

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 超汎用性即納型 T 細胞製剤の開発
(英語) Development of super universal T cell medicine

研究開発実施期間: 令和元年 10 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日(予定)

研究開発代表者 氏名: (日本語) 河本 宏
(英語) Hiroshi Kawamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学 医生物学研究所 再生免疫学分野 教授
(英語) Laboratory of Immunology, Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University
Professor

II 研究開発の概要

1. 目標

本課題では、誰にでも投与できる T 細胞製剤の開発に取り組んできた。現行の T 細胞療法では患者の T 細胞を材料にしているが、そのような「自家」T 細胞製剤は、細胞数が限られる、高価、時間がかかる、品質がばらつくなどの問題があった。この問題を解決するために、多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）から「他家」T 細胞を量産する技術を開発してきた。しかし、他家細胞の場合、HLA 型（白血球の血液型）が一致しないと、患者の T 細胞によって拒絶される。HLA を欠失させたら T 細胞による拒絶は防げるが、今度は NK 細胞による拒絶が起こる。本課題では、HLA 欠失細胞に対する拒絶反応を抑える技術の開発を主軸に、腫瘍浸潤 T 細胞を効率良く再生する方法等の開発を進めてきた。より具体的には、以下の 3 つの技術を開発することとした。

- 1) HLA を欠損しても NK 細胞による拒絶されないようにする技術
- 2) 多能性幹細胞あるいは成熟 T 細胞において TCR や CAR を容易にかつ安全に入れ替えられる技術
- 3) 多能性幹細胞からヘルパー T 細胞を作製する技術

2. 成果のまとめ

1) NK細胞による拒絶されないようにする技術

そもそも患者の免疫細胞による拒絶は、投与される細胞の HLA が患者と合致しないことが主因である。それならば、「HLA を欠失させてしまえば良いのでは」という話になる。HLA の発現を喪失させるためには、通常はクラス I の場合は B2M 遺伝子、クラス II の場合は転写制御に関わる CIITA を KO する方法が取られる。これにより T 細胞の攻撃を回避することができるが、今度は NK 細胞がクラス I を喪失したことを感知して攻撃するようになる。NK 細胞はクラス I 分子をリガンドとする抑制性レセプターで抑制されているため、クラス I 欠損細胞は攻撃対象になるのである。この NK 細胞が発現している抑制性レセプターには複数種類がある。しかも、NK 細胞の中でそれぞれのレセプターの陽性細胞の割合は多くの場合 20-30% 程度である。また、ランダムな組み合わせで発現するという特性を有している。このため、一種類の抑制性レセプターに強力なシグナルを入れることができたとしても、NK 細胞全体を抑制することにならない。そのために、多くのグループがいろいろな方策を提唱しているが、決め手に欠ける状況である。本研究では、上記の問題点を克服する方法の開発に成功した。従って、当初の目標は達成できたと考えている。

2) TCR/CARを安全かつ容易に入れ替える技術の開発

本研究の代表者らによって発明された特許技術の中に「TCR-iPS 細胞法」と呼んでいる技術 (PCT/JP2015/070623) があり、これが今回の開発研究の基盤になっている。これは ES/iPS 細胞に T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子を導入した細胞を作製し、その細胞を材料にして T 細胞を作製するという技術である。汎用性他家 T 細胞療法の基本特許になっている。欧州、豪州、日本で成立しており、中国、米国では審査中である。

この TCR-iPS 細胞法を発展させた方法として、本研究が始まる直前に出願した技術が「TCR カセット法」(PCT/JP2019/029537) である。本研究の開発はこれをさらに発展させ、新たな特許技術を生み出すことにあった。

以下に TCR カセット法について解説する。TCR-iPS 細胞法ではレンチウイルスを用いてゲノム中にランダムに TCR 遺伝子を挿入しているため、1) ゲノムの損傷のリスクがある、2) 発現レベルが安定しない、という欠点があった。本発明は、TCR 遺伝子を本来の TCR 遺伝子座に挿入し内因性のエンハンサーとプロモーターによる遺伝子発現制御を受けられるようにするものである。さらにカセットデッキ構造をまず挿入することにより、のぞむ TCR 遺伝子をカセットテープのように挿入するという方法も取り入れた。

この発明は、まず日本で 2023 年に特許として成立した。他の地域ではまだ審査中であるが、成立する可能性

は高いと考えている。

本研究では、この方法を「腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を再生する」という方法に応用することを目指した。多能性幹細胞において TCR 遺伝子を挿入する方法であったが、TIL から得られる TCR は患者毎に異なるので、本研究では「成熟 T 細胞」において TCR 遺伝子を入れ替える方法の開発を行った。さらに TIL の中の高頻度に存在する TCR をそのまま再現しようと考えているので、候補となる TCR が複数個 (10 個-20 個というオーダー) あることになる。それらをベクターに入れた後、ベクターが混在したままでも TCR 遺伝子を挿入できる方法の開発を目指した。複数のベクターが混在する形で挿入を行うため、「TCR カクテル法」と呼んでいる。

この技術の特徴は、以下の 2 点である。

i) カセットデッキ構造を 1 箇所だけとした。2 箇所入れると、二つの TCR 遺伝子が入ってしまう可能性が生じるからである。

ii) カセットテープを交換後、交換に成功した細胞を選択するために、カセットデッキにはあらかじめ既存のマーカを入れておき、交換の操作を行なった後はそのマーカー陰性細胞として単離する。

上記の構造を入れた Jurkat 細胞株を用いて TCR の入れ替えに成功した。マーカーとしては既存の TCR 遺伝子を用い、その TCR の発現は、テトラマーで測定した。このデータを用いて、2020 年 9 月 24 日に出願を行なった。

請求項は、以下のように原理的な要素を記した。従って、TCR 遺伝子以外のカセットテープ交換であってもカバーできるに内容になっている。

【請求項 1】 エフェクター細胞への分化能を有する材料細胞であって、当該材料細胞のゲノム内に一組の組換え酵素標的配列および該標的配列の間にマーカータンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカータンパク質が発現可能なように有している材料細胞を提供する工程、該材料細胞を増殖する工程、該材料細胞をエフェクター細胞あるいはその前駆細胞へ分化誘導する工程、および該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞を、該組換え酵素標的配列と同一の一組の組換え酵素標的配列および該一組の組換え酵素標的配列の間に所望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ交換用ベクターと共に組換え酵素の存在下で培養して、マーカータンパク質遺伝子を所望のタンパク質をコードする遺伝子と交換する工程を有する、所望のタンパク質を発現するエフェクター細胞の製造方法。

【請求項 2】 さらに、マーカータンパク質陰性細胞を選択することによって、所望のタンパク質を発現するエフェクター細胞あるいはその前駆細胞を選択する工程を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

マーカータンパク質が、エフェクター細胞あるいはその前駆細胞の表面に発現する既知のリガンドまたはレセプターである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

マーカータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

1 の材料細胞のゲノム内に、1 のカセットテープ遺伝子のみに有している、請求項 1 ~ 4 何れかに記載の方法。

【請求項 6】

マーカータンパク質のカセットテープ遺伝子を含むエフェクター細胞あるいはその前駆細胞群と、複数種のカセットテープ交換用ベクターを同時に組換え酵素の存在下で培養し、別個のタンパク質を発現するエフェクター細胞を複数種類同時に製造する、請求項 5 に記載の方法。

出願の一年後、再生 T 細胞で TCR 遺伝子を入れ替えを行うデータと、RCME 法に加えてゲノム編集法で TCR 遺伝子を入れ替えるデータを追加し、2021 年 9 月に PCT 出願を行なった (PCT/JP2021/035150)。

出願以後は再生 T 細胞におけるカセット交換の効率の改良を行い、各年度に設定したマイルストーンは達成で

きた。当初の目標は達成できたと考えている。

3) 多能性幹細胞からヘルパーT細胞を作製する技術

本研究の申請当時、河本研で行っていた多能性幹細胞からT細胞を誘導する培養法では、キラーT細胞しか生成しなかった。一方で、現在世界中で広く行われている自家T細胞を材料にしたCAR-T細胞療法では、キラーT細胞とヘルパーT細胞が混ざった状態で用いられている。これは、ヘルパーT細胞が存在していた方が効果が高いことが示されているからである。そこで、本研究では、ヒト多能性幹細胞からヘルパーT細胞を作製する方法の開発を目指した。

