

平成30年5月29日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成29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

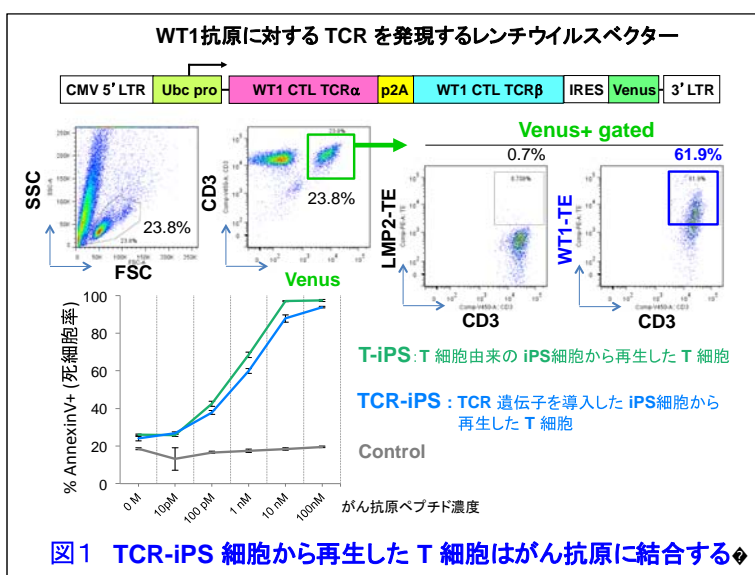
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：河本 宏

3. 研究期間：平成29年4月1日～平成30年3月31日

4. 研究経過及び研究成果：

1) 5'RACE法によるシングルセルからのTCR α 鎖とTCR β 鎖遺伝子のクローニング

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した。まずがん抗原特異的なキラー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 α 鎖とTCR β 鎖の遺伝子をセットで、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 α と TCR β 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、がん抗原特異的にがん細胞を傷害する活性を有することを確認した (図 1)。

2) ゲノム編集を用いた効率のよい TCR 遺伝子の内在性 TCR β 遺伝子座へのノックイン

① CRISPR/Cas9n を用いた薬剤耐性遺伝子カセットの TCR β 遺伝子座へのノックイン

単離した TCR α と TCR β 遺伝子を内在性の TCR β 遺伝子座へ直接ノックインすることも考えられたが、様々な TCR α と TCR β 遺伝子を次々にノックインしていく必要性が生じると予想されたため、ゲノム編集によるノックインとカセット交換法という方法を組み合わせることを考案した。すなわち、薬剤耐性遺伝子からなるカセットを予め内在性 TCR β 遺伝子座へノックインしたのち、Cre/loxP システムにより様々な TCR α と TCR β 遺伝子を次々に交換反応で組み換えるという方法である (図 2)。

