Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Re-generation of cytotoxic γδT cells with distinctive signatures from human γδT-derived iPSCs

村井，信幸

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2023-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8694号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485878

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

Re-generation of cytotoxic γδT cells with distinctive signatures from human γδT-derived iPSCs

γδT由来 iPS 細胞からの特異的な遺伝子発現と細胞傷害性を有する γδT 細胞の再誘導

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

形成外科学

（指導教員:寺師　浩人教授）

村井　信幸

【背景】γδT 細胞は皮膚や腸管に分布し MHC 非拘束性にさまざまな種類の腫瘍細胞を認識して攻撃することが知られている。体内の T 細胞における割合は数％に過ぎないため、ゾレドロン酸を用いて体外で増幅させて本人に戻す自家 γδT 細胞療法が行われてきた。しかし患者によって増幅率には違いがあり、要する時間やコスト等の問題もある。

そこで我々は人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を用いた他家移植を念頭に研究を行った。αβT 細胞から樹立した iPS 細胞を αβT 細胞に再誘導すると、もとの細胞と同一の TCR 再構成を保持することが報告されている。このことが γδT 細胞にも応用できると考え、γδT 細胞由来 iPS 細胞の作製と血球前駆細胞への分化誘導について報告した(渡邉, 2018)。なお、2019 年に Zeng らが NK 細胞の分化誘導法を用いて γδT 由来 iPS 細胞から”mimetic γδT 細胞”と称する細胞を作製したと報告したが、この細胞は体内には存在しない人工的な細胞であったと結論づけており、iPS 細胞由来 γδT 細胞の作製に関する報告はこれまでに行われてない。

【目的】我々の樹立した γδT由来 iPS 細胞から γδT 細胞が再誘導できるか、再誘導された γδT 細胞(**iγδT**)が抗腫瘍性を持つか、そして末梢血由来の γδT 細胞と近い遺伝子発現型を持つかを明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法】既報を元に分化誘導を行い、PCR やシークエンスで遺伝子再構成の保持を確認する。フローサイトメトリーでマーカーとなる細胞表面分子の発現を評価する。標識した腫瘍細胞と共培養して腫瘍傷害性を検証し、末梢血由来の免疫細胞と比較する。シングルセル RNA シークエンス(scRNAseq)で成人末梢血由来の γδT 細胞と遺伝子発現を比較する。

【結果①】既報を参考に、10 日間の Feeder free、20 日間の On feeder、その後再度 Feeder free 条件にして HMBPP 刺激を加えることで 2 株の γδT由来 iPS 細胞から CD3(+)γδTCR(+)の細胞すなわち γδT を誘導することができた。これを iγδT と名付けた。

【結果②】iγδT は γδTCR のみを発現し αβTCR を発現していないことが FCM で明らかになった。誘導産物のうち iγδT の割合は 50%ほどであった。iγδT を sort して γδ ゲノム PCR を行うと iPS 細胞の状態と同一の Vγ9δ2 遺伝子再構成を保持していた。同じく CD3 を指標に sort した iγδT の TCRγ 鎖、δ 鎖のレパトア解析を行うと Monoclonal に増殖していることが分かった。

【結果③】標識した腫瘍細胞株と共培養を行った。非接着性の Jurkat（ATL 由来）は共培養後に FCM で生細胞数を評価した。肝細胞がん由来 Huh-7、大腸がん由来 SW480 との共培養はタイムラプス撮影で測定した腫瘍細胞の面積を細胞傷害性の指標とした。

iγδT を含む誘導細胞は 3 種の腫瘍細胞株に対し再現性を持って傷害性を示した。HLA タイピングの結果から、これらの細胞傷害作用は HLA 非拘束性であることが確認された。また、末梢血由来体外増幅 γδT 細胞（PBγδT）・末梢血由来の NK 細胞と比較したところ同等の傷害性を示した。

【結果④】iγδTの細胞傷害機構を評価した。Jurkatに対する傷害性は濃度依存的・時間依存的で、Effector:Target 比 0.5:1 の場合 1 日で約 50%の腫瘍細胞を傷害し、効果は 4 日間続いた。

