

令和 2 年 7 月 19 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 672

氏 名

佐藤 洋平

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： スタンフォード大学（国名： 米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
速やかに臨床応用が可能な制御性 T 細胞による免疫制御法の研究基盤創出
3. 派遣期間： 平成 30 年 2 月 28 日 ～ 令和 2 年 2 月 27 日
4. 受入機関名及び部局名
スタンフォード大学医学部 小児科学講座造血幹細胞移植再生医学部門
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

初年度は制御性 T 細胞を用いた免疫制御法に関して研究を行った。制御性 T 細胞のマスターレギュレーターである FOXP3 遺伝子をエフェクター T 細胞に強制発現させて、制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) を誘導する実験系の最適化を行った。

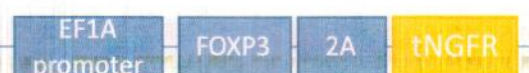
既存の FOXP3 発現レンチウイルスベクター (Allan et al. Mol Ther 2008, Passerini et al. Sci Transl Med 2013) は、目的遺伝子である“FOXP3”と、マーカー遺伝子である“NGFR”が 2 つの異なるプロモーターにより発現する Bidirectional ベクターと呼ばれる構造を取っている。利点としては 2 つの遺伝子が同時に、安定して発現する点が挙げられるが、2 つのプロモーターが必要であること、臨床応用の前例が少ないことが欠点として挙げられる。

そこで、1 つのプロモーターにより 2 つの遺伝子を発現する Monodirectional (Bicistronic) ベクターを新たにクローニングし、制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) の作成効率に関して比較検討を行った。Monodirectional (Bicistronic) ベクターは遺伝子導入効率に関しては優れていたものの、FOXP3 と NGFR の発現が安定せず、既存の Bidirectional ベクターが制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) の作成効率に関しては優れていた。

