

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860324

研究課題名(和文) iPS細胞技術を用いた疾患関連抗原特異的T細胞の拡大培養法の開発

研究課題名(英文) Development of in vitro culture to generate disease-related-antigen-reactive cytotoxic T lymphocytes using iPSC technology

研究代表者

河合 洋平 (Kawai, Yohei)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：90623364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍や慢性難治性感染症の制圧には疾患関連抗原特異的な細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte; CTL)を用いた細胞免疫療法が有効な可能性があるが、従来の手法では細胞疲弊が不可避であり十分量のCTLを調製することが極めて困難であった。そこで本研究では人工多能性幹細胞(iPSC)技術を用いた画期的なCTL再生法を確立し、オリジナルCTLと同等の細胞傷害活性を持つ再生CTLをin vitro培養系ではほぼ無限に作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) is highly promising against cancer and chronic infection, however in conventional protocol of CTL preparation, cell exhaustion is inevitable and critically hampers production of sufficient number of CTLs. Thus we developed novel iPSC-technology-based system to regenerate CTLs in cost- and labor-effective manner and successfully produced CTLs, whose cytotoxic activity was equivalent to that of original cells.

研究分野：免疫学

キーワード：iPS細胞 CTL

## 1. 研究開始当初の背景

(1)悪性腫瘍や慢性難治感染症の制圧には、疾患関連抗原に特異的なT細胞を用いた細胞療法が極めて有効な可能性がある。現状では、腫瘍浸潤T細胞の拡大培養やナイーブT細胞への抗原特異的 TCR 遺伝子導入などが試みられているが *In vitro* における拡大培養はナイーブ/メモリーT細胞の細胞老化を誘導し、免疫活性を著しく低下させる、外来性 TCR の導入は内在性 TCR との mis-pairing を起こし、avidity の低下や非標的抗原に反応する TCR の誤誘導を招く、ソースの T細胞が特定の極性に分化している場合、有効な T細胞種への転換が困難である、等の問題を抱えている。

(2)我々の研究室ではヒト末梢血 cytotoxic T lymphocyte (CTL)から iPS 細胞 (T-iPSC) を誘導することに成功し、またその T-iPSC を *in vitro* で再分化させて iPS 細胞由来 CTL (iPSC-CTL) を得ることに成功した (Cell Stem Cell 12: 114-126, 2013)。この手法により細胞老化を誘導することなく CTL を効率的に無尽蔵に調製できる可能性が出てきたのである。また本法で再分化した CTL は元の末梢血 CTL クローンの TCR 配列を保持しており、新たな TCR の導入は不要である。そして T-iPSC まで幼若化させることにより、治療効果が期待できる遺伝的改変や免疫極性の調節がより容易になると考えられる。

(3)iPSC 技術を応用した画期的な CTL 調製法が現実味を帯びつつある一方、臨床応用のためには T細胞系列への高い分化能を持つ T-iPSC 樹立法の確立 高反応性 CTL を効率的に再分化させる培養系の確立、動物由来成分の培養系からの除去、膨大な数のフィーダーを必要とする現状の拡大培養系のフィーダーフリー化等が必須である。中でもについては現状の方法で作製した iPSC-CTL

は一細胞あたりの機能性でオリジナル CTL に劣っていることが確認されている。これは臨床結果の直結する問題であり、改善の余地も大きい。また免疫療法の効果を最大化するためには輸注する CTL の成熟後のステージも重要である。過去の報告にから過度に分化したエフェクター細胞より分化の進行が浅く、増殖能を適度に保持したナイーブ/セントラルメモリー細胞の方がより強い抗腫瘍活性を持つ事が知られている。iPS 技術を用いた幼若化プロセスはナイーブ/セントラルメモリー細胞の作製を可能にするため、これらの細胞への適切な再分化法、そしてその形質を維持する拡大培養系の確立が待たれている

## 2. 研究目的

本研究では再分化過程、中でも CTL の最終成熟過程にあたる CD4/CD8 double-positive (DP)ステージから CD8 single-positive (SP)ステージへの分化過程に焦点をあてて培養系の再構築を行い、臨床応用に向けてフィーダーフリー化や iPSC-CTL の特性最適化を試みた。

## 3. 研究の方法

HIV 特異的な CTL から iPSC を作製した後、T細胞系列へ誘導して DP ステージまで再分化させ、その後のステップにおいて最適化を行った。新たに作製した iPSC-CTL は on-feeder または feeder-free 拡大培養系で細胞数を確保し、オリジナルの HIV 特異的 CTL との機能比較やマウスを使った *in vivo* アッセイなどを行った。

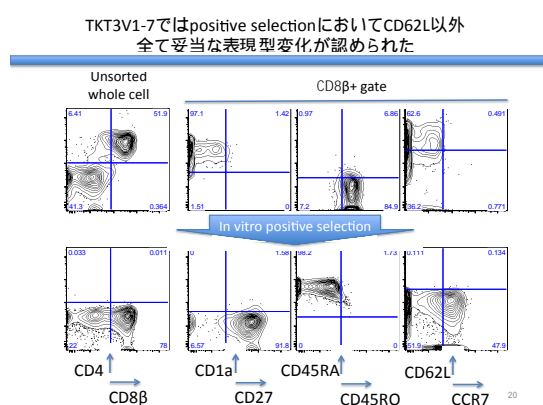
## 4. 研究成果

(1)本研究ではまず従来の iPSC-CTL で認められる抗原刺激に対する低反応性の原因を検討した。その結果 iPSC-CTL ではオリジナル細胞では見られない以下に示す自然免疫

系リンパ球様の特性が確認された 抗原依存的な細胞傷害活性に加えて抗原非依存的なナチュラルキラー（NK）活性を示す CD56 や NKG2D といった NK 細胞関連分子を発現している、 Co-receptor である CD8 が通常の CTL が発現する CD8 ヘテロダイマーではなく、CD8 ホモダイマーである、 活性化マーカーである CD69 を恒常的に発現している等である。自然免疫系リンパ球の代表格である NK 細胞と獲得免疫系リンパ球の T 細胞の間には T 細胞、NKT, Intra-epithelial lymphocyte (IEL) など中間的な形質を持つ innate-like T 細胞の存在が知られており、iPSC-CTL はこれらに該当するものと考えられる。臨床結果に影響を与え得る Innate-like T 細胞の長所、短所は以下の通りである。長所 恒常的活性化状態にあるためターゲットに対して迅速に対応できる NK 活性によって癌免疫療法で最も重要な問題である escape variant に対応し得る、短所 抗原依存的反応の強度は獲得免疫系リンパ球に劣る メモリー細胞形成能が低い ため長期的な防御能力で獲得免疫系リンパ球に劣る 抗原レセプターTCR の補助レセプターである CD8 が CD8 ホモダイマーであるため抗原認識能が本来的に低い 意図しないNK 活性が Graft-versus-host disease (GVHD) を引き起こす可能性がある。以上のように iPSC-CTL の自然免疫系の形質には一長一短があるが、重要なポイントは自然免疫系リンパ球の長所は獲得免疫系細胞からも誘導できる一方、その短所の修正は容易でないことである。

(2)以上の理由から我々は分化系を自然免疫系から獲得免疫系へ転換するため、DP ステージから CD8SP ステージに移行する最終分化過程で培養系の再構築を行った。従来法では DP 細胞を mitogenic lectin である PHA で強力な刺激を入れていたが、改良法ではよ

りマイルドな抗 TCR 抗体刺激に切り替えた。また添加するサイトカインは自然免疫系への分化を促進する IL-15 の添加をやめ、代わりにサイトカイン X を添加して NK マーカーである CD56, CD161 を発現しない CD8 + iPSC-CTL の作製に成功した。またこの細胞は抗腫瘍活性が高いナイーブフェノタイプ (CCR7+CD45RA+CD45RO-) を示す事も明らかとなった。他に CD1a, CD27 など DP ステージから CD8 SP ステージ変化するマーカーも生理的なものと同様の変化を示した (Fig. 1)。

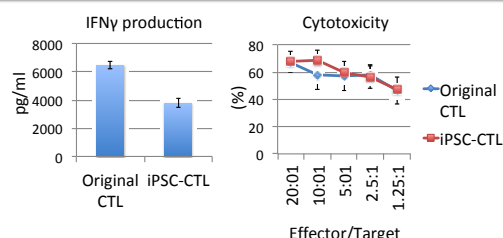


(3)改良版 iPSC-CTL は CD8 を安定的に発現するようになったこともあり、抗原パルスしたターゲットに対して従来版 iPSC-CTL 調べた全てのエフェクター機能においてより強力な反応を示すようになった。抗原依存的な増殖、サイトカイン産生、細胞傷害活性は改良版 iPSC-CTL で全て改善した。また自然免疫系リンパ球の最も顕著な表現型である NK 活性は改良版 iPSC-CTL において完全に消失した。

(4)本研究では成熟培養法でなく拡大培養法の最適化も行い、同時にフィーダーフリー化も検討した。種々のサプリメントを改変し、IL-7, IL-15 の存在下でさらにサイトカイン X を加えることにより、我々はフィーダーフリー条件で iPSC-CTL を 10 の 10 乗以上拡大することに成功した。臨床応用でも想定

されるこの拡大培養を行った後オリジナル CTL と機能比較したところ、サイトカイン産生能はオリジナル CTL に劣っているものの細胞傷害活性では同等であることを確認した(Fig. 2)。

CD8 $\beta$ + iPSC-CTLs exhibited equivalent cytotoxic activity and a little less IFN $\gamma$  production compared to the original CTLs



Feeder-free-expanded iPSC-CTLs could take the place of ex vivo CTLs not only in quantity but also quality

(5)現在進行中ではあるが免疫不全マウスに臍帯血を輸注したヒト化マウスにおいて輸注した iPSC-CTL の動態を調べたところ、iPSC-CTL はリンパ球除去の前処置なしでもマウス体内で一週間生存し、発現するケモカインレセプターCXCR3 などの働きにより炎症局所への集積も可能である事が明らかとなった。

(6)本研究は in vitro の培養系においてナイーブフェノタイプを持つ CTL を作製した初めての報告である。ナイーブフェノタイプはターゲットがない場合は深い静止期に入って次の侵入に備える獲得免疫系リンパ球の象徴的な形質と言えるが、分化経路を自然免疫系から転換することにより今回初めて実現できたと考えている。今後の細胞免疫療法においては CTL だけでなく CTL の機能をサポートするヘルパー T 細胞の作製、活用も重要となる可能性が高い。本研究におけるナイーブ CTL 作製の知見はヘルパー T 細胞の作製にも活かせると考えている。また本研究で確立した CTL 培養系はヒト T 細胞系列の分化解析や薬剤スクリーニングにも有用である。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)Kyoto-T cell conference, Kyoto

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合 洋平 (KAWAI Yohei)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90623364