

博士論文

iPS 細胞およびそのゲノム編集を利用した
腫瘍免疫療法に関する研究

南川淳隆

目次	2
要旨	3
序文	4
iPS 細胞を利用した癌免疫療法	4
TCR の再構成と T 細胞分化	7
卵巣明細胞腺癌と Glypican3 (GPC3)	10
Wilms' tumor gene 1 (WT1) 遺伝子	11
TCR 遺伝子導入 T 細胞療法	11
HLA 情報の特定された iPS 細胞ストックプロジェクト	14
研究目的	16
実験方法	17
結果	27
考察	49
謝辞	58
引用文献	59

要旨

卵巣明細胞腺癌に発現する Glypican-3(GPC3) 特異的な T 細胞より作成した iPS 細胞より、GPC3 発現細胞を特異的に傷害する、CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を効率よく分化誘導する手法の開発に成功した。CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は、抗原認識能が高く、より免疫療法に適した細胞であったが、分化中に CD4 (+)CD8(+)細胞の段階を通過する事で T Cell Receptor(TCR)の追加再構成が起こり、抗原特異性を失ってしまう事がわかった。この問題を解決するために、iPS 細胞の *RAG2* 遺伝子を CRISPR/Cas9 により欠損させる手法を開発し、TCR の変化を防ぐ事に成功した。*RAG2* KO GPC3 iPSC-T 細胞は、*in vitro*, *in vivo* 何れにおいても、効率的に卵巣明細胞腺癌株を含む GPC3 発現腫瘍を傷害する事を確認した。また、同種移植に使用可能な HLA タイピングがなされた iPS 細胞に TCR 遺伝子の導入を行い、類似の手法で抗原特異的 TCR 発現同種 iPS 細胞由来 CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を得た。iPS 細胞を元にした免疫細胞療法は癌抗原を発現する腫瘍に対する有望な治療法になると期待される。

序文

iPS 細胞を利用した癌免疫療法

1990 年代にがん抗原が同定されて以来 (1)、それまでは外来抗原に対する防御機能としてのみ働くと考えられていた免疫システムが、がんの発生や進展を阻止しているという知見が積み重ねられてきた。特に獲得免疫系の中心である T 細胞は腫瘍抗原を識別し、クローン性増殖を行い傷害する事で、がんの免疫監視を行っている事がわかり、腫瘍特異的 T 細胞を利用した養子免疫療法の研究は世界中で盛んに行われるようになった。T 細胞養子免疫療法は、がん患者の体内に存在する腫瘍特異的な T 細胞を体外にて拡大培養した後に戻す治療法であり、一定の効果が認められる事が報告されている(2) (3) (4) (5)。しかし、治療に必要な十分量の免疫細胞を確保するには、非常に多くの手間と時間を要する。また、体外で増殖させた T 細胞は老化が進んでおり、生体内での生存期間が短いため抗腫瘍効果が弱い (3)。この問題を解決するために、養子免疫用の T 細胞を iPS 細胞から作成する手法についての研究が報告された (図 1)(6) (7) (8)。腫瘍特異的な T Cell Receptor (TCR) を持つ CD8T 細胞より iPS 細胞を作成すると、腫瘍特異的 TCR 遺伝子を内在する iPS 細胞 (T-iPSC)を作る事が出来る。T-iPSC は TCR 遺伝子を内在しており、TCR transgenic 細胞になっているため、この

T-iPSC を CD8 T 細胞に再分化させることで、疲弊の進んでいない CD8 T 細胞を大量に調達する事が出来るという手法である。

$\alpha\beta$ TCR を発現している CD8 T 細胞より作成した T-iPSC は、単一の $\alpha\beta$ TCR を発現した CD8 陽性 T 細胞に分化させられる。しかしながら、これまでに報告されていた T-iPSC より分化させた CD8 T 細胞は、ヒト末梢血中の T 細胞と比べ、大きな違いが一つあった。CD8 分子には、CD8 α と CD8 β のサブユニットが存在し、末梢血中の CD8 T 細胞は CD8 $\alpha\beta$ 陽性で有るのに対し、T-iPSC 由来 CD8 細胞では CD8 β の発現が認められていない事が報告されていた。遺伝子発現解析の結果では、T-iPSC 由来 CD8 T 細胞は $\gamma\delta$ -T 細胞と類似しており、T-iPSC は胸腺分化と異なった経路を辿って CD8 T 細胞に分化している事が示唆されていた(9)。

胸腺由来の CD8 T 細胞では CD8 $\alpha\beta$ ヘテロ鎖として存在するが、NK 細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞、腸管上皮細胞間リンパ球 (intestinal intraepithelial lymphocyte IEL)などの免疫細胞では CD8 $\alpha\alpha$ ホモ鎖として存在する事が知られている(10)。CD8 は、TCR-CD3 複合体において、共刺激分子としての働きを持ち、CD8 β は特に TCR と、ターゲット抗原の親和性を上昇させる。T-iPSC 由来の CD8 T 細胞はこの CD8 β の発現を認めない。つまり CD8 $\alpha\alpha$ ホモダイマーを発現しており、この事が原因と考えられる、抗原親和性の低下を認めていた(6)。CD8 $\alpha\beta$ 陽性細胞は、生

体内では CD8 Double positive(DP) 細胞を経由して発生する事が知られており、iPS 細胞から CD8 α β T 細胞を分化させるには分化方法の改良が必要と考えられた。

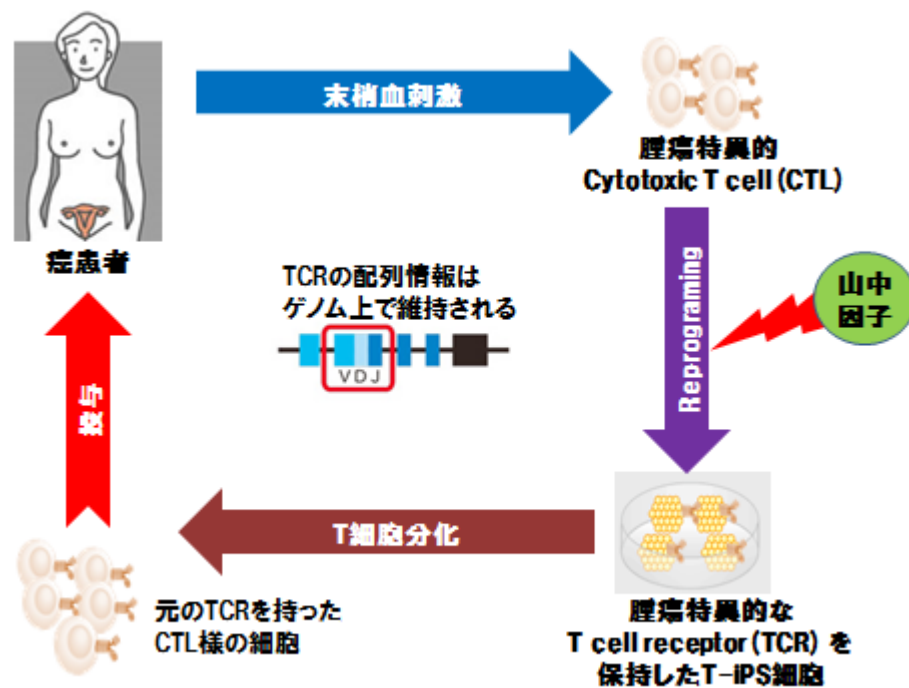


図1 iPS 細胞を利用した癌免疫療法

T 細胞より作成した iPS 細胞(T-iPS 細胞)は、TCR 遺伝子を内在している。このため、癌抗原に特異的な T 細胞より作成した T-iPS 細胞を分化させる事で、大量の癌特異的 T 細胞を産生する事ができる。

TCR の再構成と T 細胞分化

iPS 細胞由来 CD8 $\alpha\beta$ 細胞における TCR 遺伝子再構成の可能性

in vitro での T-iPSC 分化法を、生理的な胸腺細胞の分化機構に近づける改良を

行った結果、T-iPSC より CD8 $\alpha\beta$ 細胞を分化させる事が出来る事が報告された

(11)。DP 細胞に適切な強度、条件で刺激を与える事で、CD8 $\alpha\beta$ 細胞は分化可能

である事が明らかになってきた。しかし、これまで T-iPSC 由来の CD8 $\alpha\beta$ 細胞に

おける TCR 鎖の状態についての報告は存在しなかった。T-iPSC と良く似た状態

と考えられる、TCR トランスジェニック(Tg)細胞に関しては、マウスモデルに

おいて広く研究が進んでいる。TCR-Tg マウスの CD8 $\alpha\beta$ T 細胞の研究において

は、Tg-TCR 以外の内在性に新たな TCR が発現する事が確認されている(12) (13)。

CD8 $\alpha\beta$ T 細胞は、CD4 CD8 DP 細胞を経由して分化するが、この DP 段階で TCR

遺伝子の再構成を起こす、*recombination activating gene 1 and 2 (RAG1 RAG2)*遺伝

子の発現がおこる。すると、TCR- β 鎖、TCR- α 鎖の順に再構成され、新たに機能

的な TCR の発現がおこる(14)。機能的な TCR- β 鎖が出来ると、TCR- β と pT α な

らびに CD3 分子で構成される pre-TCR を介したシグナル伝達により、TCR- β は

再構成をやめ、TCR- α が再構成を開始する。TCR- α の再構成は、適切な刺激が入

り、DP 細胞が CD4 または CD8 single positive 細胞に分化するまで継続され、これにより TCR の多様性が維持されている(15)(16)。TCR トランスジェニックマウスでは、導入した TCR- β から為る pre-TCR を介したシグナル伝達がおこるためと考えられる TCR- β の単一性は保たれるが、TCR- α 鎖に関しては、遺伝子再構成が開始することがわかっていた(13)(16)。T-iPS 細胞が、TCR トランスジェニック細胞と類似のものと考え、CD8 $\alpha\beta$ T 細胞を分化させる過程において、マウスと同様に TCR の再構成がおこり、新たな TCR 鎖が作られてしまう事が推測されていた。

一方、TCR トランスジェニックマウスにおいては、TCR 鎖の再構成を防ぐために *RAG* 遺伝子 KO マウスと交配させるという手段が多用されており、T-iPS 分化細胞においても、抗原特異性を維持するために *RAG* 遺伝子のノックアウトが有用と考えられた(17)。

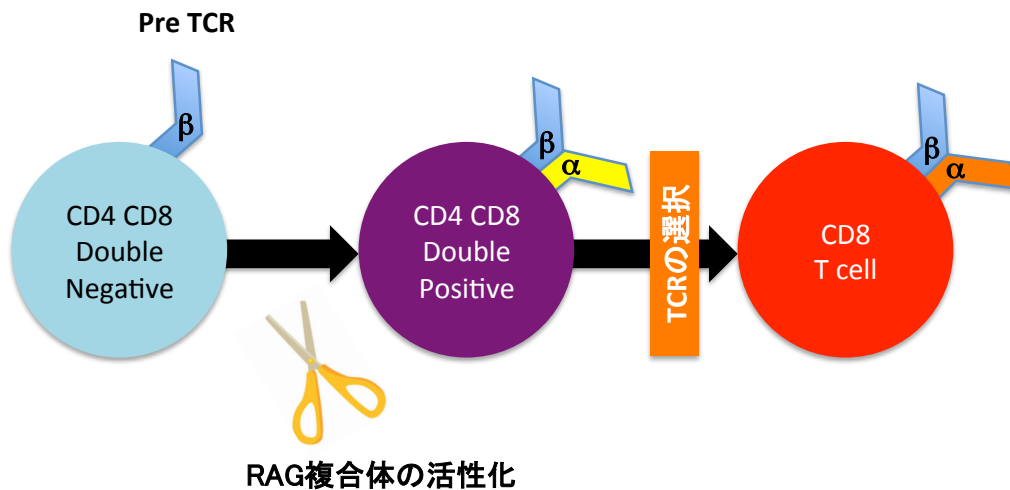


図 2; T 細胞分化と、TCR 鎖の再構成

T 細胞分化の研究において、T 前駆細胞は、TCR β と代替 TCR α から構成される pre-TCR シグナルにより、CD4 CD8 Double Negative (DN) 細胞から Double Positive (DP)細胞への分化が誘導される。この過程で、*RAG* 複合体のさらなる活性化が起こり、TCR α 鎖の再構成が起こる。その後、自己抗原に反応せず、機能的な TCR を持つ T 細胞のみが選択されて、CD8T 細胞に分化する事ができる。

卵巣明細胞腺癌と Glypican-3 (GPC3)

Glypican-3 (GPC3) はヘパラン酸プロテオグリカン的一种で、GPI アンカーにより細胞表面に接着しているタンパク質である(18)。元来、肝細胞癌特異的に発現する癌蛋白として発見され、正常組織での発現をほとんど認めないことから、免疫療法のターゲットとして有用視されていた。他種の固形腫瘍においても発現する事が近年の研究でわかってきており、メラノーマ、ウィルムス腫瘍、肝芽腫、肺扁平上皮癌、また婦人科領域においては、卵黄嚢腫瘍、卵巣明細胞腺癌等に発現する事が知られている(19) (20) (21) (22)。

