

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 胸腺機能の再構成による多様な反応性を持つヒトT細胞の再生
(英語) Regeneration of human T cells with diverse TCR repertoire using induced human thymic epithelial cells

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 濱崎 洋子
(英語) Yoko Hamazaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所・教授
(英語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

(和文)

免疫細胞の一種である T 細胞は、ウイルス感染細胞やがん細胞を直接殺傷できる強力なエフェクターである。がんや感染源が発現する「特定の」抗原に特異的なエフェクターT細胞を *in vitro* で再生させて生体内に戻す免疫再生療法の開発が近年盛んに行われており、既に一部のがんについては治療効果を上げている。しかし、この免疫再生療法が成立するための前提として、ウイルス感染細胞やがん細胞上の適切な標的抗原の同定がなされている必要があり、また特定の抗原を発現しているがんにのみ有効であるという制約がある。さらに大きな問題として、治療の過程で標的抗原の欠失や変異が起こり、移入したT細胞が反応できなくなることによる高い再発率が挙げられる。こうした T 細胞再生療法が抱える課題を克服するためには、T細胞が本来有する「あらゆる抗原を認識しうる能力」を再生することが重要である。生体内では、各々異なる特異性を有する T細胞抗原受容体 (TCR: T-cell receptor) を発現する T細胞がある一定数 (約 1000 億個) 存在することによって、見たこともない、また理論上無限に存在する多様な抗原に反応する能力が保証されている。この多様な反応性を有する T 細胞集団を再生する技術を確立することにより、多種多様な感染源、特に変異を繰り返すウイルスや、突然変異によって治療抵抗性を獲得しながら抗原性を変えていくがんに対して、効率的に免疫系を駆動させる新たな免疫再生療法の開発が可能に

なる。

抗原性を変化させる標的にも漏れなく反応しうる T 細胞の広い反応性は、「胸腺」という免疫臓器においてナイーブ T 細胞が発生する過程でのみ構築可能である。この過程に寄与する胸腺組織の主たるストロマ細胞「胸腺上皮細胞 (Thymic epithelial cell: TEC)」は、未熟な T 細胞の増殖や分化に必要なサイトカインやケモカイン等を産生し、個々人特有の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) を発現しており、T 細胞が自己の MHC に提示された抗原を認識する能力 (MHC 拘束性) と多様な反応性の賦与に必須の役割を果たす。したがって、患者が必要とする機能的な T 細胞を再生するには、MHC 型がマッチした TEC の再生が必須である。そこで本研究では、MHC ハプロタイプの選択肢があるという利点を有する iPS 細胞をソースとし、人工ヒト胸腺上皮細胞 (induced TEC; iTEC) の誘導法の開発、そして iTEC を用いたナイーブ T 細胞再生法の確立を目的とした。この方法が確立すれば、胸腺の機能を模倣してレシピエント由来造血幹・前駆細胞から多様なレパトアを有する新たな T 細胞を再生できるため、がんだけでなく、先天性の免疫不全、胸腺退縮に伴う免疫機能の低下など、広範囲の医療ニーズにおいて適応が可能となり、極めて新規性と汎用性の高い免疫再生療法を提供できる。また、移植 T 細胞への遺伝子導入に伴うリスクと拒絶を回避しうるという点においても革新的である。