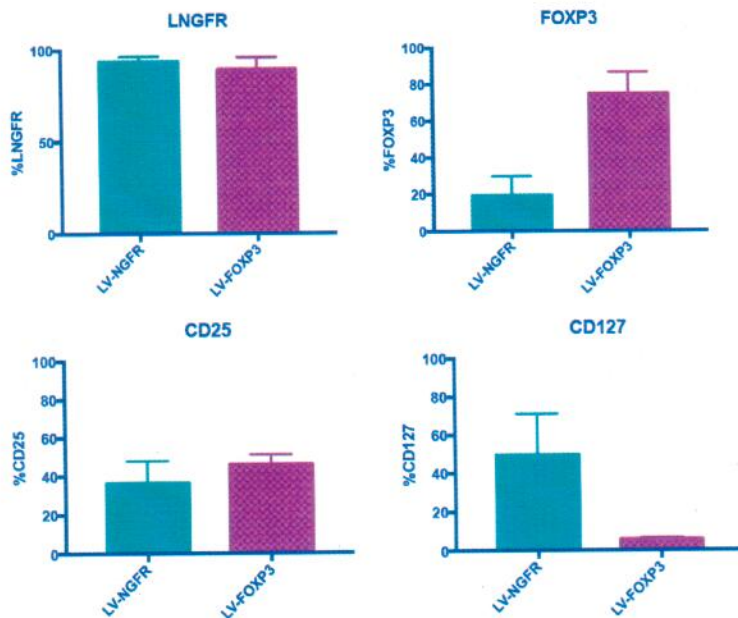
Bidirectional LV construct



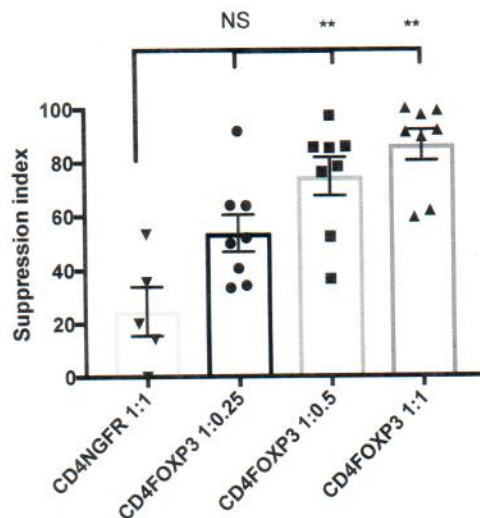
Monodirectional LV construct



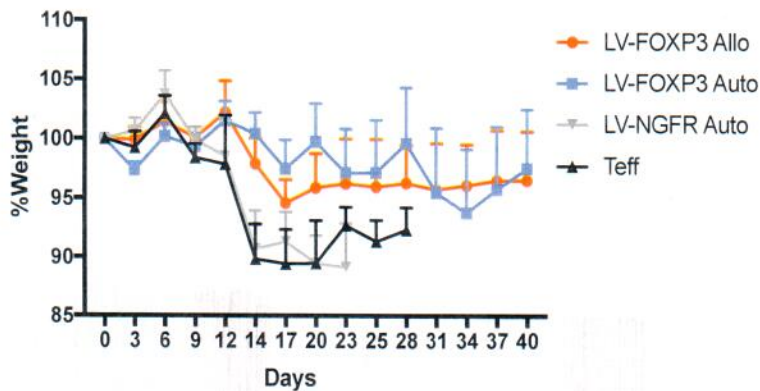
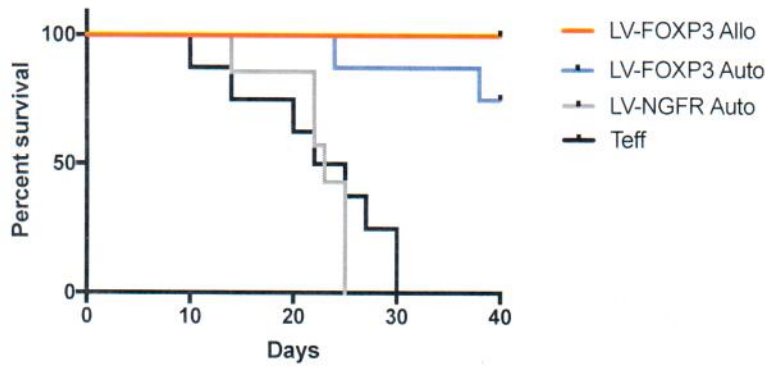
レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$) の表現形をフローサイトメトリーを用いて解析した。コントロールとして FOXP3 を除いたマーカー遺伝子のみを発現するベクターを感染させた ($CD4^{LVNGFR}$)。レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$) は FOXP3 陽性 NGFR 陽性 CD25 陽性 CD127 陰性という制御性 T 細胞に非常によく似た表現形を持っていることが確認された。コントロールでは FOXP3 弱陽性 NGFR 陽性 CD25 弱陽性 CD127 陽性とエフェクター T 細胞に似た表現形をとっており、FOXP3 の強制発現が制御性 T 細胞様の表現形を誘導していることが示された。



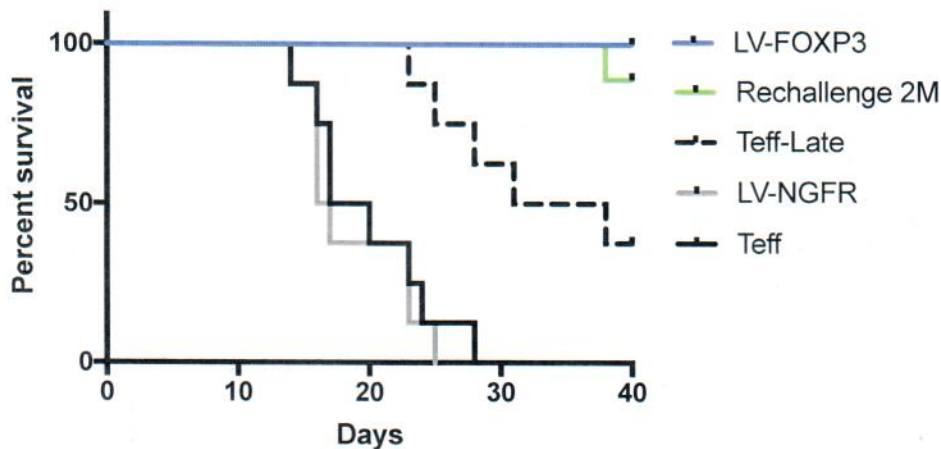
さらに、制御性 T 細胞の制御機能に関してサプレッションアッセイを行い機能評価を行なった。レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$) と T 細胞を共培養し、96 時間後の T 細胞の増殖を測定した。レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$) は容量依存性に T 細胞の増殖を抑制することが示された。コントロールでは T 細胞の増殖は抑制されなかったことから、FOXP3 の強制発現によって、表現形だけでなく、機能的にも制御性 T 細胞に類似した細胞が誘導できることが示された。



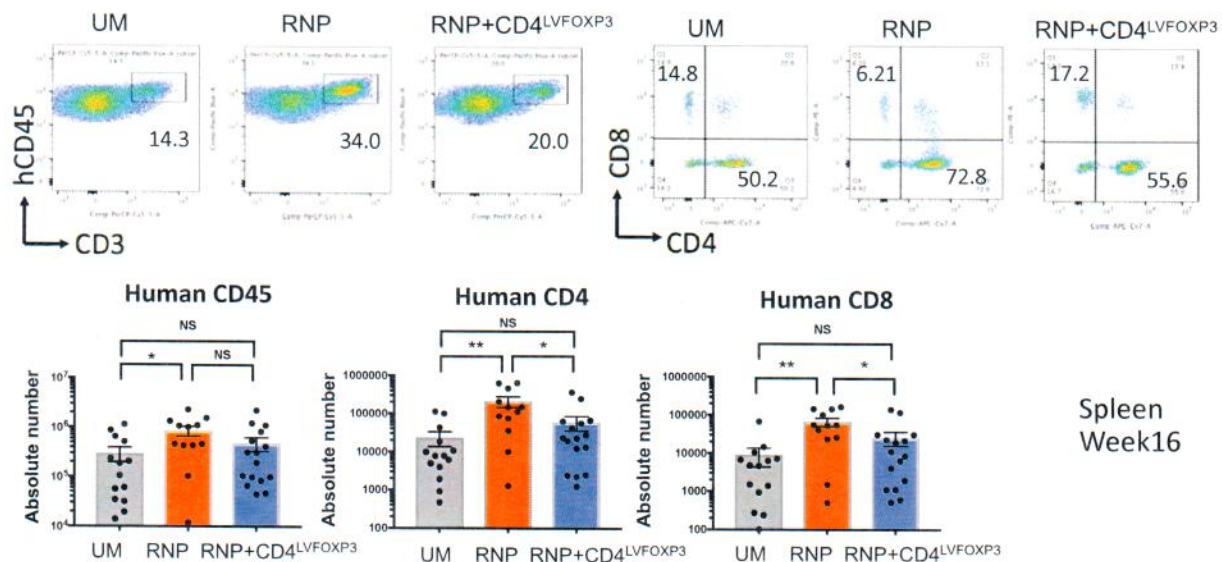
制御性 T 細胞の制御機能に関して生体下で評価を行うため、免疫不全マウス (NSG マウス) にヒト CD4+T 細胞を投与して異種移植片対宿主病モデル (xeno GVHD model) を作成した。レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$ Allo) を投与したマウスでは体重減少が緩和され、生存期間の優位な延長が認められた。さらに、ヒト CD4+T 細胞とレンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$ Auto) を同一ドナーより作成した場合にも治療効果が認められたことから、レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 ($CD4^{LVFOXP3}$) は生体下においても同一ドナーによる免疫反応をコントロールできることが示された。



さらに、ヒト CD4+T 細胞とレンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3} Allo) を投与したマウスに対して、再度ヒト CD4+T 細胞を投与することによって、残存する制御機能に関する評価を行なった。ヒト CD4+T 細胞とレンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) を投与した群 (LV-FOXP3)、ヒト CD4+T 細胞とレンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) を投与したマウスに対して、再度ヒト CD4+T 細胞を投与した群 (Rechallenge) を用意した。さらに、コントロールとしてヒト CD4+T 細胞を Day0 で投与した群 (Teff) と Day16 で投与した群 (Teff-Late)、マーカー遺伝子のみを導入した CD4+T 細胞 (LV-NGFR) を用意した。レンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) はヒト CD4+T 細胞の再投与による異種移植片対宿主病を抑えていることが示された。



次年度はレンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) が制御性 T 細胞機能異常である IPEX 症候群のマウスモデルの自己免疫異常を改善できるかを検討した。ヒト CD34 陽性細胞の FOXP3 遺伝子を CRISPR/Cas9 (RNP) によりノックアウトし、新生児 NSG マウスに投与したところ、投与後 12 週間後に CD4 陽性 T 細胞数の増加を認めた。同一ドナーから採取した CD4 陽性 T 細胞から制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) を誘導し、投与したところ、T 細胞数の増加だけでなく生存率の改善など種々の治療効果が認めれた。以上の結果からレンチウイルスにより誘導した制御性 T 細胞 (CD4^{LVFOXP3}) が種々の自己免疫異常症に対して有効な治療法である可能性が示唆された。



以上の成果を、2019年の米国遺伝子治療学会（口演）、国際細胞治療学会（口演）で発表した。国際細胞治療学会では上記の結果が高く評価され、Top-Scoring Abstract Award（最優秀演題賞、1名のみ）に選出された。