卵巣明細胞腺癌 (Ovarian clear cell carcinoma CCC)は、卵巣上皮性腫瘍 (Epithelial ovarian carcinoma EOC)の約 10-15%を占めるが、他の卵巣がんと比較し、卵巣がん全般の治療に多用される、白金製剤、タキサン製剤に対する耐性を持つ事が多く確立した治療指針は存在しない。この結果として予後が悪い事が知られている(23) (24) (25)。卵巣明細胞腺癌は子宮内膜症病変と共存することが知られており、発生のメカニズムとの関与が考えられている(23)。卵巣明細胞腺癌、子宮内膜症は共に日本において近年増加傾向にあり、食生活等のライフスタイルの変化、初産年齢の上昇などとの関連が疑われている。

Wilms' tumor gene 1 (WT1) 遺伝子

ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 は白血病や多様な固形腫瘍に発現する癌抗原であり、治療効果、免疫原生、腫瘍特異性、腫瘍産生における役割、抗原発現腫瘍の患者数等からの評価において、最も有用なターゲットとされている(26)。全世界ですでにペプチドワクチンの臨床試験が実施されており、臨床効果が報告されている。婦人科領域においても、卵巣がん、子宮頸癌等での WT1 抗原の発現が知られており、卵巣がんでは WT1 ペプチドワクチンの臨床効果も報告されている(27) (28) (29)。今後の発展が期待されるターゲットである。

TCR 遺伝子導入 T 細胞療法

がん患者の体内の腫瘍特異的 CTL を拡大培養し、戻す T 細胞養子免疫療法を、より多くの患者にて適用する方法の 1 つとして TCR 遺伝子導入法がある。癌抗原特異的な CTL より TCR 遺伝子を α 鎖、 β 鎖ともにクローニングし、2A 配列でつないだ配列を、末梢血中の T 細胞に遺伝子導入を行う事で、癌抗原に特異的な CTL を人為的に短時間で作成する方法である。悪性黒色種に高発現する癌抗原、MART-1 や NY-ESO-1 をターゲットとした臨床研究にて一定の臨床効果が

報告されている(30) (31) (32)。この方法の問題点としては、TCR 蛋白は CD3 分子と複合体を作る事で細胞表面に発現するが、導入先の T 細胞が内在性に持つ TCR 蛋白が、CD3 分子を巡り導入 TCR と競合する事で発現を阻害する。また内在性 TCR と導入 TCR のミスペアリングのために、予測不能で場合によっては自己反応性を示しうる配列を持つ TCR が産生されてしまう可能性があることが上げられる。この問題の解決のために、内在性 TCR の発現を抑制する手法として siRNA やジンクフィンガーヌクレアーゼを用いる方法が報告されている(33) (34)。

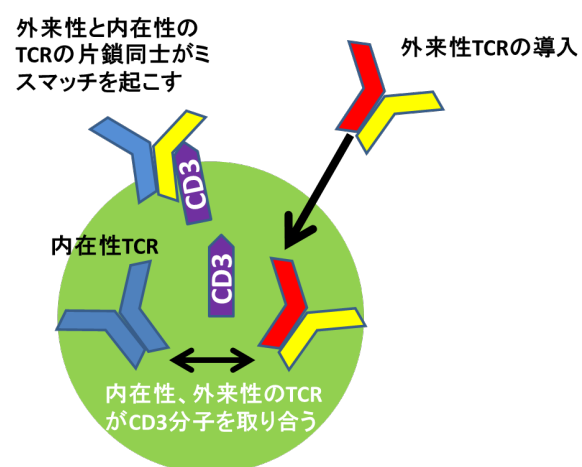


図 3; TCR 遺伝子導入法の問題点

外来性の TCR を末梢血中の T 細胞に導入すると、内在性の TCR と CD3 分子を取り合うために、発現の低下が見られ、また外来、内在の TCR がミスマッチをおこし、予想外の特異性を持つ新しい TCR 複合体が形成される危険がある。

HLA 情報の特定された同種移植用 iPS 細胞ストックプロジェクト

臨床において、同種移植に使用可能な細胞バンクのアイデアは既に実現している。幹細胞バンクとしては、臍帯血バンク、骨髄バンク（ドナーレジストリー）等、現在既に実用化している細胞バンクも存在する。これらに加え、将来的に iPS 細胞バンクを実現させようという取り組みが始まっている。対立遺伝子頻度の高い HLA ハプロタイプをホモ接合で保持した健常人由来の iPS 細胞を、各種揃えたバンクを作成しておけば、同種移植にても長期生着し、また移植後の免疫抑制処置を必要としない細胞または臓器をこの iPS 細胞から作れるのではないかという考えである(35) (36)。実際、HLA-A, -B, -DRB1 を一致させた iPS 細胞は不一致の細胞に比べ、免疫細胞による排除を受けにくい事が報告されている(37)。HLA 遺伝子群は多型性に富むため、それらの HLA 遺伝子型を全てマッチさせる事は容易ではない。しかしながら、それぞれの人類集団には比較的高頻度の HLA ハプロタイプが存在する事が知られており、日本人で最も高頻度のハプロタイプ HLA-A*24:02, HLA-B*52:01, HLA-C*12:02, HLA-DRB1*15:02, DQB1*06:01, HLA-DPB1*09:01 をヘテロ接合またはホモ接合で保持する個体は日本人の 8.59%を占めると報告されている。京都大学では、本ハプロタイプをホ

モ接合で保持する希少なボランティアドナーより iPS 細胞を作成し、一定の頻度で同種移植に使用可能な細胞として、臨床開発用に各施設への配布を開始している。

私は、以下の目的を設定し研究を行った。

研究目的

1；GPC3 特異的 T-iPS 細胞の樹立と、その分化

1-1 GPC3 特異的な CTL より、iPS 細胞を作成し(GPC3 T-iPSC)、分化法を最適化する事で CD8 $\alpha\beta$ 細胞に分化させる。

1-2 GPC3 T-iPSC より分化させた CD8 $\alpha\beta$ 細胞 TCR 鎖の解析を行う。

2；Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)ゲノム編集による、TCR 鎖再構成の阻止

2-1 CRISPR によるゲノム編集を利用し、GPC3 T-iPSC の RAG2 knock out (KO) 株を作製、iPS 細胞の性状を確認する。

2-2 GPC3 T-iPS RAG2 KO 細胞の分化 CD8 $\alpha\beta$ 細胞に関して *in vitro*, *in vivo* の卵巣明細胞腺癌株に対する細胞傷害性を検討する。

3；TCR 遺伝子導入 iPS 細胞の分化

iPS 細胞に GPC3 特異的 TCR 遺伝子を導入し、CD8 $\alpha\beta$ 細胞に分化出来るか、またターゲット特異的な細胞傷害性について検討する。

実験方法

1 GPC3 特異的 T-iPS 細胞の作成

国立がん研究センター中面哲也博士の研究室にて、HLA-A*02:01 の肝臓癌患者の末梢血より採取し、クローン化された GPC3 特異的な CTL (38)を元にして T-iPS 細胞を作成した。作成方法としては、既報で報告されているセンダイウイルスベクターを使用する方法を用いた(6)。 1×10^6 細胞の GPC3 CTL を 5×10^6 細胞の放射線照射処理を行った健常人末梢血細胞 (Peripheral blood mononuclear cell PBMC)と混合し、5 μ g/ml PHA-L (Sigma-Aldrich) , 100 U/ml IL2 (Peprotech) を加えた α -MEM 培地で刺激を行った。刺激 7 日目に、山中 4 因子および Sv40 遺伝子をセンダイウイルスベクターで導入を行い、MEF(Mouse embryonic fibroblast マウス胎児より自家作成)上に播種した。センダイウイルスベクター感染後、培地を 1 週かけて未分化培地(DMEM F12 HAM (SIGMA) , 20% KSR , 10% L-glutamin , 5ng/ml b-FGF)に置換していった。14 日目に、確認できた iPS 細胞コロニーをクローン化し拡大培養を行った。

2 TCR 鎖シーケンス解析

1x10⁵細胞の各種細胞より、Total RNA を RNeasy micro kit (Quiagen)を使用して抽出した。cDNA Synthesis kit (Roche Basel Schweiz) にて cDNA 合成後、Repertoire Genesis 社 (Osaka Japan)に依頼し、各 TCR 鎖特異的プライマーで増幅後、TCR 鎖の解析ソフトウェアである Repertoire Genesis (RG Repertoire Genesis Incorporation Osaka Japan) を利用して、シーケンスを行った。RG では、TRV TRJ アレルの選択を調べ、また CDR3 領域の配列決定も行った(39)。

3 CRISPR による iPS 細胞のゲノム編集 (RAG2 ノックアウト)

iPS 細胞は ROCK inhibitor (Y-27632 Sigma) 入りの培地で 1 時間培養後、0.25% Trypsin solution にて単一細胞化した。1x10⁶の iPS 細胞と 5 µg Cas9 発現ベクター、guide-RNA 発現ベクターを混合し、NEPA21 electroporator (Nepagene Japan)を用いてエレクトロポレーションにて細胞に導入を行った。RAG2 遺伝子のターゲット guide RNA 配列としては、京都大学 iPS 細胞研究所、堀田秋津博士の指導の下に

GGTTATGCTTTACATCCAGATGG に決定し、発現ベクターを構築した(40)。

iPS 細胞はエレクトロポレーション後、Y-27632 を加えた培地で培養し、コロニーピックにてクローン化した。T7 endnuclease1 による T7E1 アッセイにて、変異挿入クローンのスクリーニングを行い、TA クローニングを用いたシーケンスにてゲノム編集成功株を選出した。

4 iPS 細胞よりの T 細胞分化

iPS 細胞の分化法については、既報の方法を改変して行った(6) (図 4)。iPS 細胞を C3H10T1/2 フィーダー細胞上に播種し rhVEGF 入りの EB 培地で低酸素環境下にて培養を行った。14 日目に常酸素下に移動し、5 ng/ml IL-7 , 5 ng/ml Flt-3L を加えた α -MEM 培地にて OP9-DL1 ストローマ細胞と共培養を行った。1 週間毎に、浮遊細胞を回収し、新しい OP9-DL1 上に播種を繰り返した。40 日目に回収した浮遊細胞を抗 CD3 Ab である 500 ng/ml OKT3 (eBioscience) , 10 nM dexamethasone(デキササート 富士製薬工業) 10 ng/ml IL-7 , 100 U/ml IL-2 を含む α -MEM 培地にて刺激を行い CD8 α β 陽性 T 細胞を誘導した。誘導した CD8T 細胞は、3 週間毎に放射線照射処理を行った PBMC をフィーダーとして 10 ng/ml IL-7 , 5 ng/ml IL-15, 2 μ g/ml PHA を加えた α -MEM 培地にて刺激、拡大培養を行った。

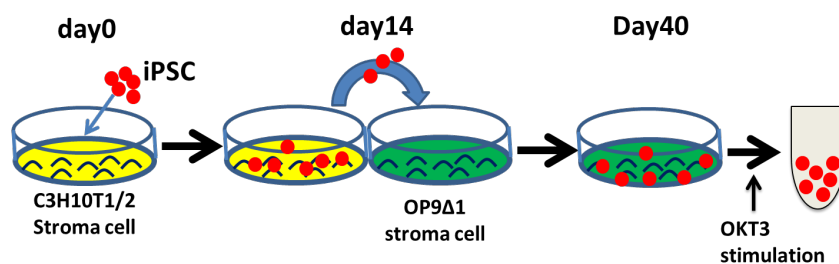


図 4；iPS 細胞よりの T 細胞分化

C3H10T1/2 及び OP9Δ1 の 2 種類のスโตรーマ細胞と共培養する事で、iPS 細胞を CD8αβ細胞に分化させる

5 フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーには下記の抗体を使用した。CD3-Alexa700(UCHT1), CD45-BV510(H130), CD7-APC (CD7-6B7), CD8a-PerCP-cy5(UCHT2), CD8b-PE-cy7(SID18BEE), CD28-FITC(CD28.2), CD27-APC (0323) , 抗体は、BD Bioscience(San Joe CA USA), Beckman Coulter(Marseille France), Biolegend(San Diego CA USA), eBioscience(San Diego CA USA), の各社から購入した。

HLA-A*02:01/GPC3₁₄₄₋₁₅₂ Dextramer, HLA-A*24:02/GPC3₂₉₈₋₃₀₆ Dextramer ,

HLA-A*24:02/WT1₂₃₅₋₂₄₃ Dextramer は IMMUDEX (Frolida USA) から購入した。抗

体染色したサンプルは、すべて FACS Aria II (BD Bioscience) にて解析し、データは FlowJo (Tree Star Ashland OR USA) を用いて処理した。