γδTCR と NKG2D に対する中和抗体を添加すると、それぞれの場合で傷害性が低下した。PBγδT と同様にグランザイム・パーフォリンを発現していたが、IFNγ の発現は低かった。T 細胞関連マーカーの発現をフローサイトメトリーで評価すると、iγδT は CD7 の発現が高い一方で CD5 および CD25（IL-2R）の発現は低く、そのほとんどが CD45RA(+)CD27(-)のエフェクターT 細胞であった。

【結果⑤】未刺激の末梢血単核球を陰性対照に、iγδT と PBγδT の遺伝子発現を scRNAseq で解析した。全体としては 6 つのクラスターに分けられた。主たるクラスターは iγδT がクラスター1、PBγδT がクラスター2 となった。クラスター1 と 2 では CD8Aの発現に違いが見られた。αβT 細胞が大半を占める未刺激の PBMC には、クラスター1 の細胞すなわち iγδT と同等の細胞が含まれていた一方で体外増幅 γδT 細胞（PBγδT）の主たる構成細胞と同等であるクラスター2 の細胞は含まれていなかった。iγδT では KIT の発現が高い一方で Pan T 細胞のマーカーとして知られる CD2 や CD5 は陰性であった。また、NK 関連マーカーを発現しており、免疫チェックポイント分子や MHC 関連遺伝子を発現する細胞は少なかった。

【考察】

αβT 細胞の分化に不可欠の BCL11b は γδT 細胞の分化には必須ではないといわれ、我々の細胞でも陰性であった。BCL11b を発現しない γδT 細胞は CD5 陰性になるとの報告があり、この点も我々の結果と矛盾しなかった。CD5 陰性の γδT 細胞は陽性のものより細胞傷害性が高いとの報告がある。

iγδT のメインクラスターは未刺激の PBMC にも含まれる細胞であったが、HMBPP による刺激では PBMC からはあまり増幅できなかった。これまでに報告された成人の末梢血由来 γδT 細胞のサブセットで完全に一致するものはなかったが、CD2 低発現 CD7 陽性で IFNγ の産生が少ないという特徴は胎児胸腺由来の γδT 細胞と一致する。CD45RA と CD27 の発現から最終分化したエフェクターT 細胞であると考えられる。

iγδT は αβTCR が陰性であるため GVHD のリスクが低くなることが期待される。CAR-T や TCR-T 細胞のキャリアとして用いることも可能と考えられる。高くない誘導効率および他種動物由来の試薬や細胞を使用していること、正常細胞への傷害性の有無など、実際に臨床で使用するにはまだいくつかの課題が残るものの、本研究は iPS 細胞から機能的な γδT 細胞が再誘導可能であることを示したものであり、iPS 細胞由来 γδT 細胞を用いた新たな免疫療法が実現に向けて一歩前進したと考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲　第3296号	氏　　名	村井　信幸
論文題目 Title of Dissertation	γδT由来 iPS 細胞からの特異的な遺伝子発現と細胞傷害性を有するγδT細胞の再誘導 Re-generation of cytotoxic γδT cells with distinctive signatures from human γδT-derived iPSCs		
審査委員 Examiner	主　　査 Chief Examiner　南　博信 副　　査 Vice-examiner　久保　亮治 副　　査 Vice-examiner　鈴木　聡		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景・目的】

γδT細胞は皮膚や腸管に分布しMHC非拘束性にさまざまな種類の腫瘍細胞を認識して攻撃するが、体内のT細胞における割合は少なく、体外で増幅させる自家γδT細胞療法が行われてきた。しかし患者により増幅率に差があり、増幅に要する時間やコスト等が問題となる。

過去にNK細胞の分化誘導法を用いγδT由来人工多能性幹細胞(iPS細胞)から"mimetic γδT細胞"なる細胞が作製されたが、これは体内には存在しない人工的な細胞で、iPS細胞由来γδT細胞は作製されていない。γδT細胞由来のiPS細胞からγδT細胞を再誘導できれば免疫療法に使用できる可能性がある。本研究はiPS細胞からγδT細胞を再誘導し、抗腫瘍性や末梢血由来γδT細胞と近似した遺伝子発現の有無を検討した。