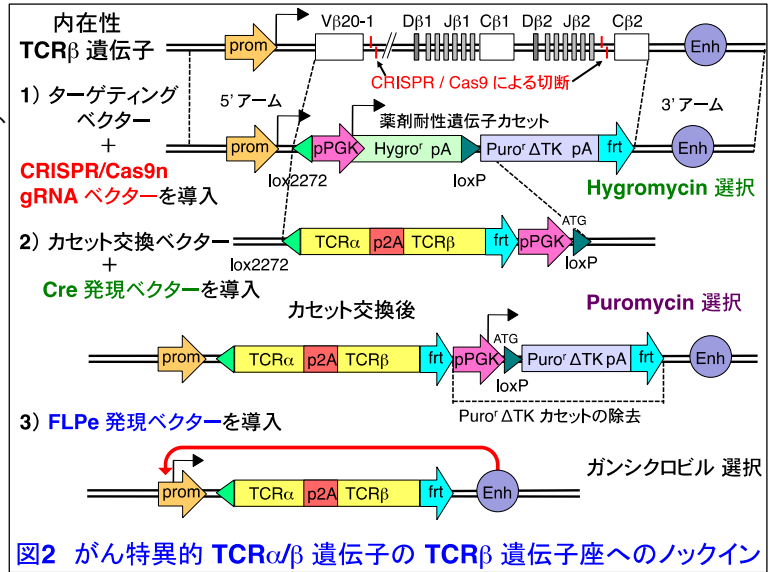


図2 がん特異的 TCR α/β 遺伝子の TCR β 遺伝子座へのノックイン

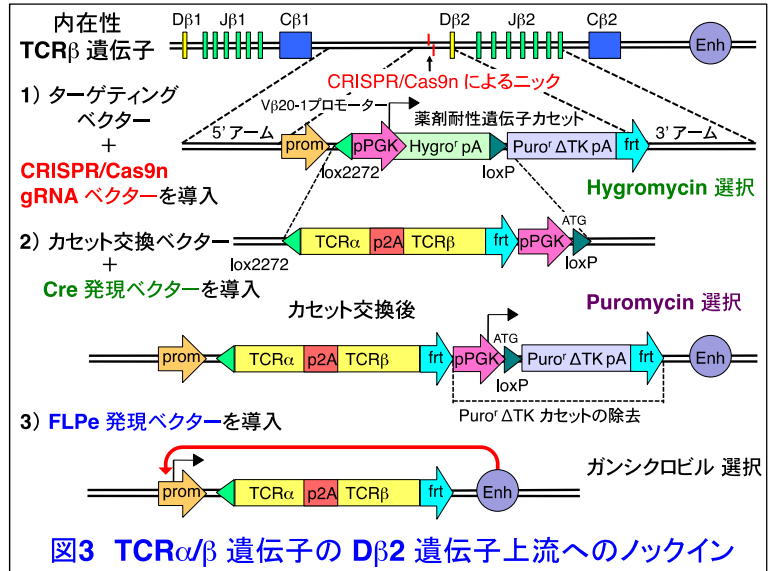
そのために、まず PGK プロモーターでドライブされる Hygromycin 耐性遺伝子の前後に、Cre 組み換え酵素の標的で、配列の異なる lox2272 と loxP 配列を配置し、その下流に開始コドンを含み Puromycin 耐性遺伝子とチミジンキナーゼ (TK) の融合遺伝子と、FLP 組み換え酵素の標的である frt 配列を配置した薬剤耐性遺伝子カセットを作製した。さらにその上流に、T 細胞における転写活性化能が高い V β 20-1 遺伝子のプロモーターを含む相同領域を 5'アームとして付加し、下流にはエンハンサー (Enh) を含む相同領域を 3'アームとして付加したターゲティングベクターを構築した。次にアームの内側 2カ所にニックを導入する CRISPR ガイド RNA と Cas9 ニッカーゼ (Cas9n) を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、ヒト T 細胞性白血病由来の Jurkat 細胞を用いて薬剤耐性遺伝子カセットのノックインを試みた。

Jurkat 細胞にターゲティングベクターを CRISPR/Cas9n 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 PCR により調べたところ、V β 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'側にはベクターが付いた状態で挿入されていた。他方、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'側には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。

そこで確実に相同組み換えを起こさせるために、切断部位を 1 カ所にしてノックインを行うこととした。具体的には、VDJ 組み換えを起こし再構成している TCR β アリルに変異が入り TCR β 鎖が発現しない Jurkat β 変異細胞株を用いて、D1J1 組み換えまでで再構成が停止している TCR β アリルの D β 2 遺伝子上流にノックインすることを試みた (図 3)。

そのために、Hygromycin 耐性遺伝子上流に V β 20-1 遺伝子のプロモーターを付加し、さらにその上流に、内在性 TCR β 遺伝子座の D β 2 遺伝子上流の相同領域を 5'アームとして付加し、下流には D β 2, J β 2 遺伝子を含む相同領域を 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 D β 2 遺伝子上流にニックを導入する CRISPR ガイド RNA と Cas9n を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 Jurkat β 変異細胞へ遺伝子導入した。Hygromycin で選択したのち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か PCR で解析したところ、薬剤耐性遺伝子カセットが正しくノックインされたものを複数得ることができた。



② カセット交換法による TCR α -p2A-TCR β 融合遺伝子の TCR β 遺伝子座への挿入

次に WT1 抗原特異的な TCR α と TCR β 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、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 β 変異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 によって組み換えが起こるため、Hygromycin 耐性遺伝子と TCR α -p2A-TCR β 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 で選択したクローンのうち調べたもの全てで正しい組み換えが起きていた。

③ FLP 組換え酵素による Puro-TK 遺伝子の欠失

正しく TCR α -p2A-TCR β 遺伝子が導入された Jurkat β 変異細胞では、PGK プロモーターによって Puro-TK 遺伝子が発現しているため、内在性 TCR β 遺伝子座のエンハンサー (図 3 Enh) が V β 20-1 プロモーターに作用することができず、導入された TCR α/β 遺伝子は発現しなかった (図 4)。そこで FLPe 組み換え酵素の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した。その結果、Puro-TK 遺伝子が欠失し、内在性エンハンサーが V β 20-1 プロモーターに作用することにより、導入された TCR α/β 遺伝子が発現することが確認できた (図 4)。