6 細胞傷害性試験

T 細胞の抗原特異的な反応については、標準的な ^{51}Cr リリースアッセイを用いて行った(41)。ターゲット細胞を ^{51}Cr を加えた培地で 1 時間培養し、2 回洗浄。ペプチドをパルスする場合は、この後 1 時間ペプチド入りの無血清培地で培養を行った。その後、96 穴プレートにターゲット細胞を 5000 細胞/well で播種し、エフェクターT 細胞と Effector Target ratio (E/T ratio) を振り分けた上で 5 時間の共培養を行った。培養上清を液体シンチレータと混合し、 β カウンターMicro beta (Perkin Elmer) で線量を測定した。ターゲット細胞としては、HLA-A*02:01/A*24:02 陽性又は陰性の不死化 B 細胞株 (B-LCL) (理研セルバンク), Koc-7c (卵巣明細胞腺癌株 HLA-A*02:01/A*31:01), HepG2 (肝細胞癌株 HLA-A*02:01/A*24:02), sk-Hep-1(HLA-A*02:01/A*24:02), PC9 (HLA-A*24:02/A*24:02), PC9-WT1(国立がん研究センター、植村靖史博士より提供)を使用した。

7 細胞増殖試験

細胞増殖に関して、 ^3H チミジンラベルにて解析した。 1×10^5 細胞の T 細胞を放射線照射処理した 5×10^5 ターゲット細胞と 3 日間共培養した後、 ^3H チミジンのパルスを行った。16 時間後に ^3H チミジンの取り込み量を Micro beta (Perkin Elmer) で線量を測定した。

8 *in vitro* CTL イメージング

分化 CTL の細胞傷害像を *in vitro* タイムラプスにて撮影行った。T 細胞を Cell trackerTM Orange (Thermo Fisher) にてプロトコル通りに染色し、GFP 又は、CFSE でマーキングしたターゲット細胞とガラスボトムディッシュにて共培養行った。タイムラプス画像は、Biostation-IMQ (Nikon Japan) にて撮影行った。

9 iPS 細胞への TCR 遺伝子導入

TCR 遺伝子入りのレンチウィルスベクターを作成し、iPS 細胞への導入を行った。

レンチウィルスベクターは、慶応大学 三好浩之博士より供与頂いた、

CS-UbC-RfA-IRES2-hKO1 をバックボーンとし、RfA サイトに TCR β -2A-TCR α 遺

伝子の順で配列を組み込んだベクターを作成した(図 5)。

導入する TCR は、国立がん研究センター中面哲也博士の研究室にて樹立された

HLA-A*24:02 GPC3 特異的 CTL よりクローニングした TCR 及び、愛媛大学 安

川正貴博士より提供頂いた HLA-A*24:02 WT1 特異的 CTL よりクローニングし

た TCR の 2 種類で行った (42) (43)。

レンチウイルスベクターを、HEK293T 細胞に導入し、得た培養上清をレンチウ

イルスとして使用した。iPS 細胞を 24well ディッシュに 1×10^5 播種し、翌日レン

チウイルスの感染をスピニン感染法で行った。感染 1 週後に Kusabira

Orange 陽性細胞を FACS ソーティングにて選別し、TCR 遺伝子導入細胞を作成

した。

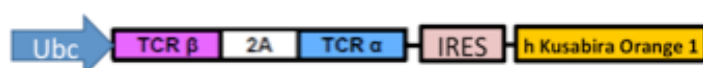


図 5 ; TCR 導入に用いたレンチウイルスベクターの構造

TCR β 鎖、TCR α 鎖の順に 2A 配列で結合し、Ubiquitin プロモーター下に組み込んだレンチウイルスベクターを作成し、実験に用いた。

10 *in vivo* 腫瘍モデル

免疫不全マウスに腫瘍株を異種移植する事で、*in vivo* 腫瘍 xenograft モデルを作り、分化 T 細胞の抗腫瘍効果について検討を行った。6-12 週齢の NOD-SCID IL2R γ c^{null} マウスをオリエンタルバイオサービスより購入し、動物の管理は京都大学の定める施設動物実験規則を遵守した。細胞株は卵巣明細胞腺癌株 Koc7c 及び、肝細胞癌 HepG2、WT1 導入 PC9 の 3 種類の細胞を使用した。Koc7c, PC9-WT1 については、CMV-Luciferase-EF1a-GFP ベクター (SBI system Bioscience)にて産生したレンチウイルスで Luciferase の発現株を作成し、使用した。

がん細胞の腹膜播種モデルとして、day0 に 5×10^5 細胞の Koc7c-Luc 株または、PC9-WT1 細胞を腹腔内投与 (intra-peritoneum injection IP) 行い、day2,9 の 2 回に分けて、GPC3-iPSC または WT1-TCR-iPSC より分化させた $5-10 \times 10^6$ 細胞の CD8 α β T 細胞またはコントロール用 PBS を IP 投与を行った。腫瘍の進展は、毎週 Luciferine 3mg/匹で IP 投与し 10 分後に IVIS Spectrum(Perkin Elmer)にて発光強度、範囲の測定を行った。

固形癌モデルとして、マウス下肢に HepG2 又は PC9-WT1 を 5×10^5 で皮下腫瘍を

作成し、計 5 回、 $5-10 \times 10^6$ 細胞のエフェクター細胞またはコントロール PBS を

静脈投与行った。週 1-2 回の頻度で腫瘍径を測定し、腫瘍体積は、

腫瘍体積 = $\frac{1}{2} \times \text{短径}^2 \times \text{長径}$

の計算式により近似値を算出した。

11 免疫染色

NSG マウスに静脈投与した、iPS 細胞由来 CD8T 細胞について、anti-CD3

antibody (clone: PS-1 Leica Biosystems), anti-CD45 antibody (PD7/26

+2B11 DAKO) を使用して検出した。NSG マウスより摘出した、皮下移植

PC9WT1 腫瘍を、4% Paraformaldehyde over night にて固定し、パラフィン

包埋行った。切片作成、及び免疫染色は京都大学総合解剖センターに依頼して

施行した。スライドは BX51 (Olympus Tokyo Japan) にて、観察、撮影を行っ

た。

11 統計

全てのデータは Excel 及び Prism(GraphPad software) を使用し解析した。2 群間の比較には Student t 検定、生存期間の比較には log-rank 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差を認めるものとした。

結果

1-1 GPC3 特異的 CTL よりの iPS 細胞樹立

国立がん研究センター、中面哲也博士の研究室にて樹立された、HLA-A*02:01 の肝臓癌患者の末梢血由来の GPC3 特異的な CTL は、HLA-A*02:01 及びターゲットの GPC3 特異的に細胞傷害性を示す事が知られていた(38)。我々はまずこの GPC3 CTL にセンダイウイルスベクターにて SV40 Large T 抗原および *OKT3*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc* の山中 4 因子を導入し、iPS 細胞を作成した。作成した中の 1 クローンである GPC3 16-1 株(GPC3 T-iPSC)をこの後の実験に使用した。GPC3-16-1 株は、センダイウィルスの残存を認めず、iPS 細胞としての性状に問題を認めなかった。

1-2 GPC3 T-iPS 細胞は CD8 $\alpha\beta$ T 細胞に分化可能であった

次に、我々は GPC3-16-1 株の T 細胞分化を行った。既報の分化法にて分化 day40 日目に CD4 CD8 DP 細胞が確認できた。DP 細胞に OKT3 抗体および、デキサメサゾンを加えた刺激を行う事で、CD8 $\alpha\beta$ 陽性細胞に分化させる事に成功した(図 6)(44, 45)。

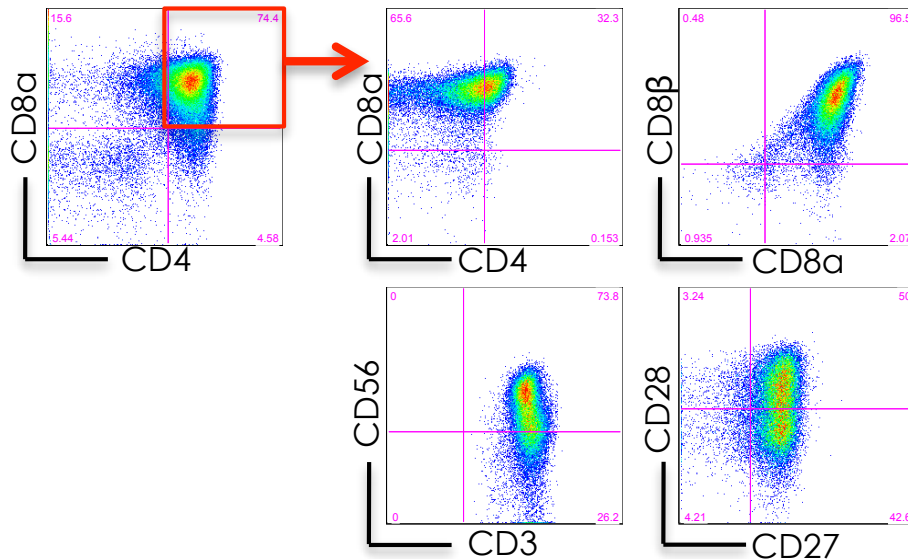


図 6 ; GPC3T-iPSC は CD8 α β 細胞に分化する

(左) GPC3 T-iPS 細胞の分化 40 日目での FACS 解析。

(右) DP 細胞を OKT3 およびデキサメサゾンにて刺激し、47 日目での FACS 解析。CD8 α β 陽性 T 細胞の分化が確認できた。

1-3 TCR 鎖は、DP 細胞の段階で特異性を失う

GPC3 T-iPS 細胞を分化させた細胞は、GPC3 特異性を保っている事がもちろん

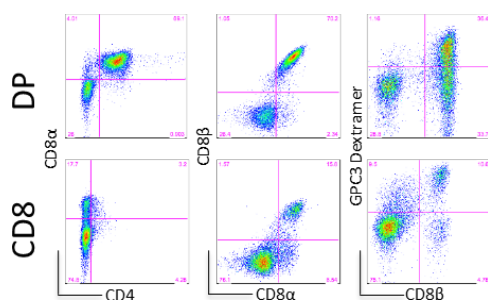
望ましい。しかし、マウス胸腺において DP 細胞は、適切な刺激を受けて CD8T

細胞に分化するまで、TCR α 鎖の再構成を受け続ける事が知られている。*In vitro*

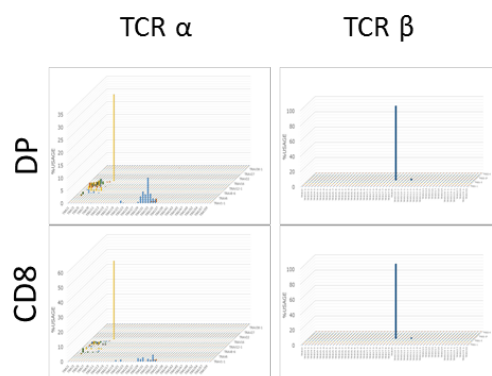
で分化させた T-iPS 細胞由来の DP 細胞において、TCR 鎖の再構成がおこるのか、

またおこるならどの程度の割合かを調べるため、我々はまず HLA-A*02:01 GPC3 Dextramer との結合能にて、GPC3 特異性を確認した。予想した通り、DP 細胞の段階で約半数の細胞が GPC3 Dextramer と反応せず、GPC3 特異性が失われている事がわかった(図 7-A)。また、DP を刺激し分化させた CD8 T 細胞においても同様に Dextramer に反応しない細胞の存在を認めた。この特異性の消失がおこる原因を、TCR 鎖の再構成のためと考え、CDR3 領域のシーケンスを行った。TCR トランスジェニックマウスでの報告と同様に、 β 鎖は対立遺伝子排除(allelic exclusion)のためと考えられる強固な安定性をみせ、再構成は見られなかった(図 7-BC)。これに対し、TCR α 鎖は、多様な再構成を認め、DP 細胞段階にて元来の GPC3 特異的な TCR α は 30%程度までの減少を認めた。CD8 $\alpha\beta$ 細胞においても同様の結果を認め、元通りの TCR α 鎖は約 45%であった。