【対象と方法】

独自に樹立したγδT細胞由来iPS細胞を、既報にならい10日間のFeeder free、20日間のOn feeder、その後再度Feeder free条件で(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphate (HMBPP)刺激を加え分化誘導した。これを、PCRやシークエンスで遺伝子再構成の保持を確認し、フローサイトメトリーで細胞表面分子の発現を評価した。腫瘍傷害性は標識した腫瘍細胞と共培養し検討し、末梢血由来免疫細胞と比較した。その際、Jurkat(ATL由来)は共培養後にFCMで生細胞数を評価し、肝細胞がん由来Huh-7、大腸がん由来SW480との共培養ではタイムラプス撮影で腫瘍細胞の面積を測定し細胞傷害活性を評価した。HLA拘束性はHLAタイピングを行い検討した。遺伝子発現はシングルセルRNAシークエンス(scRNAseq)で成人末梢血由来のγδT細胞と比較した。

【結果】

2株のγδT由来iPS細胞からCD3(+)γδTCR(+)細胞、すなわちγδTを誘導しiγδTとしてその後の実験に用いた。遺伝子再構成を確認したところ、iγδTはγδTCRのみを発現しαβTCRの発現はなかった。誘導産物のうちiγδTの割合は50%ほどで、iγδTをsortしてγδゲノムPCRを行うとiPS細胞の状態と同一のVγ9δ2遺伝子再構成を保持していた。同じくCD3を指標にsortしたiγδTのTCRγ鎖、δ鎖のレパトア解析でMonoclonal増殖を確認した。

標識した腫瘍細胞株との共培養で、iγδTを含む誘導細胞は3種の腫瘍細胞株に傷害性を示し、HLAタイピングでは細胞傷害活性はHLA非拘束性であった。また、末梢血由来体外増幅γδT細胞(PBγδT)・末梢血由来のNK細胞と同等の傷害活性を示した。

傷害活性はγδTCRやNKG2Dに対する中和抗体で低下し、グランザイム・パーフォリンは発現していたが、IFNγの発現は低かった。T細胞関連マーカーの発現をフローサイトメトリーで評価すると、iγδTはCD7を高発現しCD5およびCD25(IL-2R)は低発現で、そのほとんどがCD45RA(+)CD27(-)のエフェクターT細胞であった。

未刺激の末梢血単核球を陰性対照として、iγδTとPBγδTの遺伝子発現をscRNAseqで解析したところ、全体としては6つのクラスターに分けられ、主たるクラスターはiγδT、PBγδTは別のクラスターとなり、CD8Aの発現に違いが見られた。αβT細胞が大半を占める未刺激のPBMCにはiγδTと同等の細胞が含まれていた。

iγδTはKITの発現が高い一方でPan T細胞のマーカーとして知られるCD2やCD5は陰性であった。また、NK関連マーカーを発現しており、免疫チェックポイント分子やMHC関連遺伝子の陽性細胞は少なかった。

【考察】

αβT 細胞の分化に不可欠の BCL11b は γδT 細胞の分化には必須ではないといわれ、我々の細胞でも陰性であった。BCL11b を発現しない γδT 細胞は CD5 陰性になると報告され、この点も我々の結果と一致した。CD5 陰性の γδT 細胞は陽性のものより細胞傷害活性が高いとも報告されている。

iγδT のメインクラスターは未刺激の PBMC にも含まれる細胞であったが、HMBPP による刺激では PBMC からはあまり増幅できなかった。これまでに報告された成人の末梢血由来 γδT 細胞のサブセットで完全に一致するものはなかったが、CD2 低発現 CD7 陽性で IFNγ の産生が少ないという特徴は胎児胸腺由来の γδT 細胞と一致する。CD45RA と CD27 の発現から最終分化したエフェクターT 細胞であると考えられる。

iγδT は αβTCR が陰性であるため GVHD のリスクが低くなることが期待され、CAR-T や TCR-T 細胞のキャリアとして用いる可能性も考えられる。誘導効率が高くないこと、他種動物由来の試薬や細胞を使用していること、正常細胞への傷害活性の有無など、実際に臨床で使用するにはまだ課題は多いが、本研究は iPS 細胞から機能的な γδT 細胞が再誘導可能であることを示したものであり、iPS 細胞由来 γδT 細胞を用いた新たな免疫療法が実現に向けて一歩前進したと考えられる。。

【結論】

本研究は iPS 細胞から機能的な γδT 細胞が再誘導可能であることを示したものであり、まだ課題は多いものの iPS 細胞由来 γδT 細胞を用いた新たな免疫療法の開発につながるものと考えられ、重要な貢献をした価値ある研究であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。