

学位論文抄録

Development of HLA-modified induced pluripotent stem cell-derived dendritic cells for a novel
cancer immunotherapy

(HLA 遺伝子改変型 iPS 細胞由来の樹状細胞を用いた新規樹状細胞療法の開発)

小島 拓

指導教員

中山 秀樹 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 歯科口腔外科学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: We previously established a method to generate human iPS cell-derived myeloid cell line (iPS-ML) with a proliferation capacity from an HLA-A*24:02 donor. Upon stimulation with IL-4, iPS-ML differentiated into dendritic cells (DC) which were highly potent in stimulating T cells. Although this system enabled us to generate a large quantity of human antigen presenting cells (APCs) from iPS-ML with a very simple procedure, the issue of histoincompatibility between donors and recipients, that can be an obstacle for broad clinical application, have been remained. In order to overcome this problem, we developed a method to generate HLA-modified iPS-ML-DC using CRISPR-Cas9 system in this study. Furthermore, we investigated the capacity of this cell line to elicit tumor-specific immune response *in vitro*.

Methods: We disrupted HLA-A, B and DRA gene in iPS-ML by CRISPR-Cas9 system. Next, we introduced HLA-A *02:01 to HLA-deficient iPS-ML and generated HLA-A *02:01 expressing iPS-ML-DC upon stimulation with IL-4. Then, we co-cultured this cell line and MART-1-specific CD8⁺ T cells derived from an HLA-A*02:01 positive allogeneic donor and examined the antigen-presenting capacity of HLA-modified iPS-ML-DC.

Results: Using CRISPR-Cas9 system, we could generate HLA-disrupted iPS-ML that could avoid recognition by allo-reactive CD8⁺ T cells. Then, we confirmed the expression of DC activation markers, namely CD80, CD83, CD86, and CD40 on HLA-A *02:01 introduced iPS-ML-DC as well as non-genetically modified iPS-ML-DC. HLA-A *02:01 introduced iPS-ML-DC could stimulate HLA-A2-restricted MART-1-specific CD8⁺ T cells derived from allogeneic donor *in vitro*. In addition, both MART-1 gene and HLA-A*02:01 gene introduced iPS-ML-DC could stimulate HLA-A2-restricted MART-1-specific CD8⁺ T cells derived from an HLA-A*02:01 positive allogeneic donor as well.

Conclusions: We established a system that can exchange HLA allele from HLA-A*24:02 to *02:01 in iPS-ML and this system may conquer the obstacle of histoincompatibility in cellular vaccination therapy regardless of HLA allele.

学位論文抄録

[目的] 我々は以前、HLA-A * 24:02 ドナーからヒト iPS 細胞由来の骨髄細胞株 (iPS-ML) を作製する方法を報告し、この iPS-ML は IL-4 の存在下で樹状細胞 (DC) に分化し、T 細胞の活性化能を有することを証明した。この技術は樹状細胞の大量産生を可能にしたが、より幅広い患者への臨床応用を実現するためにはドナーとレシピエントの間の HLA 不適合性の問題を克服する必要がある。本研究では、CRISPR-Cas9 を用いて HLA 遺伝子の改変を行った iPS-ML-DC を作製し、その T 細胞活性化能を検討した。

[方法] CRISPR-Cas9 システムにより iPS-ML の HLA-A、B、DRA 遺伝子を破壊し、HLA 欠損 iPS-ML を作製した。その細胞にレンチウイルスを用いて HLA-A * 02:01 を導入し、IL-4 の存在下で培養し DC に分化させた。この iPS-ML-DC と HLA-A2 拘束性 MART-1 特異的 CD8⁺T 細胞を共培養して、iPS-ML-DC の T 細胞活性化能を検討した。

[結果] CRISPR-Cas9 システムを用いて作製した HLA 欠損 iPS-ML は、他のドナー由来の CD8⁺T 細胞からの拒絶反応を回避した。また、HLA 欠損 iPS-ML に HLA-A * 02:01 を導入して作製した iPS-ML-DC 上の表面マーカーを解析した結果、遺伝子改変を行っていない iPS-ML-DC と同等に DC の活性化刺激分子 (CD80, CD83, CD86, CD40) が発現していた。HLA-A2 を遺伝子導入した iPS-ML-DC は、HLA-A2 拘束性 MART-1 特異的 CD8⁺T 細胞を活性化した。また、さらに MART-1 遺伝子を追加導入した iPS-ML においても、HLA-A2 拘束性の MART-1 特異的 CD8⁺T 細胞が活性化されることが分かった。

[結論] HLA 遺伝子改変により、HLA の型に関係なく使用可能な iPS 細胞由来の樹状細胞を作製した。この技術により、従来の樹状細胞ワクチン療法と比べてより幅広い患者に対して使用可能な樹状細胞ワクチン療法の開発につながると考える。