

2023年12月13日

## iPS細胞由来レジデントメモリーT細胞で子宮頸がん治療

— 健康人由来 ゲノム編集技術で拒絶反応軽減 —

順天堂大学大学院医学研究科 血液内科学の古川芳樹大学院生、石井翠助教、安藤美樹教授、細胞療法・輸血学の安藤純教授、産婦人科学の寺尾泰久教授、およびスタンフォード大学医学部幹細胞生物学・再生医療研究所の中内啓光教授らの共同研究グループは、健康な人から樹立した iPS 細胞にゲノム編集を行うことで、その iPS 細胞から作製したヒトパピローマウイルス\*1 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)\*2 が、患者の免疫細胞から拒絶されずに子宮頸がんを強力に抑制できることを明らかにしました。さらに、その iPS 細胞由来 CTL\*3 が大量の組織レジデントメモリー T 細胞\*4 を含むために高い細胞傷害活性を持つことを解明したことより、難治性子宮頸がんに対して、有望な新規治療法となりうる可能性を示しました。本成果は、来夏にも開始を予定している子宮頸がんを対象とした iPS 細胞由来 CTL 療法の医師主導治験の基礎的データとなるものです。

本論文は、Cell 系の学術雑誌「Cell Reports Medicine」のオンライン版で 2023 年 12 月 12 日付け（米国東部時間）で先行公開されました。

### 本研究成果のポイント

- 健康人由来 iPS 細胞をゲノム編集することで、同種免疫反応を軽減した CTL の作製に成功
- その iPS 細胞由来 CTL は豊富に組織レジデントメモリー T 細胞を含むため、もとの CTL と比較して、より強力に子宮頸がんを抑制できることを発見

### 背景

子宮頸がんは、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染が原因で発症します。先進国ではワクチンの普及により患者数、死亡率ともに減少している中、国内では増加傾向が続いており、年間 1 万人以上の患者が新たに子宮頸がんと診断され、約 3,000 人が死亡しています。国内では子宮頸がんワクチン接種率は依然 15% 以下と低迷しており、20-30 歳代における子宮頸がん発症数増加は特に深刻な問題です。子宮頸がんはマザーキラーと呼ばれ、結婚、妊娠、子育て世代の若い女性の場合、その進行は極めて速く予後不良であるため、有効な新規治療法開発が必要です。研究グループは、2020 年に子宮頸がんに対する iPSC 由来 HPV 抗原特異的 CTL (HPV-CTL) の開発に成功し、その持続的で強力な抗腫瘍効果を証明しました。しかし、抗がん剤治療中の子宮頸がん患者血液からの CTL 作製は難しく、また時間がかかり、さらに作製には高額なコストがかかることが実用化に向けた課題でした。一方で、健康人の CTL から樹立した他家 iPS 細胞を用いると上記の問題は解決する一方で、患者免疫細胞からの同種免疫反応が起こり、抗腫瘍効果が減弱する問題が生じます。そのため、研究グループはこの問題を解決するために、CRISPR/Cas9 技術\*5 を用い、HLA\*6 クラス I をゲノム編集した健康人由来他家 HPV-CTL の開発を試みました。

## 内容

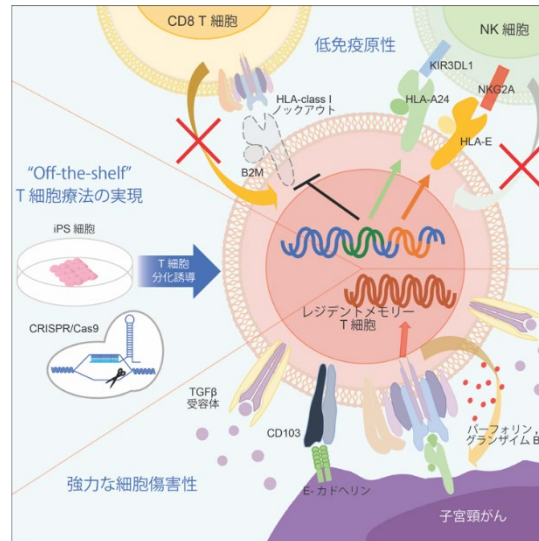
本研究では、はじめに HPV-CTL を健常人の末梢血より誘導後、iPS 細胞を樹立しました。続いて、患者免疫細胞から攻撃されないようにするために、iPS 細胞の HLA クラス I 抗原を編集しました。ゲノム編集は、臨床で用いる細胞を作製するため安全面に配慮して、オフターゲット作用<sup>\*5</sup>が少ない CRISPR/Cas9 二段階編集法を用いることにしました。まず、HLA クラス I 分子の存在に重要な B2M 遺伝子をノックアウトして HLA クラス I 抗原の発現を消失させることで、患者免疫 T 細胞から攻撃されないようにしました。しかしこれだけでは患者 NK 細胞(ナチュラル・キラー細胞)は HLA クラス I 抗原の発現のない細胞を攻撃するため、次に攻撃を回避できるようにいくつかのクラス I 分子を強制的に発現させました。NK 細胞と抑制性の結合をすることで知られる HLA-E と HLA-A24 の両分子を発現させることで、効果的に NK 細胞の攻撃を抑制することができました。ゲノム編集した iPS 細胞から CTL を分化誘導後、同種免疫反応を解析したところ、ゲノム編集した iPS 細胞由来 HPV-CTL は T 細胞に拒絶されず、また NK 細胞からの攻撃も回避できることを証明できました。さらに、ゲノム編集したことで子宮頸がんに対する抗腫瘍効果が軽減しないか確認しました。その結果、ゲノム編集した iPS 細胞由来 HPV-CTL は編集の有無に関わらず、強力に子宮頸がんの増殖を抑制できました。末梢血から誘導したもとの HPV-CTL よりも短期間で強力に抗腫瘍効果を発揮して、また長期間の生存期間延長効果も認めました。

そこで、なぜもともとと同じ T 細胞受容体配列を持つ CTL であるにも関わらず、このように iPS 細胞由来 HPV-CTL では細胞傷害活性が増強するのか、その機序を調べるためにシングルセル解析<sup>\*7</sup>を行い、その遺伝子発現を比較しました。その結果、iPS 細胞由来 HPV-CTL は末梢血由来 HPV-CTL に比較して細胞傷害活性に関する遺伝子(*IFNG*, *PRF1*, *GZMB*)および、組織レジデントメモリー T 細胞に関係する遺伝子(*ITGAE*, *CD69*, *TGFBRI*)の発現レベルが有意に高いことがわかりました。フローサイトメトリーによる解析でも、iPS 細胞由来 HPV-CTL では組織レジデントメモリー T 細胞を豊富に含むことを示しました。機能解析の結果、iPS 細胞由来 HPV-CTL は TGF $\beta$  シグナリング<sup>\*8</sup>により CD103 発現レベルを有意に上昇させ、その結果 HPV 抗原特異的細胞傷害活性が増強することを証明しました。

以上より、本研究では iPS 細胞技術とゲノム編集技術を用いて、健常人由来 iPS 細胞から患者免疫細胞の攻撃を回避できる HPV-CTL の作製に成功し、作製した HPV-CTL は組織レジデントメモリー T 細胞を豊富に含む結果、子宮頸がんに対して強力な細胞傷害活性をもたらすことを明らかにしました。同種免疫反応を軽減でき、かつ T 細胞の機能も強化された次世代 T 細胞療法の開発に成功したことにより、HPV-CTL は子宮頸がんに対する画期的な新規治療となりうることが示唆されました(図 1)。

## 今後の展開

研究グループは、重症患者にも迅速に投与できる“off-the-shelf” T 細胞療法<sup>\*9</sup>を目指し、ゲノム編集した臨床用 iPS 細胞を作製しました。さらに安全性を十分に確認の後、この臨床用 iPS 細胞を増幅して凍結保存することで、マスターセルバンクを作製しました。今後、子宮頸がんに対する本治療の医師主導治験を開始する予定です。マザーキラーである子宮頸がんの克服に向けて重要な一歩となることが期待されます。



【図1】本研究で作製した健康人 iPS 由来レジデントメモリーT細胞の特徴が明らかになった。

### 用語解説

- \*1 ヒトパピローマウイルス (Human papilloma virus: HPV)： 子宮頸がんの原因ウイルス。HPV 感染後、多くは自然にウイルスが排除されるが排除されなかった場合、前がん状態を経て子宮頸がんを発症する。
- \*2 抗原特異的細胞傷害性 T細胞 (Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes: CTL)： 免疫細胞である Tリンパ球の中でも、ウイルス抗原や腫瘍抗原を認識し、異常細胞を攻撃するリンパ球。患者のウイルス特異的細胞傷害性 T細胞を体外で増幅し、再び患者体内に戻す CTL療法は、重症ウイルス感染症やウイルス関連腫瘍に有効である。キラーT細胞とも呼ぶ。
- \*3 iPS細胞由来 CTL： iPS細胞から作製した抗原特異的 CTL。iPS細胞技術は細胞の若返り法の一つと言える。この手法を利用して、HPV感染腫瘍に反応する末梢血中のHPV抗原特異性をもつ CTLから iPS細胞を作製し、再びT細胞に分化させることにより、腫瘍を攻撃する若い CTLを無限に供給することが可能になる。
- \*4 メモリーT細胞： 抗原と出会う前のナイーブT細胞が抗原認識により活性化するとエフェクターT細胞となり、その一部が長期生存し次の抗原暴露に備えるため分化したT細胞。2回目の抗原暴露によりメモリーT細胞はすぐにエフェクターT細胞となり最初の抗原暴露に比較し早く効率よく反応する。
- \*5 CRISPR/Cas9技術とオフターゲット作用： 部位特異的ヌクレアーゼを使った簡便な遺伝子改変ツール。DNAの二本鎖切断を介して修復機構を利用することによりゲノムの特定の場所を削除、置換、挿入することが可能。しかしながら、通常の標的以外の場所で遺伝子切断が発生することがあり、それをオフターゲット作用と呼ぶ。
- \*6 HLA (Human Leukocyte Antigen)： ヒト白血球抗原と言われる白血球型。免疫系で「自己」を「他者」と区別する役割を果たす。異なる個体でHLAが異なるため造血幹細胞移植や免疫細胞療法の際の免疫反応に重要な役割を果たす。
- \*7 シングルセル解析： 1つの細胞からRNA情報を取得し、個別の細胞の遺伝子発現パターンを詳細に調査する次世代シーケンシング解析。これにより、異なる細胞の個別の特性を理解でき、がんや免疫応答の微細な変化を把握するのに役立つ。
- \*8 TGFβシグナリング： TGFβとは細胞増殖・分化を制御し、細胞死を促すことが知られているサイトカイン。TGFβシグナルが、がん化を未然に防ぐと考えられている。
- \*9 “off-the-shelf” T細胞療法： 患者由来細胞ではなく、健康人由来の他家 iPS 由来 T細胞を作