Jurkat 細胞を用いた上記の実験系で、導入した外来性のがん抗原特異的 TCR 遺伝子の発現が確認できたことから、iPS 細胞でも同様の手順で実験系が正しくワークすることが予想された。そこで iPS 細胞を用いて、ターゲティングベクターを CRISPR/Cas9n ベクターとともに遺伝子導入を行い、既に薬剤耐性遺伝子カセットのノックインまで終了し、現在カセット交換反応を実施している。

カセット交換法により TCR α -p2A-TCR β 遺伝子が内在性 TCR β

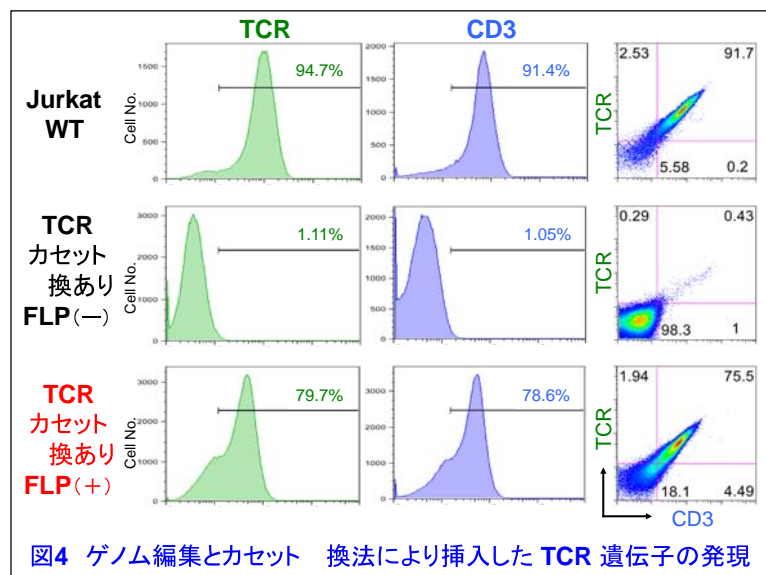


図4 ゲノム編集とカセット交換法により挿入した TCR 遺伝子の発現

遺伝子座へ正しく挿入された iPS 細胞 (TCR-KI-iPS 細胞) が得られたら、以下のようにして T 細胞へ分化誘導する。まず T 細胞分化を誘導する Notch リガンド DLL1 を発現した OP9/DLL1 細胞の上で培養し、さらに抗 CD3 抗体で刺激することで CD8 陽性の成熟キラー T 細胞へと分化誘導する。こうしてできた成熟 T 細胞の WT1 抗原反応性とキラー活性を検討する予定である。

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

発表論文リスト

Ichise H, Nagano S, Maeda T, Miyazaki M, Miyazaki Y, Kojima H, Yawata N, Yawata M, Tanaka H, Saji H, Masuda K, and Kawamoto H. NK cell alloreactivity against KIR ligand-mismatched HLA-haploidentical tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells. Stem Cell Reports. 12;9(3):853-867.2017.

Tenno M, Kojo S, Lawir DF, Hess I, Shiroguchi K, Ebihara T, Endo TA, Muroi S, Satoh R, Kawamoto H, Boehm T, Taniuchi I. Cbfb2 controls differentiation of

and confers homing capacity to prethymic progenitors. *J Exp Med.* 215:595-610. 2018.

学会発表

河本宏「Generation and Regeneration of T cells」 The Molecular Developmental Biology of Lymphocytes, Symposium in honor of Ellen Rothenberg, USA, 2017.4.20

河本宏「Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ type T cells with potent tumor antigen-specific cytotoxic activity from T cell-derived iPSCs」 日本がん免疫学会総会シンポジウム 1 "Immune Cell Engineering", 幕張メッセ国際会議場, 2017.6.29

河本宏「iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT 細胞の再生 —他家移植の系で使える T 細胞製剤の開発— 」 日本肝癌研究会, 京王プラザホテル, 2017.7.6

河本宏「iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT 細胞の再生 —ネオアンチゲンを標的とした個別化医療への応用— 」 第 23 回国際個別化医療学会学術集会, 品川フロントビル会議室, 2017.10.28

嘉島相輝「WT1-specific cytotoxic T lymphocytes regenerated from T cell-derived iPSC cells exert therapeutic effect in xenograft model of renal cellcarcinoma」 Keystone symposia Lymphocytes and their Roles in Cancer (R1) joint with the meeting on Emerging Cellular Therapies: T Cells and Beyond (B6), Keystone resort, 2018.2.12

特許：出願準備中