A



B



C

DP						CD8αβ					
Rank	TRAV	TRAJ	CDR3	Reads	%Reads	Rank	TRAV	TRAJ	CDR3	Reads	%Reads
1	TRAV19	TRAJ10	CALTYILTGGGNKLT	76,811	29	1	TRAV19	TRAJ10	CALTYILTGGGNKLT	182,541	45
2	TRAV1-1	TRAJ33	CAVMDSNYQLIW	6,540	2	2	TRAV8-4	TRAJ3	CAVSDSSASKIIF	8,166	2
3	TRAV1-1	TRAJ31	CAVRDNNARLMF	5,989	2	3	TRAV1-1	TRAJ33	CAVRDSNYQLIW	6,455	2
4	TRAV9-2	TRAJ4	CALSDSGGYNKLIF	4,624	2	4	TRAV1-1	TRAJ35	CAVRGFGNVLHC	5,159	1
5	TRAV1-1	TRAJ34	CAVRDNTDKLIF	3,937	2	5	TRAV1-1	TRAJ35	CAVIGFGNVLHC	4,727	1
6	TRAV12-2	TRAJ3	CAVNSSASKIIF	3,627	1	6	TRAV1-1	TRAJ31	CAVRDNNARLMF	4,538	1
7	TRAV1-1	TRAJ33	CAVRDSNYQLIW	3,625	1	7	TRAV1-1	TRAJ22	CAVRDGSARQLTF	4,214	1
8	TRAV1-1	TRAJ33	CAVDSNYQLIW	3,365	1	8	TRAV1-1	TRAJ30	CAVRDDKIIF	3,767	1
9	TRAV13-1	TRAJ6	CAASGGSYIPTF	3,103	1	9	TRAV1-1	TRAJ35	CAVRDQFGNVLHC	3,698	1
10	TRAV1-1	TRAJ31	CAVSNNARLMF	3,002	1	10	TRAV12-3	TRAJ9	CAMSAGGFKTIF	3,564	1

図 7 ; DP 段階以降で、TCR の再構成が起こる

(A) GPC3 T-iPS 細胞より分化した DP 及び CD8SP 細胞での GPC3 Dextramer 染色。DP、CD8SP 何れにおいても、Dextramer 陰性集団が認められる。

(B) TCR 鎖シーケンス解析による TCRα及び TCRβの VDJ 鎖構成。

(C) DP 及び CD8αβ細胞の TCRα鎖 CDR3 配列頻度。元の TCRα鎖配列は DP 細胞では 30%以下にまで低下している。

2-1 CRISPR-Cas9 による GPC3 T-iPSC の *RAG2* ノックアウト

T-iPS 細胞の分化細胞で、DP 細胞以降は特異的な TCR を持つ細胞の割合が減少してしまうと、養子免疫療法に使える細胞が減少するだけでなく、予期しない自己抗原を認識する TCR が再構成で産生されうり、不都合である。このため TCR の再構成を防ぐ方法の開発が必要と我々は考えた。

Rearrangement Activating Gene (RAG) 蛋白は、*RAG1* 及び *RAG2* から構成されるが、マウスの胸腺細胞の分化において、TCR 鎖の再構成を起こすことが知られている(15)。TCR トランスジェニックマウスでの検討では、*RAG1* または *RAG2* ノックアウトマウスと交配させることで、TCR の再構成を防ぐことができることが知られていた(17)。我々の GPC3 T-iPS 細胞の分化細胞における *RAG* 遺伝子の発現について、RT-PCR にて確認したところ、T-iPS 分化細胞においても DP 段階での発現上昇を認めた。このため、CRISPR によるゲノム編集を利用し、GPC3 T-iPS 細胞の *RAG2* knockout (KO) 株を作製した。*RAG2* 遺伝子特異的な guide-RNA を設計し、guide-RNA 配列及び Cas9 蛋白の発現ベクターを GPC3 T-iPS 細胞にエレクトロポレーションにて導入し、KO 株を選別した(GPC3 *RAG2* KO iPSC)。TA クローニングにて、両アレル共に *RAG2* 遺伝子に蛋白産生を起こさない変異

を導入した株であることが確認された。*RAG2* KO 株は、核型異常を認めず、iPS 細胞としての多分化能についてもテラトーマ形成にて確認することができた(図 8)。

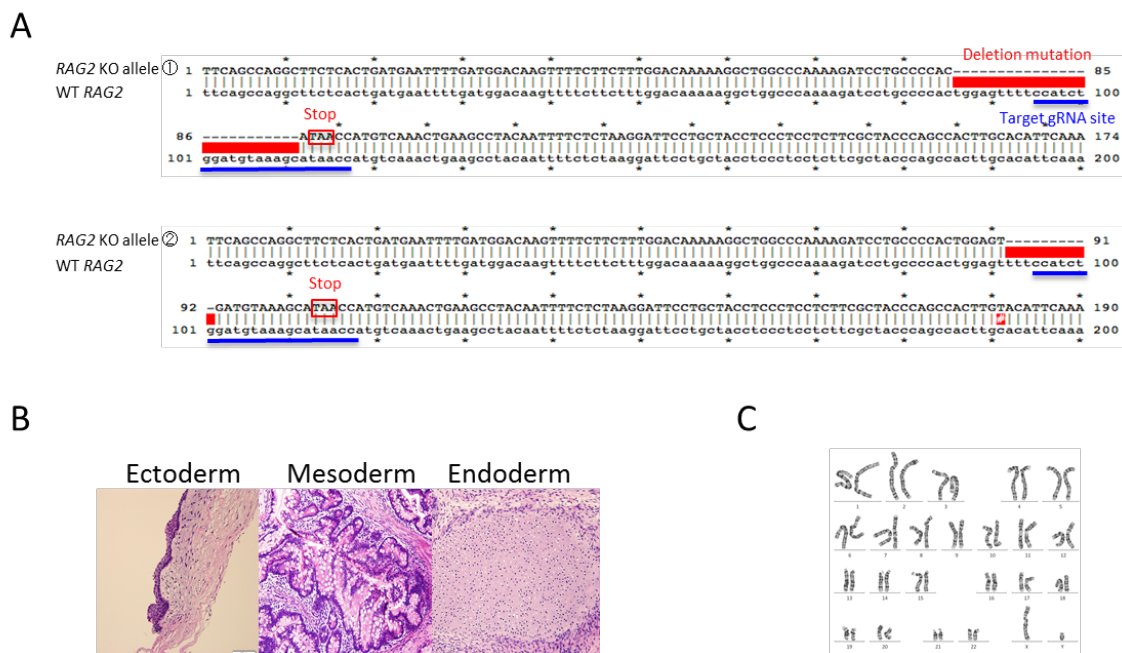


図 8; GPC3 T-iPS 細胞の *RAG2* KO 株の作製と、iPS 細胞の性状確認

- (A) GPC3 T-iPSC *RAG2* KO 株の変異部位シーケンス。両アレルともに、蛋白非発現性の変異の導入を確認した。
- (B) GPC3 T-iPSC *RAG2* KO 株を NOG マウス精巣に移植し、12 週後に回収したテラトーマ作製像。3 胚葉全てへの分化が確認できる。
- (C) GPC3 T-iPSC *RAG2* KO 株の核型解析の結果。46XY であり、異常を認めない。

2-2 RAG2 KO により、TCR 遺伝子の再構成を防ぐことが可能であった

GPC3 RAG2 KO iPS 細胞は、親株 (WT) と遜色なく DP 細胞を経て、CD8 $\alpha\beta$ 細胞に分化する事が可能であった(図 9)。また、GPC3 Dextramer 染色にて、分化した DP 及び、CD8 T 細胞は全細胞が GPC3 特異性を持つ事を確認した。TCR 鎖の CDR3 シーケンスにても、 α 鎖 β 鎖共にオリジナルの GPC3 特異的な配列以外の再構成を認めなかった。

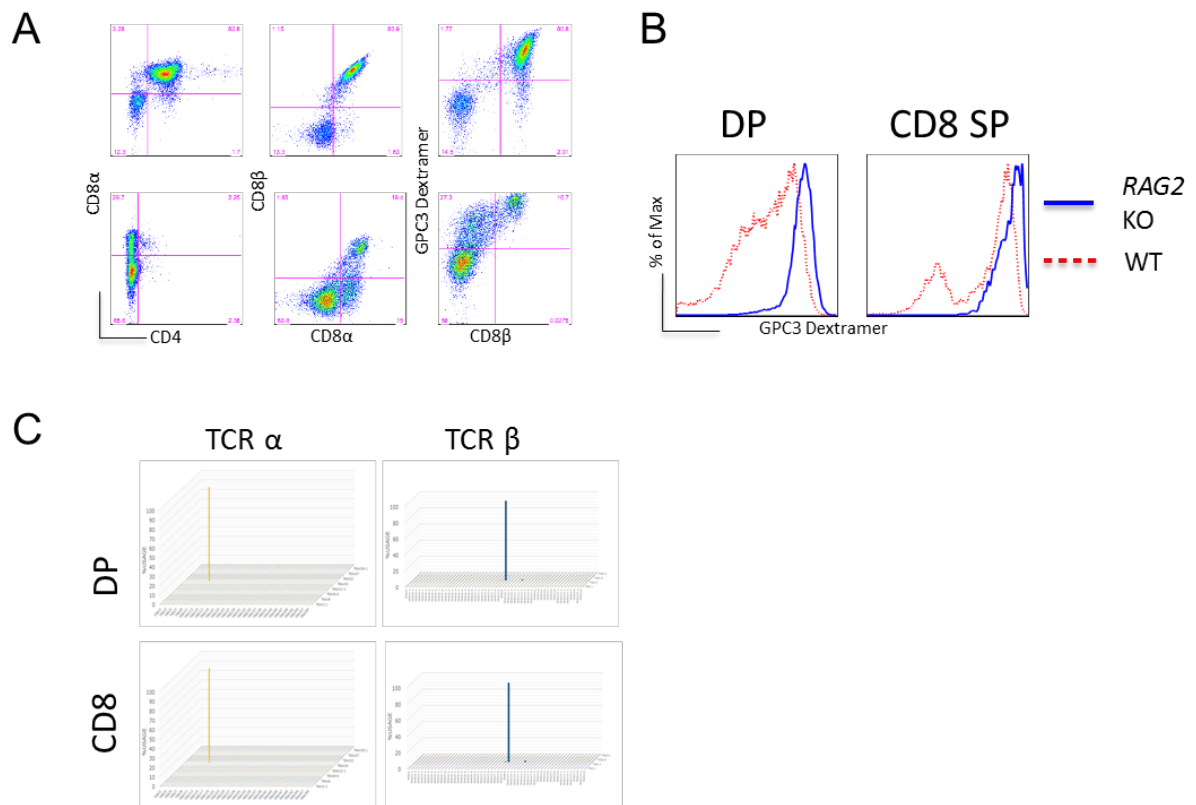


図 9; *RAG2* KO は、TCR の再構成を防ぐ

(A) *RAG2* KO iPSC の分化 DP および CD8 T 細胞における GPC3 Dextramer 染色。

DP、CD8SP 何れにおいても 100%の細胞が GPC3 Dextramer を認識する事が確認された。

(B) WT 及び *RAG2*KO 分化 DP、CD8SP 細胞における Dextramer 染色比較。

(C) GPC3 *RAG2* KO 分化細胞の TCRαβ鎖 VDJ 組み合わせ。

GPC3 特異的な TCRαβ鎖以外の配列を検出しなかった。

2-3 GPC3-RAG2- KO CD8 T 細胞は GPC3 発現癌細胞を傷害する

次に我々は、GPC3-RAG2 KO iPS 細胞より分化した CD8 T 細胞に関して機能解析を行った。まず HLA-A*02:01 を発現する B-LCL に GPC3 エピトープペプチドをパルスすることで、HLA 及びターゲット依存性の細胞傷害性を確認した。

GPC3 ペプチド濃度依存的に LCL が障害される事が確認でき、GPC3 特異的な細胞傷害性を確認した。また、CD8 β 発現した CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、発現していない CD8 $\alpha\alpha$ 細胞に比べ、ターゲットペプチドに対する反応感度が高くなっていることが確認できた(図 10-A)。また、GPC3 発現 HLA-A*02:01 肝腫瘍株である、HepG2 についても、GPC3-TiPS 細胞由来の CD8 $\alpha\beta$ 細胞は細胞傷害性を示し、他の T-iPS 細胞由来の CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、細胞傷害性を認めなかった(図 10-B)。また、GPC3 発現腫瘍株に対する細胞傷害をタイムラプスイメージングで撮影行った所、GPC3-TiPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、ターゲット細胞に反応して遊走し、活性化し、約 5 時間程度でターゲット細胞の細胞死を引き起こすことが確認できた(図 10-C)。

次に我々はマウス腫瘍モデルを作成し、*in vivo* での GPC3-TiPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞の抗腫瘍効果について検証を行った。NSG マウス腹腔内に Lucifase 遺伝子を発現させた、卵巣明細胞腺癌株 Koc7c を腹腔内注入し、卵巣がん腹膜播種モデルを作

成後、GPC3-TiPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞の腹腔内投与を行った。治療群では、腫瘍進展の

遅延と有意な生存時間の延長を認めた(図 11)。

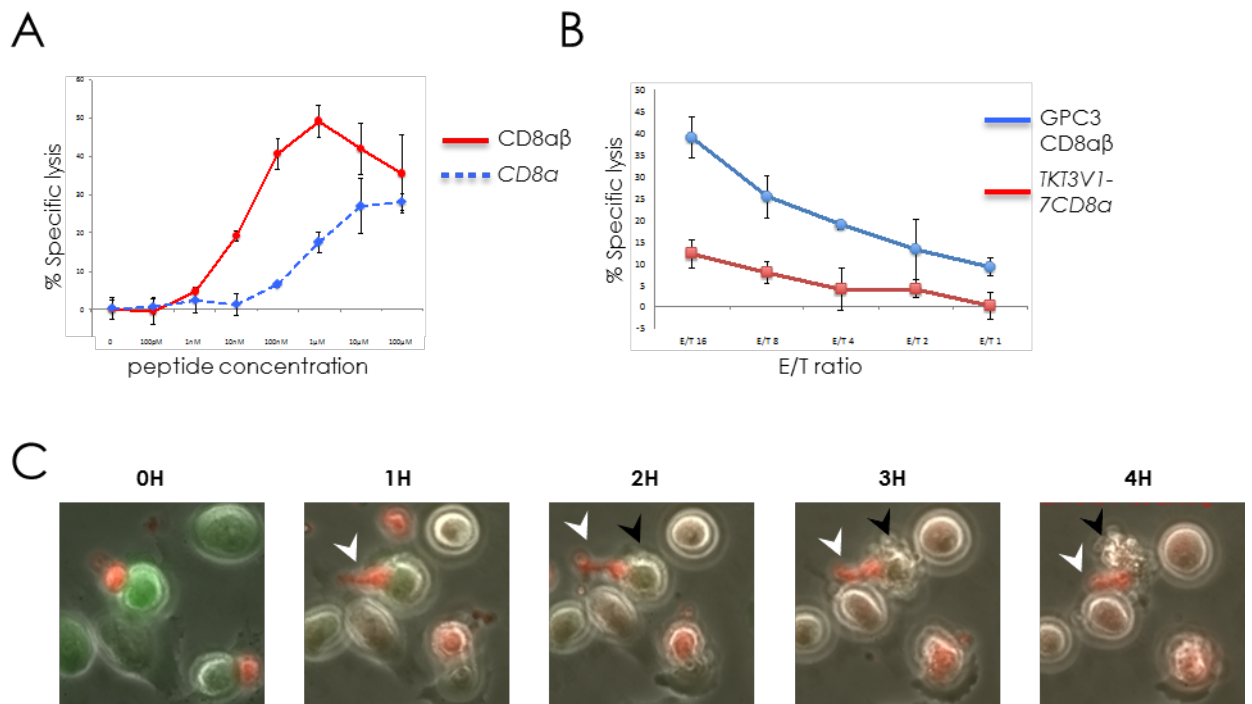


図 10; RAG2KO GPC3-TiPS 細胞由来 CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、GPC3 特異的に細胞傷害性を示す

(A) HLA-A0201 LCL に各種濃度で GPC3 ペプチドをパルスし、 ^{51}Cr アッセイにより評価した CD8 $\alpha\beta$ 細胞、CD8 α 細胞の細胞傷害性

(縦軸: 細胞傷害性 横軸: ペプチド濃度 n=3)

(B) GPC3 iPS T 細胞および、他種 T-iPS 細胞由来 T 細胞(clone TKT 1-7)における HepG2 ターゲットとした細胞傷害性データ

(縦軸: 細胞傷害性 横軸: Effector/Target ratio n=3)

(C) GPC3-TiPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞による GPC3 発現ターゲット傷害のタイムラプスイメージング。エフェクター細胞が、ターゲットに接着し、細胞死を引き起こしていく様子が経時的に確認できる。

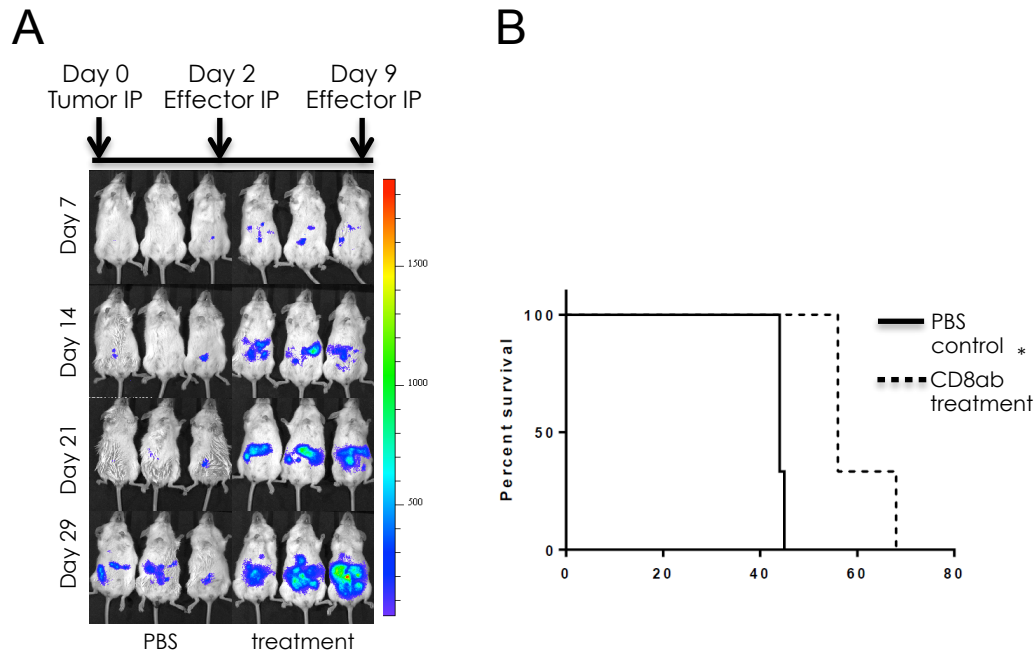


図 11; GPC3-TiPSC-CD8 $\alpha\beta$ 細胞の *in vivo* 抗腫瘍効果

- (A) Koc7c 細胞を day0 に腹腔内投与し作成した卵巣がん腹膜播種モデルでの、腫瘍進展を IVIS にて撮影したもの。コントロール群と比較し、治療群では腫瘍進展に遅延を認める。
- (B) PBS 群および治療群での Kaplan-Meier 曲線で表した生存率 (n=3) log-rank 検定にて有意差を認めた (P=0.0224)。

3-1 TCR 遺伝子導入により、HLA ホモストック iPS 細胞から抗原特異的な CD8 α β 細胞を誘導できる

現在、HLA のマッチした iPS 細胞を同種細胞移植に利用する事が検討され始めている(37, 46)。免疫細胞療法に関しても、HLA 多型が適合した同種移植用 iPS 細胞を分化させる事で産生する事が可能であれば、数多くの人々に、迅速にそしてより低コストで治療細胞を用意する事が出来る。そこで、私は T-iPS 細胞で出来た事と同様の事が、クローニングした腫瘍特異的な TCR 遺伝子を単核球由来の TCR 遺伝子をもたない iPS 細胞に導入する事で出来ないか、またその場合の TCR 鎖の再構成はどうなっているかについて検討を行った。将来的に、iPS 細胞を利用した分化免疫細胞の同種移植療法を視野にいれ、京都大学 iPS 細胞研究所にて、日本人最頻度の HLA ハプロタイプをホモで持つ健常人ドナーの末梢血単核球より作成された iPS 細胞(clone FFI-01, HLA-A*24:02, HLA-B*52:01, HLA-C*12:02, HLA-DRB1*15:02, DQB1*06:01, HLA-DPB1*09:01, 京都大学、山中伸弥博士より提供)を実験に使用し、HLA-A*24:02 GPC3 特異的 TCR 及び、HLA-A*24:02 WT1 特異的 TCR の2種類をクローニングし上記の iPS 細胞株への遺伝子導入を行った(図 12-A)。TCR 遺伝子を導入した iPS 細胞は、導入マーカーである Kusabira Orange 発現を保ったままで分化した。T 細胞由来でない iPS

細胞は分化過程において、CD3 分子を表面に発現しないが、WT1-TCR 導入 iPS 細胞は T-iPS 細胞と同様に、CD3 の発現を認め、また DP 細胞を介して分化した CD8 α β 細胞は WT1 dextramer 陽性であった(図 12-B)。全く同様の事が、GPC3 特異的 TCR を導入した iPS 細胞においても確認出来た。分化 CD8 α β 細胞の TCR 鎖についてシーケンス解析行ったら、 α 鎖 β 鎖ともに導入した TCR 鎖の配列のみである事が確認された。しかしながら、TCR 導入 iPS 細胞由来の DP 細胞についても、TCR 鎖のシーケンス解析を行った所、T-iPS 分化細胞とは異なり、多様な TCR β 鎖の配列を認めた。TCR α 鎖については導入した TCR 配列しか認めなかった(図 12-D)。

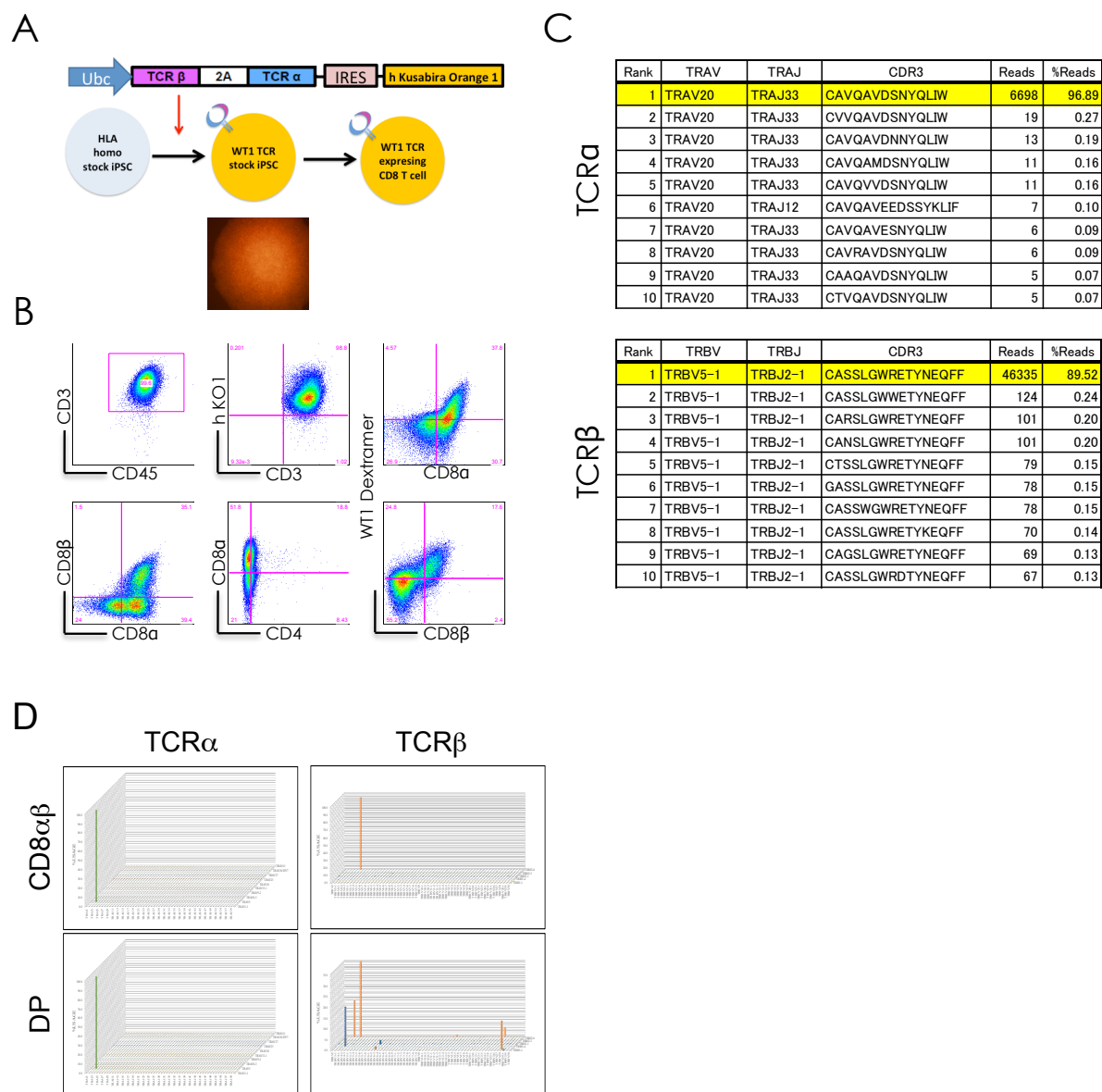


図 12; TCR 導入 iPS 細胞は導入 TCR 特異的な CD8αβ細胞に分化する

(A) TCR 遺伝子導入 iPS 細胞の模式図

(B) WT1 TCR 導入 iPS 細胞より分化した T 細胞の表面マーカープロファイル

(C) WT1TCR 導入 iPS-CD8αβ細胞の TCR 鎖シーケンスデータ。導入した配列は TRBV5-1 TRBJ2-1 TRAV20 TRAJ33 であり、導入配列以外を検出しなかった。CDR3 バリエーションは全て検出誤差内。

(D)GPC3TCR 導入 iPS 細胞より分化させた DP 細胞及び、CD8αβ細胞の TCR 鎖シーケンスデータ。CD8αβ細胞では導入した配列のみが検出されたが、DP 細胞では多様な TCRβ鎖と、導入した単一 TCR 鎖が検出された。

3-2 TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞は *in vitro* で HLA、抗原特異的な細胞傷害性を示す

HLA-A*24:02 陽性および陰性の B-LCL 細胞にターゲットペプチドをパルスし、細胞傷害性の発現を検討した所、TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、HLA 依存、またターゲット濃度による細胞傷害を示すことが確認された(図 13-A)。また、 ^3H サイミジン取り込みによる細胞増殖アッセイにおいても、ペプチド濃度依存的な細胞増殖を認めた(図 13-B)。各種ターゲット細胞において検討を行い、WT1 および GPC3 特異的に細胞傷害性を認める事が確認できた(図 13-C)(図 14)。

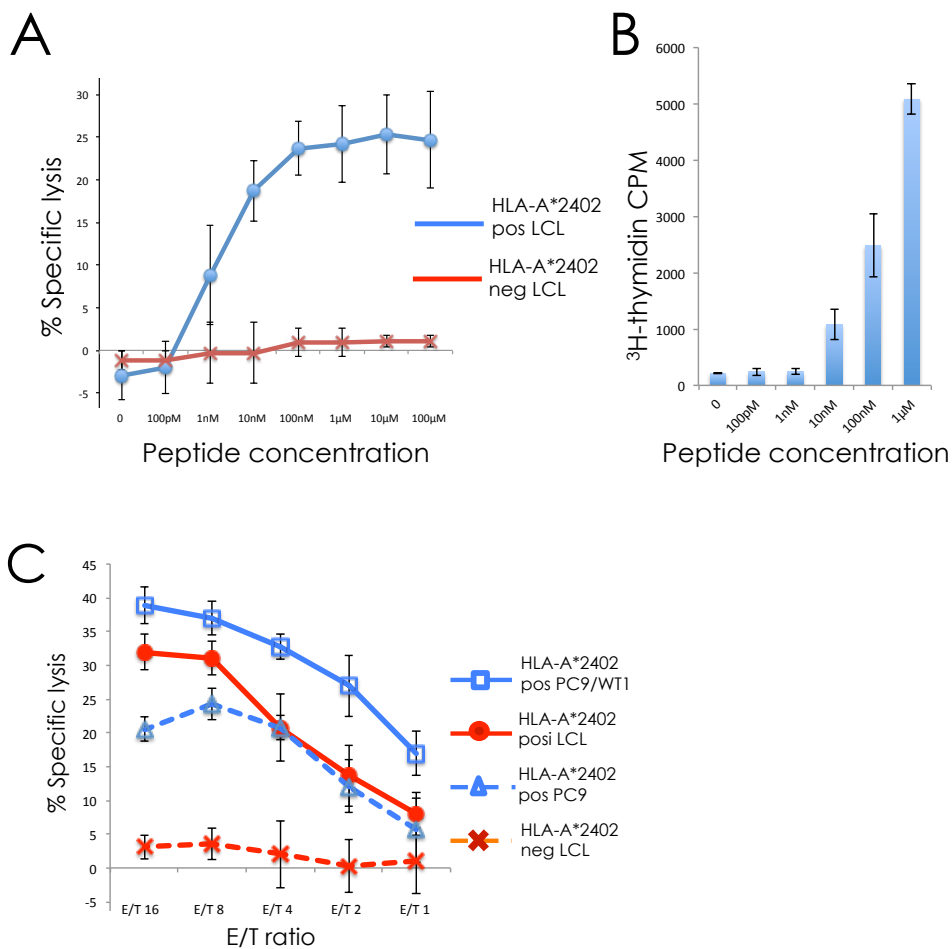


図 13; WT1 TCR-iPS-CD8αβ細胞は HLA, ターゲットペプチド特異的な細胞傷害性、増殖能を持つ

- (A) HLA-A*24:02 陽性、陰性の B-LCL に WT1 ペプチドを各種濃度でパルスしたターゲットに対する WT1 TCR-iPS-CD8αβ細胞の細胞傷害性。(E/T 4:1 n=3)
- (B) B-LCL に WT1 ペプチドを各種濃度でパルスし、WT1 TCR-iPS-CD8ab 細胞と共培養した場合の ³H-サイミジンによる細胞増殖アッセイ (縦軸: ³H 取り込み CPM 横軸: ペプチド濃度 n=3)
- (C) WT1 ペプチドパルスした HLA-A*24:02 陽性、陰性の LCL, 肺癌細胞株 PC9, WT1 ペプチドを発現させた PC9-WT1 の 4 種に対する細胞傷害性。(縦軸: 細胞傷害性 横軸: Effector/Target ratio n=3)

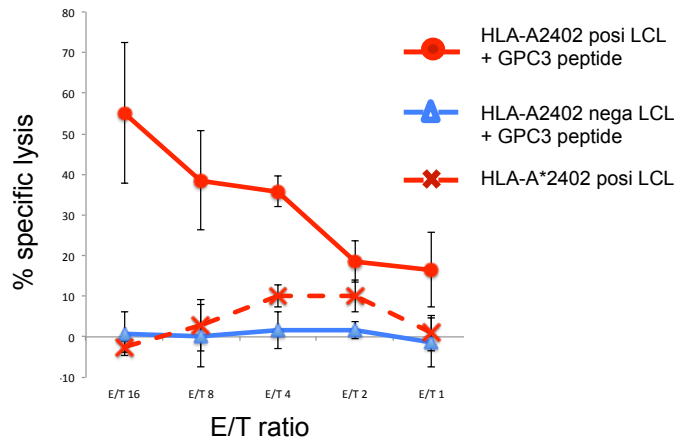


図 14 GPC3-TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞は HLA,ターゲット特異的に細胞傷害性を持つ

HLA-A*24:02 陽性または陰性の B-LCL に GPC3 ペプチドをパルスし、GPC3-TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞と共培養した際の細胞傷害性。HLA-A*24:02 陽性かつ、GPC3 ペプチドをパルスしたターゲットのみに反応が認められた。

縦軸: 細胞傷害活性 横軸: Effector/Target ratio n=3

3-3 TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞は *in vivo* 腫瘍モデルにおいても効果を 確認出来た

TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞の *in vivo* での抗腫瘍効果について確認するために、WT1 発現腫瘍株移植マウスにて検討を行った。腹膜播種モデルとして、WT1 遺伝子導入 PC9(PC9-WT1)細胞の腹腔内投与を行った後に、WT1-TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞 (Ff-WT1CD8) 又は、コントロールとして PBS、WT1-TCR 導入 PBMC CD8 $\alpha\beta$ 細胞 (PBMC-WT1 CD8) の 3 グループにて実験を行った。WT1-TCR 導入 PBMC は、PBMC に WT1-TCR 発現レンチウィルスを感染させ、WT1 Dextramer 陽性細胞を sorting 後、拡大培養を行った細胞を使用した。拡大培養後の WT1-TCR 導入 PBMC を WT1 Dextramer にて染色した所、全細胞中の Dextramer 陽性細胞率が低下している事が確認された(図 15)。

Ff-WT1 CD8 治療群は、コントロール PBS 群と比べ有意な腫瘍発育の遅延、生存時間の延長が確認でき、また PBMC-WT1 CD8 治療群よりも、高い治療効果を持つ傾向が見られた。観察期間中に明らかな体重減少、下痢、皮膚症状はなく、Graft-Versus-Host Disease (GVHD)の兆候は認めなかった(図 16)。次に、固形腫瘍モデルでの検討として、PC9-WT1 の大腿部皮下への移植を行い、その後同様の 3 群で静脈投与を計 4 回行い腫瘍体積の測定を行った。治療群は PBS 群と比較

し、明らかな腫瘍体積増大の遅延を認め、35 日目に腫瘍重の計測を行った所、治療群では有意な減少を認めた(図 17)。また、免疫染色にて、腫瘍周囲組織中に、CD3 CD45 陽性のエフェクター細胞を検出する事が可能であった(図 18)。

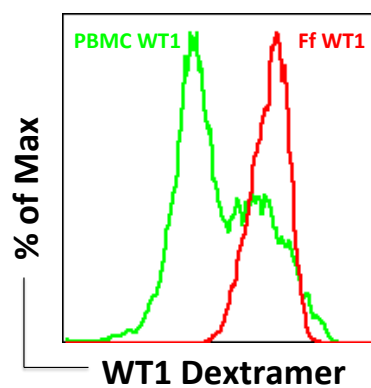


図 15; PBMC に WT1-TCR を導入し、拡大培養した細胞と
WT1-TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞の WT1 Dextramer 染色

WT1-TCR-iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞 (Ff WT1) および、WT1-TCR 発現レンチウィルスを導入し、導入細胞を sorting 後、拡大培養を行った CD8T 細胞 (PBMC WT1) の WT1-Dextramer 染色。

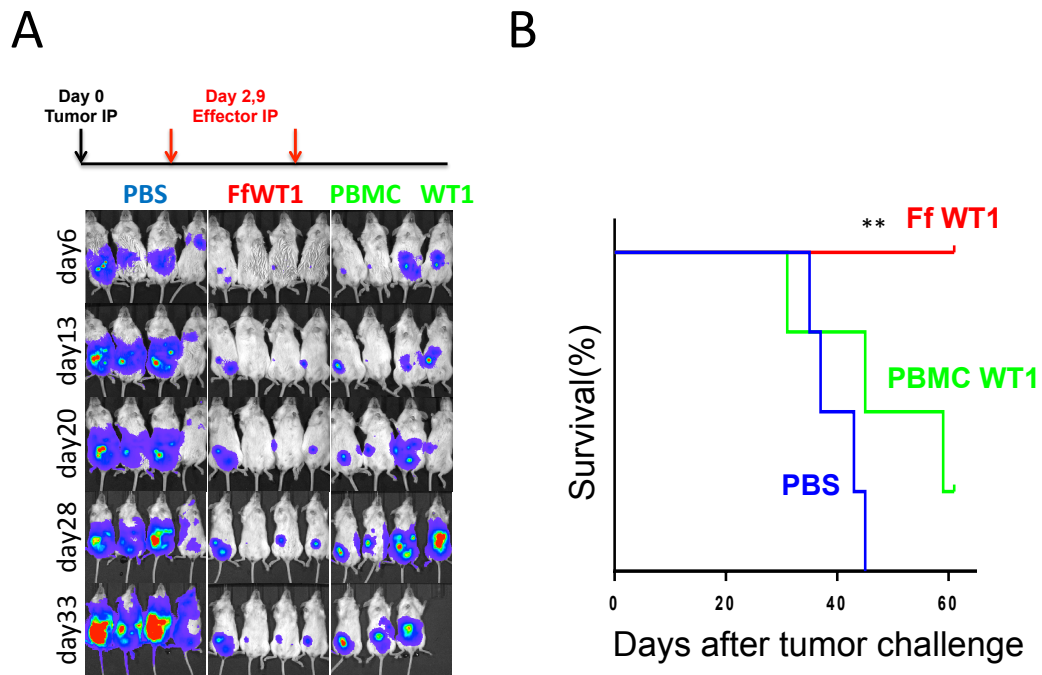


図 16; *in vivo* 腹膜播種モデルにおける WT1 TCR 導入 iPS-CD8 細胞の抗腫瘍効果

(A) PC9WT1 細胞を腹腔内注入し作成した腹膜播種モデルに、計 2 回 PBS, Ff WT1 細胞又は PBMC WT1 細胞を投与した各群における腫瘍進展を IVIS により評価したもの。

(B) Kaplan-Meier 曲線で表した各群の生存率 (n=4 p=0.0067)

