

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 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：26860728

研究課題名(和文) iPS細胞技術を用いて再生した抗原特異的T細胞の安全性と有効性の検証

研究課題名(英文) Validation of safety and efficacy of regenerated antigen-specific T lymphocyte using iPS cell technology

研究代表者

増田 喬子 (Masuda, Kyoko)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：40565777

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)：ヒト抗原特異的細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte; CTL)からiPS細胞を樹立し、そのiPS細胞から再生したCTLの有効性と安全性をより成体に近い条件で検証することを目的とした。複数の抗原において、より高品質なCTLの誘導に成功し、それらのin vitroにおける細胞傷害活性は、元のT細胞と同等であった。また、in vivoにおいてWT-1抗原陽性白血病株を重度免疫不全マウスに移植し、再生WT-1抗原特異的T細胞投与による治療を試みたところ、延命効果が示された。また治癒したマウスを長期飼育した結果、投与した再生T細胞が腫瘍化する現象は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：All cytotoxic T Lymphocytes (CTL) induced from antigen specific CTL derived induced pluripotent stem cells (T-iPSCs) are expected to express same T cell receptor of original CTL. The goal of our project is to apply this method to the clinical setting. To this end, the present study aimed to examine the efficacy and safety of regenerated CTL from T-iPSCs in vivo. Firstly, we established LMP2- and WT1-specific T-iPSCs and regenerated CTL from these T-iPSCs. We have succeeded in inducing conventional type of CTL. The cytotoxic activity of this produced CTL was found to be at the same level as original CTL. To examine the efficacy of cytotoxicity of regenerated CTL against tumor cells in vivo, severely immunocompromised mice carrying human leukemia cell lines were treated with regenerated CTL. The CTL-treated mice showed a significantly longer survival compared with control mice. Transferred CTL didn't develop into leukemia cells over a long time period, ensuring safety of regenerated CTL.

研究分野：再生免疫学

キーワード：抗原特異的T細胞 iPS細胞 再生

1. 研究開始当初の背景

がんに対する免疫細胞療法は細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte; CTL)を活性化して患者に戻すという方法がとられている。一定の効果は見られるものの、問題点も残されている。エフェクター細胞は寿命が短いということである。このため、エフェクター細胞を体外に取り出して刺激したあとに再び体内に戻すことをしても、その寿命の短さから効果が長続きしない。この問題を解決するためには、抗原特異的なエフェクター細胞を継続的に大量に得る必要がある。

そこで申請者らは、iPS細胞技術を用いてCTLを大量に再生する研究を進めてきた。T細胞は細胞表面に発現するT細胞レセプター(TCR)によって抗原を認識する。このTCRは遺伝子再構成によって作られているので、特定の抗原に特異的なT細胞からiPS細胞を樹立した場合、再構成されたTCR遺伝子はそのまま引き継がれる。したがって、T-iPS細胞から再びT細胞を再生した場合には、同じTCRを発現するT細胞のみが誘導されると考えられた。実際に、申請者らは、悪性黒色腫特異的抗原であるMART-1に特異的に反応するT細胞からiPS細胞を樹立し、そのiPS細胞からT細胞を誘導することでMART-1特異的CTLを再生することに成功した(Vizcardo et al, Cell Stem Cell, 2013) (図1)。

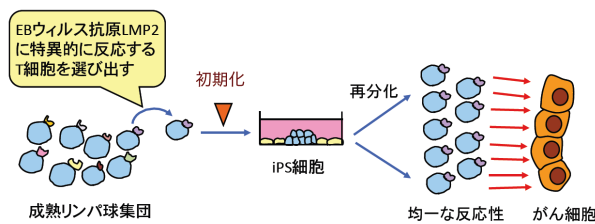


図1. iPS細胞を用いた抗原特異的T細胞の再生

2. 研究の目的

申請者らが開発したこの技術を新規がん治療法として臨床応用するためには、in vitro だけの機能解析だけではなく、より成体に近い条件で検証する必要がある。そこで、本研究では iPS 細胞技術を用いて再生した

CTLの有効性と安全性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、対象疾患としてEBウイルス関連Bリンパ腫を想定したLMP2抗原および種々のがん細胞に発現していることが知られているWT-1抗原を用いた。LMP2抗原もしくはWT-1抗原に特異的なT細胞からiPS細胞を樹立し、得られたT-iPS細胞から誘導したT細胞を用いてin vivoにおける抗原特異的細胞障害活性を検証した。具体的には、1) まずHLA-A24をもつ健常人ボランティア末梢血単核球から抗原特異的CTLを増幅させ、2) 次にそのCTLからiPS細胞を作製(T-iPS細胞)し、3) T-iPS細胞からCTLを再生した。In vitroにおいて、再生T細胞の細胞傷害活性の検定を行った。LMP2ペプチドをパルスした対象細胞株を蛍光標識し、再生T細胞と共培養を行った。フローサイトメトリーを用いた解析により、対象細胞株のなかでAnnexinV陽性細胞の割合を再生T細胞によって殺傷された対象細胞株として算出した。WT-1抗原特異的再生T細胞についても同様の実験を行い、再生T細胞の細胞傷害活性を検定した。さらに、WT-1抗原特異的再生T細胞を用いて、in vivoでの有効性と安全性を検証した。重度免疫不全マウスにWT-1抗原陽性細胞株を移入し、そこに再生CTLを移入してマウスの延命/救命効果が得られるかどうかを測定す