これまで報告されているマウスモデルや胎児胸腺の研究論文の知見を活用し、胸腺上皮細胞分化に至るそれぞれの発生過程 Primitive Streak、Definitive endoderm、Anterior foregut endoderm、Pharyngeal endoderm に必要と想定される様々な因子をヒト iPS 細胞株に添加し、各ステップを規定する転写因子や機能的分子の発現を qPCR で確認しながら誘導培養条件の検討を行った。遺伝子発現解析は、京都大学病院との共同研究で入手しているヒト胸腺組織から単離したヒト primary TEC をコントロールに用いた。その結果、培養後期には、TEC のマスター制御因子である FOXP1 だけでなく、皮質上皮細胞に特異的に発現する胸腺プロテアソームサブユニット $\beta 5t$ 、T 細胞系列への運命決定に必要な DLL4、T 前駆細胞の増殖・維持に必要な IL-7、T 前駆細胞の胸腺内移動に重要なケモカイン、さらには最も重要な成熟マーカーである MHCII を、human primary TEC とほぼ同等レベルで発現することが分かった。MHC class II やケラチンなど、抗体が入手可能なものに関しては、フローサイトメトリ解析と免疫染色等を行い、タンパク質レベルでも発現を確認した。さらに培養後期の細胞を回収しシングルセル解析を行ったところ、正の選択を担う皮質 TEC、負の選択を担う髄質 TEC に特徴的な遺伝子発現を有するクラスターが別々に同定され、その一部に MHC II の発現を認めた。これらの結果から、本誘導系により機能の異なる 2 つの lineage の TEC への分化と成熟が起こっていることが確認された。以上、ヒト iPS 細胞から髄質・皮質上皮細胞への分化さらには成熟を誘導可能な iTEC 誘導培養系を確立することができた。

今後、iTEC とヒト造血系細胞との共培養により CD4、CD8 シングルポジティブ細胞 (ナイーブ T 細胞) の誘導法を確立するにあたり、本研究ではさらに、ヒト胸腺から間葉系細胞 (thymic mesenchymal cell; TMC) を単離・拡大培養する方法を開発した。RNA-seq 解析により、プライマリ TMC と拡大培養した TMC の遺伝子発現を比較し、T 細胞の分化支持に必要と想定される代表的な遺伝子群の発現は概ね維持されていることを確認した。この質的に担保された TMC のフリーズストックを作製し、iTEC 誘導のための TMC の安定供給が可能な体制を整えた。また、TEC の成熟と T 細胞分化には三次元の組織様構造が必要であると考えられることから、そのための scaffold として共培養に用いるヒト胸腺の脱細胞化プロトコルの確立を行った。様々な界面活性剤処理等を行うことにより、残存する DNA が 1% 以下で、かつ細胞外マトリックスの構造が維持された 3 D scaffold の作製に成功した。現在、iTEC およびこれらのマテリアルを用いて、多様な反応性を有するナイーブ T 細胞の分化プロトコルの確立を行っている。

(英文)

T cells play a central role in immune responses against viruses and cancers. The development of immunoregenerative therapies, in which T cells targeting specific antigens are regenerated, has been a prime research focus in recent years. The effectiveness of this treatment strategy has been shown already for some cancers, but several problems remain: (1) few target antigens have been identified to date, thus limiting the range of therapeutic targets; and (2) immune escape due to mutation of the target antigens can dramatically reduce or even abolish treatment effectiveness. In contrast, our acquired immune system can theoretically respond to an infinite number of antigens by producing large number of T cells in the body, each with a distinct specificity. The recent success of immune-checkpoint therapy has revealed that targeting specific antigens is not always necessary for targeting against cancers with any mutation. Thus, regenerating a T-cell population that could recognize a broad spectrum of antigens could provide next-generation T-cell immunotherapy.

The broad reactivity of T cells can only be established during the development of naïve T cells in the thymus. Thymic epithelial cells (TECs) are indispensable stromal components for T cell development and selection. TECs express self-MHCs on their surface and instruct developing T cells to recognize antigens only when presented with self-MHC molecules (MHC restriction). Thus, This project aimed to induce human TECs from human iPSC, which are available from desired MHC haplotype donors. As a result, we have developed a culture system that recapitulates the developmental processes leading to thymic epithelial cell differentiation from hiPSC based on the knowledge from mouse models and human fetal thymus research. The expressions of transcription factors and functional molecules that define each step were confirmed by qPCR analysis using human primary TECs as controls. Importantly, iTECs expressed TEC markers such as FOXN1, proteasome (b5t), DLL4, and IL-7 as well as maturation markers such as MHCII in the late stages of culture at comparable levels to primary human TECs. A scRNA-seq experiment using these iPS cell-derived TEC further confirmed the differentiation and divergence of mTEC- and cTEC-like cells, which were positioned in different clusters with unique gene expression profiles. In conclusion, we have established an iTEC induction system to induce differentiation and maturation of human iPS cells into medullary and cortical epithelial cells.