

iPS 細胞からの T 細胞再生と同種 CAR-T 療法、TCR-T 療法の開発

京都大学 iPS 細胞研究所 免疫再生治療学/ Laboratory of Regenerative Immunotherapy, CiRA, Kyoto University

筑波大学トランスボーダー医学研究センター がん免疫治療研究分野/Laboratory of Cancer Immunotherapy and Immunology, Transborder Medical Research Center, University of Tsukuba

金子新

Keywords

Induced pluripotent stem cells

Cytotoxic T cell differentiation

Xenogeneic components free manufacturing

Hypoimmunogenic CAR-T cells

抄録

T 細胞を用いた細胞治療において治療効果を左右する重要な要素は、T 細胞の抗原特異性ならびにメモリー表現型維持、そして T 細胞の生体内での長期生存能と増殖能維持である。また現行の T 細胞製剤は個別化された自家製剤であるがゆえに製造と品質ならびに供給の安定性の面に一定の課題を有する。これらの要素を充足するアプローチとして同種 T 細胞の活用が注目されているが、近年、iPS 細胞から CD8 キラーT 細胞を誘導できるようになり、同種 iPS 細胞をソースとする CAR-CD8 キラーT 細胞の開発も試みられている。本稿では iPS 細胞からの CD8 キラーT 細胞の誘導と、その誘導工程の安全性と確実性を強化する試み、ならびに同種抗原性を低減化する遺伝子編集の有用性などについて概説する。

英文抄録

Important factors that determine the therapeutic efficacy of T cell-based cell therapy are the maintenance of antigen specificity and memory phenotype of T cells, and the maintenance of long-term viability and proliferative capacity of T cells in vivo. In addition, current T-cell preparations are personalized autologous preparations, which pose certain challenges in terms of manufacturing, quality, and stability of supply. Recently, it has become possible to induce CD8 killer T cells from iPS cells, and development of CAR-CD8 killer T cells from allogeneic iPS cells has been attempted. In this article, we review the induction of CD8 killer T cells from iPS cells, attempts to enhance the safety and reliability of the induction process, and the

usefulness of gene editing to reduce allogeneic antigenicity.

はじめに

生体の T 細胞は胸腺における成熟と抗原特異性の教育の後に末梢に動員され、生体防御の多彩な機能を担う。本来は胸腺で獲得される抗原特異性を、末梢の T 細胞に後天的に付与する抗原レセプター改変技術が開発され、遺伝子改変 T 細胞として実臨床に用いられるようになってきている[1]。B 細胞悪性腫瘍を筆頭にいくつかの腫瘍において大変に期待されている抗原レセプター遺伝子治療であるが、現状では都度の製造とそれに伴う待機期間の問題、また患者ごとの T 細胞の fitness の違いにより製造安定性やコスト、品質の不均一性などが問題と考えられている[2]。その解決策の一つとして健常人をドナーとする同種末梢 T 細胞の活用が考えられており、既にいくつかの治験が始まっている。iPS 細胞は自己複製能と多分化能を持つ幹細胞であり抗原特異性を持った同種 CD8T 細胞の *in vitro* 分化のソースとなる可能性が示されている[3]。実際、がん治療や感染症治療への応用の期待から臨床応用に適した材料を用いた培養法の開発が進んでおり、B 細胞悪性腫瘍の動物モデルにおいては同種末梢血 T 細胞に匹敵する T 細胞プラットフォームとして期待されている[4]。また iPS 細胞は確実な遺伝子編集に適した細胞であることから、同種免疫反応を抑制するための技術開発も進んでいる[5]。本稿では同種 iPS 細胞をソースとして CAR-T や TCR-T を作成し臨床応用を目指す試みについて概説する。

T 細胞のエピゲノム修飾と iPS 細胞技術

iPS 細胞は 2006 年にマウス[6]、2007 年にヒト[7]での樹立が報告された多能性幹細胞であり、胚性幹細胞同様の分化多能性とほぼ無限の自己複製能を併せ持つ細胞である。胚性幹細胞は我々の胎内発生の一過程である胚盤胞期の内部細胞塊を採取し *in vitro* で培養することで得られる細胞であるのに対して[8]、iPS 細胞は皮膚線維芽細胞や末梢血細胞といったいわゆる体細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の遺伝子を導入するだけで、文字通り「人工的に」多能性幹細胞を得ることができる。これらの遺伝子群は iPS 細胞の報告者である山中伸弥博士にちなんで Yamanaka Factors と呼ばれたり、惹起されている細胞初期化現象にちなんで Reprogramming factors と呼ばれたりする。iPS 細胞樹立の最初の報告から 15 年以上が経つが、これらの遺伝子群が iPS 細胞を誘導していく詳細なメカニズムの全容は今なお解明されておらず、新たな知見が日々蓄積されているのが現状と言えよう。現時点で一つ確実に言えるのは iPS 細胞の誘導すなわち細胞の初期化とは、エピゲノムの初期化 (epigenomic reprogramming) ということである[9, 10]。細胞のエピゲノム状態はよく山の頂と尾根、そして谷底に例えられる。山頂は分化特異的なエピゲノム修飾のない状態、そして谷底は分化誘導を経てたどり着く強固なエピゲノム修飾状態の終末分化細胞である[11] (図 1)。つまり Yamanaka Factors はエピゲノム修飾を解除して、谷底の分化細胞を山頂に引き上げて iPS 細胞としているのである。分化誘導は一度山頂に引き上げられた細胞を適

