

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15278

研究課題名（和文）iPS細胞技術を用いたヘルパーT細胞の大量調製法の樹立

研究課題名（英文）Redifferentiation culture to generate helper T cells from iPS cells

研究代表者

河合 洋平 (Yohei, Kawai)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90623364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では人工多能性幹細胞（iPSC: induced pluripotent stem cell）から細胞傷害性T細胞（CTL: cytotoxic T lymphocyte）を作製する分化培養法と作製したCTLを高効率に増幅する拡大培養法をいずれも完全フィーダーフリー条件で実現した。

具体的な改良点の一例として、T細胞分化培養においてはIL-7+IL-21のサイトカイン添加が有効であり、拡大培養においてはIL-7+IL-15+IL-12+IL-18のサイトカイン添加が有効であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年腫瘍や慢性難治感染症の治療法として注目を集めているT細胞免疫療法では輸注T細胞を疲弊させることなく大量に調製する事が必須条件となっている。本研究では高増殖性形質をiPSC由来T細胞に付与させることにより、分化と拡大培養を組み合わせることで1ディッシュのiPSCから10個以上のT細胞作製を可能にした。この成果により既製品T細胞を患者に他家移植する画期的な棚卸式免疫療法が可能になると期待される

研究成果の概要（英文）：In this study we generated highly proliferative cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in complete feeder-free condition.

Specifically, we found cytokine combination of IL-7+IL-21 was beneficial in T-cell development culture while combination of IL-7+IL-15+IL-12+IL-18 was beneficial in T-cell expansion culture.

研究分野：immunology

キーワード：iPSC T cell immunotherapy helper T cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍や慢性難治感染症の治療における免疫療法のプレゼンスは近年急速に高まっており、T細胞を輸注する免疫細胞療法の有効性もキメラ抗原受容体(CAR: Chimeric Antigen Receptor)導入T細胞を使った治療(CAR-T細胞療法)のB細胞性腫瘍に対する著効により注目を集めている。しかし現在の免疫細胞療法ではコストも労力もかかる自家移植が基本であり、他家移植には細胞疲弊を回避しながら大量のT細胞を調製する戦略が必要とされる。

この問題に対して申請者の研究チームを含めいくつかの研究グループが人工多能性幹細胞(iPSC: induced pluripotent stem cell)を用いたT細胞の大規模調製法を提案してきた。この手法では細胞疲弊の形質を示すT細胞クローンから増殖に限りがないiPSCをまず樹立し、そこから*in vitro*の再分化を経てiPSC由来T細胞を無限に得ることを目指している。既報のiPSC由来T細胞は全て細胞傷害性T細胞(CTL: cytotoxic T lymphocyte)であり、ヘルパーT細胞(Th: helper T cells)の作製はまだ報告されていない。ただ従来のiPSC由来CTLについては抗原特異的な細胞傷害活性に加えて通常のT細胞が持たないNK活性も認められる。また異所的NK活性を持つ自然免疫系CTLの特徴として通常の獲得免疫系T細胞より低い増殖/生存能も確認されており、治療効果への負の影響が懸念されていた。従来のT細胞分化培養系ではデフォルトで自然免疫系へ分化していたため、本来の獲得免疫系への誘導を可能にするT細胞分化培養系の改変が必要であった。

また既製品iPSC-T細胞の汎用化のためには成熟後の拡大培養において高い増幅効率を実現する必要もある。なぜなら無限増殖能を付与するiPSC技術は確かにT細胞の大規模調製を可能にするが、iPSC段階の細胞数拡大ではその後のステップが全て膨大になるためコストはかえって増大するからである。さらに免疫療法の効用を最大化するには拡大培養系で細胞疲弊を回避し、ナイーブ形質を維持する工夫も必須である。以上の条件をクリアする拡大培養系はiPSC由来T細胞だけでなく、プライマリーT細胞の拡大培養においても実現できていなかった。

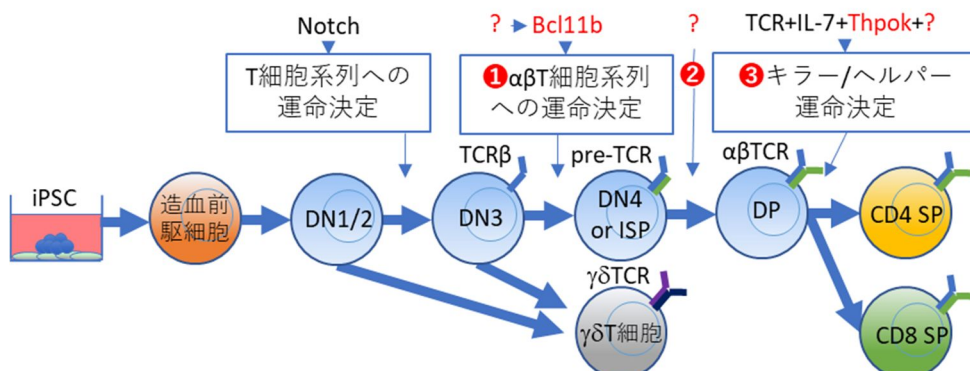
2. 研究の目的

本研究の目的は分化培養系において自然免疫系から本来の獲得免疫系の形質を付与することでiPSCから獲得免疫系CTLとヘルパーT細胞を作り分け、iPSC由来T細胞の増殖/生存能を改善することにある。またiPSC由来T細胞の拡大培養系においてナイーブ形質を維持しながら増殖効率を改善することも目指している。これらは全て棚卸方式の免疫療法 大量のiPSC由来T細胞を予めストックしておき、需要に応じてT細胞製品を安価に迅速に患者に届けて他家移植する免疫療法 のための必須条件である。本研究では棚卸式免疫療法を可能にする水準のiPSC由来T細胞の分化培養法と拡大培養法、両方の確立を目指している。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* T前駆細胞分化培養系の最適化と機能因子の探索

CTLとThはiPSCから造血幹/前駆細胞に至る造血発生経路とそこから胸腺CD4/CD8 double-positive (DP) ステージに至るT前駆細胞分化経路を共有しており、その後TCRが認識するHLAのタイプによってCD4 single-positive (SP) ThまたはCD8 SP CTLに分岐する(図中 参照)。DPステージまでの分化は全てフィーダーフリー化されているため、本研究ではDP以降のフィーダーフリー化に特に注力した。またフィーダーフリー化が既に実現しているDPステージより前の段階においても、従来のフィーダーフリー培養系ではメインで産生される細胞が自然免疫様T細胞であるT細胞であるなど問題があった。目的のTCRを発現T細胞獲得のためにはT細胞系列への運命決定(図中 参照)とDPステージへの分化(図中 参照)をより強く誘導する必要がある。本研究ではそれぞれの分化段階で目的の方向に分化を誘導する生理活性物質や化合物の探索を行った。さらにT細胞コミットメントをより早い段階で直接的に検討するため、この過程で特異的に発現が誘導され、T細胞コミットメントを誘導するmaster regulatorとして知られている転写因子Bcl11bのレポーター細胞を作製し、調節因子の探索も行った。



(2) *In vitro* T細胞拡大培養系の最適化と機能因子の探索

まず *In vitro* における増殖効率を軸に、疲弊マーカーやナイーブマーカーの発現等を指標にして拡大培養系の最適化を行った。具体的には CD8 $\alpha\beta$, CD5 を NK 活性の低い獲得免疫系列のマーカーとして、CCR7, CD62L を増殖/生存能の高いナイーブ T 細胞のマーカーとして設定し、それぞれの発現を維持する生理活性物質やサプリを探索した。次いでマウスの担癌異種移植モデルにおいて調製した iPSC 由来 T 細胞の *in vivo* 増殖生存能力とエフェクター活性を調べ、T 細胞拡大培養系の妥当性をそのつど検討した。

4. 研究成果

本研究では最適化の結果 iPSC から CTL を作製する分化培養法と作製した CTL を高効率に増幅する拡大培養法をいずれも完全フィーダーフリー条件で実現した。具体的には T 細胞分化培養においては IL-7+IL-21 のサイトカイン添加が有効であり、拡大培養においては IL-7+IL-15+IL-12+IL-18 のサイトカイン添加が有効であることを見出した。また T 細胞分化培養においてレトロネクチン、CD3 抗体の至適濃度も見出した。これらの最適化により iPSC 由来 T 細胞の NK 活性や細胞疲弊は抑えられながら増殖/生存能は劇的に改善し、1 ディッシュの iPSC から棚卸式免疫療法が可能になる 10^{15} 個以上の T 細胞を獲得できるまでになった。iPSC からヘルパー T 細胞の分化についてはフィーダーありの条件では実現できているが、質の高いヘルパー T 細胞のフィーダーフリー条件での作製はまだ実現できていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河合洋平
2. 発表標題 iPSC-derived T cells exhibit superior effector functionality with rejuvenated phenotype compared to parental T-cell clone
3. 学会等名 血液疾患免疫療法学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河合洋平
2. 発表標題 iPSC-derived T cells exhibit superior effector function with rejuvenated phenotype compared to parental T-cell clone
3. 学会等名 免疫学会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 CD3陽性細胞の拡大培養方法	発明者 金子新、河合洋平、 有馬寿来留、葛西義 明、林哲、滝口麻衣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-151580	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 メモリーT細胞の増殖を亢進する方法	発明者 金子新、河合洋平、 高柳晋一郎、國里篤 志、中願寺風香、福	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-229478	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----