

## 論文の内容の要旨

**論文題目** T 細胞由来人工多能性幹細胞(T-iPS 細胞)を用いた、抗原特異的かつ機能的な T 細胞の再分化誘導

**氏名** 西村 聡修

### <研究の背景と目的>

獲得免疫の主役ともいえる T 細胞は、体内・体外の様々な病原に対してシステマティックな免疫システムを形成している。その中でも細胞傷害性 T 細胞(Cytotoxic T Lymphocyte: CTL)は、癌やウイルス感染細胞を直接排除する主要な役割を担う。ヘルパー T 細胞(Helper T Lymphocyte: Th)や制御性 T 細胞(Regulatory T Lymphocyte: T<sub>reg</sub>)も細胞傷害性 T 細胞やその他のリンパ球、自然免疫担当細胞等の働きを制御することで病原の排除と免疫反応の収束に貢献するが、時に自己抗原に対する望まれざる免疫反応を惹起することも知られる。T 細胞はそのサブセットに関わらず、それらが持つ T 細胞受容体(T-cell Receptor: TCR)を介して標的抗原を認識することで T 細胞としての機能を発揮する。TCR による抗原認識は、主要組織適合遺伝子複合体(Major Histocompatibility Complex: MHC、特にヒトでは Human Leukocyte Antigen: HLA と呼ばれる)とその上に提示された標的抗原の両方の認識を介するものであるため、非常に特異性の高い認識反応であることが知られている。

抗原特異的な T 細胞を用いた免疫細胞療法は、安全かつ効果的に病原を駆逐できる可能性を持つ技術として現在でも活発に研究・開発が進められている。この手法の最も優れている点は、抗原認識の特異性を持ちながら長期に渡るターゲット細胞の監視が可能な点にある。現在までに様々な研究グループによって、抗原特異的な細胞を得る手法が開発されてきた。その一例として、癌患者の癌組織内に浸潤している T 細胞(Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL)を取り出し、体外増幅を経て、再び患者体内に輸注する方法があるが、体外で抗原特異的な T 細胞を大規模に増幅させる際に T 細胞が幾度も抗原に晒された疲弊状態、すなわち長期生存能、増殖能、細胞傷害活性、サイトカイン産生能が著しく低下した状態に陥ってしまうことが知られる。そのため、現状では高い治療効果

が得られていない。また患者から同じ TIL を繰り返し取り出すという操作も現実的には困難であるため、繰り返しの輸注は不可能である。また、抗原特異的 T 細胞を産出する手法として、T 細胞に外から抗原特異的 TCR 遺伝子を導入し、発現する TCR を変換する手法も取られている。この手法を用いることで抗原特異的 T 細胞を繰り返し作り出すことが可能ではあるが、外来遺伝子導入の際に必要な体外増幅過程による細胞疲弊は避けられず、また外来 TCR 遺伝子と内在性 TCR 遺伝子間でのハイブリッド TCR が発現してしまう問題も懸念されている。TCR は $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖がヘテロダイマーを形成した構造をしている。外来性 TCR $\alpha$ 鎖と内在性 TCR $\beta$ 鎖(もしくはその逆)が形成するハイブリッド TCR は外来性の抗原特異的 TCR $\alpha\beta$ や内在性 TCR 遺伝子による TCR $\alpha\beta$ とは別物であり、目的とした抗原を認識する TCR の割合の減少ばかりか、GvHD を始めとした意図しない副反応を呈する事例も報告されている。

これらの問題を乗り越えるために、我々は T 細胞から作製した iPS 細胞(T-iPS 細胞)を用いることを考えた。iPS 細胞は様々な細胞種に分化可能な多能性を有しているのと同時に、その多能性を維持したまま半永久的に自己複製させることが可能な細胞である。また、T-iPS 細胞は ES 細胞や他の組織由来の iPS 細胞とは異なり、そのゲノム中の TCR 遺伝子領域において正常な遺伝子再構成を有しているものと考えられる。T-iPS 細胞を起点に再び T 細胞へと分化誘導する際には、既に再構成された TCR 遺伝子は更なる遺伝子再構成を受ける必要はなく、そのまま同じ再構成様式の TCR が発現するものと考えられる。以上の特性から、ある抗原に対して特異的に反応する TCR を発現する T 細胞を無限に産出することが可能になると考え、実験を行った(図参照)。