切な方法で別の谷底すなわち細胞種へと導く操作と理解できる。一方でゲノム配列は初期化の前後で積極的に変化しないので、単一遺伝子疾患症例からその責任変異を内在した iPS 細胞を樹立し、責任変異を持つ遺伝子を発現する細胞へと分化させることでその病態を再現することが可能となる。実際にこの手法を用いることで、例えば患者の皮膚線維芽細胞や末梢血単核球から作られた iPS 細胞を用いて、神経疾患や心筋疾患の分化異常を *in vitro* で再現するなどの試みがなされている[12]。一見、免疫治療とは関係のない特徴であるが、実は我々が取り組む T 細胞の再生に関しても、研究の萌芽期には iPS 細胞のこの特徴すなわちエピゲノム情報のリセットとゲノム情報の保持が大いに役立った[13]。以下にその理由を解説する。

T 細胞は胸腺内で分化成熟し抗原特異性を獲得したのちにナイーブ T 細胞として胸腺から末梢のリンパ組織へと移行する。そこで抗原提示細胞の MHC 拘束性に提示された特異抗原ペプチドを T 細胞受容体で認識し、増殖しながらの分化を開始する。ナイーブ T 細胞からの末梢における分化は階層性を持って進むことが知られており、メモリーステム T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞を経て大量のエフェクター T 細胞へと分化していく。エフェクター T 細胞はグランザイムや IFN γ などによる武装が進んで強力な細胞傷害性を持つようになる一方で増殖能の低下とアポトーシス感受性の増加が起こり、標的細胞の傷害後に速やかに細胞死を起こすよう変化する(図 2)。それに対して上位のメモリー T 細胞は TCR 刺激による増殖能とエフェクターへの分化能を保ったまま休止期に入り、免疫記憶を司ることになる。一般に、悪性腫瘍や致死的な慢性感染症への長期罹患の結果、疾患抗原特異的な T 細胞は持続的な抗原刺激によりエフェクター T 細胞への分化を余儀なくされ、エフェクター T 細胞の疲弊化とメモリー T 細胞プールの消失をきたす。その結果、T 細胞による疾患の制御に失敗してしまうのである。このプロセスの制御が効果的な免疫反応の持続やメモリー T 細胞プールの消失回避につながると考えられる。この現象は生体内のみならず治療応用目的での T 細胞の体外増幅でも頻繁に観察される現象であったため、過度の終末分化や疲弊化を抑えて抗原特異的なメモリー T 細胞を増幅するための培養法やメモリー T 細胞への特異抗原レセプター遺伝子導入法などの開発がなされてきた[14]。その知見の一部は TCR-T 療法や CAR-T 療法の開発にも生かされている。

さて、このナイーブ T 細胞からメモリー T 細胞、エフェクター T 細胞、そして疲弊 T 細胞へのこの一連の過程で起きているのは、終末分化に伴うエピゲノム修飾とそれに伴う発現遺伝子プロファイルの変更が引き起こす細胞特性の変化である[15]。ということは T 細胞受容体の抗原特異性すなわち T 細胞受容体遺伝子のゲノム情報を変えることなく、エフェクター T 細胞のエピゲノム修飾をリセットすることが可能となれば、エフェクター化が進んだ T 細胞からでも抗原特異的な T 細胞のプールを再生できる可能性が生じる。その点からエピゲノム初期化とゲノム情報の保持という特性を持つ iPS 細胞技術の活用は、抗原特異的な T 細胞再生の最も有用な方法論の一つと考えられた。

抗原特異的 T 細胞リプログラミングと再分化誘導の試み

2013 年、3つの研究グループからヒト T 細胞に由来する iPS 細胞 (T-iPS 細胞) を介しての抗原特異的キラーT細胞の再生が報告された[13, 16, 17]。我々を含む 2 報は抗原特異的 CD8T 細胞クローンをソースとする抗原特異的キラーT細胞の再生であり[13, 16]、もう一報は T 細胞に由来する iPS 細胞への CD19 CAR 遺伝子導入とそこからの CAR-T 細胞分化である[17]。それ以前のヒト ES 細胞や造血幹細胞などを用いた研究では T 細胞受容体 α 鎖と β 鎖の遺伝子再構成を *in vitro* で誘導することができなかったが、分化誘導のソースを TCR α 鎖と β 鎖の再構成を予め有する T-iPS 細胞とすることにより、自発的な TCR 遺伝子組み換えが生じなくても抗原特異性のある TCR を発現するキラー分化細胞を得られるようになったのである。これらの一連の研究から示されたことは、iPS 細胞由来の T 細胞では TCR 遺伝子の塩基配列が保たれていること、MHC 拘束性に TCR に特異的な抗原を認識して細胞傷害性を発揮したり IFN γ を産生できたりすること、本来は分裂とともに短縮化するテロメアが元の T 細胞クローンと比較して伸長していること、その結果増殖刺激応答性が著しく改善していることなどであった[13]。一方で、生体内に存在する TCR $\alpha\beta$ 型 T 細胞とは全遺伝子 RNA 発現プロファイルに相違が見られること、具体的には $\gamma\delta$ T 細胞の RNA 発現プロファイルに類似していること、また NK 細胞受容体や CD8 分子サブセットの発現パターンについて TCR $\alpha\beta$ 型 T 細胞との相違が見られることなどが示された[17]。後の報告と併せると、これらの分化誘導法で得られた細胞は、むしろ NK 細胞や IFN γ を産生する能力のある 1 型自然リンパ球 (ILC1) であり、再構成済みの TCR を異所性に発現していると考えるほうが適切であろう[18]。バリエーションの無い TCR を持つ T 細胞として知られる iNKT 細胞[19, 20]や MAIT 細胞[21]からの iPS 細胞誘導とそれぞれの TCR が認識する糖脂質抗原や微生物由来ビタミン合成産物抗原に特異的な T 細胞への再分化誘導についても、同様に解釈できる可能性がある。

CD8 $\alpha\beta$ T 細胞の誘導と抗原特異性の安定化

その後、この自然リンパ球様の TCR 発現キラー細胞の活用を探る研究に加え、分化誘導を最適化して生体の CD8T 細胞に近い iPS-T 細胞を誘導する研究が進められた[3, 22]。後者の研究から、自然リンパ球様キラー細胞は CD4 ならびに CD8 両陰性 (DN-) T 細胞から生じるが、生体の CD8T 細胞に近い性質を持つ CD8 $\alpha\beta$, CD5 陽性 CD4 陰性のキラーT細胞を得るには、より分化段階の進んだ CD4 と CD8 が両陽性のダブルポジティブ (DP-) T 細胞を適切な TCR 刺激で成熟させる必要があることがわかってきた[3, 22]。一方で生体でのプロセスから予想されていたことではあるが、DN-T 細胞から DP-T 細胞への分化が成功裏に進むにつれて TCR 遺伝子の再構成を行う RAG 酵素が産生され、T-iPS 細胞に備わっていた再構成済み TCR α 鎖遺伝子の追加再構成を引き起こされることがわかった[3]。その結果、抗原特異性を保てない iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞が一定の割合で産生されるのである。自験例ではとくに OP9-DL1 細胞との共培養時に DP-T 細胞としての培養期間が

長くなるにつれて、元クローンの Va 配列を維持できなくなる傾向があった。もちろん元となった T 細胞クローンが持つ TCR の MHC 拘束性と特異ペプチドが明らかであれば TCR 遺伝子再構成をおこしていない T 細胞をペプチド刺激で増幅することやテトラマーで分離することも可能である。我々は必ずしも特異ペプチドが明らかではないケースにも対応できる汎用性を重視した結果、iPS 細胞の段階で RAG2 遺伝子を KO することで追加の TCR 遺伝子再構成を抑制し、拘束 MHC や認識抗原ペプチドの情報がなくとも所望の TCR を持つ T 細胞のみを再生する方法の有用性を検討した。その結果、分化誘導後の iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞の抗原特異性はほぼ 100%維持されることが明らかになった。DP-T 細胞から CD8 $\alpha\beta$ T 細胞への成熟方法に若干の相違はあるものの、いくつかの研究において抗原特異的ヒト iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞の治療有効性が示唆されるとともに、iPS 細胞を介した T 細胞クローンの再生が CD8 $\alpha\beta$ キラーT 細胞のどのような機能にどのように寄与しているかが明らかにされてきた[23-27]。CD4 ヘルパーT 細胞によって産生されるサイトカインである IL-21 を DP-T 細胞からの成熟や増幅に用いるプロトコールで得られた iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は、元となった T 細胞クローンに限られた増殖能力しか示せないのに対して、複数回刺激に応答して末梢血のナイーブ T 細胞と近似した増殖活性を示した[24]。また iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は HLA 拘束性に TCR の標的抗原を提示した K562/HLA-A24 細胞に対して、元の T 細胞クローンでは観察できなかった連続した細胞傷害性を示した。K562/HLA-A24 細胞を皮下に移植した担がんマウスへの iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞静注においても、生存期間の有意な延長を認めた。同様の手法で大腸腫瘍浸潤 CD8 $\alpha\beta$ T 細胞クローンを再生した研究においても、元の T 細胞クローンと比較してテロメアの再伸長や増殖能の改善、予備呼吸能の改善、そして静注後の免疫不全マウス体内でのキメリズム上昇などのメモリーT 細胞特性の獲得も示唆された[25]。抗原特異的な T 細胞の再生コンセプトが細胞生物学的に確認されたと考えられる(図3)。

