

平成 29 年 4 月 20 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点  
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：滋賀医科大学・生化学分子生物学講座

職名：教授

氏名：縣 保年

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：iPS 細胞技術とゲノム編集を用いた効率のよいがん抗原特異的キラーT 細胞の再生
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：河本 宏
3. 研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

本研究は、がん抗原特異的 T 細胞から iPS 細胞技術を用いてキラー T 細胞を再生する方法をより発展させることを目的として、がん抗原特異的な T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を直接 iPS 細胞に導入することにより、効率よく再生 T 細胞を作製することを目指す。まずがん抗原特異的 T 細胞をセルソーターで分取し、シングルセルから完全長の TCR  $\alpha$  と TCR  $\beta$  遺伝子をセットで、5'RACE 法によって効率よくクローニングする方法を確立した。同様に WT1 がん抗原に特異的なキラー T 細胞クローンから単離した TCR  $\alpha$  と TCR  $\beta$  遺伝子を、自己開裂型 p2A ペプチドでつないだ融合遺伝子としてレンチウイルスベクターに挿入し、T 細胞への分化誘導能が高い高品質な iPS 細胞に直接遺伝子導入を行った。得られた TCR 遺伝子導入 iPS 細胞 (TCR-iPS 細胞) を T 細胞へ分化誘導し、再生した T 細胞が、機能的ながん抗原特異的 TCR を発現することや、がん抗原特異的ながん細胞を傷害する活性を有することを確認した (図 1)。

一方、TCR-iPS 細胞から分化誘導した T 細胞では、TCR の発現レベルが元のがん抗原特異的 T 細胞と比較するとやや低いことや、レンチウイルスを用いた遺伝子導入では、挿入部位によるがん化のリスクを完全には否定できないことから、ゲノム編集とカセット交換法を用いた効率のよい TCR  $\alpha/\beta$  遺伝子の内在性 TCR  $\beta$  遺伝子座へのノックインを試みた (図 2)。まず Cre 組換え酵素の標的で、配列の異なる lox2272 と loxP 配列を Hygromycin 耐性遺伝子の前後に配置

し、その下流に開始コドンを含み Puromycin 耐性遺伝子とチミジンキナーゼ (TK) 融合遺伝子と、FLP 組換え酵素の標的である frt 配列を配置したカセットを作製した。その上流に、活性が高い V  $\beta$  20-1 プロモーターを含む配列を 5'アームとして付加し、下流にはエンハンサーを含む配列を 3'アームとして付加したターゲティングベクターを構築した。次にアームの内側にニックを導入する CRISPR ガイド RNA を設計し、Cas9 ニッカーゼ (Cas9n) と共発現するベクターを構築し、ターゲティングベクターとともに iPS 細胞へ遺伝子導入する。ただし iPS 細胞では T 細胞へ分化誘導しないと TCR が発現しないので、まず実験系を確立するために T 細胞性白血病由来の Jurkat 細胞を用いてノックインを試みた。

Jurkat 細胞に CRISPR/Cas9n ベクターをターゲティングベクターとともに遺伝子導入し、Hygromycin で選択したのち、複数のクローンを得た。正しくノックインされているか調べたところ、V  $\beta$  20-1 プロモーターを含む 5'アーム側のゲノム領域では相同組み換えが起きたが、カセットと 3'アームの 3'側にベクターが付いた状態で挿入され、エンハンサーを含む 3'アーム側のゲノム領域でも相同組み換えが起きたが、カセットと 5'アームの 5'側にベクターが付いた状態で挿入され、正しいノックインは起きていないことがわかった。これはおそらく 2 カ所の切断部位が約 180kb 離れていることから、180kb を欠失するような形でノックインすることは難しいためであると考えられた。

そこで確実にノックインするために切断部位を 1 カ所にして、Jurkat 細胞で再構成している TCR  $\beta$  遺伝子座へ導入することを試みた。具体的には図 3 のようなターゲティングベクターを構築し、CRISPR/Cas9n ベクターとともに遺伝子導入し、Hygromycin で

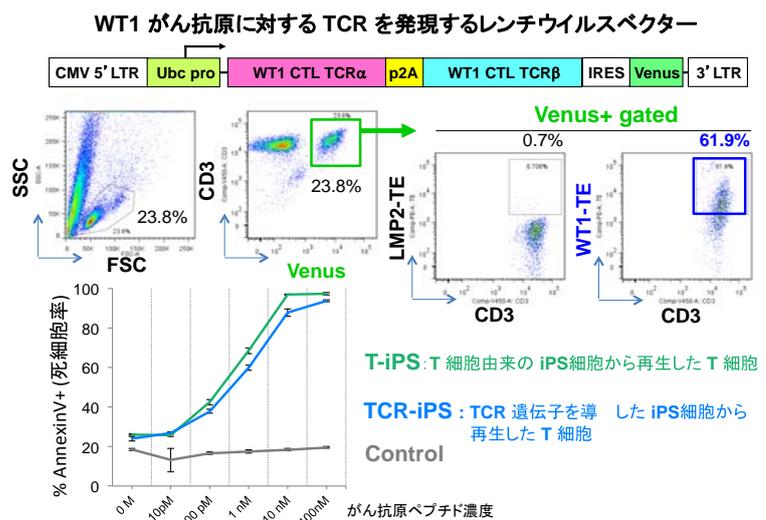


図1 CR-iPS 細胞から再生した T 細胞はがん細胞を傷害する

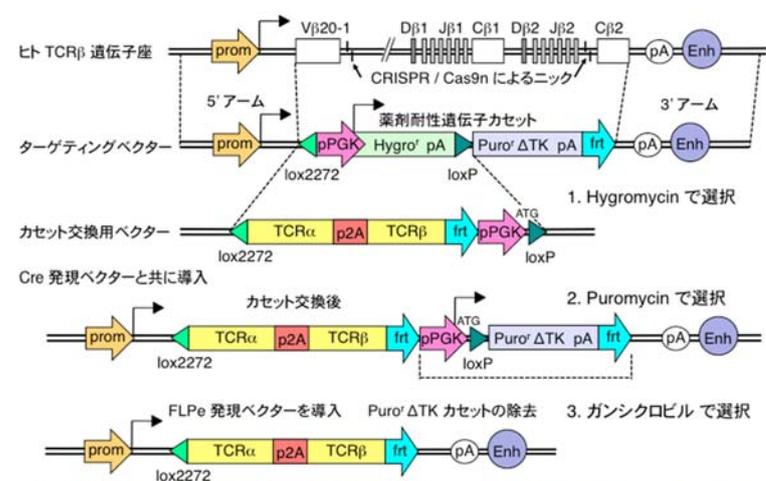


図2 がん抗原特異的 TCR $\alpha/\beta$  融合遺伝子の TCR $\beta$  遺伝子座へのノックイン

選択し複数のクローンを得た。そのうち正しくノックインされたクローンが得られ、ノックインの結果 TCR の発現が消失していることも確認された。

次に WT1 がん抗原に特異的な TCR  $\alpha$  と TCR  $\beta$  遺伝子を、自己開裂型 p2A ペプチドでつないだ融合遺伝子の前に lox2272 配列を付加し、下流に frt

配列、PGK プロモーターと開始コドンをつけた loxP 配列を付加したカセット交換用ベクターを構築した。これを Cre 発現ベクターとともに上記の薬剤耐性遺伝子カセットがノックインされた Jurkat 細胞へ遺伝子導入を行った。lox2272 と loxP 配列はそれぞれの間でのみ Cre によって組換えが起こるため、Hygromycin 耐性遺伝子と、TCR  $\alpha$ -p2A-TCR  $\beta$  遺伝子が交換されるとともに、PGK プロモーターと開始コドンの付加によって Puro-TK 遺伝子が発現するようになる。Puromycin で選択したコロニーから正しい組換えが起きたものを得る（現在進行中）。

正しく TCR  $\alpha$ -p2A-TCR  $\beta$  遺伝子が導入された Jurkat 細胞に、FLPe 組換え酵素発現ベクターを導入し、frt 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する。得られたコロニーから正しい欠失が起きたものを得る。得られた Jurkat 細胞において、導入した WT1 がん抗原特異的 TCR  $\alpha/\beta$  が発現するかテトラマーを用いて解析する。発現が確認できれば、iPS 細胞でも同様の手順で実験系が正しく行われることが予想できることから、iPS 細胞用のターゲティングベクターを構築し、CRISPR ガイド RNA と Cas9n を共発現するベクターとともに iPS 細胞へ遺伝子導入を行い、同様の実験を行う。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

第 75 回日本癌学会学術総会 シンポジウム 2016 年 10 月 7 日

Regeneration of tumor antigen-specific T cells using the iPSC technology :

A novel method of allogeneic T cell therapy

演者 河本 宏

7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference シンポジウム 2017 年 3 月 17 日

Regeneration of CD8 $\alpha\beta$  type T cells with potent tumor antigen-specific cytotoxic activity from T cell-derived iPSCs

演者 河本 宏

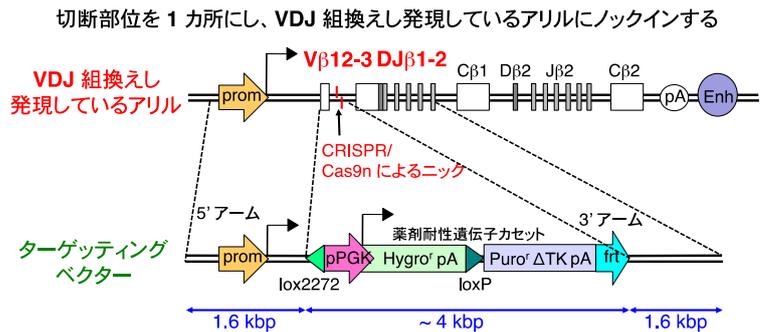


図3 Jurkat 細胞の再構成した TCR $\beta$  遺伝子座へのノックイン

7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference ポスター発表 2017年3月16日

iPSCs transduced with WT1-TCR gene give rise to potent CTLs with antigen specific cytotoxic activity comparable to those from T-iPSCs

演者 前田卓也

特許：出願準備中