

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 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：18H02641

研究課題名（和文）多彩な癌浸潤T細胞集団を包括的に再生し、自家腫瘍オルガノイドで評価する手法の開発

研究課題名（英文）The therapeutic potential of multiclonal tumoricidal T cells derived from tumor infiltrating lymphocyte-derived iPS cells

研究代表者

金子 新（KANEKO, SHIN）

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：40361331

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）：本研究は腫瘍への特異性とT細胞受容体の多様性が保たれたTILを対象に、我々が既に報告したiPS細胞を介する抗原特異的T細胞再生の方法論を適用して、TIL集団をT-iPS細胞化し、そのT-iPS細胞集団を再生TIL集団化し、腫瘍オルガノイド技術を用いて作出した自家腫瘍モデルを対象として治療効果を検証する研究である。

大腸がん切除検体からTILを分離し、TIL集団を効率よく増幅したのちに自家大腸がんスフェロイドとの共培養により、反応性が確認されたTILからT-iPS細胞を樹立した。それらのT-iPS細胞からCD8陽性T細胞を分化誘導し、自家がんスフェロイド特異的な免疫応答を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞の最大の利点は、自らの多能性幹細胞をもって長期に機能する再生細胞をもちいたオーダーメイド治療を実現できることである。その点からはいわゆるneoantigenを認識する腫瘍抗原特異的T細胞の分離と再生が技術的に可能であれば、誰でも自己の腫瘍を認識する再生T細胞治療の恩恵を受けられる可能性がでてくる。本プラットフォーム研究を通じて、患者検体を用いたTILの再生と自家腫瘍スフェロイドに対するエフェクター機能のPOCを示すことができたことから、今後はより治療効果を向上させるための個別研究へと発展することが期待される。またその結果、新しい個別化免疫治療法の実現可能性が高まると考える。

研究成果の概要（英文）：Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), which include tumor-specific T lymphocytes with frequency, are used for adoptive cell transfer therapy (ACT) in clinical practice. The optimization of TIL preparation has been investigated to reduce the senescence and increase the abundance of TIL, as both the quality and quantity of the transferred cells have great influence on the outcome of TIL-based ACT (TIL-ACT). Considering the effects of cell reprogramming on senescence, we expected that the anti-tumor effect could be enhanced by TIL regeneration. To confirm this hypothesis, we established tumor-specific TIL-derived iPS cells (TIL-iPSC) with human colorectal cancer specimens. T cells differentiated from TIL iPSC (TIL-iPS-T) retained not only intrinsic T cell functions and tumor specificity, but also exhibited improved proliferation capacity and additional killing activity. Moreover, less differentiated profiles and prolonged persistency were seen in TIL-iPS-T compared with primary cells.

研究分野：免疫再生治療

キーワード：T細胞免疫治療 iPS細胞 腫瘍浸潤T細胞 再生T細胞 がんスフェロイド

1. 研究開始当初の背景

2013年のScience誌のBreakthrough AwardはCancer Immunotherapyであった。PD-1/PD-L1経路に代表される免疫学的チェックポイントの抑制(ICB: Immunological Checkpoint Blockade)による腫瘍免疫の惹起や、抗CD19-CAR(chimeric antigen receptor)遺伝子導入T細胞(CAR-T)による抗原特異的細胞傷害性の増強などの戦略に対して与えられたAwardであるが、改めてT細胞を中心とする免疫反応には腫瘍を制御する力があるということが明らかになった。それは即ち1)単一の標的抗原であっても、多量のT細胞にその(自己/腫瘍共通)抗原への特異性を持たせることで腫瘍を制御する方法論(CAR-T)の有用性と、2)腫瘍局所で抑制されている多様な腫瘍抗原特異的T細胞を活性化させる方法論(ICB)の有用性が明らかになったということである。

