

令和元年9月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670578

研究課題名(和文) 同種iPS細胞治療を支えるための特異性の高い移植免疫調節法の開発

研究課題名(英文) Development of iPSC-derived T cells with antigen-specific helper or regulatory function

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：3種の抗原を対象に、それぞれに対して特異的な反応性を示すCD4陽性T細胞クローンを樹立し、iPS細胞へと初期化させた。既存の分化誘導技術を適用してもCD4陽性T細胞への分化に困難を極めた。遺伝子改変技術を用いることにより、HLAクラスII拘束性に標的抗原を特異的に認識するCD4陽性再分化T細胞を誘導することに成功した。具体的には同細胞は、抗原特異的に増殖応答とサイトカイン産生を示すのみならず、樹状細胞を成熟させることによって、抗原特異的細胞傷害性CD8T細胞を誘導する能力を示した。これらの細胞が示すアジュバント作用は、抗原特異的I型ヘルパーCD4T細胞が示すそれと類似していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療における免疫反応の重要性は広く知られるところである。iPS細胞は抗原特異的CD8キラーT細胞再生のソースとして期待されているが、抗原特異的CD4の再生についての報告はない。本研究では、抗原特異的TCRを発現しヘルパー機能をもつCD4発現細胞をiPS細胞から誘導することに成功した。キラーT細胞との併用により、治療効果の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Three different antigen specific CD4 T cell clones are isolated from human peripheral blood and reprogrammed into T-iPS cells. For the purpose of induce HLA Class II restricted TCR expressing antigen specific T cells with helper function or regulatory function, current T cell differentiation protocol from iPS cell was optimized. Those T cells induced by the protocol showed HLA-class II restricted antigen specific proliferation and cytokine production. In addition, such HLA Class II restricted TCR expressing re-differentiated T cells showed an adjuvant function to induce antigen-specific CD8 CTLs for desired antigen via maturation of dendritic cells. The adjuvant effect was similar to the effect induced by Type I helper T cells.

研究分野：免疫再生

キーワード：iPS細胞 再分化T細胞 CD4T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の発見により、自己の多能性幹細胞を利用した再生医療実現への展望が大きく広がった。しかし一方で、iPS 細胞作製から目的臓器への分化誘導とその臨床応用を全て自家細胞でまかなうオーダーメイド医療は、何よりも時間面とコスト面、そして実施施設間での品質管理レベルの差といった面での制約が大きい。京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) ではその問題を解決することを目的として、「HLA ホモドナー由来 iPS 細胞ストック」プロジェクトが立ち上がっている。民族として HLA 多型が比較的良好に保存されている日本人を対象に、最終的には移植を必要とする患者さんの 90%以上に少なくともハプロタイプ(2対の HLA のうちの 1 対)が適合する iPS 細胞を供給するプロジェクトである。このプロジェクトにより、分化誘導した各種組織や臓器の HLA ハプロタイプ適合移植がどの程度有効であるかが明らかにされると考えられる。

一方で、iPS 細胞ストックを利用する他家移植治療においては、HLA 抗原以外にも数多くの同種抗原があるため、免疫抑制剤の併用なしでは移植片の拒絶を完全に防ぐことはできない点、また iPS 細胞由来臓器ならではの腫瘍化リスクが潜在する点など、iPS 細胞の臨床応用を実現するために積極的に解決すべき課題は多い。そこで申請者は iPS 細胞の多能性と、CD4T 細胞の持つ免疫抑制作用ならびに免疫賦活作用を利用する新しい問題解決法、すなわち移植細胞特異性の高い免疫機能調製法の開発を提案する。(次ページの研究概念図参照)

T 細胞は生体防御の中核であり、抗原特異的に免疫反応を促進するサブセットや、免疫抑制に特化したサブセットを有する。これらの T 細胞を体外で分離増幅し、目的に応じて再び体内に戻す治療が試みられているが、総じて成果は上がっていない。その理由として分離 T 細胞の抗原特異性を担保することが困難である点と、体外での分離・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。

申請者らはこの課題克服の Proof of concept として HIV-1 感染患者から HIV 由来のペプチドを特異的に認識する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンを単離し、iPS 細胞 (T-iPSC) を樹立した。そして T-iPSC から元の T 細胞と同一の T 細胞受容体 (TCR) のみをクローナルに発現する機能的 CTL を誘導したのみならず、テロメアの再伸長や増殖応答性が回復した良質な T 細胞へと「若返え」らせることに成功した。つまり、抗原特異性を保った有用な機能性 T 細胞を拡大再生させる手法であることを確認したのである (Nishimura, Kaneko, et al., *Cell Stem Cell*, 2013)。本研究にはこの技術を応用する。