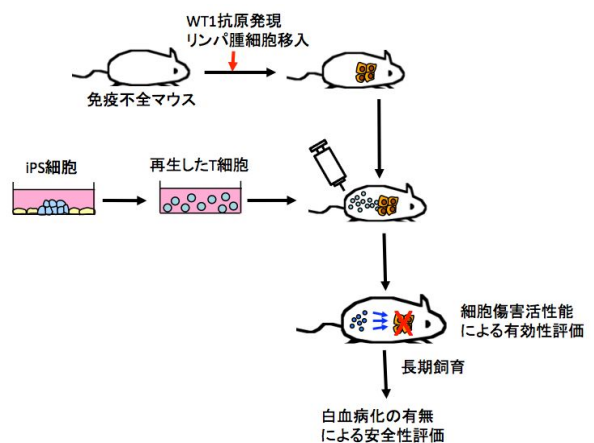


図2. WT1特異的CTLの再生と機能・安全性評価実験系

ること有効性を検証した。また、治癒したマウスを長期飼育することで、移入した再生 T 細胞が腫瘍化するかどうかを観察することで安全性の検証を行った(図 2)。

4. 研究成果

まず複数のがん抗原特異的 CTL から iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞であることを確認するために、未分化マーカーの発現解析、テラトーマ形成能、核型解析を行った。その結果、樹立した T-iPS 細胞は iPS 細胞としての基準を満たすものであった。

得られた T-iPS 細胞から OP9 細胞もしくは OP9/DLL1 細胞との共培養によって、T 細胞を再生した。再生した CTL はフローサイトメトリ解析によって、元の CTL と同じ TCR を発現する CD4CD8 ダブルポジティブの未熟 T 細胞であることを確認した。さらに、TCR 刺激することで CD8 シングルポジティブの成熟 CTL へと分化させた。しかしこれまでの方法では、誘導された成熟 CTL は CD8 $\alpha\alpha$ 型 T 細胞であり、細胞傷害能は NK 細胞様の活性によるものが大きいことが分かった。そこで分化誘導系に改良を加え、CD8 $\alpha\beta$ 型 T 細胞を誘導することに成功した。新規開発した方法で得られた CD8 $\alpha\beta$ 型 T 細胞は、in vitro において標的細胞に対してペプチド存在下で元の CTL と同等の細胞傷害活性を示した。また、抗 HLA 抗体で処理することで、細胞傷害活性が示されなくなったことから、再生した CD8 $\alpha\beta$ 型 T 細胞は T 細胞レセプターによって抗原を認識し、細胞傷害活性を示しているといえる。

さらに、WT1-T-iPS 細胞から得られた再生 CTL を用い、in vivo における細胞傷害活性を検証した。WT-1 抗原を発現する白血病細胞株を NOG マウスの腹腔内に投与し、1 日後から再生 CTL を週に 1 度、腹腔内投与した。すると、再生 CTL 投与群(治療群)で延命効果および救命効果が見られた。治療

群のマウスの末梢血中には CTL が検出されていた。救命効果が見られた群については、長期間の観察においてもそれらの細胞が腫瘍化することはなかった。また、WT-1 陽性白血病患者検体を標的細胞として用いた実験においても、抗原特異的な細胞傷害活性が確認された。

本研究において、iPS 細胞を用いて再生した CTL についての有効性と安全性が in vivo においても確認され、臨床応用に向けた研究を進めるにあたり大きく前進したと言える。従って、本研究は計画通りの進展があったと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Ikawa T, Masuda K, Huijskens MJ, Satoh R, Kakugawa K, Agata Y, Miyai T, Germeraad WT, Katsura Y, Kawamoto H (2015) Induced Developmental Arrest of Early Hematopoietic Progenitors Leads to the Generation of Leukocyte Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 5(5): 716-727 (査読有)
2. Chojnowski JL, Masuda K, Trau HA, Thomas K, Capecchi M, Manley NR (2014) Multiple roles for HOXA3 in regulating thymus and parathyroid differentiation and morphogenesis in mouse. *Development*, 141(19): 3697-3708 (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. 増田 喬子
“Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology”
ThymOz VII
2014 年 4 月 4 日, オーストラリア
2. 増田 喬子
「多能前駆細胞から B 前駆細胞へ至る過程にミエロイド-B 前駆細胞段階が存在する」
新学術領域「細胞運命制御」若手の会
2014 年 4 月 19 日, 浜松
3. 増田 喬子
「胸腺原基の胸腔への移動過程における神経堤由来間葉系細胞の役割」
Kyoto T cell conference

2014年5月16日, 京都

4. 増田 喬子
“Segregation of $\gamma\delta$ T cell progenitors prior to TCR β chain gene rearrangement independently of TCR-mediated signal”
The Fourth Bizan Immunology Symposium

2015年1月29日, 徳島

5. 増田 喬子
「胸腺周囲の間葉系細胞に発現する Hoxa3 は胸腺の胸部への移住に必須である」
第34回胸腺研究会
2015年2月7日, 相模原

6. 増田 喬子
“Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology:
A novel strategy of cancer immunotherapy”
Venice Thymus Meeting
2015年4月12日, イタリア

〔図書〕(計 2件)

1. 増田喬子、河本宏
実験医学別冊「フローサイトメトリー」(羊土社)2014年2月1日発行
実践編 17 T細胞のソーティング
2. 増田喬子、河本宏
実験医学別冊「ES・iPS細胞実験スタンダード」(羊土社)2014年3月5日発行
III章 分化誘導のプロトコール
5. ヒト iPS細胞からのキラーT細胞への分化誘導

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
増田 喬子 (MASUDA, Kyoko)
京都大学・再生医科学研究所・助教
研究者番号: 40565777

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし