

主論文の要旨

**Generation of TCR-Expressing Innate Lymphoid-like
Helper Cells that Induce Cytotoxic T Cell-Mediated
Anti-leukemic Cell Response**

〔 細胞傷害性 T 細胞を介した抗白血病細胞応答を誘導する
TCR 発現自然リンパ球様ヘルパー細胞の作製 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

上田 格弘

【緒言】

白血病抗原特異的 CD4 陽性ヘルパーT 細胞(Th)は、樹状細胞(DC)活性化を介した白血病特異的傷害性 T 細胞(CTL)免疫応答の誘導に重要であり、これを使用した T 細胞免疫療法は白血病治療への応用が期待できる。しかし、抗原特異的 CD4 陽性 Th の体外での増殖能には限界があるため臨床応用に十分な細胞数を得ることは困難である。本研究は、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から白血病抗原特異的 CD4 陽性 Th を無限に供給する方法を確立し、白血病に対する新たな細胞免疫療法開発につなげることを目的とした。

【方法と結果】

慢性骨髄性白血病(CML)の BCR-ABL 融合タンパクに由来する b3a2 ペプチド特異的 CD4 陽性 Th クローンにセンダイウイルスを用いて山中 4 因子(*Klf4, Oct3/4, Sox2, c-Myc*)を遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。次に、この iPS 細胞を C3H10T1/2 細胞上で VEGF, FLT3 リガンド, SCF の存在下で培養することで、造血前駆細胞を誘導した。引き続き OP9-DLL1 細胞上で FLT3 リガンド, インターロイキン(IL)-7 の存在下で培養し iPS 細胞由来 T 細胞(iPS-T)へと分化誘導した。この iPS-T は、元の b3a2 ペプチド特異的 CD4 陽性 Th クローンと同一の T 細胞抗原受容体(TCR)を発現していた(Figure 1A)。一方で、iPS-T は 1 型自然リンパ球(ILC1)・ナチュラルキラー(NK)細胞に類似の表面分子発現と遺伝子パターンを示した(Figure 1A-C)。

HLA-classII 拘束性の TCR をもつ Th の十分な活性化には、CD4 分子の補助が重要であることが知られている。しかしながら、誘導した iPS-T は CD4 分子を発現していなかった(Figure 1A)。そこで、iPS-T にレトロウイルスベクターを用いて CD4 分子を遺伝子導入して、CD4+iPS-T を作製した。得られた CD4+iPS-T は、CD4 を発現していない Mock iPS-T と比較して、b3a2 ペプチド特異的な増殖能の増強を認めた(Figure 1D,E)。

活性化 Th に発現する CD40L 分子は DC 表面の CD40 分子を架橋することで、DC 活性化における重要な共刺激を供給することが知られている。CD4+iPS-T には、IL-2 依存性に CD40L 分子を高発現する分画(CD4+CD40L^{high}iPS-T)が含まれることを見出し、この CD40L^{high}分画を FACS Aria セルソーターにて分離した(Figure 2A,B)。得られた CD4+CD40L^{high} iPS-T に、抗 CD3 抗体刺激を加えると、表面の CD40L 分子発現が上昇した(Figure 2C)。また、CD4+CD40L^{high} iPS-T を DC と共培養すると b3a2 ペプチド依存的に DC 表面の CD83 分子, CD86 分子, CCR7 分子の発現が上昇した(Figure 2D)。

次に、51 クロム遊離試験にて iPS-T の細胞傷害活性を評価した。iPS-T は白血病細胞株である THP-1 に対して NK 細胞様の抗原非特異的細胞傷害活性を示した(Figure 3A)。阻害抗体を用いて細胞傷害活性を評価したところ、この抗原非特異的細胞傷害活性は、DNAM1 分子とパーフォリン分子に依存していた(Figure 3A)。抗原非特異的細胞傷害活性は患者に投与した場合に想定外の副作用を引き起こす可能性があると考え

られる。しかしながら、CD4⁺CD40L^{high}iPS-T は、CD4⁺CD40L^{low}iPS-T と比べ DNAM1 分子の発現が低く、THP-1 に対する抗原非特異的細胞傷害活性を示さなかった (Figure 3B)。つまり、CD4⁺CD40L^{high}iPS-T は、CD4⁺CD40L^{low}iPS-T と比較して、より抗原特異的免疫応答の惹起に特化していると考えられる。

次に、b3a2 ペプチド存在下で CD4⁺CD40L^{high} iPS-T と共培養することで活性化した DC と、CD8 陽性 T 細胞を白血病抗原である Wilms' tumour 1(WT1)ペプチドを付加して培養すると、CD8 陽性 T 細胞の増殖が認められ(Figure 4A)、増殖した CD8 陽性 T 細胞を解析したところ WT1 テトラマー陽性細胞が検出された(Figure 4B)。つまり、CD4⁺CD40L^{high} iPS-T は、DC 活性化を介して WT1 ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞の効果的なプライミングを誘導した。一方で、CD4⁺CD40L^{low} iPS-T や Mock CD40L^{low} iPS-T を用いてもこの反応は認められなかった(Figure 4A)。次に、誘導された WT1 ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞を、WT1 ペプチド存在下で HLA-A24 陽性白血病細胞株(K562)と共培養し、その細胞傷害活性を 51 クロム遊離試験にて評価したところ、WT1 ペプチド依存性の細胞傷害活性を示した(Figure 4B)。WT1 ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞を、WT1 minigene を導入した HLA-A24 陽性 K562 と共に、NSG マウスの皮下に投与し経時的に腫瘍径を観察したところ、マウス体内での腫瘍増大を完全に抑制した(Figure 5)。

【考察】

本研究では、*in vitro* の実験系で iPS-T が DC の活性化を介した抗腫瘍 CTL 応答を誘導することを示した。しかし、iPS 細胞由来 Th 細胞を利用した治療を実現する上で、今後乗り越えるべき課題は多い。

in vivo での iPS-T の生存、DC/CTL との相互作用、腫瘍局所への移動能力などは明らかになっていない。これらを明らかにするためには、HLA-class II 拘束性 TCR を発現した T 細胞と DC の相互作用による抗原特異的 CTL プライミングを体内で再現するような動物モデルが必要である。具体的には、免疫系ヒト化マウスを用いて、同じ患者由来の腫瘍細胞・iPS-T を用いるようなアッセイ系が必要である。

HLA ホモドナー由来 iPS 細胞を用い、これに抗原特異的 TCR を導入するような方法は、同じ HLA ハプロタイプを持つ患者に広く使用できるため、患者本人由来の iPS 細胞を用いた自家移植と比較して、治療用 T 細胞の準備にかかる時間やコストの抑制につながるため有望だと考えられる。さらに、ヒトに投与する臨床応用につなげるためには、異種動物由来の成分やフィーダー細胞を使用しない分化誘導系の確立も必要であり、今後の検討課題である。

【結語】

CML 特異的 CD4 陽性 Th クローンから樹立した iPS 細胞から元の Th クローンと同じ TCR を発現する iPS-T を誘導した。これに CD4 分子を導入することによって iPS-T の抗原特異的免疫応答が増強された。さらに、iPS-T から CD40L 分子の高発現

能を持つ分画を単離した。得られた CD4⁺CD40L^{high}IPS-T は、抗原特異的な DC の活性化を介して、白血病抗原特異的 CTL プライミングを誘導した。