

研 究 報 告 書
令和4年度：A課題

令和6年 4月 20日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 神戸大学医学研究科病態情報学・
／保健管理センター
住所 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1番1号

研究者氏名 井口 元三

(研究課題)

疾患iPS細胞を用いた腫瘍随伴症候群の病態解明と創薬シーズの創出

令和5年1月23日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたので
ご報告いたします。

【研究目的】

腫瘍隨伴症候群は、担癌患者において自己免疫機序により生じる多様な症候群であり、その多くが指定難病として医療費助成の対象となっている。しかしながら、病態を解析するための有用な疾患モデルが存在しない事から、病態に直接アプローチする治療法は確立していない。モデルを樹立できない理由として、マウスとヒトでは免疫機構が異なるため、マウスモデルでは再現できない事と免疫機構には HLA 拘束性があり HLA が異なると再現できない事があり、現時点ではヒトの腫瘍隨伴症候群の解析モデルは存在せず、病因解明の大きな障壁となっている。本研究では、これまで申請者が明らかにしてきた本症候群の患者サンプルを用いた疾患 iPS 技術を応用することにより、腫瘍隨伴症候群の病態を解明するための新たな再構成モデル樹立し病態解明と創薬シーズの創出につなげることを目的とする。

【研究成果】

本研究では、以下の3ステップで腫瘍隨伴症候群の *in vitro* 再構成疾患モデルを樹立して網羅的な新規分子同定と機能解析を行った。本研究の概要を(図1)に示す。

Step①: 患者由来 iPS 細胞(AP01 株)から下垂体組織を作成した。また、ターゲット抗原蛋白である PIT-1 の制御下に GFP レポーターを発現する iPS 細胞を用いて標的組織としての下垂体細胞の収集効率を高めた。

Step②: 患者由来の抗原特異的キラーT 細胞の作成と再活性化を行った。まず、患者末梢血からリンパ球を抽出し、マグネットビーズを用いて制御性 T 細胞(T-reg)を除去した後、抗原認識部位であるエピトープの近傍の複数ペプチドでリンパ球を刺激して特異的キラーT 細胞を選別し、キラーT 細胞の特異的

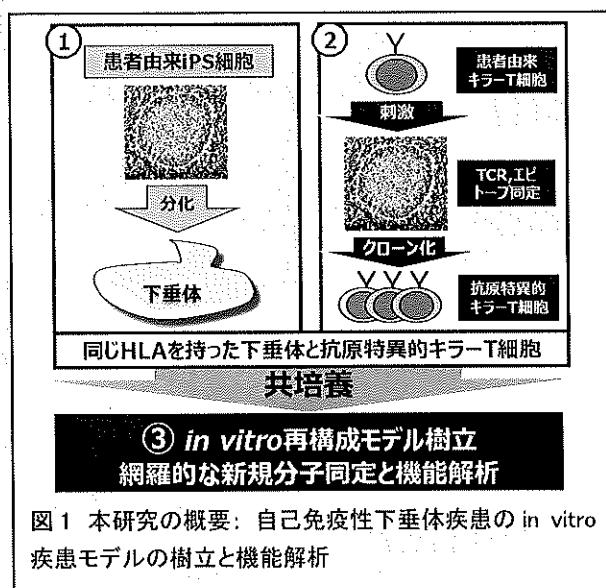


図1 本研究の概要: 自己免疫性下垂体疾患の *in vitro* 疾患モデルの樹立と機能解析

反応を確認した。その後、IFN- γ ELISpot 解析により抗原特異的反応性を確認し、FACS・セルソ

ーターを用いて、T 細胞の活性化および細胞傷害指標である CD137(4-1BB)および CD107a をマーカーとしてクローニングを行った。得られた細胞障害性の高い候補クローンである V β 7.1 クローンを中心に解析を行った。

Step③: in vitro 再構成モデルの樹立と病態解析: ①で作成した患者由来 iPS 細胞からの下垂体組織と②でクローニングした患者由来抗原特異的キラー T 細胞を共培養することにより、③自己免疫性下垂体疾患(抗 PIT-1 下垂体炎)の in vitro 疾患モデルを樹立することに成功した。

さらに、樹立に成功した in vitro 再構成モデルを用いて腫瘍随伴症候群の病態解析および創薬スクリーニングを行つた。

作成した in vitro 再構成モデルにおいて、特異的細胞に対するキラー T 細胞の自己免疫機序を、正常者から作成したモデルと比較した(図2)。

患者 iPS 細胞由來下垂体と PIT-1 反応性 CTL の共培養により特異的下垂体傷害を確認した。これは、リビングイメージによる細胞傷害プロセスの可視化においても同様で、疾患モデルの薬物スクリーニングツールとして用いることが可能となつた。