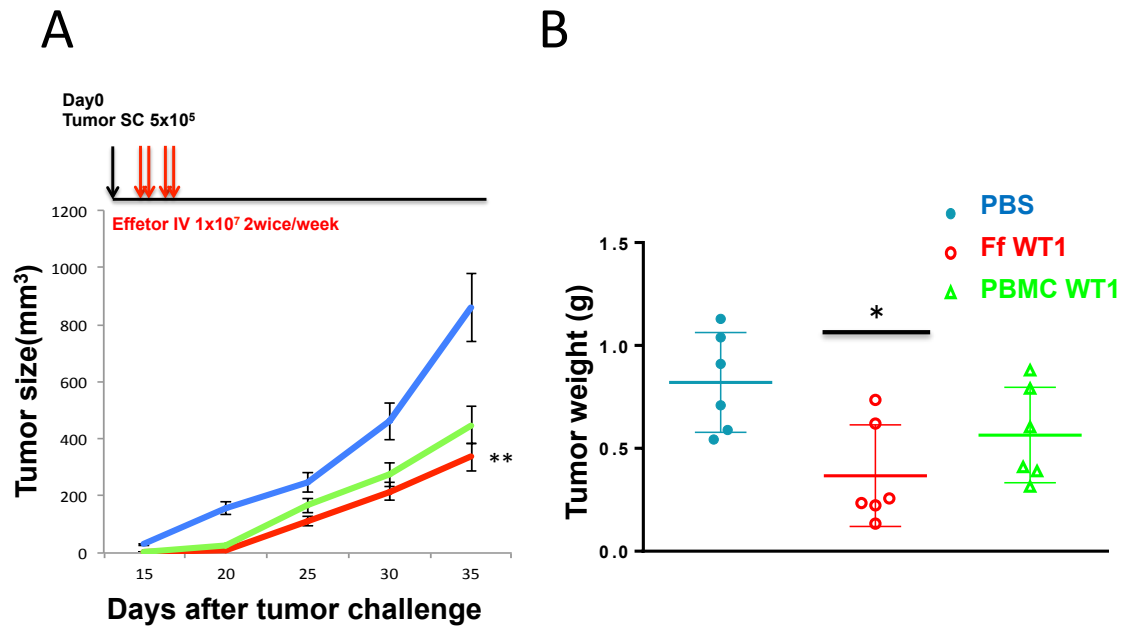
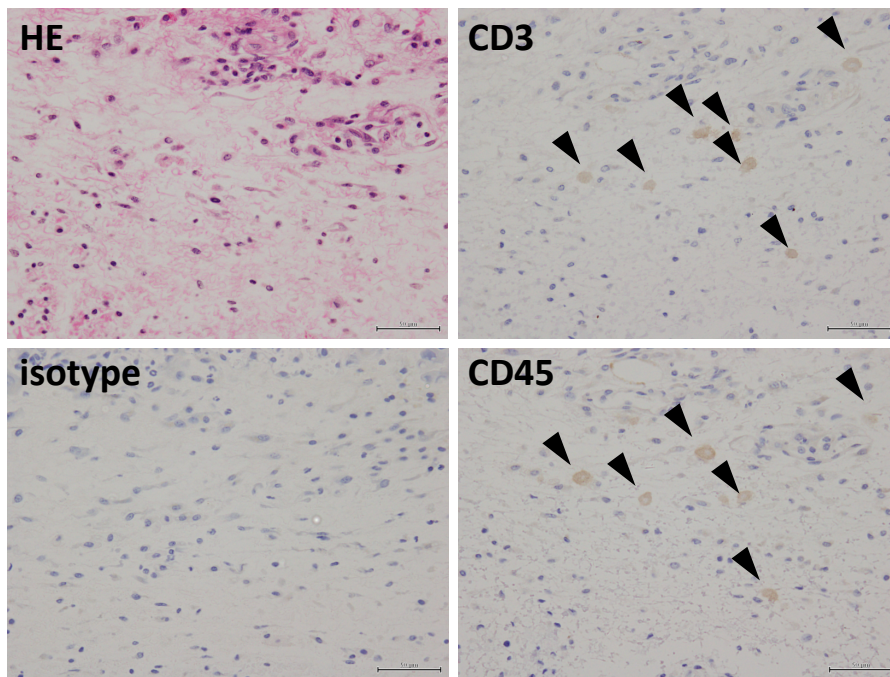


図 17; *in vivo* 皮下腫瘍モデルにおける WT1 TCR 導入 iPS-CD8 細胞の抗腫瘍効果

(A) PC9WT1 細胞を皮下移植し作成した固形腫瘍モデルに、計 4 回 PBS, Ff WT1 細胞又は PBMC WT1 細胞を投与した各群における腫瘍体積の測定結果。(n=6 p=0.0076)

(B) 移植腫瘍を、35 日目に摘出し測定した重量。(n=6 p=0.0108)



**図 18; WT1 TCR 導入 iPS-CD8 細胞投与群における腫瘍周囲組織での
CD3 CD45 免疫染色**

35 日目に皮下移植した PC9WT1 腫瘍を摘出した検体の免疫染色。CD3 CD45 陽性の投与細胞を検出した(scale bar 50 μ m)

考察

iPS 細胞から T 細胞を作成するという、本研究で取り組んだ方法論の一つの究極的な目標は、同種細胞移植による養子免疫療法の実現である(8)。この最終的な目的に対して、我々は本研究を通じて 3 つの事実を明らかにした。① T-iPS 細胞を CD8 α β 細胞へと分化させると、DP 段階で TCR の再構成がおこり、TCR 特異性が失われる事、② T-iPS 細胞の段階で *RAG2* 遺伝子をゲノム編集により KO する事で、TCR 特異性の変化を防ぐ事が出来る事、③ TCR 遺伝子を T 細胞由来ではないストック iPS 細胞に導入する事で、抗原特異的な CD8 α β 細胞を分化させられる事、である。

1 つ目に関しては、T-iPS 細胞からの CD8 α β 細胞の分化の報告はあるが、その過程における TCR 鎖の再構成と TCR 多様性については明らかにされていなかった(11)。我々の研究では、培養系を最適化した結果、複数株において TCR- α 鎖の追加再構成が認められ、*in vitro* の培養系においても、胸腺内の DP 細胞と同様に TCR の再構成がおこっている事が示された。一方で TCR- β 鎖については再構成を認めず、*in vitro* 培養系においても生理的な *allelic exclusion* の機構が保たれていることが示唆された。ヒト造血幹細胞やヒト胚性幹細胞からの培養を含

め、一般に *in vitro* で TCR 再構成を効率よく観察できる実験系は存在せず、我々の開発した T-iPS 細胞からの分化培養系はヒト T リンパ球発生の基礎研究ツールとしても有用と考える。

臨床応用を考える際、CD8 $\alpha\beta$ 細胞は従来の CD8 $\alpha\alpha$ 細胞に比べターゲット親和性が高い事が示され、より有用な細胞と言えるが、T-iPS 細胞株によっては、元の TCR α 鎖の配列を保っている DP 細胞が 10%程度まで減少するというデータがとれており、特異性を保った CD8 $\alpha\beta$ 細胞の細胞数を確保するには TCR 再構成の防止が必要である。また、再構成後の TCR に自己免疫を引き起こす物が出現する可能性は否定できず、TCR 再構成の防止の処置をしない場合、特異的な TCR を維持する細胞を sorting する、拡大培養時にターゲットペプチドを使用する事で特異的な細胞を選択的に増殖させる等の手間が必要になる。安全性、また簡便性を考えた場合、TCR 再構成の防止は必須であろう(33, 34)。

RAG2 KO による T-iPS 細胞の TCR 再構成防止については、マウス幹細胞における *RAG2* KO は、TCR 再構成を防ぐ事が知られていたが、ヒト幹細胞における *RAG2* KO に関する報告はこれまでなかった。近年のゲノム編集技術の進歩は著しく、我々の実験においても非常に簡便に、また高確率で *RAG2* KO 変異導入株

を作成する事が可能であった。ゲノム編集による iPS 細胞特性の変化や *RAG2* KO による T 細胞分化への負の影響は認めなかった。*RAG2* KO T-iPS 細胞より分化した CD8 α β 細胞はその 100%が元の TCR のみしか発現しておらず、機能的な細胞で有る事がわかった。我々の結果は、細胞製剤として均一な細胞を産生する事を目指す上での *RAG2* 遺伝子 KO の重要性を示すのみならず、ヒト T 細胞の分化研究のツールの一つとしてゲノム編集を施した iPS 細胞より分化させた細胞の利用が有用であることの一つの例と言えるだろう。ゲノム編集が簡便にできる事を考えると、T 細胞の機能を高めるため PD1 等の抑制性シグナル分子を KO するなど、追加で様々な処置をする事の有用性も考えられる。

本研究では、今後世界中での利用が検討されうる HLA 一致 iPS 細胞をソースとする同種移植医療を視野にいれ、腫瘍抗原特異的な TCR を同種移植用の iPS 細胞に導入して分化させる実験を行った。その結果、抗腫瘍効果をもつ機能的な CD8 α β T 細胞を得る事が出来た。自己 PBMC に TCR 遺伝子や CAR 遺伝子を導入し、自家免疫療法に使用する手法は、様々な臨床試験が既に報告されている (30-32)。ただ、これらの自家療法の問題点として、個別化療法になるため莫大なコストがかかる事、また治療に必要な細胞数を確保するための拡大培養に時

間がかかる事などがあげられる。TCR 導入 iPS 細胞から、均一な TCR を発現する CD8T 細胞を大量産生する事が出来れば、癌の免疫細胞療法をより低コストに幅広く使える療法とする事ができる。

その際、どのような iPS 細胞をベースに使用するかは重要な課題である。T-iPS 細胞へ *RAG2* KO を施すことによって得られる CD8 $\alpha\beta$ 細胞の TCR 頑健性とその有用性は本研究で十分に示されたと考えるが、*RAG2* KO を行った、T-iPS 細胞であっても、TCR 遺伝子導入のソースとしての利用には懸念が残る。内在性の TCR 鎖の存在により、導入 TCR の効率よい発現が得られない、また内在性および導入した TCR 鎖のミスペアリングにより、自己免疫性の細胞が出現し得るという、末梢血 T 細胞を対象とした TCR 遺伝子治療が抱える問題は T-iPS 細胞に TCR 遺伝子を導入した場合にも同様であると予想される(33)。実際、我々の使用した TCR ベクターを PBMC に導入し、導入細胞について Dextramer 解析を行うと、CD8 陽性細胞における Dextramer 陽性率は 40%程度であった。一方で、TCR 遺伝子を導入した末梢血単球由来 HLA ホモ iPS 細胞より分化した CD8 $\alpha\beta$ 細胞はその 100%が導入 TCR のみしか発現していなかった。末梢血単球由来の iPS 細胞は内在性の TCR を発現していないため、TCR 導入のベース

としては T-iPS 細胞より適していると考えられる。今回の治療効果比較実験で *in vivo* での抗腫瘍効果において、TCR 導入 PBMC が TCR 導入 iPS-CD8 細胞に比べ弱いのは、ターゲット反応性の細胞数の不足がその一因であった事が予測される。TCR 遺伝子導入 HLA ホモストック由来 CD8 $\alpha\beta$ 細胞のマウス輸注実験では、投与経路によらず明らかな異種 GVHD は確認出来ず、短期観察時点での安全性の問題も認めなかった。本 CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、細胞数を得るための拡大培養も問題なく行う事が出来る事から、同種免疫細胞療法に極めて適した細胞と考える。

TCR 導入 iPS-CD8 細胞は、固形腫瘍に対する遊走能、抗腫瘍効果を持つ事を、私は *in vivo* マウス皮下腫瘍モデルで示したが、その効果は現在の所限定的である。コントロールである、PBS 投与群のマウスと比べ、治療群では腫瘍増大の開始は遅延するが、時間経過とともに、腫瘍サイズの増大が確認された。この原因の一つとして、TCR 導入 iPS-CD8 細胞は、*in vivo* における生着、増殖能力が低いという事が挙げられる。TCR 導入 iPS-CD8 細胞の静脈投与後 20 日での検討において、腫瘍周囲組織への遊走は確認出来たが、末梢血、脾臓細胞における検出は不可能であった。この問題の改善策として、分化法の改良による細

細胞の質を改善する事と、治療時の投与法を改良する事が挙げられる。細胞の質自体の改善には、抜本的な細胞分化法、培養法の改善が必要であり、多くの時間を要する。しかし、TCR 遺伝子導入末梢血 CD8T 細胞における検討においては、患者に細胞の投与前処置を加える事や投与細胞の体外培養期間を減少させる事により、抗腫瘍効果が増強する事が知られている。T 細胞輸注前処置として、化学療法、放射線照射によるリンパ球減少処置を加えると、輸注 T 細胞の患者体内での長期維持を可能にし、治療効果が増強する(3, 47)。培養期間の短縮や、培養液に IL-21 を添加する事も輸注細胞の老化を防ぎ、輸注後の長期生着、機能向上が確認されている(5, 47)。これらの知見を鑑みると、TCR 導入 iPS-CD8 細胞においても、リンパ球減少前処置の併用、拡大培養期間の短縮、サイトカイン変更などの工夫を加える事で、より長期生着し抗腫瘍効果を高められることが期待できる。今後は、TCR 導入 iPS-CD8 細胞の長期生着を目指した投与方法、経路の詳細な検討が必要であろう。

今回の実験では、iPS 細胞由来の CD8T 細胞の投与自体による明らかな副作用は認めなかったが、今後投与細胞の長期生着を目指していくのであれば、安全性の向上についての注意、工夫が必要になると考えられる。iPS 細胞より分化し

た細胞を体内に長期生着させる際に、未分化な段階の iPS 細胞の混入や iPS 細胞の悪性転化による腫瘍形成の危険がある事が動物モデルで報告されている (48, 49)。この危険を防ぐ既存の安全策の一つとして、herpes simplex virus thymidine kinase (*HSV-TK*) 遺伝子等の自殺遺伝子を導入する方法が挙げられる。*HSV-TK* は、抗ウイルス薬として汎用されるガンシクロビルをリン酸化する事で DNA 合成阻害活性を有する毒性物を産生するため、ガンシクロビル投与により *HSV-TK* 発現細胞のアポトーシスを誘導できる。*HSV-TK* を導入した iPS 細胞は、移植後にガンシクロビル投与により除去可能である事が知られている(50, 51)。

iPS 細胞由来の CD8T 細胞についても、これらの技術と組み合わせる事で、より安全性の高い細胞にする事が出来ると予想される。今後、検討していく必要があるだろう。

私は TCR 導入 iPS-CD8 $\alpha\beta$ 細胞は、導入した TCR のみを発現している事を各種の TCR 遺伝子導入株を用いて確認したが、これらについても *RAG2* KO が必要かについては更なる議論が必要である。我々のデータでは、TCR 導入 iPS 細胞より分化した DP 細胞は T-iPS 細胞のそれとは異なり、導入した monoclonal TCR α および oligo clonal な TCR β を発現しているという興味深い結果を得た。

生理的なマウス胸腺細胞では、機能的な TCR β が再構成されると、その TCR β を構成成分とする pre-TCR からのシグナルが入り、DP 細胞への分化および TCR α の再構成が開始するという機序が広く知られる。また、本研究で用いた TCR 導入 iPS 細胞は、分化過程において CD3, TCR $\alpha\beta$ の発現が T-iPS 細胞に比べ低い事を我々は観察している。これらの事から仮説を立てると、TCR 導入 iPS 細胞の分化過程における TCR β 発現が不十分な一部の集団では pre-TCR シグナルによる allelic exclusion と TCR α 鎖遺伝子再構成の機構が十分に働かず、その結果 TCR β のみを再構成した集団が DP 細胞に検出されるのではないだろうか。今後の研究で明らかにしたい点の一つである。

HLA ハプロタイプホモの iPS 細胞を分化させた細胞や臓器を同種移植用にするという試みは、全世界で検討されている(35, 36)。日本では、京都大学を中心に高頻度 HLA から順に HLA タイプ別の iPS 細胞を作成している。iPS 細胞由来の細胞が、同種移植にてどの程度長期生着するかについては今後の検証が必要だが、有望な方法論である事は間違いない。T 細胞養子免疫療法では、投与後に長期生着を認めると効果が高い事については上述したが、同種 iPS 細胞から抗原特異的な T 細胞を作成する事の一番のメリットは、ほぼ無限にエフェクター

細胞を産生できる事である。エフェクター細胞の *in vivo* での長期生存を目指す一方で、繰り返し投与、局所投与、集学的治療での併用など、安全性を保った上で大量の細胞を投与し、より治療効果を発揮させるための方法の検討を行っていく必要があるだろう。

本研究において、私は iPS 細胞より作成した CD8 T 細胞が *in vitro*, *in vivo* において固形腫瘍、播種腫瘍を問わず抗腫瘍効果を持つ事を示した。また、ゲノム編集、TCR 導入といった遺伝子治療の既存法を組み合わせる事で、より安全でコントロール可能な CD8T 細胞を作成できる事を示すことが出来た。今回、私はターゲットとして GPC3 及び WT1 という 2 種類の抗原を用いたが、婦人科腫瘍において、GPC3 は卵巣明細胞腺癌、胚細胞腫瘍に特異的に発現、また WT1 は子宮頸癌、多様な卵巣腫瘍に発現しておりいずれも非常に有望なターゲットと考えられる(24, 26, 42)。何れの抗原に関しても、ワクチン療法、TCR 療法に関しての臨床試験が進行中であるが、今後、iPS 細胞を利用した同種細胞移植による養子免疫療法についても、研究が進展し、臨床試験に進んでいく事が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究計画の立案から、実験環境の整備、論文執筆まで様々な面でご指導頂きました、京都大学 iPS 細胞研究所、金子新先生、また、私に再生医療研究に携わるきっかけを与えて下さり、様々な面でのご指導、ご支援下さった日本大学医学部産婦人科、川名敬先生には深く感謝致します。東京大学産婦人科の藤井知行先生、大須賀穰先生には、研究にご理解、ご支援頂きました。京都大学 iPS 細胞研究所、堀田秋津先生には実験手技、研究計画についてのご指導頂きました。国立がん研究センター、中面哲也先生、植村靖史先生には、細胞材料の提供から、実験計画、実験手技まで様々な面でのご支援、ご指導頂きました。入口翔一先生、上田樹先生、丸山晃先生、安井裕氏、喜多山秀一氏には研究室での議論、歓談でお世話になりました。今井絵里さん、上林早苗さんには実験上の様々な箇所でお助けいただきました。野田桂さん、笠松郁子さんには、手続き上の諸点でお助け頂きました。様々な方々に、色々な形で助けていただけてきております。ここに、改めて感謝させていただきます。

最後になりましたが、私の生活に驚きと彩りを与えてくれている、家族、母の昌子、妻の麻里に改めて感謝させていただきます。いつも有り難う。

参考文献

1. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991;254(5038):1643-7.
2. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):269-81. doi: 10.1038/nri3191.
3. Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(5):383-93. doi: 10.1038/nri1842.
4. Butler MO, Friedlander P, Milstein MI, Mooney MM, Metzler G, Murray AP, Tanaka M, Berezovskaya A, Imataki O, Drury L, Brennan L, Flavin M, Neuberg D, Stevenson K, Lawrence D, Hodi FS, Velazquez EF, Jaklitsch MT, Russell SE, Mihm M, Nadler LM, Hirano N. Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8+ T cells. *Sci Transl Med*. 2011;3(80):80ra34. doi: 10.1126/scitranslmed.3002207.
5. Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, Duerkopp N, Roberts IM, Pogosov GL, Ho WY, Ochsenreither S, Wolfl M, Bar M, Radich JP, Yee C, Greenberg PD. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med*. 2013;5(174):174ra27. doi: 10.1126/scitranslmed.3004916.
6. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):114-26. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.002.
7. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H. Regeneration of human tumor antigen-specific T

cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):31-6. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.006.

8. Minagawa A, Kaneko S. Rise of iPSCs as a cell source for adoptive immunotherapy. *Hum Cell*. 2014;27(2):47-50. doi: 10.1007/s13577-014-0089-8.

9. Themeli M, Kloss CC, Ciriello G, Fedorov VD, Perna F, Gonen M, Sadelain M. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2013;31(10):928-33. doi: 10.1038/nbt.2678.

10. Bettini ML, Bettini M, Vignali DA. T-cell receptor retrogenic mice: a rapid, flexible alternative to T-cell receptor transgenic mice. *Immunology*. 2012;136(3):265-72. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03574.x.

11. Maeda T, Nagano S, Ichise H, Kataoka K, Yamada D, Ogawa S, Koseki H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, Kawamoto H. Regeneration of CD8 α beta T Cells from T-cell-Derived iPSC Imparts Potent Tumor Antigen-Specific Cytotoxicity. *Cancer Res*. 2016;76(23):6839-50. doi: 10.1158/0008-5472.can-16-1149.

12. Bluthmann H, Kisielow P, Uematsu Y, Malissen M, Krimpenfort P, Berns A, von Boehmer H, Steinmetz M. T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature*. 1988;334(6178):156-9. doi: 10.1038/334156a0.

13. Uematsu Y, Ryser S, Dembic Z, Borgulya P, Krimpenfort P, Berns A, von Boehmer H, Steinmetz M. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell*. 1988;52(6):831-41.

14. Gascoigne NR, Rybakin V, Acuto O, Brzostek J. TCR Signal Strength and T Cell Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016;32:327-48. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125324.

15. Michie AM, Zúñiga-Pflücker JC. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and β -selection. *Semin Immunol*. 2002;14(5):311-23. doi: 10.1016/s1044-5323(02)00064-7.

16. Michie AM, Soh JW, Hawley RG, Weinstein IB, Zuniga-Pflucker JC. Allelic exclusion and differentiation by protein kinase C-mediated signals in

immature thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(2):609-14. doi: 10.1073/pnas.021288598.

17. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992;68(5):855-67.

18. Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest*. 2001;108(4):497-501. doi: 10.1172/JCI13712.

19. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, Senju S, Ono T, Nishimura Y. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(19):6612-21. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0348.

20. Saikali Z, Sinnett D. Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. *Int J Cancer*. 2000;89(5):418-22.

21. Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, Voigt RW, Strauch ED, Sun CC, Huber R, Meltzer SJ, Schlessinger D. Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23(8):496-9.

22. Aviel-Ronen S, Lau SK, Pintilie M, Lau D, Liu N, Tsao MS, Jothy S. Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2008;21(7):817-25. doi: 10.1038/modpathol.2008.37.

23. Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008;99(4):653-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00747.x.

24. Kennedy AW, Biscotti CV, Hart WR, Webster KD. Ovarian clear cell adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 1989;32(3):342-9.

25. Recio FO, Piver MS, Hempling RE, Driscoll DL. Lack of improved survival plus increase in thromboembolic complications in patients with clear cell carcinoma of the ovary treated with platinum versus nonplatinum-based chemotherapy. *Cancer*. 1996;78(10):2157-63.

26. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM, Matrisian LM. The

prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5323-37. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-0737.

27. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Uda K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(38):13885-90. doi: 10.1073/pnas.0405884101.

28. Ohno S, Takano F, Ohta Y, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Sugiyama H, Ohta T, Inoue M. Frequency of myeloid dendritic cells can predict the efficacy of Wilms' tumor 1 peptide vaccination. *Anticancer Res.* 2011;31(7):2447-52.

29. Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Takakura M, Kyo S, Soma G, Sugiyama H, Inoue M. WT1 peptide vaccine stabilized intractable ovarian cancer patient for one year: a case report. *Anticancer Res.* 2011;31(7):2441-5.

30. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006;314(5796):126-9. doi: 10.1126/science.1129003.

31. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009;114(3):535-46. doi: 10.1182/blood-2009-03-211714.

32. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C, Rosenberg SA. Tumor regression in patients with

metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29(7):917-24. doi: 10.1200/JCO.2010.32.2537.

33. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, Kato I. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.* 2009;69(23):9003-11. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-1450.

34. Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magnani Z, Liu PQ, Reik A, Chu V, Paschon DE, Zhang L, Kuball J, Camisa B, Bondanza A, Casorati G, Ponzoni M, Ciceri F, Bordignon C, Greenberg PD, Holmes MC, Gregory PD, Naldini L, Bonini C. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med.* 2012;18(5):807-15. doi: 10.1038/nm.2700.

35. Peyrard T, Bardiaux L, Krause C, Kobari L, Lapillonne H, Andreu G, Douay L. Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev.* 2011;25(3):206-16. doi: 10.1016/j.tmr.2011.01.002.

36. de Rham C, Villard J. Potential and limitation of HLA-based banking of human pluripotent stem cells for cell therapy. *J Immunol Res.* 2014;2014:518135. doi: 10.1155/2014/518135.

37. Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kimura T, Futagami T, Suegami S, Takahashi M. Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. *Stem Cell Reports.* 2016;7(4):619-34. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.011.

38. Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Tanaka Y, Hayashi S, Nakatsura T. HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.* 2011;102(5):918-25. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01896.x.

39. Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice

infected with West Nile virus. *J Immunol.* 2011;187(8):3919-30. doi: 10.4049/jimmunol.1100442.

40. Li HL, Gee P, Ishida K, Hotta A. Efficient genomic correction methods in human iPS cells using CRISPR-Cas9 system. *Methods.* 2016;101:27-35. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.10.015.

41. Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya Ji, Shioda T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A. An Efficient and Versatile Mammalian Viral Vector System for Major Histocompatibility Complex Class I/Peptide Complexes. *J Virol.* 2002;76(23):11982-8. doi: 10.1128/jvi.76.23.11982-11988.2002.

42. Suzuki S, Yoshikawa T, Hirosawa T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2011;102(9):1622-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02003.x.

43. Ochi T, Fujiwara H, Okamoto S, An J, Nagai K, Shirakata T, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood.* 2011;118(6):1495-503. doi: 10.1182/blood-2011-02-337089.

44. Iwata M, Hanaoka S, Sato K. Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur J Immunol.* 1991;21(3):643-8. doi: 10.1002/eji.1830210316.

45. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, Fan S, Visconti R, Frucht DM, Geenen V, Chrousos GP, Ashwell JD, O'Shea JJ. Positive Effects of Glucocorticoids on T Cell Function by Up-Regulation of IL-7 Receptor *The Journal of Immunology.* 2002;168(5):2212-8. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2212.

46. Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, Kamao H, Mandai M, Shiina T, Ogasawara K, Hirami Y, Kurimoto Y, Takahashi M. Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote

iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Reports*. 2016;7(4):635-48. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.010.

47. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8. doi: 10.1126/science.aaa4967.

48. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cell Reports*. 2015;4(3):360-73. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.006.

49. Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Refaat MM, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J. Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2012;30(5):935-45. doi: 10.1002/stem.1060.

50. Cheng F, Ke Q, Chen F, Cai B, Gao Y, Ye C, Wang D, Zhang L, Lahn BT, Li W, Xiang AP. Protecting against wayward human induced pluripotent stem cells with a suicide gene. *Biomaterials*. 2012;33(11):3195-204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.023.

51. Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. *Stem Cell Reports*. 2015;5(4):597-608. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.011.