

令和元年6月20日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05194

研究課題名(和文) iPS細胞を利用したCD4陽性T細胞の再生医療のための基盤技術の確立

研究課題名(英文) Trial of CD4 positive T cell induction from iPS cells

研究代表者

塩田 達雄 (Shioda, Tatsuo)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00187329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞からのCD4陽性T細胞の再構築を目的とし、アカゲザルからiPS細胞を樹立し、HIV-1阻害因子TRIM5遺伝子あるいはHIV-1やSIV感染に必須なCCR5遺伝子をCRISPR/Cas9によるゲノム編集技術で人為的に破壊し、シグナル伝達領域を欠損したEGFRでマーキングする作業を行ってきたが、遺伝子導入効率の向上に時間を要し、サル個体への移入実験の実施には至らなかった。現在、細胞の大量調整を行っており9月ごろに移植を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV感染症の治療を目指して、HIVに感染しないCD4陽性T細胞をiPS細胞から誘導することを目的とした。これまで、iPS細胞からCD4陽性T細胞を試験管内で分化誘導した成功例の報告はない。よって、CD4陽性T細胞ではなく、未分化な造血幹細胞を個体に移入することによりCD4陽性T細胞への誘導を計画したが、実験動物として使用可能なアカゲザルのiPS細胞はヒトのiPS細胞とは様々な面で異なることが明らかとなり、現在までにはサルへの移入実験には残念ながら至らなかった。しかし、アカゲザルiPS細胞特有の性質への理解は深まり、今度の研究の進展に役立つ知見は得られた。

研究成果の概要(英文)：To develop a method to induce CD4 positive T cells from iPS cells, we established several iPS cell clones from rhesus monkeys. We tried several methods to introduce CRISPR/Cas9 into iPS cells and succeeded in destroying anti-HIV-1 TRIM5 gene. We are now preparing large amount of iPS cells in which HIV-1 co-receptor gene was swapped with truncated EGFR-marker gene for injection into animals. The transfusion of iPS cell-derived hematopoietic stem cells into animal will facilitate differentiation of iPS cells to CD4 positive cells in vivo.

研究分野：ウイルス学(HIV)

キーワード：iPS CD4 TRIM5 CCR5

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症は、休止期にある CD4 陽性 T 細胞やその他の寿命の長い細胞の中で HIV が潜伏し続けるために感染者は生涯抗 HIV 薬を服用し続ける必要がある。iPS 細胞から HIV-1 耐性のヒト CD4 陽性 T 細胞を産生し、生体において長期間安定して存続させることが可能となる技術が確立できれば、HIV 感染者自身の細胞から樹立した iPS 細胞を用いて、抗 HIV 薬を服用しなくとも通常の生活を送れる程度に HIV 感染症を制御すること (functional cure) が可能になると考えた。一方で、HIV-1 は宿主域が狭く、ヒト以外に感染する動物は倫理的問題や絶滅危惧種であるために実験動物としての使用が困難なチンパンジーのみである。アカゲザルやカニクイザル等の旧世界ザルにおいては、HIV-1 はこれらサル種の CD4 陽性 T 細胞上のレセプター CD4 と CCR5 を利用できるために細胞内に侵入はできるものの、サル細胞内の HIV 阻害因子 TRIM5 $\alpha$  や APOBEC3G によりそれ以降の過程が効率よく進行せず、遺伝子の発現に至らない。HIV-1 が感染・増殖できる実験動物が存在しないため、感染防御ワクチンの有効性検定するにはヒトでの野外実験を行う以外に方法がなく、HIV-1 の狭い宿主域はワクチン開発の大きな障害の一つとなっている。申請者は TRIM5 $\alpha$  による感染抑制を回避する HIV-1 の作出を行ってきたが、発想を逆に、旧世界サルの iPS 細胞の TRIM5 $\alpha$  や APOBEC3G の発現を人為的に抑制してから HIV-1 が感染・増殖する CD4 陽性 T 細胞に分化させて個体に戻し、変異を持たない HIV-1 が一過性に感染・増殖できる旧世界サル個体を作ることが出来ると考えた。さらに、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルモデル系において、人為的に抗 SIV 機能を付与した iPS 細胞由来 CD4 陽性 T 細胞を移植することで、前述の HIV 感染症治療の動物モデルも作成できると考えた。

### 2. 研究の目的

iPS 細胞から様々な組織が再生構築可能になっている。我々はこれまで血球系細胞の分化、なかでも T 細胞の構築に取り組んできた結果、ヒト CD8 陽性 T 細胞の再生に成功した。しかし、ヒトにおいてもアカゲザルにおいても、CD4 陽性 T 細胞の再構築には成功していない。本研究は、個体を用いた T 細胞の選択分化が可能なマウスやアカゲザルへの移植実験により、CD4 陽性 T 細胞の誘導と定着を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アカゲザル iPS 細胞株の樹立およびマクロファージへの分化誘導

3 頭のアカゲザルから分離した末梢血単核細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子 (Klf4, Oct3/4, Sox2, c-Myc) を導入し、25-30 日後に iPS 細胞を樹立した。フィーダー細胞 C3H/10T1/2 の存在下で iPSC を 14 日間培養して CD34 陽性細胞を得たのちに、さらに M-CSF と GM-CSF を加えて 21 日間培養し、マクロファージに分化させた。

#### (2) CRISPR/Cas9 による TRIM5 遺伝子欠損

TRIM5 遺伝子の exon3 を標的とした gRNA を設計し、精製 Cas9 タンパク質とともにエレクトロポレーション法にて、iPS 細胞へトランスフェクトし、薬剤耐性細胞株を得た。

### 4. 研究成果

3 頭のアカゲザルから樹立した iPS 細胞から分化誘導したマクロファージは、細胞表面マーカーとして CD11b(+), CD14(+), CD68(+), CD86(+), CD163(-) であることから、M1 タイプのマクロファージであると考えられた。また蛍光ラベルした大腸菌を貪食したことから、機能的なマクロファージが分化誘導できていることが確認された。HIV の感染に必須な CD4, CCR5 および CXCR4 はいずれも陽性だった。一方、試験管内での CD4 への分化誘導を様々な手法で試みたが、結果として CD4 陽性 T 細胞への分化は観察されず、サル個体へ CD34 陽性細胞を移入し、個体内での「学習」により CD4 陽性 T 細胞への分化誘導を期待することとした。

CRISPR/Cas9 により TRIM5 遺伝子の破壊を試みた。1 回のトランスフェクションで片側の染色体に欠損が導入できたので、得られた細胞株にもう 1 度トランスフェクションを行い、双方の染色体に 14 塩基あるいは 5 塩基が欠損した細胞株を得ることができた。マクロファージに分化させて TRIM5 の mRNA を測定したところ、CRISPR/Cas9 導入細胞で発現抑制が確認できた。

TRIM5 遺伝子欠損細胞に Luciferase をレポーターとする HIV-1 ベースのレンチウイルスベクターを感染させたところ、TRIM5 遺伝子欠損前の iPS 由来マクロファージでは検出できない Luciferase の発光を確認することができ、iPS 細胞由来マクロファージが HIV 感受性を持つことと、アカゲザルでの HIV 感染の抑制は既報通りに TRIM5 $\alpha$  分子の発現によることが改めて確認された。また、樹立したマクロファージへサル免疫不全ウイルス SIVmac316 株 (マクロファージ指向性) と SIVmac239 株 (T 細胞指向性) を感染させたところ、T 細胞指向性の後者の増殖は認められず、マクロファージ指向性の前者のウイルス増殖のみが観察された。以上の結果から iPS 由来のマクロファージへの分化がウイルス感染モデルとして十分な機能を有していることが確認された。現在は同様の手法で CCR5 遺伝子を欠損させる gRNA と、CCR5 遺伝子の部位にマーカーとして細胞内シグナルドメインを持たない EGFR を導入するスワップベクターの構築を行なっている。

現在、iPS 細胞を樹立した個体に病原性 CCR5 指向性の HIV と SIV のキメラウイルス SHIV (R5-SHIV) を接種し、CD4 陽性 T 細胞が減少しつつある、すなわち外来性 CD4 陽性 T 細胞増殖のためのニッチが形成されつつあるサル個体へ、CCR5 欠損 EGFR 導入 iPS 細胞由来造血幹細胞

( R5-iHSC ) の自家移植を計画し準備を進めている。 R5-iHSC 自家移植実験の評価方法としては、安全性については血液内科学、臨床獣医学的検査を行い、有効性についてはサル個体レベルでの定着性や経時的分化誘導能・持続能(末梢血やリンパ節におけるマーカー陽性血液細胞の定性・定量解析) 病原性 R5-SHIV 感染動態(血中ウイルス量、マーカー陰性 CD4 陽性 T 細胞の推移)を予定している。安定した R5-iHSC の定着および CD4 陽性 T 細胞等への分化誘導が生じれば、SHIV 感染によりマーカー陰性 CD4+T 細胞は減少するが、マーカー陽性の CD4 陽性 T 細胞は CCR5 が欠損しているために R5-SHIV が感染出来ずにサル生体内で維持され、iPS 由来 CD4 細胞の分化誘導が確立できるものと期待している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, Nomaguchi M, Kimura Y, Nishi M, Kimura H, Sato H, Hirano H, Tamura T, Akari H, Miura T, Adachi A, Sawasaki T, Yamamoto N, Ryo A. PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation. *Nature Communications*, 10, 2019, 844. doi:10.1038/s41467-019-09867-7. 査読有り
2. Xu Huaigeng, Wang Bo, Ono Miyuki, Kagita Akihiro, Fujii Kaho, Sasakawa Noriko, Ueda Tatsuki, Gee Peter, Nishikawa Misato, Nomura Masaki, Kitaoka Fumiyo, Takahashi Tomoko, Okita Keisuke, Yoshida Yoshinori, Kaneko Shin, Hotta Akitsu. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell*, 24, 2019, 566-578. e7. doi:10.1016/j.stem.2019.02.005. 査読有り
3. Torisawa Y, Mishima Y, Kaneko S, Developing thymus-on-a-chip and cancer-on-a-chip for cancer immunotherapy. *Impact*, 29, 2019, 33-35. doi:10.21820/23987073. 査読有り
4. Iriguchi Shoichi, Kaneko Shin. Toward the development of true "off-the-shelf" synthetic T-cell immunotherapy. *Cancer Science*, 110, 2019, 16-22. doi:10.1111/cas.13892. 査読有り
5. 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 497, 2018, 719-725. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.139. 査読有り
6. Ueda N, Zhang R, Tatsumi M, Liu TY, Kitayama S, Yasui Y, Sugai S, Iwama T, Senju S, Okada S, Nakatsura T, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S, Uemura Y. BCR-ABL-specific CD4+ T-helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. *Cell Mol Immunol*, 15, 2018, 15-26. doi:10.1038/cmi.2016.7. 査読有り
7. Yokokawa Hiroshi, Higashino Atsunori, Suzuki Saori, Moriyama Masaki, Nakamura Noriko, Suzuki Tomohiko, Suzuki Ryosuke, Ishii Koji, Kobiyama Kouji, Ishii Ken J, Wakita Takaji, Akari Hirofumi, Kato Takanobu. Induction of humoral and cellular immunity by immunisation with HCV particle vaccine in a non-human primate model. *Gut*, 67, 2018, 372-379. doi:10.1136/gutjnl-2016-312208. 査読有り
8. Nakayama EE, Saito A, Sultana T, Jin Z, Nohata K, Shibata M, Hosoi M, Motomura K, Shioda T, Sangkitporn S, Locket R, Saeng-Aroon S, Naturally Occurring Mutations in HIV-1 CRF01\_AE Capsid Affect Viral Sensitivity to Restriction Factors. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 34, 2018, 382-392. doi:10.1089/AID.2017.0212. 査読有り
9. Komurlu S, Bradley M, Smolin N, Imam S, Pauszek RF 3rd, Robia SL, Millar D, Nakayama EE, Shioda T, Campbell EM. Defects in assembly explain reduced antiviral activity of the G249D polymorphism in human TRIM5. *PLOS ONE* 14, 2018, e0212888. doi:10.1371/journal.pone.0212888. 査読有り
10. Saeng-aroon Siriphan, Saipradit Nonglak, Locket Ruangchai, Klamkhai Nattapong, Boonmuang Ratrawee, Kaewprommal Pavita, Prommajan Korrakot, Takeda Naokazu, Sungkanuparph Somnuek, Shioda Tatsuo, Sangkitporn Somchai, Motomura Kazushi. External Quality Assessment Scheme for HIV-1 Drug-Resistance Genotyping in Thailand. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 34, 2018, 1028-1035. doi:10.1089/AID.2017.0299. 査読有り
11. NARUSE Taeko K, AKARI Hirofumi, MATANO Tetsuro, KIMURA Akinori. Diversity of ULBP5 in Old-World monkeys (Cercopithecidae) and divergence of the *ULBP* gene family in primates. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 94, 2018, 441-453. doi:10.2183/pjab.94.029. 査読有り

12. Ejikeugwu C, Eze P, Iroha I, Esimone C, Adikwu M, Akari H. Understanding the facts and minding the gap of (HIV-1/HIV-2) primate research and infectious disease laboratories in Africa. *International Journal of Virology and AIDS*, 5, 2018, 46. doi: 10.23937/2469-567X/1510046 査読有り
13. Higaki K, Hirao M, Kawana-Tachikawa A, Iriguchi S, Kumagai A, Ueda N, BoW, Kamibayashi S, Watanabe A, Nakauchi H, Suzuki K, Kaneko S. Generation of HIV-Resistant Macrophages from iPSCs by Using Transcriptional Gene Silencing and Promoter-Targeted RNA. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 12, 2018, 793-804. doi:10.1016/j.omtn.2018.07.017. 査読有り
14. Ueda N, Uemura Y, Zhang R, Kitayama S, Iriguchi S, Kawai Y, Yasui Y, Tatsumi M, Liu TY, Mizoro Y, Okada C, Watanabe A, Nakanishi M, Senju S, Nishimura Y, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, and Kaneko S. Regeneration of TCR expressing Innate Lymphoid helper cells that induces cytotoxic T cell- mediated anti-leukemic immunity in HLA Class II and bcr-abl peptide restriction. *Stem Cell Reports*, 10, 2018, 1935-1946. doi:10.1016/j.stemcr.2018.04.025. 査読有り
15. Lee Suji, Huh Ji Young, Turner David M, Lee Soohyeon, Robinson James, Stein Jeremy E, Shim Sung Han, Hong Chang Pyo, Kang Myung Seo, Nakagawa Masato, Kaneko Shin, Nakanishi Mahito, Rao Mahendra S, Kurtz Andreas, Stacey Glyn N, Marsh Steven G.E, Turner Marc L, Song Jihwan. Repurposing the Cord Blood Bank for Haplobanking of HLA- Homozygous iPSCs and Their Usefulness to Multiple Populations. *STEM CELLS*, 36, 2018, 1552-1566. doi:10.1002/stem.2865. 査読有り
16. Minagawa A, Yoshikawa T, Yasukawa M, Hotta A, Kunitomo M, Iriguchi S, Takiguchi M, Kassai Y, Imai E, Yasui Y, Kawai Y, Zhang R, Uemura Y, Miyoshi Hi, Nakanishi M, Watanabe A, Hayashi A, Kawana K, Fujii T, Nakatsura T, Kaneko S. Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy. *Cell Stem Cell*, 23, 2018, 850-858. doi:10.1016/j.stem.2018.10.005. 査読有り
17. Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Hamano A, Okada A, Ode H, Maejima M, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, Akari H, Iwatani Y. Mapping Region of Human Restriction Factor APOBEC3H Critical for Interaction with HIV-1 Vif. *J Mol Biol*, 429, 2017, 1262-1276. doi:10.1016/j.jmb.2017.03.019. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 金子新、Enhancing T cell receptor stability confirm antigen specificity of regenerated T cell。第 18 回日本再生医療学会 ISCT Joint Symposium(招待講演) 2019/3/21~23 兵庫県神戸市。
2. 金子新、再生医療等製品の若手開発者による薬事承認に向けた開発と課題。第 18 回日本再生医療学会 シンポジウム 39(招待講演) 2019/3/21~23、兵庫県神戸市。
3. 塩田達雄、(招待講演)エイズ基礎研究の歴史と展望。第 32 回日本エイズ学会学術集会、2018/12/2~4、大阪府大阪市。
4. 鷲崎彩夏、村田めぐみ、関洋平、Yin Pui Tang、寒川裕之、Wei Keat Tan、入江一浩、明里宏文。新規 PKC 活性化剤 10-Methyl-Aplog-1 と JQ1 の併用は Latency Reversing Agent として理想的な活性を示す。第 32 回 日本エイズ学会学術集会・総会、2018/12/2~4、大阪府大阪市。
5. 明里宏文、HIV 感染霊長類モデルによる HIV 根治研究、第 32 回 日本エイズ学会学術集会・総会(招待講演)、2018 年、2018/12/2~4、大阪府大阪市。
6. 明里宏文、新しい HIV 感染霊長類モデル:HIV 感染症の根治に向けて。第 14 回霊長類医科学フォーラム(招待講演)、2018/11/9、茨城県つくば市。
7. Akatsuki Saito, Joao I Mamede, Tahmina Sultana, kyoutaro Nohata, Emi E nakayama, Tatsuo Shioda, Thomas J Hope. The Q4R mutation accelerates Kinetics of reverse transcription and initiation of uncoating of IFN- hypersensitive HIV-1 capsid mutant. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018/10/28~30、京都府京都市。
8. Ayaka Washizaki, Megumi Murata, Yohei Seki, Yin Pui Tang, Hiroyuki Kangawa, Kazuhiro Irie, Hirofumi Akari, A novel PKC activator 10-Methyl-Aplog-1 in combination with JQ1 showed high potency as LRA for shock and kill therapy. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018/10/28~30、京都府京都市。
9. Ayaka Washizaki, Megumi Murata, Yohei Seki, Yin Pui Tang, Hiroyuki Kangawa, Tan Wei Keat, Kazuhiro Irie, Hirofumi Akari, A novel PKC actvator 10-Methyl-Aplog-1 in combination with JQ1 showed high potency as LRA for shock and kill therapy, 36th Annual Symposium Nonhuman Primate Models for AIDS(国際学会)、2018/10/2~5、アメリカ。
10. Yohei Seki, Akatsuki Saito, Shigeyoshi Harada, Ayaka Washizaki, Megumi Murata, Yuta

- Hikichi, Kazuhisa Yoshimura, Hiroshi Ishii, Yorifumi Satou, Islam Mohammad Saiful, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Takeshi Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Tomoyuki Miura, Hirofumi Akari, Cooperative cellular and humoral immunity may contribute to the efficient control of HIV-1 replication in macaques. 36th Annual Symposium Nonhuman Primate Models for AIDS(国際学会)、2018/10/2~5、アメリカ。
11. Shigeyoshi Harada, Yuta Hikichi, Yohei Seki, Yasumasa Iwatani, Yasuhiro Yasutomi, Tomoyuki Miura, Tetsuro Matano, Hirofumi Akari, Kazuhisa Yoshimura, Molecular characterization of the env gene during transmission of macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt), 36th Annual Symposium Nonhuman Primate Models for AIDS(国際学会)、2018/10/2~5、アメリカ。
  12. Nakayama EE, Saito A, Sultana T, Jin Z, Nohata K, Shibata M, Hosoi M, Motomura K, Shioda T, Sangkitporn S, Loket R, Saeng-Aroon S. Naturally Occurring Mutations in HIV-1 CRF01\_AE Capsid Affect Viral Sensitivity to Restriction Factors, The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity(国際学会)、2018/9/5~7、兵庫県淡路市。
  13. Kaneko S, HLA homologous iPS cell project for regenerative medicine. Frontier iPS and Stem Cell Therapeutic Summit 2018 in Taipei(招待講演)(国際学会)、2018/6/30 台湾。
  14. 金子新、iPS細胞からのヒト免疫細胞再生。第29回日本生体防御学会学術総会(招待講演)、2018/6/27、京都府京都市。
  15. Akatsuki Saito, Joao I Mamede, Tahmina Sultana, Hirotaka Ode, Kyoutaro Nohata, Emi Nakayama, Yasumasa Iwatani, Thomas J Hope, Tatsuo Shioda. Multiple pathways to avoid IFN- sensitivity of HIV-1 by mutants capsid. Retroviruses 2018(国際学会) 2018/5/21~26、アメリカ。
  16. Minagawa A, Hotta A, Kawai Y, Yasui Y, Uemura Y, Yasukawa Y, Nakatsura T, Kaneko S. T cell receptor-stabilized regenerated CD8ab cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. AACR Annual Meeting 2018(国際学会)、2018/4/14~18年、アメリカ。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：明里宏文

ローマ字氏名：Hirofumi Akari

所属研究機関名：京都大学

部局名：霊長類研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：20294671

研究分担者氏名：金子 新

ローマ字氏名：Shin Kaneko

所属研究機関名：京都大学

部局名：iPS細胞研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40361331