

令和2年4月23日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2019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

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：2019年4月1日～2020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する。がん抗原特異的なT細胞受容体（TCR）遺伝子をゲノム編集とカセット交換法を用いて、iPS細胞の内在性TCR遺伝子座へノックインすることにより、TCRの生理的な発現時期と高い発現レベルを再現し、それにより高品質でキラー活性の高い再生T細胞を効率よく作製することを試みた。

まず実験系を確立するために、ヒトT細胞白血病株Jurkat細胞に薬剤耐性遺伝子カセットのノックインとカセット交換を行い、導入したTCRを正しく発現させることに成功した。そこでiPS細胞でも、同様に薬剤耐性遺伝子カセットのノックインとカセット交換が起こるか検討を行った。その結果iPS細胞では、薬剤耐性遺伝子カセットが正しくノックインされたクローンは得られたが、カセット交換されたクローンを得ることができなかった。カセット交換されたクローンでは、Puromycin耐性遺伝子がPGKプロモーターにより発現する設計であるが、そのプロモーター活性がiPS細胞では低い可能性が考えられた。そこでPGKプロモーターを、iPS細胞で活性が高いことが知られているEF-1 α プロモーターと交換したところ、正しくカセット交換されたクローンを再現性

よく得ることができるようになった。カセット交換できたクローンにおいて、Puromycin 耐性遺伝子を欠失させたのち、T 細胞へと分化誘導させ、高いがん抗原特異的キラー活性を持つことを見出した。以上のようにして、ゲノム編集とカセット交換法を用いて、iPS 細胞からがん抗原特異的キラーT 細胞を効率よく再生する方法の確立に成功した(論文投稿準備中)。

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

1. 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** 2020 In press.
2. Nagasawa M, **Tomimatsu K**, **Terada K**, Kondo K, Miyazaki K, Miyazaki M, Motooka D, Okuzaki D, Yoshida T, Kageyama S, Kawamoto H, Kawauchi 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**. 2020 Mar 18 doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.043.

学会発表

1. 永野誠治、**寺田晃士**、**近藤遼平**、**縣 保年**、増田喬子、河本 宏. Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method. 第 48 回 日本免疫学会総会 (2019 年 12 月 11-13 日, 浜松)
2. **寺田晃士**、**近藤遼平**、永野誠治、増田喬子、河本 宏、**縣 保年**. Development of an efficient method to introduce TCR genes into the endogenous TCR locus by genome editing and cassette exchange. 第 48 回 日本免疫学会総会 (2019 年 12 月 11-13 日, 浜松)
3. **縣 保年**. iPS 細胞から再生した T 細胞とカニクイザルを用いたがん免疫療法の開発. 多様な新ニーズに対応する「がん専門医療人材(がんプロフェッショナル)」養成プラン 令和元年度「5 大学連携医療フォーラム」(2019 年 9 月 20 日, 京都)