

iPS 細胞から再生した T 細胞の活性化シグナルを強化するがん免疫療法の開発

縣 保年

滋賀医科大学 生化学・分子生物学講座

【研究の背景】

がんの養子免疫療法は、患者のがん抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を増やして患者に戻すものであるが、細胞数が少ないため増殖しづらいという問題があった。そこでがん抗原特異的な T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を導入する TCR-T 細胞療法が開発されたが、導入した TCR が内在性の TCR と競合したり、移入した T 細胞の増殖が十分に維持されないという問題がある。一方、近年開発された CAR-T 細胞療法は、がん細胞の表面抗原を認識する抗体の可変部と、T 細胞活性化シグナルを伝達する分子を融合させたキメラ抗原受容体 (CAR) を発現させるもので、白血病などに著効することが示された。しかしながら効果が強いがために副作用の問題や、表面抗原しか標的にできないこと、固形がんには有効でないという問題がある。さらに、ポリクローナルな T 細胞は他人の組織に反応するため他家移植ができず、TCR-T 細胞も CAR-T 細胞も患者本人の T 細胞を用いる自家移植であることから、コストが非常に高く、患者の状態によっては治療ができない場合もある。

そこで京都大学再生研の河本宏教授らは、がん抗原特異的な T 細胞から iPS 細胞を作製し (T-iPS 細胞) 大量培養したのち、T 細胞へ分化誘導することにより、がん特異的な T 細胞を再生することに成功した。一方、T-iPS 細胞を樹立するには時間と手間がかかることや、T-iPS 細胞が T 細胞へ分化しづらくなるなど、品質にばらつきが生じるといった問題があった。そこで我々は、高品質な iPS 細胞にレンチウイルスを用いて直接がん抗原特異的な TCR 遺伝子を導入し、得られた TCR-iPS 細胞を T 細胞へ分化誘導し、機能的な TCR が発現され、キラー活性を有することを報告した。しかしながら、TCR-iPS 細胞から再生した T 細胞では TCR の発現がやや低く、またウイルスを用いた遺伝子導入では、挿入によるがん化のリスクを否定できないといった問題がある。

【目 的】

そこで本研究では、ゲノム編集とカセット交換法を用いて、高品質な iPS 細胞の内在性 TCR 遺伝子座へ、がん抗原特異的な TCR 遺伝子をノックインする。それにより TCR の生理的な発現時期と高い発現レベルを再現し、活性の高いがん抗原特異的な CTL を、短期間で効率よく再生することを第一の目的とした。TCR 遺伝子を導入した iPS 細胞から再生した T 細胞は、導入 TCR のみを発現するモノクローナルな集団であるため、HLA が一致していれば他家移植ができるという大きな利点がある。しかしながら、CAR-T 細胞が強い活性化シグナルのために増殖能や活性が高いのに対し、TCR 導入 T 細胞は生体内での増殖能が低いことが多く、効果も限定的である。そこで本研究では、iPS 細胞から再生した T 細胞に CAR のシグナル伝達分子を発現させ、活性化シグナルを強化することにより、増殖能や抗腫瘍活性を高めることを第二の目的とした。それにより、他家移植ができる安価で、かつ抗腫瘍活性の高いがん抗原特異的な T 細胞製剤の開発を目指す。

【方 法】

1) ゲノム編集とカセット交換法を用いた iPS 細胞への TCR 遺伝子のノックイン

がん抗原特異的な TCR 遺伝子を、iPS 細胞の内在性 TCR 遺伝子座にゲノム編集とカセット交換法を用いてノックインした。具体的には、Hygromycin 耐性遺伝子と、Puromycin 耐性遺伝子-チミジンキナーゼ (TK) 融合遺伝子のカセットを、CRISPR/Cas9 によって内在性の TCR β 遺伝子座にノックインした。次にごがん抗原特異的な TCR α / β 融合遺伝子の前後に

lox 配列を付加したカセット交換用ベクターを Cre 発現ベクターとともに遺伝子導入した。Hygromycin 耐性遺伝子にも lox 配列を付加してあるので、それぞれの間で組換えが起こり、Hygromycin 耐性遺伝子と TCR 遺伝子が交換されるとともに、PGK プロモーターの付加により Puro-TK が発現した。次に FLP 発現ベクターを導入し、frrt 配列で挟まれた Puro-TK 遺伝子が欠失した細胞をガンシクロビルで選択した。正しく TCR 遺伝子が交換された iPS 細胞を、OP9-DLL1 細胞を用いた T 細胞培養系により、キラー T 細胞へ分化誘導したのち、がん抗原を発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を解析した。

2) T-iPS 細胞から再生した T 細胞への CAR シグナル伝達分子の遺伝子導入

iPS 細胞から再生した T 細胞の増殖能や腫瘍抑制活性を高めることを目的として、CAR のシグナル伝達分子を発現させた。CAR シグナル伝達分子としては、名古屋大学の寺倉らが開発した CD3 ζ /CD28 と CD3 ζ /4-1BB 分子を用いた (Cancer Immunol. Res. 6: 6, 733, 2018)。これらは、TCR が抗原を認識した際に主シグナルを伝える CD3 ζ 分子と、活性化に必要な副シグナルを伝達する CD28 や 4-1BB 分子を融合させたキメラ分子である。T 細胞が抗原を認識すると、CD3 ζ は TCR と会合するため、これらのキメラ分子も集合することにより、主シグナルと副シグナルが同時に細胞内に伝達される。特に CD3 ζ /4-1BB はヒト末梢血 T 細胞に遺伝子導入すると、抗原特異的に増殖能が高まり、強い抗腫瘍活性を示す。

T-iPS 細胞から再生した T 細胞は、内在性のがん抗原特異的 TCR を発現するので、これらのキメラ分子をレトロウイルスを用いて遺伝子導入したのち、抗原ペプチドで刺激して増殖能を解析した。

3) 未知がん抗原に対する腫瘍殺傷能を有する TCR 遺伝子の単離

がん抗原は未知であっても、腫瘍細胞を殺傷できる TCR 遺伝子を単離するために、MHC ホモのカニクイザル由来の腫瘍細胞を MHC ヘテロのサルに移植し、腫瘍組織に浸潤した PD-1 陽性 T 細胞のシングルセルから TCR α 鎖と TCR β 鎖の遺伝子をセットで単離した。多数単離した遺伝子セットのうち出現頻度の異なる TCR 遺伝子を、ヒト iPS 細胞から再生した T 細胞へレトロウイルスを用いて導入したのち、腫瘍細胞と共培養し、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を解析した。さらに免疫不全マウスに腫瘍細胞を皮下移植したのちに、TCR 遺伝子を導入した再生 T 細胞を移植し、抗腫瘍活性を解析した。

【結 果】

1) ゲノム編集とカセット交換法を用いた iPS 細胞への TCR 遺伝子のノックイン

がん抗原特異的な TCR 遺伝子を、iPS 細胞の内在性 TCR 遺伝子座にゲノム編集とカセット交換法を用いてノックインした。正しく TCR 遺伝子がノックインされた iPS 細胞を、OP9-DLL1 細胞を用いた T 細胞培養系により、キラー T 細胞へ分化誘導したのち、がん抗原を発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を解析した。その結果、がん抗原特異的に高い細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

2) T-iPS 細胞から再生した T 細胞への CAR シグナル伝達分子の遺伝子導入

iPS 細胞から再生した T 細胞の増殖能や腫瘍抑制活性を高めることを目的として、CAR のシグナル伝達分子 (CD3 ζ /CD28 と CD3 ζ /4-1BB 分子) を、T-iPS 細胞から再生した T 細胞にレトロウイルスを用いて発現させた。T-iPS 細胞から再生した T 細胞は、内在性のがん抗原特異的 TCR を発現するので、これらのキメラ分子を発現させた再生 T 細胞を、抗原ペプチドで刺激して増殖能を解析した。しかしながら、CAR シグナル伝達分子の発現の有無に拘わらず、再生 T 細胞は高い増殖能を示した。

3) 未知がん抗原に対する腫瘍殺傷能を有する TCR 遺伝子の単離

がん抗原は未知であっても、腫瘍細胞を殺傷できる TCR 遺伝子を単離するために、MHC ホモのカニクイザル由来の腫瘍細胞を MHC ヘテロのサルに移植し、腫瘍組織に浸潤した PD-1 陽性 T 細胞のシングルセルから TCR α 鎖と TCR β 鎖の遺伝子をセットで単離した。多数単離した遺伝子セットのうち出現頻度の異なる TCR 遺伝子を、ヒト iPS 細胞から再生した T 細胞へレトロウイルスを用いて導入したのち、腫瘍細胞と共培養し、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を解析した。その結果、出現頻度の高い TCR は腫瘍細胞に対して高い細胞傷害活性を示したのに対して、出現頻度の低い TCR は細胞傷害活性を示すものは少ないことがわかった。さらに免疫不全マウスに腫瘍細胞を皮下移植したのちに、TCR 遺伝子を導入した再生 T 細胞を移植し、抗腫瘍活性を解析したところ、細胞傷害活性を示した TCR を発現させた再生 T 細胞は、腫瘍の成長を抑制するとともに、マウスの生存期間を延長させた。これらの結果から、このサルの腫瘍移植モデルにおいて、腫瘍浸潤 T 細胞は腫瘍細胞を殺傷する能力を有し、腫瘍の消失に寄与することが示唆されるとともに、この方法をヒトの治療に応用できる可能性が示された。

