

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「iPS/アニマルモデル」

(iPS 細胞技術を用いて再生した WT1 抗原特異的 T 細胞の有効性/安全性の検証)

2. 研究開発代表者：国立大学法人京都大学 再生医科学研究所 河本 宏

3. 研究開発の成果

【計画の概要】本研究では、iPS 細胞を用いた新しい T 細胞のクローニングと増幅法を提供することを目的とした。本研究では、まずがん抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) から iPS 細胞を作成する (T-iPS 細胞)。この T-iPS 細胞には再構成された T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子が受け継がれるので、その T-iPS 細胞から T 細胞を再生させると、全ての再生 T 細胞は元と同じ TCR を発現する。このようにして、新鮮な再生 T 細胞必要なだけつくるという戦略である。本申請の 2 年間の目標として、「WT1 抗原特異的な T-iPS 細胞から再生した CTL の有効性、安全性を検定する」を掲げた。具体的には、免疫不全マウスを用いて、再生 CTL が生体内でがん細胞を見つけて殺傷できるかどうかを調べた。また、がん化するあるいは標的外の反応性を持つようになるなどの危険性が発生しないかどうかを検定した。さらに、TCR 遺伝子を iPS 細胞に導入した細胞 (TCR-iPS 細胞) を作製することと、その TCR-iPS 細胞から CTL を再生することを目標とした。

【成果の概要】全体としては、ほぼ計画通りに研究が進んだ。WT1-T-iPS 細胞から再生した CTL で動物実験で有効性と安全性が確認できた。また、現在臨床試験で用いられている TCR 遺伝子を用いた WT1-TCR-iPS 細胞の作製と、その WT1-TCR-iPS 細胞から CTL を再生することに成功した。

1) WT1-T-iPS 細胞由来再生 CTL の有効性/安全性の動物モデルによる検定

平成 26 年度に整備した白血病細胞播種免疫不全マウスモデルによる評価法を用いて、27 年度には WT1-T-iPS 細胞 (クローン#3-3) から再生した CTL の有効性/安全性を検定した。WT1 抗原陽性白血病細胞株 (HL60) を免疫不全マウスに腹腔内投与し、翌日から再生 CTL を週に 1 回、計 4 回腹腔内投与した。その結果、延命効果が認められた。一方、移入した細胞は GVHD を起こす事もなく、また移入細胞は最長 6 ヶ月の観察で白血病化することも認められなかった。すなわち、動物モデルで再生 CTL の有効性と安全性を検証できた。

2) WT1-TCR-iPS 細胞の作製と CTL の再生

平成 26 年度には自前の WT1-T-iPS 細胞由来の TCR を遺伝子導入して WT1-TCR-iPS 細胞を作製した。27 年度は、WT1-TCR-iPS 細胞から再生した CTL はほぼ全てがテトラマー陽性である事が確認し、また白血病細胞を殺傷する能力を有することを確認した。さらに、安全性と有効性などがすでに評価されている TCR として愛媛大学の安川らが単離した WT1 特異的 TCR の遺伝子を入れて WT1-TCR-iPS 細胞を作製し、この WT1-TCR-iPS 細胞から CD8T 細胞の再生に成功した。

【分担研究者の成果の概要】

1) 研究開発分担者 増田喬子

平成 26 年度に作製した WT1-T-iPS 細胞および WT1-TCR-iPS 細胞の各クローンについて、i) 幹細胞遺伝子発現 profile を RT-PCR および免疫染色で評価、ii) 外来性の山中因子の残存がないかを検定、iii) 染色体異常がないか解析、iv) 多能性を保持しているかを奇形腫の形成能の測定により検証し、品質に問題がないことを確認した。

2) 研究開発分担者 北脇年雄

HLA-A*24:02 陽性の WT1 発現急性骨髄性白血病細胞株をターゲットとして、WT1-T-iPS 細胞から再生した CTL の細胞傷害活性を計測し、CTL の細胞数依存的な細胞傷害活性を認めた。

3) 研究開発分担者 門脇則光

HLA-A*24:02 陽性の WT1 発現急性骨髄性白血病細胞株をターゲットとして、WT1-TCR-iPS 細胞から再生した CTL の細胞傷害活性を計測し、CTL の細胞数依存的な細胞傷害活性を認めた。