また、遺伝子発現プロファイルによる網羅的発現解析を行い、発症メカニズムに関わる新規候補分子を同定した(図3)。

さらに、共培養実験系を用いた創薬シ

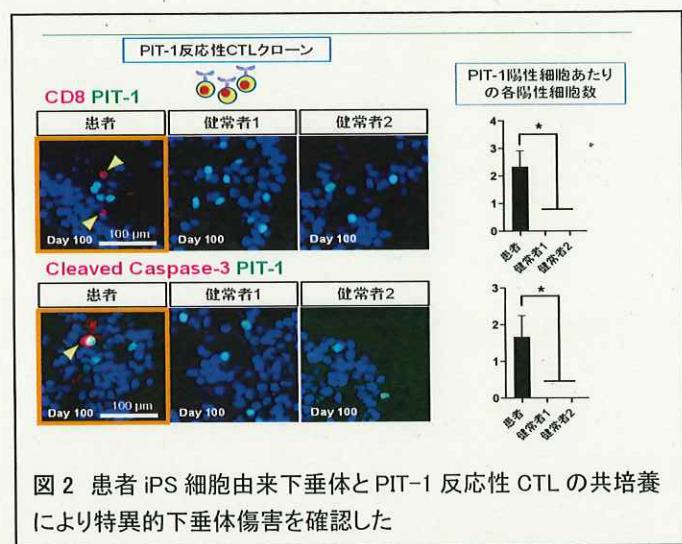


図2 患者 iPSC 細胞由來下垂体と PIT-1 反応性 CTL の共培養により特異的下垂体傷害を確認した

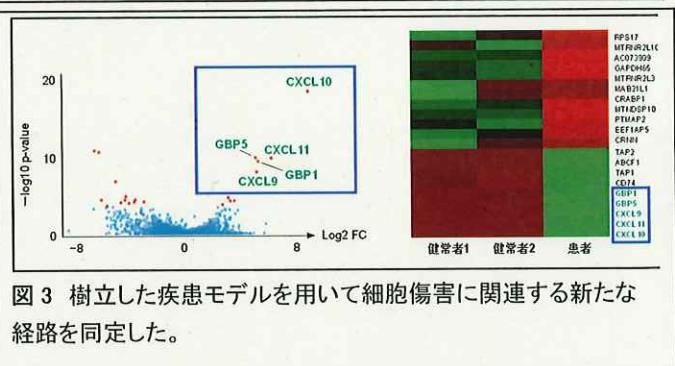


図3 樹立した疾患モデルを用いて細胞傷害に関連する新たな経路を同定した。

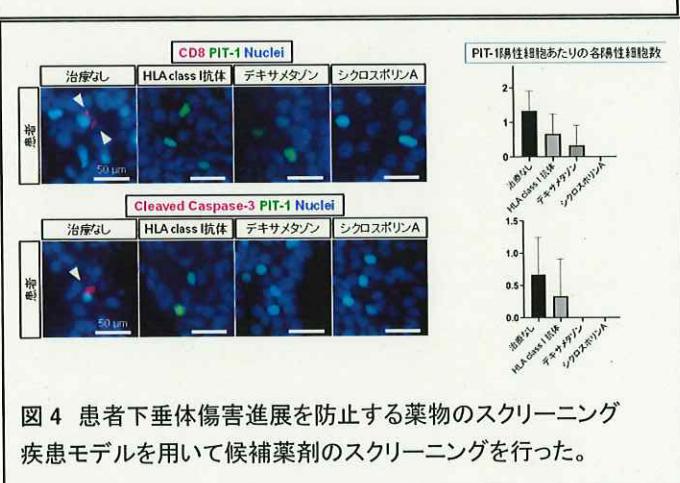


図4 患者下垂体傷害進展を防止する薬物のスクリーニング疾患モデルを用いて候補薬剤のスクリーニングを行つた。

ーズ候補のスクリーニングとして、候補薬剤であるシクロスボリン A、デキサメザン、HLA class I 抗体等を *in vitro* 再構成モデルに添加する事により、腫瘍随伴症候群の細胞傷害抑制に繋がることを証明した(図4)。

【本研究の考察】

腫瘍随伴症候群の末梢血から特異的 CTL のクローニングに成功し、特異的な TCR、抗原、および HLA を決定した。特異的 CTL を患者 iPS 細胞由来の下垂体と共に培養することで、抗 PIT-1 下垂体炎の病態再現に成功した。

今回申請者が樹立した患者由来 iPS 細胞からの疾患特異的 *in vitro* 再構成モデルはヒトの自己免疫性疾患のモデルとしてこれまで報告がなく世界初の成果である。

これまで、1 型糖尿病疾患モデルへの疾患 iPS 細胞の応用が報告され、特異的な T 細胞活性化は示されたが臓器の細胞傷害は示されていない(*Cell Rep.* 2020;32:107894.)。それに対して本疾患モデルは、既存研究では困難であった未踏領域を探索できるというアドバンテージを持ち、これまで存在しなかったヒト細胞モデルを用いた病態解明が可能となった。

さらに、本腫瘍随伴症候群疾患モデルを用いることで、新規の分子経路を同定することに成功し、また、薬物治療による細胞傷害抑制のスクリーニングを行うシステムの構築に成功した。

【本研究の今後の展望】

本研究において、腫瘍随伴症候群の患者 iPS 細胞を用いた *in vitro* 疾患モデル作成に世界で初めて成功し、CTL のクローニングを行うことにより細胞性免疫による腫瘍随伴症候群における臓器の細胞傷害を確認した。

本手法を用いることで、他の腫瘍随伴症候群や細胞性免疫関連腫瘍随伴症候群モデルの解析に広く応用が可能であり、活用することにより詳細な機序の解明、創薬に貢献する可能性がある。