同種 iPS 細胞からの TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞誘導

一方、TCR トランスジェニック動物が抗原特異的な T 細胞クローンを末梢血中にドミナントに有する事実を鑑みると[28]、当初からのコンセプトである iPS 細胞を介した疾患抗原特異的 T 細胞クローンの再誘導だけではなく、疾患抗原特異的 TCR を導入した iPS 細胞から抗原特異的 T 細胞を誘導する方法も同様の有用性を持つと考えられた。京都大学 iPS 細胞研究所では AMED 再生医療実現化ネットワークプログラム中核拠点事業の支援を受けて、これまでに日本人 HLA ハプロタイプ頻度上位 4 つのアリルをそれぞれホモ接合体として有するドナー末梢血単球系細胞から臨床用 iPS 細胞を作成し、2015 年から内外の研究施設に供給している[29]。我々は、この iPS 細胞に腫瘍抗原特異的 TCR 遺伝子を導入しキラーT 細胞への分化誘導を試みた[3](図4)。前述の抗原特異的 T 細胞の再生と同様の手法で分化誘導を試みたところ、興味深いことに外来性 TCR 遺伝子導入 iPS 細胞からの分化誘導では RAG 遺伝子の発現が抑制され、結果として導入遺伝子由来の TCR のみを持

つ iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞が得られた。一般に TCR トランスジェニックマウスにおいても、導入 TCR による T 前駆細胞の RAG 発現抑制が胸腺で観察されることが知られており[30]、同様の抑制が TCR 遺伝子導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞 (TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞) への分化過程でも観察されたと考えられる。我々はがん抗原である WT1 を HLA-A24 拘束性に認識する TCR を遺伝子導入した iPS 細胞から CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を誘導し、WT1 を発現する H226 細胞を皮下移植した免疫不全マウスに複数回投与し、腫瘍増大の遅延効果ならびに転移の抑制効果を確認した(図 4)。その他にも複数のグループから、標的抗原を発現した腫瘍細胞株を移植した免疫不全マウスを用いて iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞治療の有用性を示唆する研究が報告されている[22, 25, 26, 31]。複数回投与やサイトカイン補充を必要とする例も多いが、一定の治療効果を見込める可能性があり、さらなる開発が期待される。いくつかの研究では腹腔内腫瘍に対する腹腔投与の *in vivo* 治療モデルを用いているが、T 細胞の重要な機能である腫瘍ホーミング機能を評価することができないため、その解釈は慎重である必要がある。後述するが、腹腔などへの局所投与を前提とするのであれば iPS 細胞由来の NK 細胞も十分な抗腫瘍活性をもつことが知られる[32]。

iPS 細胞誘導の方法論と CAR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 臨床製造の可能性

上述のように 2013 年の最初の報告以来、iPS-T 細胞の分化誘導法は改良を重ねられている。その中から 2 つのトピックスを紹介したい。1 つ目は動物由来成分を除いた臨床製造に適用できる大量製造法の確立である[4]。臨床製造において動物由来成分、特にマウス由来異種フィーダー細胞との共培養はウイルス安全性や製造安定性の観点から品質管理や安定供給のリスク因子となる。我々は造血前駆細胞から DP-T 細胞への分化に用いているマウスフィーダー細胞 OP9-DLL1 をリコンビナント DLL4 蛋白とレトロネクチンに置き換え、分化効率の低下を改善するために MEK 阻害剤と SDF-1 を添加した誘導法を開発した。この二剤の併用により PU.1 などの骨髓球系転写因子の発現が抑制される一方、T 細胞分化に必須の転写因子である BCL11B などが早期から効率よく発現する。その結果、DP-T 細胞の誘導効率と細胞終了が著しく改善する。実際この培養法を用いることで 6 ウェルプレートの 1 ウェル相当の 3×10^5 程度の iPS 細胞から 10^9 に至る TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を得ることができる。TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は一度の刺激によって 200 倍程度の増幅を得ることができるため一連の培養で 2×10^{11} の細胞が得られ、それは例えば 50kg の患者に対して 2×10^6 /kg の条件で 2000 回投与分の TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞が得られる計算になる。従来法に比して安全性を高めつつ製造安定性と収量を向上させたこの手法は、臨床応用が可能な原材料のみで構成されており、TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞治療実用化への大きな推進力となっている。本手法の同種プラットフォームとしての有用性、特に同種 CAR-T 治療への適応可能性を明らかにする目的で、この TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞に CD19CAR 遺伝子と生体内での T 細胞生存期間延長に寄与することが知られる膜結合型 IL-15/IL-15Ra 複合体遺伝子を導入し[33]、CD19 陽性ヒト B 細胞腫瘍である Nalm-6 を予め静脈投与した免疫不全マウ

スに移植してその治療効果を検討した。比較対象として無治療群ならびに CD19CAR 遺伝子を導入した健常人由来同種 CD8T 細胞を移植した群を設定し、治療後の生存期間を観察したところ、TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞と健常人 CD8T 細胞由来の CAR-T はいずれも有意に Nalm-6 移植マウスの生存期間を延長し、両者に有意な差を認めなかった。単一の TCR しかならない TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞に対してポリクローナル TCR を持つ健常人 CD8T 細胞由来の CAR-T 治療成績には同種 GVHD による死亡を含むものの、同種 iPS 細胞由来の TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞をベースにした CAR-T 細胞は、健常人由来の CD8T 細胞に匹敵する同種 T 細胞プラットフォームである可能性が示唆された (図 5)。

2 つ目のトピックスは、オルガノイド培養系である。前述のごとく iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞分化誘導法は臨床応用における安全性と培養操作の簡便性を重視した無フィーダーの 2 次元培養を基本とする。その一方で、生体での T 細胞成熟を完全に再現するには胸腺環境が必須であることが FTOC などを用いたマウスの実験から広く知られていることから [34]、同種 T 細胞の *in vitro* 分化に胸腺構造を模したオルガノイドを導入する試みがなされている。Artificial Thymic Organoid (ATO) はその試みの一つであり、Notch 刺激分子である DLL 蛋白を発現したマウス MS5 フィーダー細胞と造血幹・前駆細胞を混じりだけの比較的シンプルな「オルガノイド」である [35]。この ATO の特徴は複数サブセットに渡る自律的なヒト T 細胞分化が見られることである。それまでの iPS 細胞由来血球の 2 次元培養系では CD8 $\alpha\beta$ T 細胞の他に比較的限られたサブセット (CD8 $\alpha\alpha$ T [13, 16, 17], ILC1, iNKT [19, 20], MAIT [21], gdT [36] など) を得るに留まっていたが、ATO では *in vitro* 分化で得ることが困難であった CD4T 細胞サブセットの出現が報告されている [37]。特にマウスの単一 HSC を用いた ATO では制御性 T 細胞をも含む多彩な T リンパ球の誘導が報告され [38]、またリンパ球減少症患者の HSC をもちいた ATO での病態再現も報告されている [39]。HSC に CAR を導入すると Notch シグナルの抑制に伴う BCL11B の発現低下のため NK/ILC 方向への分化傾向が得られやすいことが知られるが [40]、近年 iPS 細胞に CD19CAR を導入した後にクローン化を行わずに ATO 分化を行うことで、CAR に由来する分化抑制の影響を受けにくい集団から CAR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を得る方法が報告された [41]。CAR プロモーター領域のメチル化が亢進したその iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞の性状は活性化状態の低いメモリー T 細胞寄りであり、サイトカイン補充や AKT 阻害剤併用を組み合わせることで B 細胞性白血病動物モデルでの抗腫瘍効果を示している。ATO 培養では 2 次元培養よりも比較的生理的な分化誘導過程を通っていると推測されるが、それらは直接抗腫瘍効果へのインパクト、すなわち CAR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞に生体での持続性やメモリー機能に基づく治療効果を与えるにはまだ不十分な印象であり、現段階では 2D 培養法を凌駕しているとまでは言えないようである。

現状ブラックボックスである ATO の深堀りからより生理的な T 細胞を誘導する手法を確立する試みも重要であろう。特に、三次元化することによって何が変わっているのか。Notch シグナル強度、TCR 刺激の強度と持続時間、それ以外の分子間作用などの項目

については MS5 とのインタラクションを含めた時間空間的な理解が必要であろう。また MS5 のみが支持細胞たり得ることが驚きであり、より胸腺環境に近い細胞集団で置き換える試みも必要かもしれない。それら諸点を明らかにする試みは、最終的によりクオリティの高い再生 T 細胞を生み出すことに直結するであろうし、より産業化に適した大量無フィーダー培養系への落とし込みにも有用と考えられる。

同種免疫の回避

上述した HLA ホモ接合体 iPS 細胞戦略では 1 株で日本人の 17%程度をカバーすることが期待されており、2022 年現在供給されている 4 種の iPS 細胞株で日本人の XX% をカバーすると考えられる[29]。人種をまたいで一株でカバーできる人口を増やす目的で、我々は HLA-A,B および ClassII を細胞表面に出させない遺伝子編集を iPS 細胞に行い、HLA-C のみを合わせる同種移植のソースとすることを提唱した[42]。HLA-C を中心に、いくつかの HLA は NK 細胞の活性化を抑制するリガンドになっていることが知られる。したがって HLA 完全欠損細胞は NK 細胞による攻撃を受けるため、HLA 欠損戦略には NK 細胞抑制の戦略が欠かせない。一部の NK 細胞抑制リガンドである HLA-E 分子や CD47 分子の導入は一定の NK 細胞抑制効果を認める[43, 44]。HLA-C を残す遺伝子編集は、移植時には HLA-C を合わせる必要はあるものの、同種 HLA 分子を抗原として認識する T 細胞の反応を抑え、かつ HLA 完全欠損による同種 NK 細胞の活性化も抑える戦略である。この手法により、理論上は 7 株でほぼ日本人の全体をカバーすることが可能であり、世界全体でも 14 株で大半の人口をカバーできると試算されている[42]。

我々はさらに少ない株で多くの人口を、究極的には一株の iPS 細胞ですべての人口をカバーすることを目的に iPS 細胞の HLA-Class I と Class II を細胞表面から欠失させ、更に NK 細胞の抑制性リガンドとなる短鎖型の HLA-E 分子を遺伝子導入し、また NK 細胞の活性化リガンドである PVR 遺伝子をノックアウトすることで、iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞が同種 CD4T 細胞、同種 CD8T 細胞のみならず同種 NK 細胞からの免疫反応も回避できることを見出した[5]。いわばステルス戦闘機のように T 細胞や NK 細胞からの攻撃を回避するこの iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞に抗 CD20CAR を導入し、第三者の末梢血リンパ球 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞)ならびに同じドナーの B 細胞から樹立した CD20 陽性不死化 B リンパ球(B-LCL) を移植した免疫不全マウスに繰り返し投与を行い、同種 CAR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞移植の治療効果と免疫反応の回避効果を評価した。対象として免疫原性を減ずる遺伝子操作をしていない iPS 細胞から誘導した CAR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を設定して比較したところ、“ステルス”型の iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は免疫原性を減じていない再生 CD8 $\alpha\beta$ キラーT 細胞よりも有意に長く免疫不全マウス体内に生存し、有意に B-LCL の増殖を抑制した。通常の CAR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を移植されたマウスでは第三者の末梢血リンパ球 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞) が反応性に増加しており、繰り返し移植にともなって速やかに体内から排除される主因となっていることが示唆された。これらの結果より、“ステルス”型の iPS-CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は

同種 CAR-T 細胞プラットフォームの汎用性を向上させる可能性が示唆された(図 6)。

CAR-ILC/NK 細胞の開発

2013 年当時の手法を用いて T-iPS 細胞から誘導した TCR 発現キラーT 細胞が ILC/NK 細胞用の特徴を持つことは上述したとおりであるが、iPS 細胞からの NK 細胞もまた免疫細胞治療のプラットフォーム細胞として期待が寄せられている。ヒト多能性幹細胞からの NK 細胞分化の歴史は T 細胞よりも古く ES 細胞の時代に遡る[45]。分化誘導手技の簡便さや安定性に加えて基本となる細胞傷害性に HLA 拘束性を要しないこと、CAR 搭載による抗原特異性の付与や近年の CD19 CAR 搭載同種さい帯血 NK 細胞移植の良好な治験成績などから、iPS 細胞由来 CAR-NK 細胞の臨床開発が国内外で進んでいる[46]。我々の検討では iPS 細胞由来の ILC/NK 細胞は CD8 α β T 細胞と異なり、NK 活性化受容体を介した抗原非特異的細胞傷害性を持つため、CAR の併用で更に強い標的細胞傷害性を有する。一方で、静脈投与におけるホーミング能力の不足や生体内での長期生存は CD8 α β T 細胞に劣る傾向があり、その特性を考慮した開発戦略が求められる。

米企業の Fate therapeutics 社は抗 CD20 抗体や抗 CD38 抗体、抗 PD1/PD-L1 抗体など有用性が確認されている抗体との併用を中心に、iPS 細胞由来の CD19 CAR-NK 細胞や BCMA CAR-NK 細胞などの第一相臨床試験を造血器腫瘍対象に先行させている。同種 iPS 細胞由来の NK 細胞の弱点を補うための遺伝子改変も複数併用しており、その結果が注目される。我々は AMED 革新的がん治療実用化研究事業の支援を受け、がん抗原の一つである GPC3 に特異的な scFv を持つ CAR を遺伝子導入した日本人最頻度 HLA ホモ iPS 細胞クローンを樹立し、ILC/NK 細胞誘導法を確立するとともに非臨床試験での有効性と安全性を確認した[32]。治験 GMP 対応施設での製造を経て 2021 年より卵巣がん腹膜播種患者を対象とした第一相医師主導治験を開始している。非臨床試験で有効性が確認されたパッケージ、すなわち腹膜播種卵巣がんに対する繰り返し腹腔投与を基本とした容量漸増試験となっており、安全性を中心とした評価がなされる予定である。

おわりに

本稿では iPS 細胞からのキラーT 細胞の誘導と改良の歴史を、特に臨床応用に向けての開発の観点から概説した。CAR による修飾を受けた免疫細胞治療の有用性が明らかになるにつれ、そのプラットフォームとしての同種 iPS 細胞由来 T 細胞や NK 細胞への期待の高まりを感じるとともに、技術的完成度がいまだ十分でないことへの不満も、開発者の一人として感じている。一方で、より品質の向上した iPS 細胞作製技術[47]、分化誘導方法の改良と誘導される免疫細胞種の増加、多岐にわたる遺伝子改変の余地[48]など、この技術を構成する諸因子のポテンシャルを考えると、現在のパッケージは開発途上の一通過点に過ぎず、その到達点において見えてくる景色への期待を隠せないのもまた事実である。数多くの野心的な基礎研究者、臨床研究者の参画によって、iPS 細胞を用いた免疫治療の開発が

一層進むことを期待したい。

Figure 1, The epigenomic state of a cell is often compared to a mountain peak, a ridge, and a valley floor. The top of the mountain is a state without differentiation-specific epigenomic modifications, and the bottom of the valley is a terminally differentiated cell with a robust epigenomic modification that is reached through induction of differentiation. In other words, Yamanaka Factors lifts differentiated cells at the bottom of the valley to the top of the mountain by removing epigenetic modifications. Differentiation induction can be understood as an operation in which a cell that has been raised to the summit is guided to another valley floor, or cell type, in an appropriate manner.

Figure 2, Differentiation from naïve T cells is known to proceed in a hierarchical manner, with memory stem T cells, central memory T cells, and effector memory T cells differentiating into large numbers of effector T cells. Effector T cells are armed with granzymes and IFN γ and become potent cytotoxic, but they also have decreased proliferative capacity and increased susceptibility to apoptosis, and they rapidly undergo cell death after injury to their target cells. In contrast, upper memory T cells enter quiescence, maintaining their TCR-stimulated proliferative and effector differentiation capacities, and become responsible for immune memory. T_n, naïve T cells; T_{cm}, central memory T cells; T_{em}, effector memory T cells; T_e, effector T cells; T_{ex}, exhausted T cells.

Figure 3, iPSC technology allows for the cancer antigen-specific T cells to be reprogrammed to a pluripotent state (T-iPSC). The T-iPSCs are expanded and then induced into hematopoietic progenitor cells (HPC) and finally into a preferred T cell population for immunotherapy.

Figure 4, Knockout of a recombinase gene in the patient-derived T-iPSCs prevented additional TCR rearrangement during CD8 $\alpha\beta$ T cell differentiation from T-iPSC. Moreover, when CD8 $\alpha\beta$ T cells were differentiated from monocyte-derived HLA homozygous iPSCs that were transduced with an antigen-specific TCR, they showed monoclonal expression of the transduced TCR. TCR-stabilized, regenerated CD8 $\alpha\beta$ T cells could be useful for cancer immunotherapy.

Figure 5, Embryoid body method was used for HSPC differentiation and Notch ligand DLL4 stimulation was used for T cell differentiation. A breakthrough point of the method was identification of reagent SDF1 α and MEK inhibitor which accelerated elevation of T-lineage cell-related transcriptional factors such as BCL11B and suppression of myeloid cell-related transcriptional factors such as PU.1, even without support of feeder cell line. The reagents also support expansion of differentiating cells significantly better than no-reagents condition.

Main component of the cell at day 35 of differentiation was CD4 and CD8 double positive T cells which were just a precursor of mature CD8 killer T cells. We injected iCAR-T cells, primary CAR-T cells, or CAR untransduced iPS-T cells to CD19 leukemia-bearing animal model. After the observation more than 100-days, iCAR-T cells with mbIL-15 and primary CAR-T cells showed similar benefit to leukemia treatment. The observation indicated promiscuous result of iCAR-T cells as a cell source for allogeneic T cell therapy as good as healthy volunteer-derived CAR-T cells.

参考文献

1. June, C.H. and M. Sadelain, *Chimeric Antigen Receptor Therapy*. N Engl J Med, 2018. **379**(1): p. 64-73.
2. Kamal-Bahl, S., et al., *Barriers and solutions to improve access for chimeric antigen receptor therapies*. Immunotherapy, 2022.
3. Minagawa, A., et al., *Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy*. Cell Stem Cell, 2018. **23**(6): p. 850-858 e4.
4. Iriguchi, S., et al., *A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 430.
5. Wang, B., et al., *Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells*. Nat Biomed Eng, 2021. **5**(5): p. 429-440.
6. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
7. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
8. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
9. Basu, A. and V.K. Tiwari, *Epigenetic reprogramming of cell identity: lessons from development for regenerative medicine*. Clin Epigenetics, 2021. **13**(1): p. 144.
10. Scesa, G., R. Adami, and D. Bottai, *iPSC Preparation and Epigenetic Memory: Does the Tissue Origin Matter?* Cells, 2021. **10**(6).
11. Nishikawa, K. and A.R. Kinjo, *Mechanism of evolution by genetic assimilation : Equivalence and independence of genetic mutation and epigenetic modulation in phenotypic expression*. Biophys Rev, 2018. **10**(2): p. 667-676.
12. Karagiannis, P., et al., *Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development*. Physiol Rev, 2019. **99**(1): p. 79-114.
13. Nishimura, T., et al., *Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(1): p. 114-26.
14. Gattinoni, L., C.A. Klebanoff, and N.P. Restifo, *Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(10): p. 671-84.
15. Henning, A.N., R. Roychoudhuri, and N.P. Restifo, *Epigenetic control of CD8(+) T cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(5): p. 340-356.
16. Vizcardo, R., et al., *Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs*

