

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22840

研究課題名（和文）癌モデルザルの作製とiPS細胞由来の再生T細胞を用いた新規癌免疫療法の開発

研究課題名（英文）Generation of cancer model monkeys and development of novel cancer immunotherapy using regenerated T cells derived from iPS cells

研究代表者

近藤 健太（Kondo, Kenta）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60779974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトへの外挿性が高い非ヒト霊長類のがんモデルを作出するために、p53を阻害する優性変異体p53CT、Rb経路を阻害するCDK4、活性化型KRAS（G12V）、テロメラーゼ逆転写酵素TERTの4つのがん関連遺伝子を薬剤誘導性に発現するカニクイザルの作製を行い、当該遺伝子が導入された産仔を得ることに成功した。さらに、サルに腫瘍細胞を移植し、腫瘍に浸潤したT細胞からTCR遺伝子を単離し、iPS細胞から再生したT細胞に導入したところ、出現頻度の高いTCRが腫瘍細胞を殺傷できることを明らかにし、この成果を報告した（Mol Ther Oncolytics. 2021）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法の前臨床試験において、マウスで得られた知見がヒトに外挿できない例が知られている。そのためヒトへの外挿性が高い霊長類を用いたがん研究が必要不可欠である。本研究で作製された遺伝子導入サルで薬剤誘導性に腫瘍が形成されれば、世界初の非ヒト霊長類のがんモデルとなり、霊長類を用いたがん免疫療法の前臨床試験が可能になる

研究成果の概要（英文）：To create a non-human primate cancer model, we tried to generate monkeys that express four cancer-related genes in a drug-inducible manner: p53CT, a dominant mutant that inhibits p53; CDK4, which inhibits the Rb pathway; activated KRAS (G12V); and telomerase reverse transcriptase TERT. We succeeded in obtaining the transgenic non-human primate. In addition, we isolated TCR genes from T cells infiltrated in tumor cells transplanted from monkeys and introduced them into regenerated T cells from iPS cells. We found that these TCR-transduced regenerated T cells kill the tumor cells.

研究分野：免疫学

キーワード：カニクイザル 癌免疫療法 iPS細胞 再生T細胞 TCR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

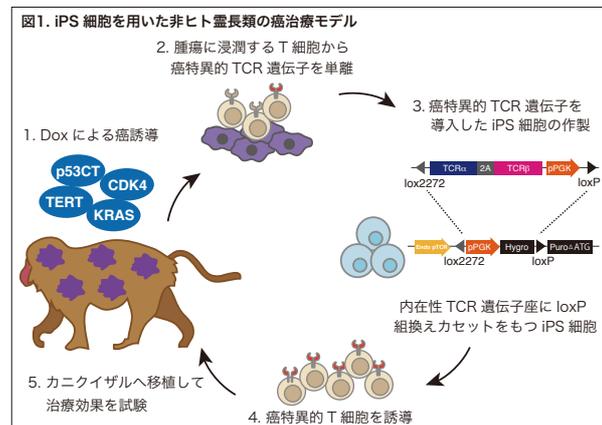
1. 研究開始当初の背景

癌の発生は多段階的であり、そのプロセスに関わる遺伝子変異は動物種により異なる。マウスの細胞は単一の癌遺伝子変異と癌抑制遺伝子の欠失によって癌化が誘導できるのに対して、ヒトの腫瘍形成には少なくとも4つの遺伝子変異が必要である。さらに癌に対する薬剤や免疫細胞療法などの前臨床試験には動物モデルが必要であるが、マウスで得られた知見がヒトに外挿できない例が知られている (Evol Med Public Health 1:170, 2016)。そのため非ヒト霊長類を用いた癌研究の推進が必須であるが、非ヒト霊長類の癌モデル動物はまだ例がない。

一方、従来の癌免疫療法では、患者自身の癌特異的なT細胞を体外で増やして患者に戻すという方法が主流であったが、T細胞が増殖しづらいことや疲弊して活性を失うという問題があった。そこで京都大学の河本らは、癌抗原特異的なT細胞からiPS細胞を作製し(T-iPS細胞)、大量培養したのちにT細胞(再生T細胞)へ分化誘導する方法を確立した(Cell Stem Cell 12:31, 2013)。再生T細胞の治療効果を調べるには、免疫不全マウスが用いられるが、複雑な免疫機構を掻い潜って形成された腫瘍に対し、免疫不全マウスを用いた人工的な系がどれだけ実際の病態を反映するかは不明である。そのため免疫システム存在下で再生T細胞の効果を検討できる動物モデルが求められている。

2. 研究の目的

本研究では、**4つの癌誘導遺伝子を発現するトランスジェニック(Tg)カニクイザル**を作出し、**世界初の霊長類の癌モデル動物を開発することを目的とする**。さらにTgザルで発生した腫瘍に浸潤するT細胞からTCR α/β 鎖の遺伝子を単離し、高頻度に出現したTCR遺伝子をMHCホモザル由来iPS細胞の内在性TCR β 遺伝子座にカセット交換法によりノックインした後、T細胞に分化誘導させる。さらに得られた再生T細胞をTgザルに移植し、安全性と治療効果を検討可能な癌免疫療法モデルを確立するために必要な実験系の構築を目的とする(図1)。

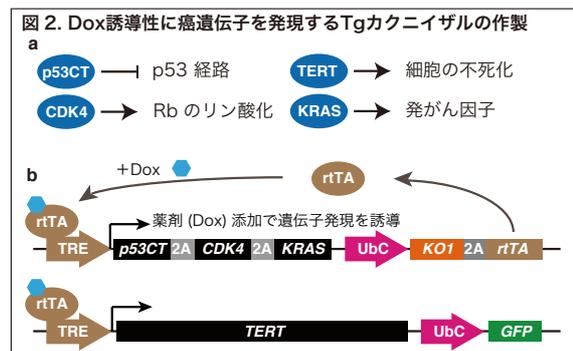


3. 研究の方法

1. 癌遺伝子を誘導性に発現する Tg カニクイザルを用いた霊長類癌モデルの確立

腫瘍形成に必要な① p53 を阻害する優性変異体 p53CT、② Rb 経路を阻害する CDK4、③ 活性化型 KRAS (G12V)、④ テロメラーゼ逆転写酵素 TERT の変異遺伝子を Dox 誘導性に発現可能なレンチウイルス(図2)をカニクイザルの卵に感染させた後、MHCホモザル由来の精子を用いて顕微授精を行い、遺伝子導入された胚を仮親へ移植して、Tgカニクイザルの作製を試みた。

さらに、遺伝子導入した癌遺伝子の発現効率を改善するために、トランスジーンのコピー数を増やすことを試みた。具体的には、ウイルスを用いずに Transposase により積極的にゲノム DNA へ遺伝子を挿入できる piggyBac Transposon ベクターを構築した。作製した piggyBac Transposon ベクターをサルの上胚嚢に導入してマーカー遺伝子の蛍光タンパク質が発現するのかが確認した。



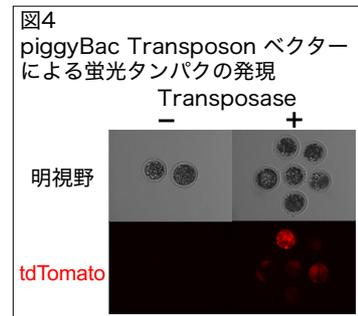
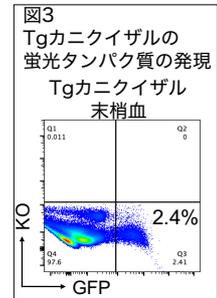
2. カニクイザルの腫瘍浸潤 T 細胞から単離した T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の機能評価

MHC ホモサル由来の腫瘍細胞 (PTY 細胞) を MHC ヘテロサルに移植し、腫瘍組織に浸潤した T 細胞から TCR 遺伝子を単離した。さらに当該 TCR 遺伝子を iPS 細胞から再生した T 細胞に遺伝子導入し、PTY 細胞に対する細胞傷害活性を有しているのかを検討した。

4. 研究成果

1. 癌遺伝子を誘導性に発現する Tg カニクイザルを用いた霊長類癌モデルの確立

申請者らは、レンチウイルスを用いて 4 つの癌関連遺伝子をカニクイザルの卵に遺伝子導入させた後、MHC ホモサル由来の精子を用いて顕微授精を行い、遺伝子導入された胚を仮親へ移植した。得られた仔ザルのゲノム DNA には、4 つの癌関連遺伝子が挿入されていた。Tg カニクイザルは、マーカー遺伝子として GFP とクラビラオレンジ (KO) を導入している (図 2)。そのため、フローサイトメトリーを用いて GFP と KO の発現を確認すると、GFP の発現は確認していたが、クラビラオレンジ (KO) は発現していなかった (図 3)。クラビラオレンジが発現していない理由として、挿入されたトランスジーンのコピー数が少ないことが考えられた。そこでトランスジーンのコピー数を増やすため受精卵に遺伝子導入する方法の改善を試みた。具体的には、ウイルスを用いずに Transposase により積極的にゲノム DNA へ遺伝子を挿入できる piggyBac Transposon ベクターを構築した。作製した piggyBac Transposon ベクターをサルの受精卵に導入すると蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現した (図 4)。現在は、構築した piggyBac Transposon ベクターのシステムを用いて 4 つの癌関連遺伝子を遺伝子導入した Tg カニクイザルの作出を試みている。



2. カニクイザルの腫瘍浸潤 T 細胞から単離した T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の機能評価

作出した Tg カニクイザルで発生した腫瘍に浸潤する T 細胞から TCR 遺伝子を単離し、機能評価できる実験系を構築するため、腫瘍をカニクイザルに移植する系を用いた。先行研究により MHC ホモサル由来の腫瘍細胞 (PTY 細胞) を MHC ヘテロサルに移植すると、腫瘍細胞が生着した後、腫瘍組織に T 細胞が浸潤して腫瘍細胞が拒絶されることが確認されている。この実験系を用いて腫瘍組織に浸潤した T 細胞や、腫瘍細胞を繰り返し移植することで迅速に腫瘍細胞を拒絶する MHC ヘテロサルの末梢血中 T 細胞からシングルセルレベルで TCR α 鎖と β 鎖の遺伝子をセットで単離した。その中から出現頻度の高い TCR 遺伝子セットを選択し、iPS 細胞から再生した T 細胞に遺伝子導入したところ、腫瘍細胞を殺傷できる TCR 遺伝子を同定することに成功した (図 5)。さらに免疫不全マウスに腫瘍細胞を移植した後、TCR 遺伝子を導入した再生 T 細胞を移植すると、腫瘍の増殖が抑制され、マウスの生存期間が延長した (図 6)。このことから、TCR 遺伝

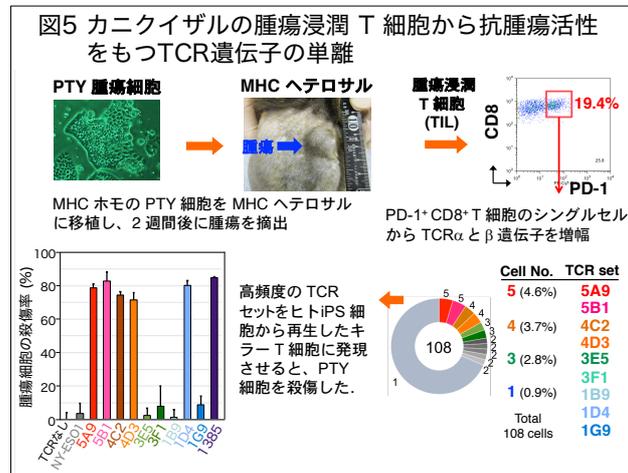
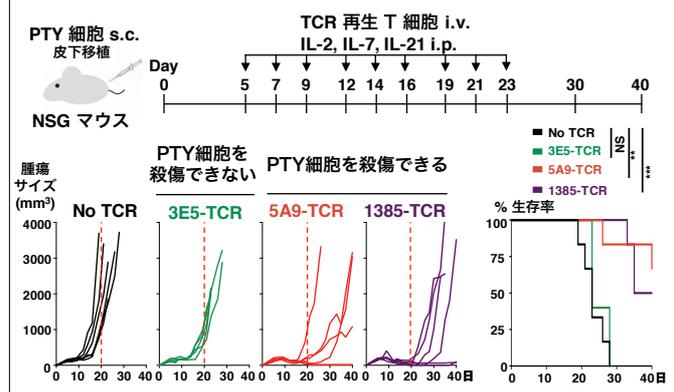


図6 TCR 導入再生 T 細胞は *in vivo* で抗腫瘍活性を示す



子を導入した再生 T 細胞が、生体内でも抗腫瘍活性を示すことがわかった。これらの成果を取りまとめ、論文発表した (Terada K and Kondo K et al. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 24:77-86, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 無
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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 健太、長谷川 達矢、寺田 晃士、口分田 美奈、新田 信人、縣 保年
2. 発表標題 ビタミンCによるCD8 T細胞（キラーT細胞）の機能制御機構の解明
3. 学会等名 第165回ビタミンC研究委員会（招待講演）
4. 発表年 2022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 Koji Terada, Kenta Kondo, Hirohito Ishigaki, Ayaka Nagashima, Hiroki Satooka, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Teruhisa Kawamura, Takako Hirata, Kazumasa Ogasawara, Yasushi Itoh, Hiroshi Kawamoto, 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, O 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 exchange.
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 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 第30回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2021年

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 第30回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2021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 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回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田晃士、近藤健太、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
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有するTCR遺伝子を単離する
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------