まず培養法を検討した。ヘルパーT細胞のTCRはHLAクラスIIと結合してシグナルを入れることができ、一方キラーT細胞のTCRはHLAクラスIと結合してシグナルを入れることができることが知られている。現行の誘導法では、CD4CD8共陽性(DP)の未分化T細胞にCD3抗体でTCRを介したシグナルを加えるという方法をとっている。この方法だと、特にHLAクラスIとかクラスII分子を用いた刺激ではないが、どういう訳かキラーT細胞だけが生成する。

ヘルパーT細胞とキラーT細胞の振り分けは、TCRを介したシグナルの長さ(duration)によるものであることが知られている。DP細胞においてTCRシグナルが一時的に入ってすぐに途切れるとキラーT細胞、長期間(2日以上とか)続くとヘルパーT細胞になることが知られている。そこでCD3抗体による刺激が途切れないように抗体の量を増やす、継続的に一定の刺激が入るような工夫を加えたが、効果はなかった。キラーT細胞になるとIL-7などのサイトカインシグナルが重要な役割を果たすということも知られている。そこで、サイトカインの量を増やすなどの様々な工夫を加えたが、これも効果がなかった。

培養法の改変により効果が得られなかったことから、培養法を変えるのではなく、材料である多能性幹細胞において遺伝子改変を行うことにした。キラーT細胞が生成する過程においてヘルパーT細胞の分化プログラムが発動するように遺伝子改変したマウスを作製したところ、キラーT細胞がヘルパーT細胞に運命転換する現象が観察され、この戦略が有効であることが示唆された。従って当初の目的は一定程度に達成できたと考えている。

英文

In this project, we have been working to develop a T-cell medicine that can be administered to anyone. Current T-cell therapies use the patient's T-cells as the material, but such "autologous" T-cell medicine have problems, such as limited number of cells, high cost, time-consuming, and unstable quality. To solve this problem, technologies have been developed to mass produce "allogeneic" T cells from pluripotent stem cells (ES /iPS cells). However, in the case of allogeneic cells, if the HLA type (blood type of white blood cells) does not match, they are rejected by the patient's T cells. If the HLA is completely deleted, rejection by T cells can be prevented, but this time rejection by NK cells will occur. In this project, the main focus has been on the development of technologies to suppress rejection against HLA-deleted cells, including methods to efficiently regenerate tumor-infiltrating T cells. More specifically, we have decided to develop the following three technologies: 1) technology to prevent rejection by NK cells even when HLA is deleted; 2) technology to easily and safely replace TCR and CAR in pluripotent stem cells or mature T cells as the source line; and 3) technology to generate helper T cells from pluripotent stem cells. (3) Technology to generate helper T cells from pluripotent stem cells.

Due to the failure to obtain potent ES cell line, the target cells were changed from ES cells to iPS cells for the first two years, but the plan was changed back to ES cells again after the discovery of ES cells with desirable characteristics. Regardless of this delayed the project, we were able to achieve the goals of 1) technology to prevent rejection by NK cells even if HLA is defective, and 2) development of a method to replace antigen receptors; during this period we were able to file an application for a new technology, the "TCR cocktail method". 3) The development of a method to generate helper T cells also achieved its initial goal.

Here we describe in more detail for subject (2) mentioned above. We aimed to apply this method to regenerate tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). In the preceding "TCR cassette method", The TCR gene was inserted in pluripotent stem cells, but since the TCR obtained from TILs differs from patient to patient, we developed a method to replace the TCR gene in "mature T cells" in this study. In addition, since we are trying to reproduce the TCRs that are frequently present in TILs, there are multiple candidate TCRs (on the order of 10-20). Thus, we aimed to develop a method to insert multiple TCR genes even if the vectors are mixed, which we call it the "TCR cocktail method.

This technology is characterized by the following two points.

- i) Only one cassette deck structure was used, because inserting two cassettes would result in the possibility of two TCR genes being inserted.
- ii) To select cells that were successfully exchanged after the cassette tape was replaced, the cassette deck was originally inserted with existing markers, and the cells were isolated as marker-negative cells after the replacement operation was performed.

Showing the data obtained by using Jurkat cell line, an application was filed on September 24, 2020. One year after filing the application, we added data on TCR gene replacement in regenerated T cells and data obtained by the genome editing in addition to the RCME method, and filed a PCT application in September 2021 (PCT/JP2021/035150).

Since the application was filed, we have improved the efficiency of cassette exchange in regenerated T cells and achieved the myelostone set for each fiscal year. We believe we have achieved our initial goals.