

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2022
課題番号：19K07712
研究課題名(和文) ゲノム編集をヒトとサル*iPS*細胞に用いたがんに対するT細胞製剤の新規作製法開発
研究課題名(英文) Development of a novel method for T-cell preparations targeting cancer using genome editing in human and monkey induced pluripotent stem cells
研究代表者
寺田 晃士 (TERADA, Koji)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70342722
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん抗原に特異的なT細胞受容体(TCR)を発現させた細胞傷害性T細胞が、がん治療に有効であることが確認されつつある。しかし、外来性にTCRを発現させたT細胞を用いた免疫療法をヒトに用いるには、安全性などまだ克服すべき点が存在する。本研究において、非ヒト霊長類であるカニクイザルがT細胞を用いた免疫療法研究のための動物モデルに適する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カニクイザルの腫瘍から得られた腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の細胞表面発現分子とT細胞受容体遺伝子を解析した。その結果、カニクイザルのTILはヒトのTILと共通の性質を有すること、外来性にTCRを発現させたT細胞を用いたがん免疫療法の前臨床研究においてカニクイザルが有用な動物モデルとなる可能性があることなどが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop effective adoptive cell transfer therapy using T cell receptor (TCR)-engineered T cells, it is critical to isolate tumor-reactive TCRs that have potent anti-tumor activity. Characterization of tumor reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from non-human primate tumors could improve anti-tumor activity of TCR-engineered T cells in preclinical research. In this study, we isolated TCR genes from TILs in a cynomolgus macaque model of tumor transplantation in which the tumors were infiltrated with CD8+ T cells and were eventually rejected. We identified multiple TCR pairs with high frequency. We showed that the recurrent TCRs exhibited cytotoxic activity to tumor cells *in vitro* and potent anti-tumor activity in mice transplanted with tumor cells. These results imply that this tumor transplantation macaque model recapitulates key features of human TILs and can serve as a platform toward pre-clinical studies of non-human primate tumor models.

研究分野：がん免疫

キーワード：T細胞受容体 T細胞 がん カニクイザル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性 T 細胞は、がん細胞が特異的に発現するがん抗原を T 細胞受容体で認識し、がん細胞を攻撃する。近年、がん抗原に特異的な T 細胞受容体を外来性に発現させた細胞傷害性 T 細胞ががん治療に有効であることが確認されつつある。実際に、摘出した腫瘍から、浸潤していた T 細胞 (TIL) を分離し、個々の TIL から T 細胞受容体遺伝子を単離して、その中から腫瘍に発現するタンパク質を認識する T 細胞受容体の遺伝子を同定して T 細胞に導入する試みが行われている。その一方で、T 細胞を用いた免疫療法には、安全性など克服すべき点が存在する。安全性の検証に用いる動物モデルとしてマウスなどの齧歯類では、既に実施されているヒトの免疫療法において観察される副作用が再現されない場合があることが知られており、ヒトと近縁種の動物モデルがより適すると考えられる。動物モデルに用いるには、その動物から腫瘍を認識する T 細胞受容体を得て T 細胞に導入することなどが必要であるが、非ヒト霊長類の TIL から、ヒトの場合と同様な方法を用いて腫瘍を認識する T 細胞受容体をもつものを同定できるかなどについては不明である。そのため、非ヒト霊長類の TIL から腫瘍を認識する T 細胞受容体を得る系を構築する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

免疫療法の安全性試験のための動物モデルとしてヒトに近縁の非ヒト霊長類が適すると考えられ、カニクイザルが動物モデルに適するか検討することを計画した。そのために、まず、カニクイザルの TIL がヒトの TIL と同様の性質を有するか、発現する分子を指標に調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトでは、TIL の中で PD-1 陽性集団中に、腫瘍を認識する細胞傷害性 T 細胞が高確率で存在することが示されている。カニクイザルではどうか調べるため、以下のことを行った。カニクイザル由来 iPS 細胞から人工的に作製したがん細胞を移植されたカニクイザルから、腫瘍を形成後に摘出し、腫瘍に浸潤していた T 細胞 (TIL) のうち PD-1 陽性細胞をセルソーターで 1 細胞ずつ分取し、シングルセル RT-PCR 法により、T 細胞受容体遺伝子を α 鎖遺伝子および β 鎖遺伝子のセットで単離した。単離した T 細胞受容体遺伝子の配列を細胞ごとに比較し、同一配列の T 細胞受容体遺伝子を、 α 鎖遺伝子と β 鎖遺伝子のセットでもつ細胞が複数個存在するか解析した。

