

令和4年5月3日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2021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：2021年4月1日～2022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い、プロモーターの改変等により正しくカセット交換されたクローンを得ることができた。カセット交換できたクローンにおいて、T細胞へ分化誘導させ、高いがん抗原特異的キラー活性を持つことを確認した。これまでは転写活性の高いVβ20-1遺伝子のプロモーターを、外来性に薬剤耐性遺伝子カセットの上流に挿入する形で内在性TCRβ遺伝子にノックインして来た。そこで、より生理的な転写制御状態を実現するために、内在性のVβ20-1遺伝子とD遺伝子間の約700kbを欠失させ、人工的VDJ再構成を起こしたiPS細胞でカセットのノックインを行った。その結果、V-D間領域を欠失させたiPS細胞を作製し、内在性Vβ20-1プロモーター下に薬剤耐性遺伝子カセットをノックインしたクローンを得ることができた。本年度は、それらのクローンを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確認した。

併行して未知のがん抗原を標的とする TCR 遺伝子の単離も試みた。具体的には、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 β 鎖の遺伝子をセットで多数単離した。そのうち出現頻度の高い 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、腫瘍細胞と共培養したところ、腫瘍細胞を殺傷できる TCR 遺伝子を複数同定することができ、これらの研究成果を論文発表した (Terada K et al. **Molecular Therapy – Oncolytics** 2022)。さらにこの方法をヒトの腫瘍に応用するために、河本研において京大産婦人科から卵巣がんサンプルの提供を受け、腫瘍に浸潤する T 細胞のシングルセル RNA-Seq 解析を行い、TCR レパトア解析を行った。現在、出現頻度の高い TCR 遺伝子セットを人工合成し、レトロウイルスベクターへ挿入している。

5. 研究成果の公表

・発表論文リスト

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. (2022) **Molecular Therapy – Oncolytics**. Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating and circulating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model. 24:77-86

・学会発表

Koji Terada, Kenta Kondo, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto, Yasutoshi Agata. Development of “TCR cassette method”: Regeneration of CTLs from iPSCs in which tumor-antigen specific TCR genes can be efficiently introduced into the endogenous TCR locus by cassette exchange. 第 50 回 日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日

Koji Terada, Kenta Kondo, Hirohito Ishigaki, Ayaka Nagashima, Hiroki Satooka, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Teruhisa Kawamura, Takako Hirata, Kazumasa Ogasawara, Yasushi Itoh, Hiroshi Kawamoto, Yasutoshi Agata. Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model. 第 50 回 日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日

Kenta Kondo, Tatsuya Hasegawa, Koji Terada, Yasutoshi Agata. Vitamin C alters gene expression of CD8+ T cells through DNA demethylation. 第 50 回 日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日

寺田晃士、永野誠治、近藤健太、増田喬子、河本 宏、縣 保年. “TCR カセット法”の開発：がん抗原特異的 TCR 遺伝子を内在性 TCR 遺伝子座へ効率よく導入する。第 30 回 Kyoto T Cell Conference, オンライン開催、2021 年 10 月 8-9 日

近藤健太、寺田晃士、石垣宏仁、長嶋彩花、里岡大樹、永野誠治、増田喬子、川村晃久、平田多佳子、小笠原一誠、伊藤 靖、河本 宏、縣 保年. カニクイザルの腫瘍浸潤 T 細胞から腫瘍殺傷能をもつ TCR 遺伝子を単離する。第 30 回 Kyoto T Cell Conference, オンライン開催、2021 年 10 月 8-9 日