さて我々はこのBreakthrough Awardに先駆けて、iPS細胞を介した抗原特異的T細胞の再生を報告した(Kaneko S et al., Cell Stem Cell, 2013)。奇しくも再生T細胞はCAR-T同様の概念である単一の抗原特異的T細胞に「免疫学的若返り(rejuvenation)」の要素を加えて発展させた概念である。しかしCAR-T同様、そこには単一抗原のみを標的とする弱点もある。例えば腫瘍は標的抗原を変異させることによって、特異的T細胞の攻撃を免れるようになるが、実際CD19-CAR-T治療後にCD19陰性の白血病が再発することが知られる。この観点からは、できるだけ多くの種類の標的に対応できるT細胞を活用すること、即ち多様な抗原を標的とする視点も重要である。更に言えば、抗腫瘍効果を持つ多様なT細胞のみを活性化することができれば、全身的なICBの副作用として知られる自己免疫応答の回避や、癌腫を問わず2割程度に留まると言われる治療効果の改善を期待することもできよう。この観点から、我々は腫瘍浸潤T細胞(TIL: tumor infiltrating lymphocytes)に着目し、より効果的な再生T細胞治療のためのソースとすることを考えた。

TILはその名の通り腫瘍に浸潤しているT細胞であり、幾つかの癌腫ではその存在が予後に相関することが知られ、PD-1/PD-L1経路抑制の効果予測にも用いられる。NIHのRosenbergらは腫瘍に局在していることこそがTILの腫瘍特異性の反映であるとの考えに基づき、体外でTILを増幅培養した後、自家養子免疫治療としてがん治療に用いられることを示した。TIL治療の最大の利点は、腫瘍抗原やHLA拘束性、TCR配列を決定せずとも腫瘍特異的なT細胞治療として成立する点である。これは近年着目される、個々の患者の腫瘍における特異的遺伝子変異であるneoantigenの活用とも相性が良い。個々の患者の腫瘍にはゲノム変異が蓄積しており、その結果、腫瘍原性との関連の有無にかかわらず抗原性を持つ蛋白ができることが知られ、それらの蛋白はneoantigenと称される。当然これらの変異の殆どは個人に特異的でありTILの多くはそれを認識している。つまりTILのゲノムには多様な腫瘍抗原をHLA拘束性に認識するためのTCR情報が保存されている。しかしTILの分離と増幅には高度な技術と時間を要する上に患者によってその成否はまちまちであること、またTILの機能を十分に保ちながら増幅するには限りがあることから、究極の個別治療であるTIL治療の普及は困難と考えられている。また全てのTILのTCR配列を解析・決定し、TCR遺伝子導入ベクターを複数調製し、TCR遺伝子導入T細胞治療として個々の症例に展開することも検討されているが、費用と時間のみならず技術の煩雑さからも現実的でない。そのため、neoantigenの個別化免疫治療への応用はペプチドワクチン合成に留まっている。

さて、我々の報告したT細胞のiPS細胞化と抗原特異的再生T細胞分化の技術は、TILの弱点である体外での機能的な増幅に限界がある点を完全に克服する可能性を持つ。有用かつ多様なTCRをもつTILを原材料として速やかにT-iPS細胞を樹立し、増やし、そして多様なTCR発現を保った再生T細胞へと分化誘導することができれば、個別変異ペプチドワクチン療法その先、つまり自らのTILに由来する抗原特異的T細胞を無尽蔵に用いる細胞治療が実現するのである。

もちろんそのためには、個別医療であるTILの効果を客観的に判断するにたる実験系をもってPOCを取得することが重要であることに論をまたない。標的抗原が存在するものの、その同定がなされない個別化治療であるということは、有効性の予測に一般的な腫瘍細胞株を用いることができないということである。PDXと呼ばれる免疫不全マウスへの自家腫瘍塊移植オーガノイド動物モデルは、移植の成功と個体数の確保が容易でないことから、研究協力者が日常的に安定的に樹立し(Miyoshi et al. *Nat Protocol* 2013)、繰り返し評価も簡便な腫瘍スフェロイドモデルを使用し、信頼に足る機能評価を試みることに思い至った。