(2) 複数の細胞で認められた T 細胞受容体遺伝子セットをレトロウイルスベクターに組込んだ。

(3) レトロウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞から分化誘導により作製された T 細胞に、カニクイザル TIL 由来の T 細胞受容体遺伝子を外来性に発現させた。その T 細胞がカニクイザルに移植されたものと同じがん細胞株を認識するか、共培養を行い、T 細胞における CD107a およびインターフェロン γ の発現を指標に検討した。

(4) 上記 (3) と同様の共培養実験を行い、TIL 由来の T 細胞受容体遺伝子を外来性に発現させた T 細胞が、カニクイザルに移植されたものと同じがん細胞株を殺傷するか検討した。

(5) TIL 由来の T 細胞受容体を発現させた T 細胞が個体中において抗腫瘍効果を示すか確認した。NSG 免疫不全マウスに、カニクイザルに移植したものと同一がん細胞株を移植して、腫瘍化した後に、TIL 由来の T 細胞受容体発現 T 細胞を移入し、腫瘍の成長およびマウスの生存率を継続的に解析した。

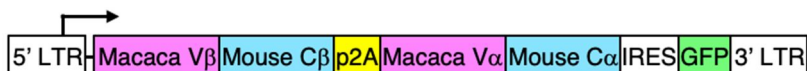
4. 研究成果

(1) PD-1 陽性の 108 個の TIL から T 細胞受容体の α 鎖遺伝子、 β 鎖遺伝子をセットで単離することに成功した。また、複数の TIL において同一の T 細胞受容体遺伝子が確認された。

	TCR pair	Cell No. (Frequency)	V α	CDR3	V β	CDR3
108 個の T 細胞から T 細胞受容体遺伝子を α 鎖遺伝子と β 鎖遺伝子のセットで単離した。その中から、5A9、5B1 と名付けられたクローンは、108 個のうち 5 個の T 細胞で共通であった。	5A9	5 (4.6%)	TRAV23	AAVSAGGAQKLV	TRBV7-2*01	ASRPGGYDYT
	5B1		TRAV13-1*01	AASIEGGGNKLT	TRBV21-1*01	ASSKGGPQTYDYT
	4C2	4 (3.7%)	TRAV36	AVLNSGNRALV	TRBV2*01	ASSELRNTEAF
	4D3		TRAV27*01	AGAGGAGYGKL	TRBV5-6*01	ASSLVRGLSDPQY
	3E5	3 (2.8%)	TRAV8-4*01	AVNDRDNNARVI	TRBV2*01	ASSEAGTPLGETQY
	3F1		TRAV25*01	AGEAYNNYKLS	TRBV5-6*01	ASSLAYRETYQPQY
	1B9	1 (0.9%)	TRAV23	AASEASSNTGKLI	TRBV5-1*01	ASSIRDRGEDPQY
	1D4		TRAV26-1*02	IVRPPDTGRRALT	TRBV2*01	ASSDLNQPQY
	1G9		TRAV12-2*02	AVYPDSGNQLT	TRBV6-1*01	ASSETGQDETQ
	Total 108 cells					

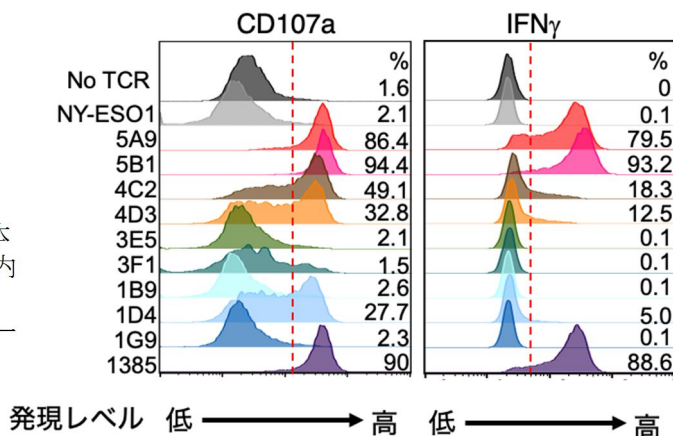
(2) T 細胞受容体遺伝子の α 鎖遺伝子と β 鎖遺伝子の両方に関して、可変領域 (V) はカニクイザル