## <方法と結果>

### 1) 抗原特異的 T 細胞からの iPS 細胞の作製

終末分化した細胞からの iPS 細胞の作製、および末梢血中の血液細胞からの iPS 細胞の作成は、従来までは非常な困難であり、それは T 細胞に関しても同様であった。我々は高感染価のレトロウイルスもしくはセンダイウイルスを用いることで、初期化因子(*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* および *c-MYC*)の導入の効率化、それらの発現量の上昇を実現し、また初期化までに要する細胞増殖と生存率の上昇を SV40 由来 T 抗原を同時に導入することで実現した。これらにより、末梢血中の T 細胞からだけでなく、*ex vivo* において高度に増幅させた T 細胞からも iPS 細胞を作成することに成功した。初期化に用いた外来遺伝子は、iPS 細胞作成後に RNAi の手法を用いて細胞内から完全に除去することが可能である。

1 型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)において、T 細胞による抗原認識の対象となるタンパク質の一つに Nef がある。Class I MHC である HLA-A24 上に提示された Nef 由来の 8 アミノ酸残基からな

るペプチド Nef-138-8 (RYPLTFGW)を特異的に認識する CD8<sup>+</sup> T 細胞を、HIV-1 患者末梢血から分取し、モノクローナルな CLT クローン(H25-4)を得た。上記の初期化系を用いて、H25-4 CTL から T-iPS 細胞(H254SeVT-3)を作成し、多能性幹細胞としての基本的性質である多分化能および自己複製能を有している細胞であることを確認した。H254SeVT-3 のゲノム DNA を抽出し、その TCR 遺伝子領域の様相を解析したところ、 $\alpha$ 鎖をコードする *TCRA* および $\beta$ 鎖をコードする *TCRB* の両遺伝子領域において再構成済みであることが確認され、それらの再構成様式は初期化前の H25-4 ゲノム中におけるそれと全く同一であった。

## 2) T-iPS 細胞を起点とした T 細胞分化誘導

多能性幹細胞を起点として T 細胞を誘導する試みは主に 2 つの段階から成り、(1)多能性幹細胞から造血幹・前駆細胞(Hemopoietic Stem/Progenitor Cells: HSPCs)を誘導する段階、および(2)HSPCs から T 系譜 細胞へと誘導する段階である。ES 細胞や iPS 細胞を、造血支持能を持つストローマ細胞である OP9 上で共培養すると、適正なサイトカイン条件の元で ES/iPS-Sac と呼ばれる嚢状構造体を形成する。この袋の中では血球系細胞が優位に誘導され、多くの造血幹・前駆細胞(CD34<sup>+</sup> HSPCs) を包含する。ヒト生体内から分取した CD34<sup>+</sup> HSPCs を Notch ligand である Delta-like 1 (DL1)を発現する OP9 (OP9-DL1)上で共培養すると T 系譜細胞への分化誘導が可能であることが知られている。我々は iPS-sac 内から取り出した CD34<sup>+</sup> HSPCs を OP9-DL1 上に播種し、適正なサイトカイン条件下で共培養することで T 系譜細胞への再分化誘導を促した。しかしながら、これらの方法によって再分化誘導された T 系譜細胞は、種々の T 細胞マーカー(CD5, CD7, CD3 および TCR $\alpha\beta$ )を発現していたものの、positive selection 以前であることを示す CD1a の発現が見受けられ、かつ CD4/CD8 共陽性細胞(Double Positive: DP)段階までしか熟成していなかった。そこで、OP9-DL1 上の T 系譜細胞を回収し allogeneic PBMC との共培養系に移行させると同時に positive selection を模倣する TCR からの刺激を与えることによって、より成熟した CD8 単独陽性(Single Positive: SP)細胞を得ることに成功した。

## 3) 再分化誘導した T 細胞の特性評価および機能評価

再分化誘導した T 細胞は表面抗原マーカーを指標とした表現型および転写因子群などの細胞内因子に関して末梢血 T 細胞と類似していた。また、これらの細胞が発現する TCR は、初期化前の H25-4 CTL が発現しているものと全く同一であった。

再分化誘導した CD8 SP 細胞を HLA-A24/Nef-138-8 テトラマーと反応させたところ、多くの細胞がテトラマー反応陽性であった。これらテトラマー陽性細胞を FACS もしくは磁気選択により純