2. 研究の目的

PD1/PD-L1経路の抑制に代表される免疫反応の増強が、幾つかのがんで既に標準治療となり、今後も大きな発展と治療の普及が期待されている。本研究は、治療効果を認めながらも普遍化が見込めない免疫細胞治療である腫瘍浸潤T細胞(TIL)療法の課題点を、iPS細胞技術を用いて解決する方法論とその有用性を検証するための研究である。腫瘍への特異性とT細胞受容体の多様性が保たれたTILを対象に、我々が既に報告したiPS細胞を介する抗原特異的T細胞

再生の方法論を適用して、TIL 集団をまるごと T-iPS 細胞化し、その T-iPS 細胞集団をまるごと再生 TIL 集団化し、腫瘍スフェロイド技術を用いて作出した自家腫瘍モデルを対象として治療効果を検証する。客観性が高く科学的に検証できる手法で、TIL 集団再生の方法論と有用性が示されれば、TIL 治療の普遍化に繋がり、がん免疫治療の一層の発展に貢献できると考える。

3. 研究の方法

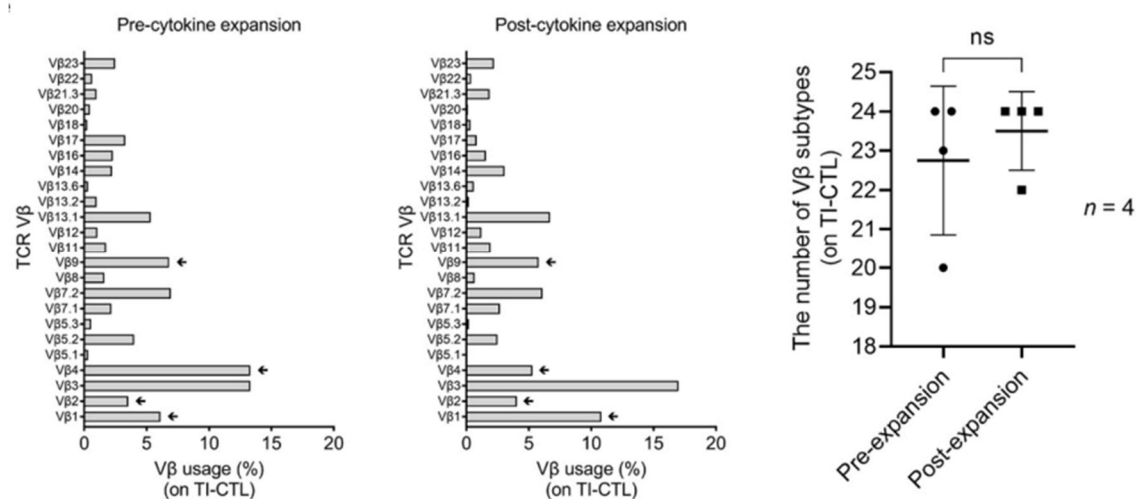
- (1) TIL を得られやすい大腸がん、非小細胞性肺癌を中心に複数の切除検体から TIL を分離し、TIL 集団の 1 TCR レパトワの多様性データを取得する。
- (2) 得られた TIL の TCR レパトワをできる限り保つよう、T-iPS 細胞樹立条件を最適化する。
- (3) 得られた T-iPS 細胞集団の CDR3 配列を NGS で網羅的に解析し、(1) で得られた TCR レパトワと比較することで、iPS 化後のレパトワ保存性を評価する。
- (4) 多様な TCR を持つ T-iPS 細胞集団から、TCR レパトワをできる限り保つ再生 TIL 集団を得られるよう、CD8T 細胞誘導条件を最適化する。
- (5) TIL を分離した切除検体から腫瘍細胞を分離し、腫瘍スフェロイドを作製する。
- (6) 自家腫瘍スフェロイドに対する再生 TIL 集団の抗腫瘍効果を評価する。

