由来 CD34 造血幹細胞移植も試みる。

上記いずれかの手法で、十分量の抗原特異的 SP が得られれば、誘導 SP の性状に応じた *in vitro* 機能アッセイを行う。また NOG マウス末梢血への T-iPSC 由来 SP 誘導が実現した場合には、ヒト造血器関連腫瘍・感染症・異種 GVHD モデルマウスへの抗原特異的 SP 輸注、あるいは抗原特異的 SP 誘導 NOG マウスへの腫瘍移植などを行い、疾患予防・治療効果を評価する。

4. 研究成果

抗原特異的な CD4 および CD8T 細胞から T-iPS 細胞を誘導することができるのか

上記の項目を明らかにするために、H23 年度はいくつかの腫瘍抗原ならびにウイルス抗原を用いて、抗原特異的 T 細胞クローンの樹立と T-iPS 細胞へのリプログラミングを試みた。遺伝子導入条件等を詳細に検討した結果、従来はリプログラミングに極めて抵抗性があった CD8 陽性 T 細胞（細胞障害性 T 細胞）からの T-iPS 細胞誘導に成功した。

H24 年度はヒト免疫不全ウイルス抗原特異的細胞障害性 T 細胞クローンを樹立し、T-iPS 細胞へとリプログラミングすることに成功した。H25 年度からは同手法を用いた各種抗原特異的 CD4 陽性クローン化 T 細胞からの T-iPS 細胞誘導に成功し、同技術が安定していることが明らかとなった。

抗原特異的 T-iPSC は機能的 T 細胞へと終末分化することができるのか

H23 年度は培養系の改良により、ダブルポジティブ T 細胞を *in vitro* で誘導することができるようになった。同培養系を用いて、T 細胞レセプター刺激とサイトカイン刺激を最適化する実験を行った結果、再分化 CD8T 細胞を誘導することができた。H24 年度以降は元の CD8 陽性 T 細胞と同様の抗原特異性を保たれた細胞障害性 T 細胞の誘導に成功し、T 細胞としての遺伝子発現、エフェクター機能を確認し、テロメアの伸長と増幅能の改善を確認し、学術誌に報告した (Cell Stem Cell, 2013)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- Nishimura T, *Kaneko S, et al, Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and redifferentiation. Cell Stem Cell 12:114-126,2013
- Minagawa A, *Kaneko S, Rise of iPSCs as a cell source for adoptive immunotherapy. Hum Cell 27:47-50, 2014

など

〔学会発表〕(計 19 件)

- Shin Kaneko, Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and redifferentiation. 3rd International Symposium of Japanese Society of Hematology, 25 May 2013, Matsuyama, Japan

など

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

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

権利者：東京大学

種類：PCT 出願

番号：WO 2013176197 A1

出願年月日：2012 年 5 月 22 日

国内外の別：国際出願

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kaneko_summary.html

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金子 新（京都大学・iPS細胞研究所・准教授）

研究者番号：40361331