### 2. 研究の目的

本提案は HLA ハプロタイプ一致 (HLA ホモ) iPS 細胞から分化誘導させた移植片に関して、その拒絶を抑える新しい手法をとして「再分化 CD4T 細胞による移植片特異的な免疫コントロール」技術を開発することを目的としている。具体的には、申請者が開発した iPS 細胞由来の T 細胞再分化誘導技術を用いて、移植片特異的な制御性 T 細胞とヘルパー T 細胞を誘導し、その機能を評価する。本研究の作業仮説を実験的に証明することができれば、iPS 細胞を利用する新しい免疫コントロール法を提案することが可能になり、ひいては HLA ホモ iPS 細胞ストックの有用性を飛躍的に高めることができる。

### 3. 研究の方法

(1) HLA ホモ iPSC 由来の分化細胞を貪食したレシピエント DC によって、同種抗原反応性のある移植片特異的なレシピエント CD4T 細胞クローンを誘導できるか?

移植片ドナーとなるホモ iPSC から分化細胞を得る(神経、心筋、網膜など)、移植片レシピエント(ハプロタイプ一致)の末梢血から樹状細胞を得る。レシピエントの樹状細胞にホモ iPSC 由来ドナー分化細胞を貪食させた後に、レシピエント CD4T 細胞と共培養を行い、移植片の持つ同種抗原に反応するレシピエント T 細胞クローンを樹立する。

研究用の HLA ホモ iPSC は既に樹立されており、そこからの分化細胞誘導技術は確立されている。また末梢血からの樹状細胞誘導やヘルパー CD4T 細胞クローンの樹立のための共培養もすでに確立された技術がある。得られるクローンの同種抗原特異性を正しく評価できるかどうかがこのステップで最も困難な点であるが、同レシピエント由来の iPSC から誘導した分化細胞をコントロールとすることで、バックグラウンドの軽減が図れると考えている。また抗原反応性も 3H 取り込み反応や CFSE のみならず、サイトカイン定量や CD40L 発現等を用いて総合的に評価する。この評価法が確立されるだけでも、iPSC 由来の移植片細胞の免疫原性の評価に有用と考える。

(2) 誘導した上記 CD4T 細胞クローンから iPS 細胞を樹立し、CD4T 細胞への再分化誘導が可能か?

CD4T 細胞クローンに山中因子を導入し iPSC を得る。ストローマ細胞との共培養によって、CD4/8 陽性 T 細胞まで分化させる。

適切な TCR 刺激と CD4T 細胞誘導、制御 T 細胞誘導、ヘルパー 1 型 T 細胞、ヘルパー 2 型 T 細胞それぞれの誘導に有用と考えられている転写因子導入を併用し、CD4T 細胞への分化を完遂させる。

(3) 再分化誘導した CD4T 細胞は、抗原特異的な機能を示すか?

(1) で樹立した移植片特異的な同種抗原反

応の検出系を用いて、再分化制御性 CD4 T 細胞による免疫応答抑制を評価する。

移植片に対する免疫応答の抑制を *in vitro* で示すことをこの実験の目的とする。IL-2 と TGF- $\beta$  の存在下に FoxP3 の発現によって誘導される、再分化制御性 T 細胞を用いる。これらの再分化制御性 T 細胞、ドナー分化細胞を貪食したレシピエントの DC、ならびに移植片特異的 CD4T 細胞クローンを共培養し、3H 取り込み反応や CFSE、サイトカイン定量や CD40L 発現等を用いて移植片特異的免疫抑制を総合的に評価する。コントロールには同一レシピエント由来で異なる抗原に特異的な反応を示す CD4T 細胞クローンと抗原貪食 DC を用いて、その反応を上記の再分化制御性 T 細胞が抑制しないことを示す。

(2)の実験でヘルパー-CD4T 細胞の再分化に成功すれば、上記の同種抗原反応検出系を用いて、同細胞が移植片に対する強力な免疫反応を惹起できるかどうかを評価する。また再分化制御性 T 細胞との混合比を変えた実験を行い、移植片特異的免疫抑制が解除されるかどうかを検討する。iPS 細胞に由来する組織は予想外の腫瘍化を起こす可能性がある。その際に抗原特異性は共通だが、正反対の機能（免疫応答惹起）を持つ再分化ヘルパー-T 細胞があれば、移植片の積極的な排除に用いることができる可能性がある。T 細胞からのこれらの実験を通じて、「再分化 CD4T 細胞による移植片特異的な免疫コントロール」が可能であるかどうかを明らかにする。なお、マウス T 細胞の iPS 細胞化技術は確立されておらず、マウス系は本研究に適さない。