- derived from mature CD8(+) T cells*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(1): p. 31-6.
17. Themeli, M., et al., *Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(10): p. 928-33.
 18. Ueda, N., et al., *Generation of TCR-Expressing Innate Lymphoid-like Helper Cells that Induce Cytotoxic T Cell-Mediated Anti-leukemic Cell Response*. Stem Cell Reports, 2018. **10**(6): p. 1935-1946.
 19. Yamada, D., et al., *Efficient Regeneration of Human Valpha24(+) Invariant Natural Killer T Cells and Their Anti-Tumor Activity In Vivo*. Stem Cells, 2016. **34**(12): p. 2852-2860.
 20. Kitayama, S., et al., *Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated Valpha24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells*. Stem Cell Reports, 2016. **6**(2): p. 213-27.
 21. Wakao, H., et al., *Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(5): p. 546-58.
 22. Maeda, T., K. Masuda, and H. Kawamoto, *Regeneration of tumor antigen-specific CTLs utilizing iPS technology*. Rinsho Ketsueki, 2016. **57**(8): p. 1066-73.
 23. Miki, S., et al., *Sustainable Antiviral Efficacy of Rejuvenated HIV-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Generated from Induced Pluripotent Stem Cells*. J Virol, 2022. **96**(6): p. e0221721.
 24. Kawai, Y., et al., *Generation of highly proliferative, rejuvenated cytotoxic T cell clones through pluripotency reprogramming for adoptive immunotherapy*. Mol Ther, 2021. **29**(10): p. 3027-3041.
 25. Ito, T., et al., *The therapeutic potential of multiclonal tumoricidal T cells derived from tumor infiltrating lymphocyte-1 derived iPS cells*. Commun Biol, 2021. **4**(1): p. 694.
 26. Ishii, M., et al., *iPSC-Derived Neoantigen-Specific CTL Therapy for Ewing Sarcoma*. Cancer Immunol Res, 2021. **9**(10): p. 1175-1186.
 27. Kashima, S., et al., *Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model*. iScience, 2020. **23**(4): p. 100998.
 28. Cho, Y.B., et al., *TCR Transgenic Mice: A Valuable Tool for Studying Viral Immunopathogenesis Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
 29. Okita, K., et al., *A more efficient method to generate integration-free human iPS cells*. Nat Methods, 2011. **8**(5): p. 409-12.
 30. Brandle, D., et al., *Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9529-33.

31. Harada, S., et al., *Dual-antigen targeted iPSC-derived chimeric antigen receptor-T cell therapy for refractory lymphoma*. Mol Ther, 2022. **30**(2): p. 534-549.
32. Ueda, T., et al., *Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells*. Cancer Sci, 2020. **111**(5): p. 1478-1490.
33. Hurton, L.V., et al., *Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(48): p. E7788-E7797.
34. van Ewijk, W., et al., *Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D?* Semin Immunol, 1999. **11**(1): p. 57-64.
35. Seet, C.S., et al., *Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids*. Nat Methods, 2017. **14**(5): p. 521-530.
36. Chang, C.W., et al., *Broad T-cell receptor repertoire in T-lymphocytes derived from human induced pluripotent stem cells*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97335.
37. Montel-Hagen, A., et al., *Organoid-Induced Differentiation of Conventional T Cells from Human Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(3): p. 376-389 e8.
38. Montel-Hagen, A., et al., *In Vitro Recapitulation of Murine Thymopoiesis from Single Hematopoietic Stem Cells*. Cell Rep, 2020. **33**(4): p. 108320.
39. Bosticardo, M., et al., *Artificial thymic organoids represent a reliable tool to study T-cell differentiation in patients with severe T-cell lymphopenia*. Blood Adv, 2020. **4**(12): p. 2611-2616.
40. Maluski, M., et al., *Chimeric antigen receptor-induced BCL11B suppression propagates NK-like cell development*. J Clin Invest, 2019. **129**(12): p. 5108-5122.
41. Wang, Z., et al., *3D-organoid culture supports differentiation of human CAR(+) iPSCs into highly functional CAR T cells*. Cell Stem Cell, 2022. **29**(4): p. 651-653.
42. Xu, H., et al., *Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(4): p. 566-578 e7.
43. Gornalusse, G.G., et al., *HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(8): p. 765-772.
44. Deuse, T., et al., *Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(3): p. 252-258.
45. Zhu, H. and D.S. Kaufman, *An Improved Method to Produce Clinical-Scale Natural Killer Cells from Human Pluripotent Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2019. **2048**: p. 107-119.
46. Liu, E., et al., *Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors*. N Engl J Med, 2020. **382**(6): p. 545-553.

47. Takashima, Y., et al., *Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human*. Cell, 2014. **158**(6): p. 1254-1269.
48. Kazuki, Y., et al., *Engineering of human induced pluripotent stem cells via human artificial chromosome vectors for cell therapy and disease modeling*. Mol Ther Nucleic Acids, 2021. **23**: p. 629-639.