京都大学	博士（医　　学）	氏　名	石　黒　義　孝
論文題目	Lineage tracing of T cell differentiation from T-iPSC by 2D feeder-free culture and 3D organoid culture （2D フィーダーフリー培養と 3D オルガノイド培養による T 細胞由来の iPS 細胞からの T 細胞分化の系統追跡）		

（論文内容の要旨）

【背景】

T 細胞を由来とする induced pluripotent stem cell(iPSC)から分化した T 細胞は、由来となった T 細胞(T-iPS-T)の持つ抗原特異的な T 細胞受容体(TCR)が保存しており、また免疫疲弊状態（抗原に対する T 細胞応答）も改善した状態となっている。標的抗原に特異的傷害を与える T 細胞を分化誘導で量産することおよび、その細胞は免疫疲弊状態を脱していることにより由来となった T 細胞よりも強力な免疫応答を示すといった観点から T-iPS-T は T 細胞における新たな免疫治療療法として期待されている。

細胞傷害性を持った T 細胞（C T L）はその分化培養方法の研究は進んでおり、製品化に重要である 2D フィーダーフリー培養(2D 培養)も確立されてきている。一方で、ヘルパーT 細胞については iPSC からの分化誘導方法は確立されていない。キメラ抗原受容体(CAR)を導入した T 細胞ではヘルパーT 細胞と CTL の併用による抗腫瘍療法で CTL 単独療法よりも優れた効果が示されている。このことから T-iPS-T においても C T L とヘルパー機能を持つ T 細胞の併用で治療効果を増強させる可能性があり、T 細胞由来の iPSC のヘルパー機能を持つ細胞への誘導が研究されている。

【方法】

2017 年に 3D オルガノイドを用いた臍帯血由来 T 細胞の分化誘導方法を用いることで iPSC からも CD4 単独陽性の T 細胞が誘導できることが報告されている。まず自検例で 3D オルガノイドによる T-iPS-T が誘導できるかの確認を行った(以下 3D 培養)。培養 2 週から 6 週にかけての週毎の解析にサンプルをフローサイトメトリーおよびシングルセル RNA シーケンス解析(scRNA-seq)を行った。この結果を胸腺細胞の一般レポジトリデータと比較した。また 2D 培養での T-iPS-T の分化誘導を行った細胞サンプルデータと胸腺細胞のレポジトリデータを比較することにより、2D 培養で欠落している発現遺伝子の同定を行った。

【結果】

3D 培養を行った T-iPS-T では週毎の解析により 2 週間から 6 週間の培養で CD4-CD8+(CD8SP)、CD4+CD8-(CD4SP)群が出現する傾向にあることが確認され、表面マーカー上は CD4+CD8+(DP)群も確認されており、3D オルガノイドを用いた T-iPS-T は胸腺細胞の分化と類似性を示す可能性を認めた。さらに行った scRNA-seq の胸腺細胞のレポジトリデータとの比較では 3D 培養の初期(2 週から 3 週)には胸腺細胞で D P を呈するクラスターに分化誘導段階の細胞が見られ、4 週から 6 週にかけて徐々に T-iPS-T の主たるクラスターが胸腺細胞の CD4SP、CD8SP に該当するクラスターに含まれる挙動を示した。2D 培養の scRNA-seq と胸腺細胞レポジトリデータと比較では 2 D 培養では CD4SP を示さないが胸腺細胞データ上の CD4SP 群に含まれる細胞群を認め、複数の遺伝子発現(SELENOW, GIMAP4, 7, SATB1, SALMF1, IL7R, SYTL2, S100A11, STAT1, IFITM1, LZTFL1, SOX4)の差異を認めた。

【考察】

3D 培養を用いた T-iPS-T は胸腺細胞の分化と表面マーカーのみならず遺伝子発現上も類似性を示す可能性を認めた。また 2D 培養では CD4SP は確立して産生されないが、胸腺細胞の CD4SP と遺伝子発現上類似した細胞が存在した。この結果は今回発現に差異を認めた遺伝子のバリデーションをとり、培養系を変更することで CD4SP のフィーダーフリー培養の確立につながる可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

抗原特異的 T 細胞由来の iPS 細胞から分化した T 細胞(T-iPS-T)のうち細胞傷害性 T 細胞は iPS 細胞から誘導した induced Hematopoietic Progenitor Cell(iHPC)を用いた 2D feeder free による分化誘導(以下 2D 培養)が確立したが、ヘルパーT 細胞の誘導は確立していない。

我々は iHPC を既報に則り MS5-hDLL4 と 3D 共培養(以下 3D 培養)で CD4+T 細胞を誘導できると仮定し、誘導した細胞を解析し feeder free 培養の実験系を確立できると考えた。

既報では iHPC より分化の上流にある細胞から T 細胞を誘導していたが、我々は iHPC から 3D 培養を行い CD8+T 細胞、CD4+T 細胞を誘導した。この結果は 3D 培養の iHPC より下流の分化への影響を示唆した。

ヒト胎児胸腺細胞の scRNA-seq 公開データと 3D 培養データを統合解析すると、胸腺細胞と T-iPS-T は遺伝子発現上類似した分化過程を呈することを示した。

また胸腺細胞と 3D、2D 培養の scRNA-seq データの統合解析で 2D 培養では CD4 は発現しないが、胸腺細胞のヘルパーT 細胞と同じクラスターに細胞を認め、この結果は 2D 培養でのヘルパーT 細胞の前駆様細胞の誘導を示唆した。また 3D と 2D 培養の遺伝子発現の差異から feeder free での CD4+T 細胞を誘導する遺伝子候補を複数同定した。

以上の研究は iPS 細胞の T 細胞分化の解明に貢献し、feeder free 下での iPS 由来のヘルパーT 細胞の生成に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和　6 年　3 月　18 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降