製してバンキングすることによって、必要時にいつでも十分量の治療用 T 細胞が提供できる治療。

## 研究代表者のコメント

本研究では、ゲノム編集した iPS 細胞由来 HPV-CTL が免疫細胞の攻撃を回避可能であること、子宮頸がんに対する抗腫瘍効果を保持すること、そしてその強力な細胞傷害活性の機序を証明することができました。同時に順天堂大学細胞療法・輸血学のセルプロセッシングセンター内で、この方法で臨床用細胞の作製を進めています。

これらの結果より、次年度の医師主導治験の開始を目指しています。

研究グループは、マザーキラーである子宮頸がんの克服を目指し、着実に努力を続けます。

## 原著論文

本研究は Cell Reports Medicine 誌のオンライン版に 2023 年 12 月 12 日付（米国東部時間）で公開されました。

タイトル：iPSC-derived hypoimmunogenic tissue resident memory T cells mediate robust anti-tumor activity against cervical cancer

タイトル(日本語訳)：iPS 細胞由来レジデントメモリー T 細胞の子宮頸がんに対する強力な抗腫瘍効果

著者：Yoshiki Furukawa<sup>1†</sup>, Midori Ishii<sup>1†</sup>, Jun Ando<sup>1,2</sup>, Kazuya Ikeda<sup>3</sup>, Kyomi J. Igarashi<sup>4</sup>, Shintaro Kinoshita<sup>1</sup>, Yoko Azusawa<sup>2</sup>, Tokuko Toyota<sup>1</sup>, Tadahiro Honda<sup>1</sup>, Mahito Nakanishi<sup>5</sup>, Koichi Ohshima<sup>6</sup>, Ayako Masuda<sup>7</sup>, Emiko Yoshida<sup>7</sup>, Mari Kitade<sup>7</sup>, Matthew Porteus<sup>3</sup>, Yasuhisa Terao<sup>7</sup>, Hiromitsu Nakauchi<sup>4\*</sup>, Miki Ando<sup>1\*</sup>

著者（日本語表記）：古川芳樹 1)、石井翠 1)、安藤純 1)、2)、池田和哉 3)、Kyomi J. Igarashi 4)、木下慎太郎 1)、梓澤陽子 2)、豊田积子 1)、本田匡宏 1)、中西真人 5)、大島孝一 6)、増田彩子 7)、吉田恵美子 7)、北出真里 7)、Matthew Porteus 3)、寺尾泰久 7)、中内啓光 4)、安藤美樹 1)

著者所属：1)順天堂大学血液学講座、2)順天堂大学細胞療法・輸血学講座、3)スタンフォード大学小児科学講座、4)スタンフォード大学幹細胞生物学・再生医療研究所、5)ときわバイオ株式会社、6)久留米大学病理学講座、7)順天堂大学産婦人科学講座

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101327>

本研究は AMED (JP19bm0404032, JP19be0404011, and JP21bk0104117), および JSPS 科研費(18K07273) の支援を受け多施設との共同研究の基に実施されました。なお、本研究にご協力いただいた皆様に深謝いたします。

### <研究内容に関するお問い合わせ先>

順天堂大学大学院医学研究科血液内科学

教授 安藤 美樹 (あんどう みき)

TEL: 03-3813-3111 E-mail: [m-ando@juntendo.ac.jp](mailto:m-ando@juntendo.ac.jp)

URL: <https://hosp.juntendo.ac.jp/clinic/department/ketsuekinaika/>

### <取材に関するお問い合わせ先>

順天堂大学 総務局 総務部 文書・広報課 (担当: 濱田)

TEL: 03-5802-1006 E-mail: [pr@juntendo.ac.jp](mailto:pr@juntendo.ac.jp) 大学 HP: <https://www.juntendo.ac.jp>