【考 察】

本研究では、がん抗原特異的な TCR 遺伝子を、iPS 細胞の内在性 TCR 遺伝子座にゲノム編集とカセット交換法を用いてノックインした。正しく TCR 遺伝子がノックインされた iPS 細胞を、キラー T 細胞へ分化誘導したところ、がん抗原を発現する腫瘍細胞に対して高い細胞傷害活性を示す T 細胞が再生できることが示された。次に iPS 細胞から再生した T 細胞の増殖能や腫瘍抑制活性を高めることを目的として、CAR のシグナル伝達分子(CD3 ζ /CD28 と CD3 ζ /4-1BB 分子)を発現させたが、増殖能に変化はなかった。ヒトの末梢血中の T 細胞では、抗 CD3/CD28 抗体などを用いて刺激しても、長期にわたり増殖させるのは困難であるのに対して、iPS 細胞から再生した T 細胞は、ほぼ無限に増殖させることができることから、CAR シグナル伝達分子の効果を見ることはできなかつたのではないかと考えている。一方、腫瘍細胞を移植した免疫不全マウスに、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を示す TCR 導入再生 T 細胞を移植したところ、抗腫瘍活性がみとめられた。しかしながら、再生 T 細胞の移植実験では複数回の移植が必要であり、現状ではサイトカインも同時に投与している。このことから、再生 T 細胞は in vitro ではほぼ無限に増殖できる利点はあるが、in vivo ではおそらく疲弊によって増殖能を失う可能性が考えられることから、CAR シグナル伝達分子を発現させた再生 T 細胞を、腫瘍細胞を移植した免疫不全マウスに移植し、in vivo で再生 T 細胞の生存能の維持や、抗腫瘍活性の強化がみられるか、引き続き検討を行っている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

TCR 遺伝子を導入した iPS 細胞から再生した T 細胞は、導入 TCR のみを発現するモノクローナルな集団であるため、HLA が一致していれば他家移植ができるという大きな利点がある。したがって他家移植可能であることをふまえて、予め大量に調製し、ストックしておくことができるのも大きな利点である。将来的にはいわゆる“off-the-shelf 型”の細胞製剤として、早期の治療応用も期待できることから非常に有意義である。

【参考・引用文献】

1. Terada K, Kondo K, Ishigaki H, Nagashima A, Satooka H, Nagano S, Masuda K, Kawamura T, Hirata T, Ogasawara K, Itoh Y, Kawamoto H, **Agata Y.*** Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating and circulating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model. **Molecular Therapy – Oncolytics**, 24:77–86, 2022
2. Maeda T, Nagano S, Kashima S, Terada K, **Agata Y**, Ichise H, Ohtaka M, Nakanishi M, Fujiki F, Sugiyama H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, Kawamoto H.* Regeneration of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from iPSCs transduced with exogenous TCR genes. **Molecular Therapy – Methods & Clinical Development**, 19:250–260, 2020
3. Satooka H, Ishigaki H, Todo K, Terada K, **Agata Y**, Itoh Y, Ogasawara K, Hirata T. Characterization of tumour-infiltrating lymphocytes in a tumour rejection cynomolgus macaque model. **Sci Rep.** 10(1):8414, 2020
4. Kashima S, Maeda T, Masuda K, Nagano S, Inoue T, Takeda M, Kono Y, Kobayashi T, Saito S, Higuchi T, Ichise H, Kobayashi Y, Iwaisako K, Terada K, **Agata Y**, Nakamura K, Saito M, Narita S, Ogawa O, Habuchi T, Kawamoto H. Cytotoxic T lymphocytes regenerated from iPS cells have therapeutic efficacy in a patient-derived xenograft solid tumor model. **iScience** 23(4):100998, 2020
5. Nagasawa M, Tomimatsu K, Terada K, Kondo K, Miyazaki K, Miyazaki M, Motooka D, Okuzaki D, Yoshida T, Kageyama S, Kawamoto H, Kawachi A, **Agata Y.*** 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. **Biochem Biophys Res Commun.** 526, 128–134, 2020