

氏名・(本籍)	嘉島 相輝 (東京都)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第1028号
学位授与の日付	令和2年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model. (iPS細胞技術を用いた再生キラーT細胞は、患者由来固形癌ゼノグラフトモデルに対して抗腫瘍効果を示す。)
論文審査委員	(主査) 田中 正光 教授 (副査) 久場 敬司 教授 高橋 直人 教授

学位論文内容要旨

Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model.

(iPS 細胞技術を用いた再生キラーT細胞は、患者由来固形癌ゼノグラフトモデルに対して抗腫瘍効果を示す。)

申請者氏名 嘉島 相輝

研究目的

近年、がん治療において免疫チェックポイント阻害薬を始めとする「がん免疫療法」が注目を集めている。一方で、免疫チェックポイント阻害薬治療が有効な患者は限られており、自己免疫疾患を始めとする有害事象が起こり得ることも課題である。この問題を解決するため、共同研究機関である京都大学ウイルス・再生医科学研究所の再生免疫学分野では、iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞療法の開発を行っている。これまでに同研究室では、T細胞から作製したiPS細胞(T-iPS細胞)から、単一のT細胞受容体(T cell receptor: TCR)を発現するT細胞を大量に誘導することに成功した(Cell Stem Cell, 2013)。更にその後、より高品質であるCD8 α β 型のキラーT細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)を開発した(Cancer Res, 2016)。この研究成果により、再生T細胞が急性骨髄性白血病に対して有効である可能性が示された。一方で、泌尿器癌を始めとする固形癌に対する再生T細胞療法の有効性は不明であり、効果の検証が求められている。また、実際の臨床応用を目指すためには、iPS細胞由来のT細胞療法を他家移植に用いるための新たな技術開発が必要である。以上の背景から我々は、再生免疫学分野との共同研究チームを形成し、免疫原性が高い固形癌の一つである腎細胞癌を標的として、固形癌に対する他家移植用iPS細胞由来再生キラーT細胞を用いた新規治療法を開発する目的で研究を行った。

研究方法

標的がん抗原として、腎細胞癌を含むあらゆる固形癌で高発現していることで知られるWT1抗原を対象とした。HLA-A*24:02を持つ健常人の末梢血WT1特異的CTLに山中因子を導入して作製された、WT1特異的T-iPS細胞を用いて、WT1特異的CTLを再生した(Cancer Res, 2016)。⁵¹Cr release assayにより、再生したWT1特異的CTLの腎細胞癌細胞株に対する殺傷効果を検証した。腎癌細胞株に*luciferase*遺伝子を導入し、免疫不全マウスNOGの腎臓に移植した後に*in vivo*イメージング装置IVISを用いて腫瘍体積をモニタリングすることで、再

生したWT1特異的CTLによる*in vivo*での抗腫瘍効果を検証した。更に市販の腎細胞癌細胞株だけでなく、臨床患者がんの性質を保持している患者由来腎細胞癌移植マウスモデル(patient derived xenograft: PDX)に対する抗腫瘍効果についても検証した。PDXモデルに対する治療細胞の作製に関しては、京都大学iPS細胞研究所が開発した、日本人のHLA最頻ハプロタイプホモ型の他家移植用iPS細胞を用いた。同iPS細胞にWT1特異的なTCR遺伝子を遺伝子導入することでWT1-TCR-iPS細胞を作製し、WT1-TCR-iPS細胞から他家移植用WT1特異的T細胞(WT1-TCR-再生T細胞)の分化誘導を試みた。WT1陽性腫瘍組織を免疫不全マウス(NOGマウス)の背中右側、WT1陰性腫瘍組織を左側に皮下移植し、WT1-TCR-再生T細胞によるPDX治療モデル実験を行った。

研究成績

(1) T細胞由来iPS細胞から再生したCTLは腎細胞癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示した。異なる市販の腎細胞癌細胞株に対する*in vitro*⁵¹Cr release assayの結果、WT1特異的再生CTLは、HLA-A*24:02及びWT1抗原を発現した腎細胞癌細胞株TUHR10を最も効率に殺傷した。また、同細胞株に*luciferase*遺伝子を導入し、NOGマウスを用いて腎被膜下ゼノグラフトモデルを作製した。コントロール群と再生WT1-CTL投与群に分けてIVISで経時的に観察した結果、再生WT1-CTL投与群において有意に腫瘍増殖が抑制された。

(2) 他家移植用WT1-TCR-再生T細胞は、腎細胞癌PDXモデルに対して抗腫瘍効果を示した。より汎用性を高めた再生T細胞を作製するため、京都大学iPS細胞研究所が作製した他家移植用のHLA最頻ハプロタイプホモ型iPS細胞に対し、予め単離しておいたWT1特異的TCR遺伝子を導入して、WT1-TCR-iPS細胞を作製した。WT1-TCR-iPS細胞を*in vitro*で分化誘導することで、他家移植可能なWT1-TCR-再生T細胞を再生することに成功した。前述のPDXモデルを作製し、WT1-TCR-再生T細胞による*in vivo*治療実験を行った結果、再生WT1-CTL投与群ではWT1陽性腫瘍の増殖を有意に抑制した。

結論

iPS細胞技術を用いた再生CTL療法は、同型HLAを持つWT1陽性ヒト腎細胞癌細胞株のマウスゼノグラフトモデルに対して抗腫瘍効果を示した。また、TCR-iPS細胞から作製した他家移植用再生CTL療法は、WT1を発現する腎細胞癌PDXモデルに対して、固形癌で初めて抗腫瘍効果を示した。本研究成果は、腎細胞癌のみならず固形がん全体に対する再生T細胞療法の臨床応用に向けて大きな前進になると考えられた。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 田中正光

申請者： 嘉島相輝

論文題名： Cytotoxic T lymphocytes regenerated from iPS cells have therapeutic efficacy in a patient-derived xenograft solid tumor model (iPS 細胞技術を用いた再生キラーT細胞は、患者由来固形癌ゼノグラフトモデルに対して抗腫瘍効果を示す。)

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、iPS 細胞の技術を用いて、固形腫瘍に対して初めて再生T細胞療法の効果を検証したものである。WT 1 抗原特異的再生 CTL が、同 HLA ハプロタイプと WT1 抗原を有する腎細胞がん細胞株を、培養状態およびマウス腎へのゼノグラフトモデルで有意に殺傷し増殖抑制をおこす結果を示した。また、他家移植用 WT1-TCR-再生T細胞を作成し、患者由来腎細胞がん移植マウスモデルにおいて抗腫瘍効果を示すことを発表した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

これまで、再生T細胞療法は急性骨髄性白血病などに対して、その効果が検証されてきた。しかし固形腫瘍に対しての評価はまだされておらず、発表研究において腎細胞がんを対象に、固形腫瘍でも有意な抗腫瘍効果を初めて確認できたことに斬新さが見られる。

また、再生TCRの効果はこれまで細胞株に対してのみ検証が行われてきた。一方、当発表では初めて患者由来の腎細胞がんという不均一な癌細胞集団に対しても、移植腫瘍レベルで抗腫瘍効果を観察したという点でも新規性がある。

2) 重要性

iPS 細胞技術を用いた再生CTL療法が、今後様々な固形腫瘍に対しても応用が広がるで

あろう事を、腎細胞がんを材料に示すことができた点は学術的な観点のみならず、医療実用上の意義も高いといえる。特に患者から採取した癌組織を扱い、マウスゼノグラフトのモデルで WT1-TCR-再生T細胞の効果を検証できたことは、実用性への検証として重要である。

3) 研究方法の正確性

技術的にも困難な側面も有する iPS 細胞の維持、分化など先行研究による実験手法を正確に習得し、安定した再現結果を得ている事を報告した。抗腫瘍効果をみる培養レベルの 51Cr 放出アッセイや、in vivo の腫瘍を IVIS モニターしながら判定する内容にも習熟度が見られた。特に患者腫瘍組織由来の PDX による評価法は、臨床医の立場も生かした今後の展望にも繋がる研究手法として重要である。

4) 表現の明瞭さ

研究目的、方法、実験結果の表現は適切であり、これまでの iPS による CTL 療法の問題点の解説や、それに対する将来の展望を含めた考察に対しても、明瞭に発表したと考える。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。