ル TIL の遺伝子、定常領域 (C) にはマウスの遺伝子を用いたキメラ遺伝子を作製。α鎖遺伝子と β鎖遺伝子は p2A ペプチド遺伝子を挟んで連結した。



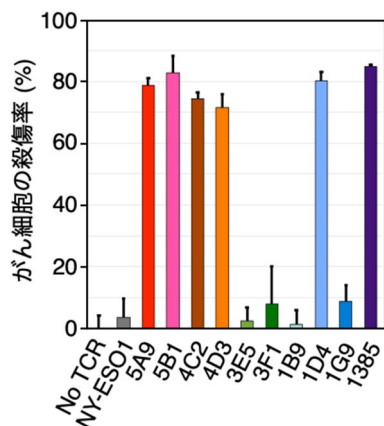
(3) TIL の T 細胞受容体遺伝子を発現させた T 細胞を、カニクイザルに移植したものと同じがん細胞株と共培養した。その結果、108 個の T 細胞から 5 個 (5A9、5B1) や 4 個 (4C2、4D3) など複数の TIL で認められた T 細胞受容体を発現させた T 細胞で、CD107a およびインターフェロン γ の発現が認められた。そのことから、複数の TIL が共通に有する T 細胞受容体はがん細胞を認識すると考えられた。それらの TIL は、腫瘍に反応してクローナルに増殖したものである可能性が考えられる。1385_ (T 細胞受容体) TCR は、がん細胞を頻回移植した個体の末梢血液中の T 細胞から単離した T 細胞受容体で、5A9 や 5B1 の T 細胞受容体と同様にがん細胞を強く認識した。

T 細胞とがん細胞株を 6 時間共培養した後、蛍光標識された、CD107a あるいはインターフェロン γ (IFN γ) に対する特異的な抗体で処理し、フローサイトメーターで蛍光強度を指標に発現を評価した。T 細胞受容体が抗原による刺激を受けると、細胞内小胞に局在していた CD107a 分子が細胞膜上に露出する。また、インターフェロン γ (IFN γ) も遺伝子発現が誘導される。



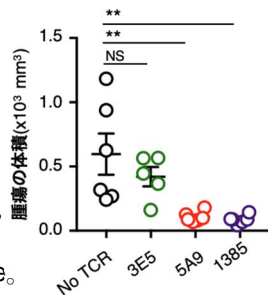
(4) CD107a や IFN γ の発現と同様に、複数の TIL で認められた T 細胞受容体および 1385_TCR を導入した T 細胞で、がん細胞の殺傷が強く認められた。

カニクイザルに移植したものと同じがん細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入した。T 細胞とがん細胞株を 20 時間共培養した後、ルシフェラーゼの基質と反応させ、蛍光強度を指標にがん細胞の生存率を評価し、それに基づき T 細胞によるがん細胞の殺傷率を算出した。CD107a や IFN γ の発現をほとんど誘発しなかった 1D4 (108 個中 1 個の T 細胞でのみ認められた T 細胞受容体) はがん細胞を殺傷した。他の 1 個の T 細胞でのみ認められた T 細胞受容体 (1B9 および 1G9) を発現させた T 細胞ではがん細胞の殺傷は認められなかった。



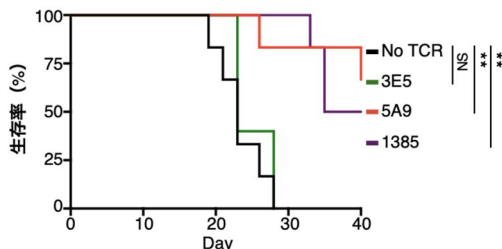
(5) カニクイザル iPS 細胞由来がん細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して腫瘍形成させ、そのマウスに再生 T 細胞を静脈注射した。その結果、共培養の実験でカニクイザルがん細胞を殺傷することが確認された T 細胞受容体を発現させた T 細胞を移入すると、腫瘍の増殖の抑制および、マウスの生存期間の延長が観察された。このことから、TIL より単離された T 細胞受容体には、生体内で腫瘍を抑制する効果をもつものが存在することが示された。

がん細胞の移植から 5 日目に各 T 細胞受容体を導入した、あるいは導入していない T 細胞を移入。T 細胞移入から 11 日に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を算出した (左)。



**は $p < 0.01$ (two-way ANOVA), NS は NO significance.

また、腫瘍を移植後のマウスの



生存率を Log-rank test により評価 (右)。**は $p < 0.01$, NS は NO significance.

以上のことなどから、PD-1 陽性の TIL はカニクイザルとヒトで類似した性質をもち、カニクイザルは免疫療法研究の動物モデルとして適する可能性があること、人工的に作製した T 細胞が、がん細胞を認識する T 細胞受容体の選別に有効であることなどが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terada Koji, Kondo Kenta, Ishigaki Hirohito, Nagashima Ayaka, Satooka Hiroki, Nagano Seiji, Masuda Kyoko, Kawamura Teruhisa, Hirata Takako, Ogasawara Kazumasa, Itoh Yasushi, Kawamoto Hiroshi, Agata Yasutoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating and circulating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 77 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2021.12.003	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 Maeda Takuya, Nagano Seiji, Kashima Soki, Terada Koji, Agata Yasutoshi, Ichise Hiroshi, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Fujiki Fumihiro, Sugiyama Haruo, Kitawaki Toshio, Kadowaki Norimitsu, Takaori-Kondo Akifumi, Masuda Kyoko, Kawamoto Hiroshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Regeneration of Tumor-Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes from iPSCs Transduced with Exogenous TCR Genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 250 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.09.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satooka Hiroki, Ishigaki Hirohito, Todo Kagefumi, Terada Koji, Agata Yasutoshi, Itoh Yasushi, Ogasawara Kazumasa, Hirata Takako	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of tumour-infiltrating lymphocytes in a tumour rejection cynomolgus macaque model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65488-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashima Soki, Maeda Takuya, Masuda Kyoko, Nagano Seiji, Inoue Takamitsu, Takeda Masashi, Kono Yuka, Kobayashi Takashi, Saito Shigeyoshi, Higuchi Takahiro, Ichise Hiroshi, Kobayashi Yuka, Iwaisako Keiko, Terada Koji, Agata Yasutoshi et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100998 ~ 100998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Masayuki, Tomimatsu Kosuke, Terada Koji, Kondo Kenta, Miyazaki Kazuko, Miyazaki Masaki, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Yoshida Tetsuya, Kageyama Susumu, Kawamoto Hiroshi, Kawauchi Akihiro, Agata Yasutoshi	4. 巻 526
2. 論文標題 Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 128 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Karki Sarita, Terada Koji, Mazaki Yuichi, Miwa Soichi	4. 巻 140
2. 論文標題 Ca ²⁺ signal is involved in endothelin-1-induced internalization of endothelin type A receptor expressed in Chinese hamster ovary cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 102 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寺田晃士, 永野誠治, 近藤健太, 増田喬子, 河本宏, 縣保年
2. 発表標題 “ TCRカセット法 “ の開発 : がん抗原特異的TCR遺伝子を内在性TCR遺伝子座へ効率よく導入する
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野誠治, 寺田晃士, 縣保年, 河本宏
2. 発表標題 TCR遺伝子導入iPS細胞からCTLを再生するための新規の方法 : TCRカセット法の開発
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤健太, 寺田晃士, 石垣宏仁, 長嶋彩花, 里岡大樹, 永野誠治, 増田喬子, 川村晃久, 平田多佳子, 小笠原一誠, 伊藤靖, 河本宏、縣保年
2. 発表標題 カニクイザルの腫瘍浸潤T細胞から腫瘍殺傷能をもつTCR遺伝子を単離する
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Terada, Kenta Kondo, Hirohito Ishigaki, Ayaka Nagashima, Hiroki Satooka, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Teruhisa Kawamura, Takako Hirata, Kazumasa Ogasawara, Yasushi Itoh, Hiroshi Kawamoto and Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Terada, Kenta Kondo, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto and Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Development of “TCR cassette method”: Regeneration of CTLs from iPSCs in which tumor-antigen specific TCR genes can be efficiently introduced into the endogenous TCR locus by cassette
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Kondo, Tatsuya Hasegawa, Koji Terada, Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Vitamin C alters gene expression of CD8+ T cells through DNA demethylation
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidetoshi Sumimoto, Koji Terada, Yasutoshi Agata and Yataro Daigo
2. 発表標題 Development of adaptive immunotherapy using neoantigen (NeoAg)-specific T cell receptor (TCR)-gene transduced T cells
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田晃士、近藤健太、永野誠治、前田卓也、増田喬子、河本宏、縣保年
2. 発表標題 ゲノム編集とカセット交換法を用いたがん抗原特異的TCR遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 第24回がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 カニクイザルの腫瘍浸潤T細胞から腫瘍殺傷能を有するTCR遺伝子を単離する
2. 発表標題 近藤健太、寺田晃士、石垣宏仁、里岡大樹、永野誠治、増田喬子、平田多佳子、小笠原一誠、伊藤靖、河本宏、縣保年
3. 学会等名 第24回がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田晃士、近藤健太、永野誠治、増田喬子、河本宏、縣保年
2. 発表標題 "TCRカセット法"の開発：がん抗原特異的TCR遺伝子を内在性TCR遺伝子座へ効率よく導入できるiPS細胞から細胞傷害性T細胞を再生する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田晃士、石垣宏仁、近藤健太、長嶋彩花、里岡大樹、永野誠治、増田喬子、川村晃久、河本宏、平田多佳子、小笠原一誠、伊藤靖、縣保年
2. 発表標題 カニクイザルの腫瘍拒絶モデルにおける腫瘍浸潤T細胞からの腫瘍殺傷能をもつTCR遺伝子の単離
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Terada, Ryohei Kondo, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto and Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Development of an efficient method to introduce TCR genes into the endogenous TCR locus by genome editing and cassette exchange
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Nagano, Koji Terada, Ryohei Kondo, Yasutoshi Agata, Kyoko Masuda and Hiroshi Kawamoto
2. 発表標題 Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

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

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