#### 4 . 研究成果

26 年度は、同種移植片のソースとなる HLA ホモ iPSC 細胞の供給に時間を要したため、今年度は先ず 2 種のパイロット抗原を標的とする CD4 陽性の抗原特異的 T 細胞クローンを樹立し、iPS 細胞へと初期化させた。

CD4 陽性細胞への分化系に関する知見が不十分であることから、諸条件の最適化に時間を要したが、遺伝子改変技術などを用いることにより、抗原特異的な TCR 反応性を有する再生 T 細胞を *in vitro* で誘導することに成功した。具体的にはそれらの抗原刺激に特異的な増殖応答とヘルパー-T 細胞様のサイトカイン産生を示すことを確認した。更には、これらの再生 T 細胞が樹状細胞を介して抗原特異的 CD 8T 細胞を誘導できるヘルパー様 T 細胞であることを確認した。

27 年度は、まず 3 種の抗原を対象に、それぞれに対して特異的な反応性を示す CD4 陽性 T 細胞クローンを樹立し、iPS 細胞へと初期化させた。既存の分化誘導技術を適用しても CD4 陽性 T 細胞への分化に困難を極めたが、遺伝子改変技術を用いることにより、HLA クラス II 拘束性に標的抗原を特異的に認識する CD4 陽性再分化 T 細胞を誘導することに成功した（CD4 陽性細胞の製造方法

特願 2015-203482）。具体的には同細胞は、抗原特異的に増殖応答とサイトカイン産生を示すのみならず、樹状細胞を成熟させることによって、抗原特異的細胞傷害性 CD8T 細胞を誘導する能力を示した。これらの細胞が示すアジュバント作用は、抗原特異的 I 型ヘルパー-CD4T 細胞が示すそれと類似していた。実際、CD4 陽性再分化 T 細胞によって樹状細胞を介して産生された抗原特異的 CD8T 細胞、標的抗原を発現した細胞株を移植されたマウスへと投与すると、移植片はすみやかに拒絶された。続いて移植片に対する拒絶反応を抑制する CD4 陽性 T 細胞を再生することを目的として、分化誘導方の開発を試みた。最適化の過程ではあるが、T 細胞受容体刺激により抑制性のサイトカインを産生する再分化 T 細胞を得ることに成功している。

また、同種移植片のソースとなる HLA ハプロタイプ一致 iPS 細胞の供給を受け、同細胞をソースとする再生 T 細胞の分化誘導に着手した。標的抗原に対する T 細胞受容体遺伝子導入を併用し、所望の抗原反応性を持たせることに成功している。

#### 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 9 件)

Mianagawa A, Kaneko S. Rise of iPSCs as a cell source for adoptive immunotherapy. *Human Cell* 27(2): 47-50, 2014.

10.1007/s13577-014-0089-8.

Iriguchi S, Kikuchi N, Kaneko S, Noguchi E, Morishima Y, Matsuyama M, Yoh K, Takahashi S, Nakauchi H, Ishii Y. T cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of lung macrophages in the lung. *Blood* 125(2):370-382, 2015.

DOI:10.1182/blood-2014-05-575225

Karagiannis P, Iriguchi S, Kaneko S. Reprogramming away from the exhausted T cell state. *Seminar in Immunology Open Access*, 2015.

DOI: 10.1016/j.smim.2015.10.007.

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 Va24 invariant human NKT-like cells from iPS cells. *Stem Cell Reports* 6(2):213-227, 2016.

DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.01.005.

Sugai S, Yoshikawa T, Iwama T, Tsuchiya N, Ueda N, Fujinami N, Shimomura M, Zhang R, Kaneko S, Uemura Y, Nakatsura T. Hepatocellular carcinoma cell sensitivity to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate. *Int J Oncol* 48(5) 1794-1804, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3403. 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<sup>+</sup> T helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. *Cellular and Molecular Immunology* In press, 2016. 金子新, iPS細胞を用いた免疫細胞の in vitro 再生, *医学のあゆみ* 251(8):643-648, 2014. 金子新, iPS細胞技術による腫瘍免疫・感染免疫の再生, *実験医学* 33(2):115-120, 2015. 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):101-108, 2015.

[学会発表](計 32 件)

金子新, Human immune cells form induced pluripotent stem cells. Joint JAPAN-US conference in iPS and cancer. 2014/4/17, 京都  
金子新, Regeneration of immune cells for immunotherapy. 第 12 回幹細胞シンポジウム, 2014/5/30, 福岡  
上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新, BCR-ABL 特異的ヘルパー T 細胞のリプログラミングと CML 治療への応用, 第 18 回日本がん免疫学会総会, 2014/7/30-8/1, 愛媛  
Shin Kaneko, Reprogramming and regeneration of antigen-specific killer T cells. The 10th Annual Meeting of Korean Society for Stem Cell Research. 2014/8/28, Soul Korea.  
Norihiro Ueda, Yasushi Uemura, Rong Zhang, Tianyi Liu, Minako Tatsumi, Yutaka Yasui, Kiyotaka Kuzushima, hitoshi Kiyoi, Shin Kaneko. Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014/9/25-27, 横浜  
上田格弘, 植村靖史, 張エイ, 劉天懿, 巽美奈子, 安井裕, 葛島清隆, 清井仁, 金子新 BCR-ABL-specific T helper cells facilitate propagation of antigen-specific CTLs via DC

maturation. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014/10/31-11/2, 大阪  
金子新, iPS 細胞技術を利用した T 細胞の再生と臨床応用の展望, 第 87 回日本生化学会大会, 2014/10/15, 京都  
金子新, iPS 細胞を用いた免疫細胞の再生, 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014/12/3, 大阪  
UEDA Norihiro, UEMURA Yasushi, ZHANG Rong, LIU Tian-Yi, TATSUMI Minako, YASUI Yutaka, KUZUSHIMA Kiyotaka, KIYOI Hitoshi, KANEKO Shin. Generation of BCR-ABL reactive CD4 T lymphocytes by reprogramming and redifferentiation. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014/12/10-12/12, 京都  
金子新, Generation of immune cells from human iPS cell. 第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム / CiRA 第 18 回 International Symposium, 2015/1/16, 吹田  
金子新, iPS 細胞技術を用いて再生した抗原特異的 T 細胞の特性, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015/3/21, 横浜  
河合洋平, Generation of adaptive and innate-like lymphoid killer cells from a single T-iPSC. Kyoto T Cell Conference, 2015/5/16, Kyoto Japan.  
Minagawa A. Making anti cancer effector cells derived from iPSCs by T-cell receptor transfer. International Society for Stem Cell Research. 2015/6/24, Stockholm, Sweden.  
Yasui Y. Optimization of Xeno-Free culture sytem for in vitro induction of T cells from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research. 2015/6/26, Stockholm, Sweden.  
Iriguchi S. T-cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of macrophages in the lung. 第 11 回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾), 2015/7/11, 東京  
Iriguchi S. T-cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and impairs function of macrophages in the lung. 第 44 回国際実験血液学ミーティング, 2015/9/17, 京都  
金子新, iPS 細胞技術のがん治療への応用, 第 13 回ペイシエント・アクティブ・フォーラム, 2015/9/23, 東京  
安井裕, iPS 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, 2015/9/26, 東京  
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、2015/10/8、名古屋  
安井裕 Optimization of Xeno-Free culture system for in vitro induction of T cells from human iPS cells. 第 77 回日本血液学会学術集会、2015/10/17、金沢
- ⑳ 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、2015/10/17、金沢
- ㉑ 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、2015/10/22、神戸
- ㉒ 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 lymphocytes by reprogramming and redifferentiation. 第 44 回日本免疫学会学術総会、2015/11/19、札幌
- ㉓ 金子新 Reprogramming and redifferentiation of antigen specific T cells by iPS cell technology. Tsukuba Hematology Seminar. 2015/11/21、筑波
- ㉔ 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」、2015/11/25、豊中
- ㉕ 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. 2015/12/7, Orland, USA.
- ㉖ 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、2015/12/10、筑波
- ㉗ 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、2015/12/19、京都
- ㉘ 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、2016/2/26、新潟
- ㉙ 安井裕 生物由来原料フリーの培養系を用いたヒト iPS 細胞からの T 細胞再分化系の構築、第 15 回日本再生医療学会総会、2016/3/17、大阪
- ㉚ 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、2016/3/18、大阪
- ㉛ 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、2016/3/19、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 2 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 07 月 17 日  
国内外の別：外国

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  
取得年月日：2015 年 11 月 13 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
金子研究室ホームページ  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/kaneko/index.html>  
京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA (サイラ)  
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
金子 新 (KANeko, Shin)  
国立大学法人京都大学・iPS 細胞研究所・准教授、研究者番号 40361331

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし