

ヒト iPS 細胞からがん細胞を殺傷できる強力なキラーT 細胞を再生 —再生 T 細胞療法の臨床応用に向けて一歩前進—

本研究成果のポイント

- ・ ヒトiPS細胞からがん細胞を殺傷する能力の高いキラーT細胞¹を作製
- ・ 作製した再生キラーT 細胞は WT1 抗原を有する白血病細胞を試験管内で殺傷
- ・ 免疫不全マウスを用いたヒト白血病モデルで治療効果を確認
- ・ 再生キラーT 細胞を用いた免疫細胞療法の臨床応用に向けて一歩前進

概要

河本宏ウイルス・再生医科学研究所教授、前田卓也同特定研究員らは、ヒト iPS 細胞からがん細胞を殺傷する能力をもつキラーT 細胞を作製することに成功しました。この成果は 11 月 22 日午前 2 時(日本時間)、米科学雑誌 *Cancer Research* の online 版に掲載されました。

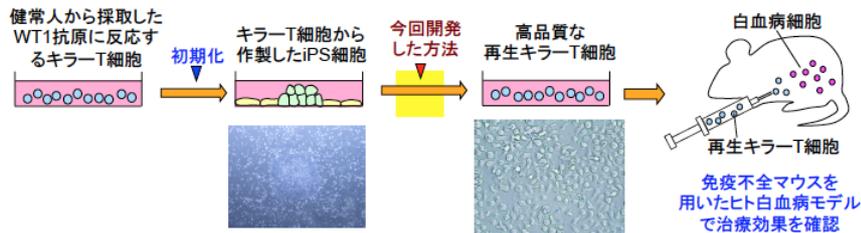
これまでがん細胞に反応するキラーT 細胞を体外で増やして患者に投与するとがんの治療に有効であることが示されてきました。しかしキラーT 細胞を培養するとある程度増えた時点で疲弊してしまうため、高品質な細胞を効率よく増やすことは極めて困難でした。

河本教授らのグループは、この問題の解析に iPS 細胞技術を用いました。まずがん細胞に特有の抗原(がん抗原)を認識できる T 細胞レセプターを有する T 細胞から iPS 細胞を作製し、その iPS 細胞から T 細胞を再生すると、がん抗原を認識する T 細胞だけを量産することができるというアイデアです。このアイデアに基づいて、同グループは 2013 年に世界で初めてがん抗原に反応するヒトのキラーT 細胞の再生に成功しました。

しかし、これまでの培養法では、生体中のキラーT 細胞に比べると、がん抗原を標的にして殺傷する能力の弱い細胞しかつくることができませんでした。今回、この問題を解決するために、培養法の改良を行いました。iPS 細胞から T 細胞を再生させる過程で、CD4 と CD8 という分子を共に出す若い細胞が生成します。この段階の細胞を他の細胞から分離した上で細胞に刺激を加えると、がん抗原を標的にして殺傷する能力の強いキラーT 細胞がつかれることを発見しました。

開発した手法を用いて、WT1 抗原というがん抗原を標的とする再生キラーT 細胞を作製したところ、この再生キラーT 細胞は WT1 抗原を出す白血病細胞を試験管内で効率よく殺傷することを確認しました。また、免疫不全マウスに白血病細胞を注入して作製した白血病モデルで治療効果が認められました。今回の成果は、再生キラーT 細胞を用いたがん治療の戦略を、臨床応用に向けて一歩前進させるものと考えられます。

¹ ウイルスに感染した細胞やがん細胞を殺すことのできる T 細胞。



概要図 高品質な再生キラーT細胞の作製と検証

健康人の T 細胞の中から WT1 抗原特異的なキラー T 細胞を選択的に増幅し、その T 細胞を初期化することで iPS 細胞を作製した。作製した iPS 細胞から、今回開発した方法を用いて WT1 抗原に反応できる T 細胞を再生した。新規の方法のポイントは、CD4 と CD8 という分子を共に出している段階の細胞を単離してから刺激を加えるという点である。再生したキラー T 細胞はヒト白血病細胞を用いた動物モデルで治療効果を示した。

研究の背景

PD-1 抗体や CTLA-4 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤²が一部のがんに奏効することは、がん患者の体の中にはがん細胞を殺す力を有しているキラー T 細胞が存在していることを示しています。実際に、がん細胞に反応するキラー T 細胞を体外で増やして患者に投与するという手法が一部のがんの治療に有効であることも示され

てきました。しかし、そのようなキラー T 細胞を効率よく増やすことは一般的にはとても困難で、よい成績をあげられるのはごく限られた医療機関だけでした。キラー T 細胞を増やすのが困難である理由として、一定期間培養すると疲弊して増えなくなってしまうことが挙げられます。

今回の研究では、この問題を解析するために iPS 細胞技術を用いました。T 細胞は、T 細胞レセプター³を細胞表面に出していて、このレセプターを使って標的になる分子(抗原)を認識します。この T 細胞レセプターは、「遺伝子再構成⁴」とよばれる仕組みによって作り出された遺伝子からつくられます。

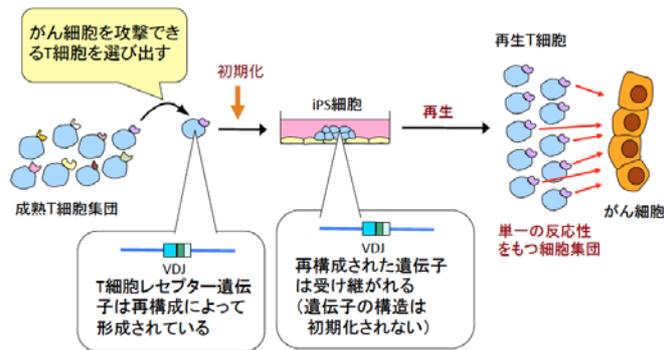


図1 iPS細胞技術を用いてT細胞を再生する戦略のコンセプト
がん細胞を攻撃できるキラーT細胞から iPS 細胞を作製すると、T 細胞レセプター遺伝子は再構成されているので、その構造は iPS 細胞化しても受け継がれる。そのため、その iPS 細胞から T 細胞を再生すると、全てが同じ反応性をもつことになる。

² PD1 や CTLA4 などのような免疫を抑制する分子を、抗体を用いて阻害することにより、免疫を活性化させることができる。このような阻害抗体の製剤を免疫チェックポイント阻害剤と呼ぶ。日本では抗 PD1 抗体が悪性黒色腫、肺がんなどに対して承認されている。

³ T 細胞が抗原を認識するために用いる T 細胞の表面に存在する受容体。受容体とは外界や外部からの何らかの刺激を受け取り、情報として利用できるように変換する仕組みを持った構造のこと。

⁴ T 細胞レセプター遺伝子は α 鎖と β 鎖というふたつの分子が会合して構成されている。α 鎖は V と J、β 鎖は V、D、J の 3 つの部品を組み合わせて形成される。体細胞のゲノムではこれらの部品の遺伝子が数十種類ずつ離れて並んでいる。T 細胞は分化の過程で、それぞれから 1 個の部品を選び、それらをゲノム上でつなぎ合わせることで、個々の細胞が特異的な T 細胞レセプターの遺伝子を新たに作りだす。この再構成により個々の細胞が異なる形状のレセプター分子を有するようになる。

がん抗原を認識できる T 細胞レセプターを有する T 細胞から iPS 細胞を作製すると、iPS 細胞には再構成された T 細胞レセプター遺伝子の構造が受け継がれます(図 1)。作製した iPS 細胞から T 細胞を再生すると、がん抗原を認識できる T 細胞だけをつくることのできるというアイデアです。この方法では新鮮で元気な T 細胞を必要なだけつくることができます。

このアイデアに基づいて、2013 年に、世界で初めてがん抗原に反応するヒトのキラー T 細胞の再生に成功し、論文発表しました。この論文では、メラノーマに特有のがん抗原を標的にしました(図2)。

しかし、この時点での技術では、再生したキラー T 細胞の品質はあまりよくありませんでした。通常キラー T 細胞は CD8 $\alpha\beta$ という分子を細胞表面に出します。これは CD8 α と CD8 β が結合したものです。この分子は T 細胞レセプターが標的となる抗原を認識する時に、補助的なシグナルを伝えます。しかし、従来の方法では、再生した T 細胞は CD8 α 分子 2 つが結合した CD8 $\alpha\alpha$ という分子を出していました。CD8 $\alpha\alpha$ という分子は補助シグナルを伝える機能が無いので、CD8 $\alpha\alpha$ 型 T 細胞はがん抗原を認識する力が弱く、がん抗原を標的にした T 細胞療法では使いにくいものでした。

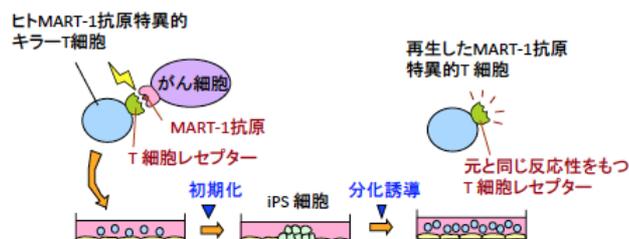


図2 iPS 細胞技術を用いた MART-1 抗原特異的 T 細胞の再生

2013 年に報告した成果。メラノーマの患者から分離されたキラー T 細胞を材料に iPS 細胞を作製した。iPS 細胞を 2 種類のフィーダー細胞と順次共培養し、キラー T 細胞を再生した。再生 T 細胞のほとんど全てが MART-1 抗原に結合できる T 細胞レセプターを出していた。

研究手法と成果

今回、この問題を解決するため、培養法の改良を試行しました。まず LMP2⁵ という EB ウイルス関連抗原に特異的な T 細胞を健常人の末梢血中の T 細胞から増幅し、それらの細胞から iPS 細胞を作製しました(図3)。この iPS 細胞をフィーダー細胞と共培養すると、6 週間後に未熟な T 細胞はまず CD8 $\alpha\beta$ と共に CD4 という分子を両方とも出すようになります (CD4CD8 共陽性細胞)。

さて、従来の方法では、この CD4CD8 共陽性細胞が培養中に出現した時に、T 細胞レセプターに刺激を加えて、CD4 陰性 CD8 α 陽性のキラー T 細胞を誘導するという方法をとっていました(図4上段)。しかし、前述のようにこの方法だと、CD8 $\alpha\alpha$ 型の T 細胞しかできませんでした。

⁵ EB ウイルスが有する抗原。上咽頭がんやホジキンリンパ腫など EB ウイルス感染が原因となって発症するがん細胞で発現しており、がん抗原として用いられる。

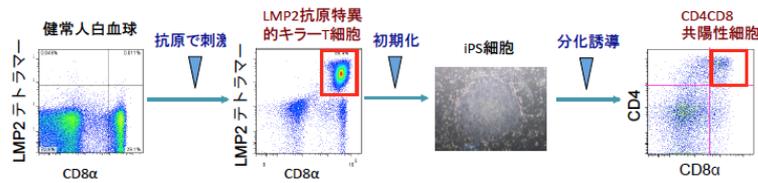


図3 LMP2 抗原特異的 T 細胞の再生

LMP2 抗原に反応する (LMP2 抗原特異的) キラーT 細胞は試薬を用いて検出可能。健康人の末梢血の T 細胞の中には、LMP2 抗原特異的 T 細胞はごく少数しか存在しない。LMP2 抗原で刺激して 4 週間培養すると LMP2 抗原特異的 T 細胞は増殖し、検出できるようになった。この T 細胞から図 2 と同じ方法で iPS 細胞を作製した。その iPS 細胞から T 細胞に向けて分化誘導を行い、6 週間後には幼若な T 細胞である CD4CD8 共陽性細胞が生成した。

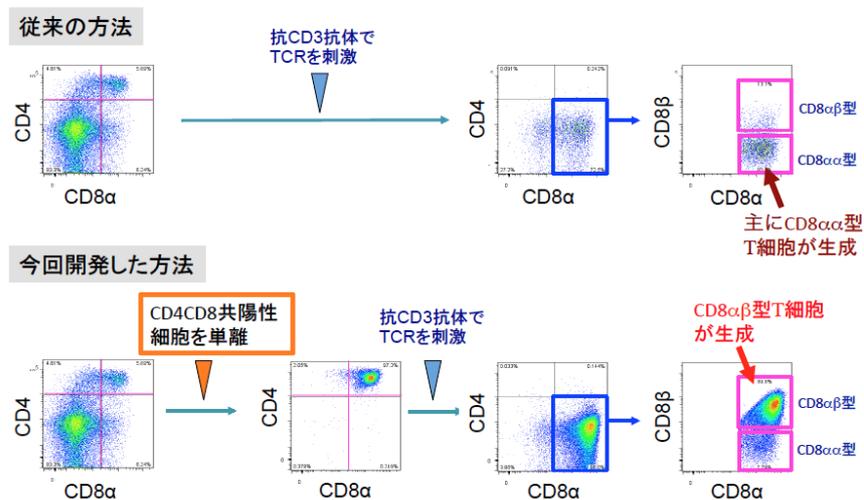


図4 CD4CD8 共陽性細胞を単離してから刺激すると CD8αβ型キラーT 細胞が生成した

従来は、図 3 のように CD4CD8 共陽性細胞が生成した時点で抗 CD3 抗体を用いて T 細胞レセプターに刺激を加えるという方法を用いていた。この方法だと、CD8 だけを出すキラーT 細胞は生成するが、それらは CD8αα型であった。今回開発した方法では、CD4CD8 共陽性細胞を、磁気ビーズなどを用いて単離し、その後、CD3 抗体で刺激を加えると、CD8αβ型キラーT 細胞が高率に生成した。

従来的方法の場合、まだ CD4 も CD8 も出していない段階の細胞 (CD4CD8 共陰性細胞) も培養中に含まれていました。今回加えた改良点は、CD4CD8 共陽性細胞を CD4CD8 共陰性細胞から分離した上で、刺激を加えるという点です (図4下段)。この措置によって、CD8αβ型の T 細胞が効率よく誘導できることがわかりました。また、分離しない状態で刺激した場合に CD8αβ型の T 細胞が生成しないのは、刺激を受けた CD4CD8 共陰性細胞が CD4CD8 共陽性細胞を殺しているためだということも確認しました。

本研究では、さらにこの方法を、WT1 抗原というがん抗原に応用しました。WT1 抗原は、白血病や各種の固形癌が多く持っている抗原です。まず健康者から WT1 抗原特異的キラーT 細胞を誘導し、そのキラーT 細胞から iPS 細胞を作製しました。その iPS 細胞から再生した WT1 抗原特異的キラーT 細胞は、元のキラーT 細胞と比べてほぼ同等の殺傷能力を発揮しました (図5)。

さらに、再生キラーT細胞はWT1抗原を有している白血病細胞株を効率よく殺傷しました。また、ヒト白血病細胞を免疫不全マウスに注入して作製する白血病モデルを用いた実験で、再生キラーT細胞を投与することにより、治療効果がみられました(図6)。

生体内で正常組織を傷つけないかという点と、投与した細胞自体ががん化しないかという点も確認しました。免疫不全マウス⁶に再生キラーT細胞だけを投与し6ヶ月間様子をみた結果、特にマウスの組織が傷害された徴候は認められず、また投与した細胞のがん化は起こりませんでした。

CD8 $\alpha\beta$ 型のT細胞は、生成してからさらに2-3ヶ月培養することで、一万倍以上に増やす事が可能でした。1回の培養でCD8 $\alpha\beta$ 型のT細胞を最初におよそ100万個作ることができます。それらを増やすことで、計算上100億個のキラーT細胞を得ることができることになります。これは、免疫細胞療法で通常用いられる投与量の数回分にあたります。

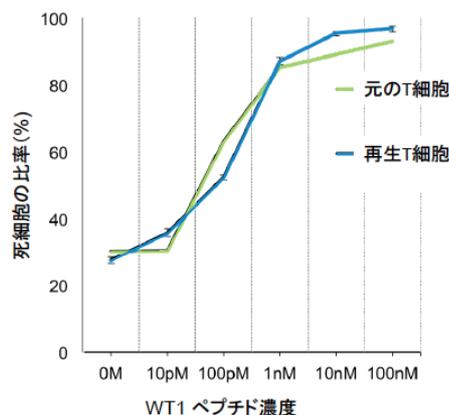


図5 今回開発した方法で再生したWT1抗原特異的キラーT細胞は元のキラーT細胞と同等の抗原特異的細胞傷害活性を示した

図3と同様の方法で、健常人の末梢血からWT1抗原特異的キラーT細胞を増幅し、iPS細胞を作製した。次に図4と同じ方法でそのiPS細胞からWT1抗原特異的再生キラーT細胞を作製した。攻撃側の細胞として元のT細胞と再生T細胞を用いた。標的細胞にさまざまな濃度でWT1ペプチド抗原を添加し、T細胞対標的細胞が3:1になる割合で混合培養した。6時間後に、標的細胞の中の死細胞の割合を測定した。

