論文内容の要旨

申請者氏名　近藤　遼平

近年、新しいがん免疫細胞療法として、がん抗原に特異的な T 細胞受容体（T cell receptor; TCR）遺伝子を、レンチウイルスを用いて直接 iPS 細胞に導入し、がん抗原特異的 T 細胞を再生する TCR-iPS 細胞が開発された。しかしながら TCR-iPS 細胞では、遺伝子の挿入によって再生 T 細胞ががん化する可能性や、TCR-iPS 細胞由来の再生 T 細胞では、TCR の発現レベルがやや低いという問題があった。

そこでこれらの問題を克服するために、がん抗原特異的な TCR 遺伝子を、内在性の TCRβ遺伝子座にノックインする計画を立てた。TCR 遺伝子を直接ノックインすることも考えられたが、様々な TCR 遺伝子を効率よく導入することを目的として、まず薬剤耐性遺伝子カセットをゲノム編集により TCRβ遺伝子座にノックインしたのち、Cre/loxP システムを用いたカセット交換法により TCR 遺伝子を導入することを試みた。

このシステムが機能するか検証するために、まずヒト T 細胞性白血病細胞株である Jurkat β-mutant 細胞株を用いて実験を行った。ハイグロマイシン耐性遺伝子と、ピューロマイシン耐性遺伝子−チミジンキナーゼ融合遺伝子（$Puro^{r}\Delta TK$）を組み合わせた薬剤耐性遺伝子カセットターゲッティングベクターを作製し、CRISPR/Cas9n 発現ベクターとともに Jurkat 細胞に導入した。ハイグロマイシン選択により、薬剤耐性遺伝子カセットが TCRβ遺伝子座にノックインされた細胞を得た。ノックイン成功クローンに対し、カセット交換を行い EGFP 遺伝子もしくは TCR 遺伝子を導入したのち、Flp 組換え酵素により $Puro^{r}\Delta TK$ を欠失させた。$Puro^{r}\Delta TK$ の欠失により、V20-1 プロモーターが、C 領域の下流にあるエンハンサーと相互作用することで、導入遺伝子が発現すると期待され、実際に EGFP の発現は確認されたが、TCR の発現は認められなかった。そこでカセット交換によって導入する TCR 遺伝子にイントロンとポリ A 付加配列を付加し、mRNA を安定化させた結果、TCR 遺伝子を発現させることに成功した。

以上の結果から、がん抗原特異的な TCR 遺伝子を、Jurkat 細胞の TCRβ遺伝子座に導入し、T 細胞を効率よく再生する基盤構築ができた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名　　近藤　遼平

近年、免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体や、CAR-T 細胞療法の開発により、がん免疫療法がめざましい発展をとげている。しかしながら、これらの治療法では重篤な副作用が見られることや、汎用性や奏効性の低さから新たながん免疫療法の開発が望まれている。本研究では新たながん免疫細胞療法である TCR 遺伝子ノックイン（KI）iPS 細胞療法の基盤構築を行った。

申請者は、TCR-iPS 細胞の問題点である、再生 T 細胞ががん化する可能性を克服するために、がん抗原特異的な TCR 遺伝子を、内在性の TCRβ遺伝子座に導入することを試みた。TCR 遺伝子を効率よく導入するために、Cre/loxP システムによるカセット交換法と呼ばれる方法を用いた。Jurkat β-mutant 細胞株では、このカセット交換法により外来性遺伝子を効率よく導入できることが示された。したがって、カセット交換法は今後、様々ながん抗原を認識する TCR 遺伝子を導入するための有用な手法となることが期待される。さらに Flp 組換え酵素により $Puro^{r}\Delta TK$ を欠失させることで、GFP の発現を誘導することに成功したが、TCR の発現はみとめられなかった。そこで申請者は、TCR 遺伝子の mRNA が不安定化されている可能性を想定し、TCR 遺伝子にイントロンとポリ A 付加配列を付加することによって、TCR 遺伝子の発現を誘導することに成功した。さらに EF1αイントロンを CAG イントロンに変更し、α鎖とβ鎖を入換ることによって、TCR 遺伝子の発現量をさらに上昇させることに成功した。

また申請者は、同一の抗原を認識する TCR でも、TCR の種類によって発現レベルが異なり、抗原の認識能に差があることを示した。この結果から、再生 T 細胞を作製する際、最適な TCR 遺伝子を選別する必要があり、スクリーニングの系として Jurkat 細胞を用いることが有用であることが示唆された。

以上のように、本論文は、Jurkat 細胞において、ゲノム編集技術とカセット交換法を用いて、がん抗原特異的な TCR 遺伝子を内在性 TCRβ遺伝子座に導入し発現させることに成功し、新たながん免疫細胞療法である TCR-KI-iPS 細胞療法の基盤を構築したもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。