化し、元の H25-4 CTL と同程度にテトラマーと反応する細胞群を得た(以下、reH25-4)。抗原特異的 T 細胞の機能評価においては、標的抗原の認識と連動して機能が発揮されることを示す必要がある。我々は、Nef-138-8 および HLA-A24 を発現する抗原提示細胞を用いて、(1)ELISPOT によるサイトカイン産生能、および(2)<sup>51</sup>Cr release assay による細胞傷害性を測定し、reH25-4 の抗原特異的機能を確認した。

### <考察・今後の展望>

iPS 細胞は ES 細胞と同等の特性を持つことに加え、皮膚細胞や血液細胞などの体細胞から作成されるため ES 細胞作製における倫理的問題を回避できる。自家細胞に由来する場合は免疫拒絶さえも回避可能なことから、再生医療における切り札となることが期待されている。我々は本研究を通して、抗原特異的な CD8<sup>+</sup> T 細胞(H25-4)から T-iPS 細胞(H254SeVT-3)を作成し、その T-iPS 細胞から再び H25-4 と同一の抗原特異性を示す機能的 CD8<sup>+</sup> T 細胞(reH25-4)を得ることに成功した。これらの知見により、図 1 に示すような抗原特異的 T 細胞を再誘導し患者へと輸注する免疫細胞療法の第一の基礎が固められたのではないかと考えている。

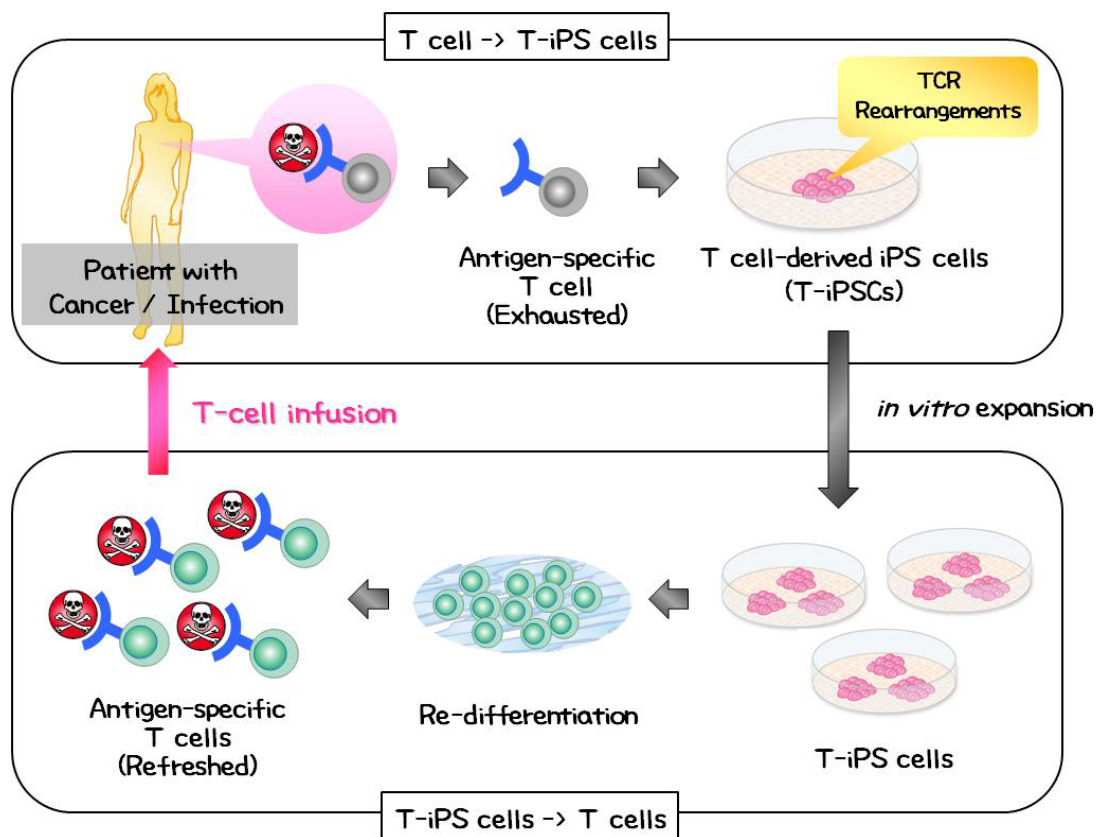


図 T-iPS 細胞を介した抗原特異的 T 細胞の誘導、およびそれらの輸注による免疫細胞療法の概略