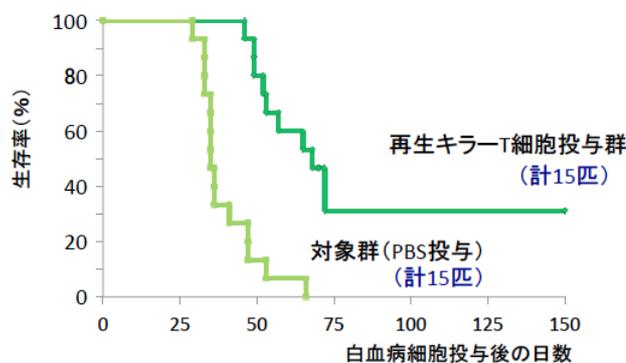


図6 WT1抗原特異的再生キラーT細胞は白血病モデルマウスで治療効果を認めた

免疫不全マウスにWT1抗原を発現するヒト白血病細胞(HL60)を 2×10^4 個腹腔内に播種した。翌日から1週間ごとに計4回再生キラーT細胞 5×10^6 個をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁して腹腔内投与した。対照群では同じ量のPBSだけを腹腔内投与した。

波及効果・今後の予定

将来的には今回開発した培養技術を応用した戦略を、白血病などの悪性腫瘍の治療に用いることを目標としています。具体的には、WT1抗原を有している急性骨髄性白血病を対象疾患として考えています。

今回の発見で、より高品質なキラーT細胞の再生方法を開発することができましたが、これがすぐに臨床応用できるわけではありません。例えば現時点での培養方法では、マウス由来のフィーダー細胞やウシ血清などといったヒト以外

⁶ 通常ヒトの細胞はマウスに移植しても拒絶されるが、T細胞やB細胞などの免疫細胞が欠損した免疫不全マウスは、ヒトの細胞を移植することができる。このため、ヒトのがん細胞を用いた生体内での治療効果を判定する実験に用いられる。

の動物の成分を用いていますが、できるかぎりこれらを用いない培養方法の開発が望まれます。またマウスを用いた実験では治療効果を認め、さらに安全性を示す所見も得られましたが、今回の実験だけで再生 T 細胞の安全性、有効性がすぐに臨床応用できるレベルで検証されたとはいえません。臨床試験までに、今後もさらなる研究の積み重ねが必要と考えています。

さらに先を見据えると、他家移植に応用することも想定しています。例えば京都大学 iPS 細胞研究所が作製している iPS 細胞ストックに、WT1 特異的 TCR 遺伝子を導入して、その iPS 細胞からキラー T 細胞を再生することも可能です。多くの患者に使えるキラー T 細胞製剤を予め作製して凍結保存しておき、必要な時に解凍して投与するという治療法が可能になります。ただしこの方法は iPS 細胞に TCR 遺伝子を導入する必要があり、安全性の担保をいかにするかが重要な課題になります。

日本は抗体製剤の開発競争では世界に大きく遅れをとりましたが、再生 T 細胞療法は、現時点では世界をリードしています。今後も日本発のこの技術を発展させ、優位性を保ちたいと考えています。また、今回開発した方法は、白血病を想定した研究でした。しかし、同じ方法が、他にいろいろながんにも応用可能と考えています。

<研究プロジェクトについて>

本研究は日本医療研究開発機構(AMED)の p-direct 事業、レグセル株式会社、アストリム株式会社(2015年12月まで)の支援を受けています。

<論文タイトルと著者>

タイトル: Regeneration of CD8 α β T cells from T cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity

著者: Takuya Maeda, Seiji Nagano, Hiroshi Ichise, Keisuke Kataoka, Daisuke Yamada, Seishi Ogawa, Haruhiko Koseki, Toshio Kitawaki, Norimitsu Kadowaki, Akifumi Takaori-Kondo, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto

掲載誌: *Cancer Research*