4. 研究成果

(1) TIL を得られやすい大腸がん、非小細胞性肺癌を中心に複数の切除検体から TIL を分離し、TIL 集団の 1 TCR レパトワの多様性データを取得する。

・大腸がん手術検体からの TIL 分離と拡大培養

16 症例の大腸がん検体から TIL とがん上皮（加えて一部の検体からは正常腸管上皮）を分離した。解析に十分な TIL を得るためにサイトカイン添加での拡大培養を行ったところ、平均 100 倍程度に増幅した TIL を得ることができた。拡大培養の前後で TIL の TCR レパトワが大きく変化しないことを確認した。



(2) 得られた TIL の TCR レパトワをできる限り保つよう、T-iPS 細胞樹立条件を最適化する。

・種々のリプログラミング法を検討し、センダイウイルスベクターによる T-iPS 細胞樹立法を採用した。上述した TIL 集団を iPS 細胞に再生した後に、その iPS 細胞集団の TCR レパトワを解析したところ、リプログラミング時の選択圧と考えられるレパトワの狭小化を認めた。そこで拡大後の TIL から機能的な TIL クローンを予め同定し、iPS 細胞化をすることを試みた。具体的には患者由来大腸がんスフェロイドとの共培養下に、HLA class I 発現依存性に、細胞傷害性分子を発現する TIL クローンを採取し、T-iPS 細胞を樹立した。各症例に付き、がんスフェロイドに反応する複数の TIL クローンに由来する複数の T-iPS 細胞を樹立した。なお、各 TIL クローンが同一患者由来の腫瘍スフェロイドを認識し、同一患者由来の正常スフェロイドを認識しないことを確認した。

(3)得られた T-iPS 細胞集団の CDR3 配列を NGS で網羅的に解析し、(1)で得られた TCR レパトワと比較することで、iPS 化後のレパトワ保存性を評価する。

・(2)において T-iPS 細胞のソースを TIL クローンに変更したことから、T-iPS 細胞と TIL クローンについて TCR の CDR3 配列を比較し、すべての TIL クローンと樹立 iPS 細胞との組み合わせにおいて同一であることを確認した。

(4)多様な TCR を持つ T-iPS 細胞集団から、TCR レパトワをできる限り保つ再生 TIL 集団を得られるよう、CD8T 細胞誘導条件を最適化する。

・(2)において T-iPS 細胞のソースを TIL クローンに変更したことから、報告済みの分化誘導条件を用いて充分量の再生 CD8T 細胞を得ることができた。

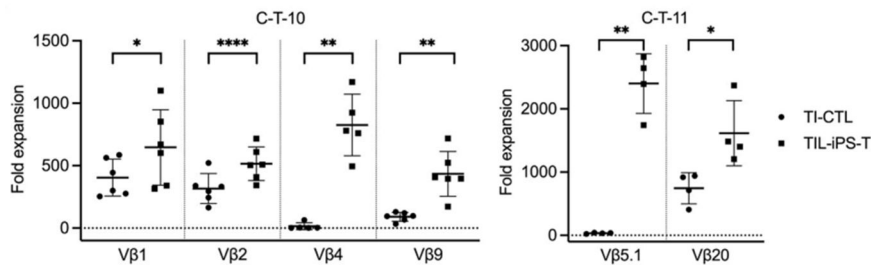
(5)TIL を分離した切除検体から腫瘍細胞を分離し、腫瘍スフェロイドを作製する。

・研究協力者らの指導を仰ぎ、複数の TIL 採取症例から腫瘍スフェロイドを樹立することができた。また、一部の症例ではコントロールとして、非がん部の正常腸管からスフェロイドを樹立した。

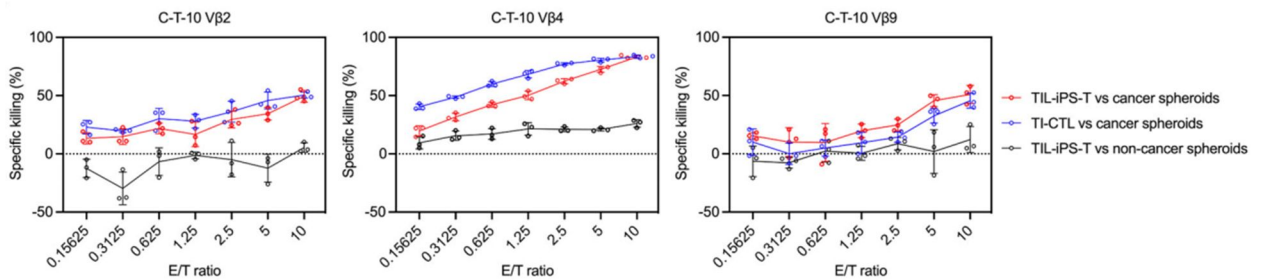
(6)自家腫瘍スフェロイドに対する再生 TIL 集団の抗腫瘍効果を評価する

・再生 TIL クローンは、そのもととなった TIL クローンに比して有意な増殖性改善を示し (A) 腫瘍スフェロイド選択的な細胞傷害性は維持していた (B)。また、再生 T 細胞クローンにおいては CCR7/CD62L を発現するナイーブ~セントラルメモリー表現型を呈する細胞が増加し、テロメア長の有意な再伸長を確認した (C)。TI-CTL:腫瘍浸潤 (TI)-細胞傷害性 T 細胞 (CTL)、TIL-iPS-T: TI-CTL をソースとした iPS 細胞由来の T 細胞

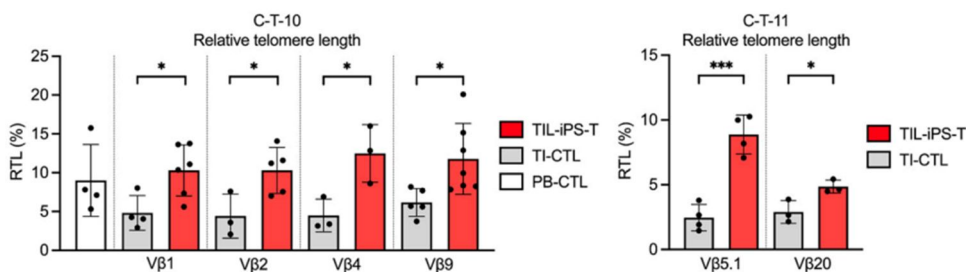
A:



B:

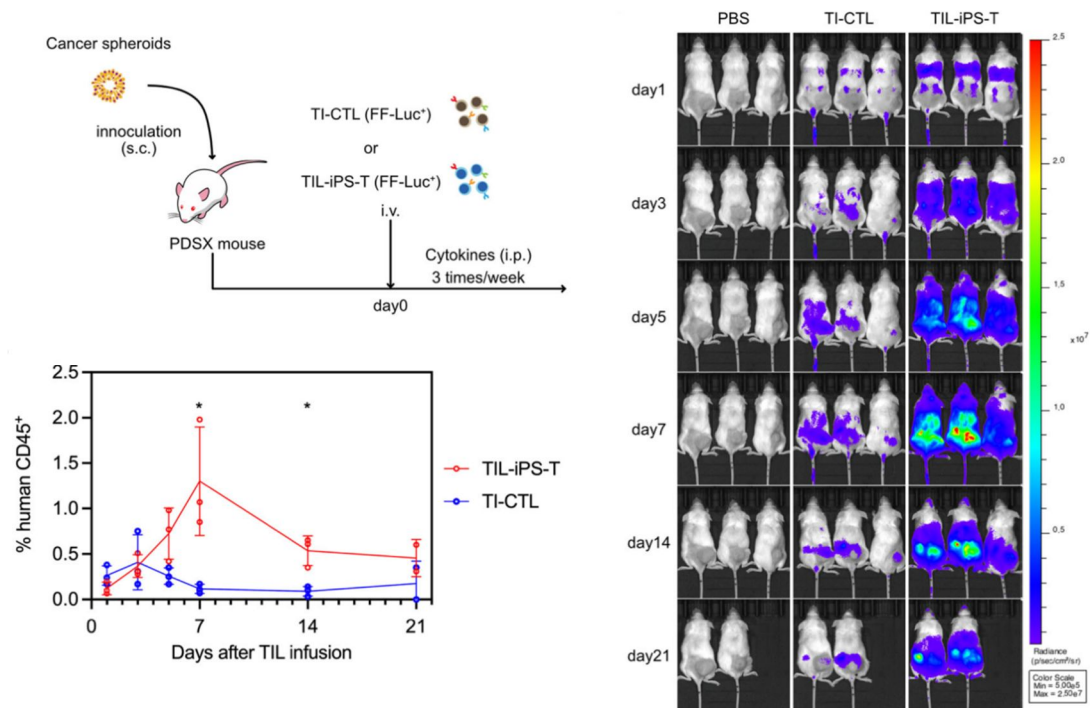


C:



・上述の再生 TIL クローンとそのもととなった TIL クローンを、患者由来腫瘍スフェロイドを予め皮下移植して腫瘍塊を作らせた免疫不全マウスに経静脈投与し、体内動態を解析した(図左

上)。再生 TIL クローン投与群において末梢血中のヒト T 細胞キメリズム値のピーク改善（図左下）と体内におけるヒト T 細胞クローン生存期間延長（図右）を認めた。



・ 今後は TIL 再生に伴うこれらの機能改善を検出できる自家腫瘍スフェロイド治療モデルの開発と同モデルによる自家再生 TIL の機能評価を検討する。

以上の研究内容は Communications Biology 誌に掲載された。
(DOI: 10.1038/s42003-021-02195-x)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Iriguchi Shoichi, Yasui Yutaka, Kawai Yohei, Arima Suguru, Kunitomo Mihoko, Sato Takayuki, Ueda Tatsuki, Minagawa Atsutaka, Mishima Yuta, Yanagawa Nariaki, Baba Yuji, Miyake Yasuyuki, Nakayama Kazuhide, Takiguchi Maiko, Shinohara Tokuyuki, Nakatsura Tetsuya, Yasukawa Masaki, Kassai Yoshiaki, Hayashi Akira, Kaneko Shin	4. 巻 12
2. 論文標題 A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 430-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20658-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takeshi, Kawai Yohei, Yasui Yutaka, Iriguchi Shoichi, Minagawa Atsutaka, Ishii Tomoko, Miyoshi Hiroyuki, Taketo M. Mark, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Sakai Yoshiharu, Kaneko Shin	4. 巻 4
2. 論文標題 The therapeutic potential of multiclonal tumoricidal T cells derived from tumor infiltrating lymphocyte-1derived iPS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 694-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02195-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shin Kaneko
2. 発表標題 Regeneration of Antigen-specific Cytotoxic T cells with an iPSC Technology
3. 学会等名 AAO International Cancer Forum 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子新
2. 発表標題 再生T細胞からがんへの挑戦状
3. 学会等名 CiRA*カンテレ 京都大学iPS細胞研究基金講演会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子新
2. 発表標題 iPS細胞を利用した免疫療法について
3. 学会等名 第12回iPS細胞産学合同研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子新
2. 発表標題 Enhancing T cell receptor stability confirm antigen specificity of regenerated T cell
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 ISCT Joint Symposium（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shin Kaneko	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 267
3. 書名 In Vitro Differentiation of T-Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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
研究協力者	坂井 義治 (Yoshiharu Sakai)	京都大学 (14301)	
研究協力者	武藤 誠 (Makoto Taketo)	京都大学 (14301)	
研究協力者	三好 弘之 (Hiroyuki Miyoshi)	京都大学 (14301)	

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
---------	---------