

II-1 TCR の抗原同定法の開発

学術研究部医学系 教授 岸 裕 幸

〈目的〉

腫瘍特異的 TCR を用いて TCR-T 細胞療法を行う場合、その TCR がどのような抗原を認識するかを知っておくことは、用いる TCR-T 細胞が正常組織を攻撃する可能性があるか無いか、その副作用の可能性を推定するのに必要である。TCR の抗原同定は、次世代シーケンス技術解析と、ペプチド/MHC ライブラリー作製の 2 つに大別できる。次世代シーケンス技術解析では変異を指標としているため、遺伝子の変異に基づくネオアンチゲンの候補が同定できる。しかし膨大な候補が得られるだけでなく、患者によって異なるため、数多くの患者への対応は困難である。さらに抗原の決定までには、複雑で多大な労力と費用が必要である。ペプチド/MHC ライブラリーの系は、予め作製したライブラリーを用いることで、おおよそ 1 ヶ月程度で TCR と結合するペプチドの候補が得られ、その後の解析に供することができ、次世代シーケンス技術と比べて、技術的に容易であり、労力も少なくて済む。現在までに、酵母表面ディスプレイ法を用いたヒト HLA-A02 について報告があるが、特に日本人のアレル頻度が約 40%と最も多い HLA-A24 については報告がなく、ライブラリーは整備されていない。そのため HLA-A24 に焦点を当ててペプチド/MHC ライブラリーを作製して、TCR の抗原スクリーニングシステムを構築することは、日本におけるがん研究の発展のために非常に意義がある。そこで本研究では、HLA-A24 に焦点を当てて TCR の抗原を効率的にスクリーニングする技術開発を行うことを目標とした。

TCR の抗原をスクリーニングする方法として、酵母表面ディスプレイ法を利用することとした。具体的には、抗原であるペプチドをランダムな配列にしてライブラリー化したペプチド MHC を酵母の膜上に発現させ、可溶化した TCR を用いて特異的なペプチド MHC を発現している酵母をスクリーニングする系である。本年度は、系を立ち上げるために、モデルペプチド MHC とその TCR を用いて、酵母の膜状にモデルペプチド MHC 発現させることができる条件検討を行った。

〈方法〉

可溶化 TCR の作製

可溶化 TCR のヘテロダイマーは、knob/hole の Fc ヘテロ二量体(JB Ridgway et al. 1996) を利用して作製した。TCR の α 鎖の細胞外領域と hole の Fc、TCR の β 鎖の細胞外領域と knob の Fc をそれぞれ融合させた。さらに knob の Fc の C 末端にビオチン付加配列である AviTag (D Bekett et al. 1999) を融合させた。TCR として、HLA-A-24 拘束性の EB ウイルス由来 BRLF-1 ペプチド特異的 TCR である F09 と EBNA3A ペプチド特異的 TCR である E21(E Kobayashi et al. 2013)を用いた。これらの DNA 断片を、pcDNA3.4 ベクター (サーモフィッシャー) にクローニングした。これらのプラスミドと、ビオチン付加酵素である BirA 発現プラスミドを、哺乳類細胞株である Expi293F™ 細胞に導入し、ビオチン存在下で 1 週間培養した。培養後、細胞上清を回収し、HiTrap Protein G HP (GE ヘルスケア)を用いて、ビオチン化可溶化 TCR を精製した。

BRLF-1/MHC 発現酵母の作製

酵母を用いた実験は、富山大学遺伝子組換え生物等使用実験安全管理委員会に遺伝子組換え実験の申請を行い、承認されている (承認番号: 第 G2020MED-1 号)。

酵母は、出芽酵母 EBY100 (*α GAL1-AGAL::URA3 ura3-52 trp1 leu2 Δ 200 his3 Δ 200 pep4::HIS3 prb11.6R can1 GAL*) を用いた。

酵母に BRLF-1 ペプチド/MHC を発現させるために、Aga2 シグナル配列-BRLF-1 ペプチド-(Gly4Ser)₃ リンカー- β 2 ミクログロブリン-(Gly4Ser)₄ リンカー-HLA-A-24 の α 1 鎖と α 2 鎖-AGIA タグ (PLoS One 2016, 11, E0156716)-Aga2 ペプチドの DNA 断片(ユーロフィンにて合成)を、pYES3 プラスミドベクターにクローニングして、BRLF-1/MHC 発現プラスミドを作製した。

Chao らの方法(Nat Protocol 2006, 1, 755)を参考に、EBY100 にエレクトロポレーションにて BRLF-1/MHC 発現プラスミドを形質転換し、ガラクトース存在下で培養して BRLF-1/MHC 発現酵母の作製を作製した。

BRLF-1/MHC 発現酵母の検証

PE 標識ストレプトアビジン (BD バイオサイエンス) とビオチン化可溶化 TCR を 1:4 のモル比で混合し、PE 標識可溶化 TCR テトラマーを作製した。

BRLF-1/MHC 発現酵母に、PE 標識可溶化 TCR テトラマーと、APC 標識の抗 AGIA 抗

体を反応させ、フローサイトメーターを用いて酵母上に発現させた BRLF-1/MHC の検証を行った。

〈結果及び今後の予定〉

HLA-A24 のペプチド/MHC ライブラリーの作製とその検証のために、モデルの TCR と抗原として、我々が以前に単離した HLA-A24 拘束性の EB ウイルス由来 BRLF-1 のペプチド/MHC と、それを特異的に認識する TCR (F09) を用いた。

はじめに可溶化させた TCR タンパク質を作製した。抗体の Fc 領域に knob と hole の変異を入れた場合、それぞれが特異的に結合して knob/hole の Fc としてヘテロ二量体を形成することが報告されている。そこで TCR の α 鎖の細胞外ドメインと hole の Fc、 β 鎖の細胞外ドメインと knob の Fc を融合させ、 α 鎖と β 鎖を knob/hole の Fc によりヘテロ二量体化させた可溶化 TCR の作製を行った(図 1)。

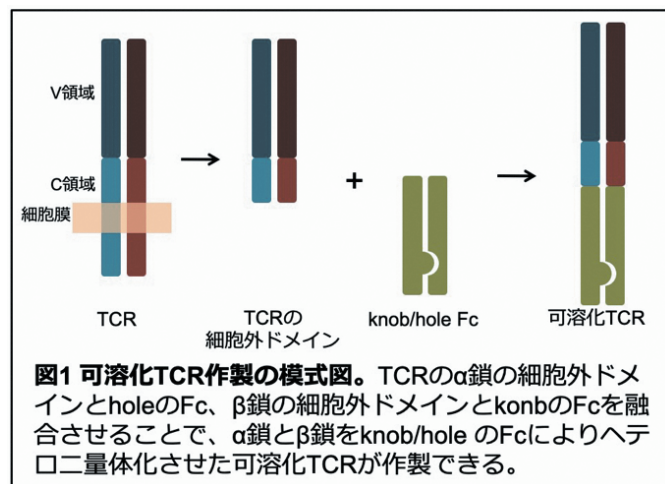


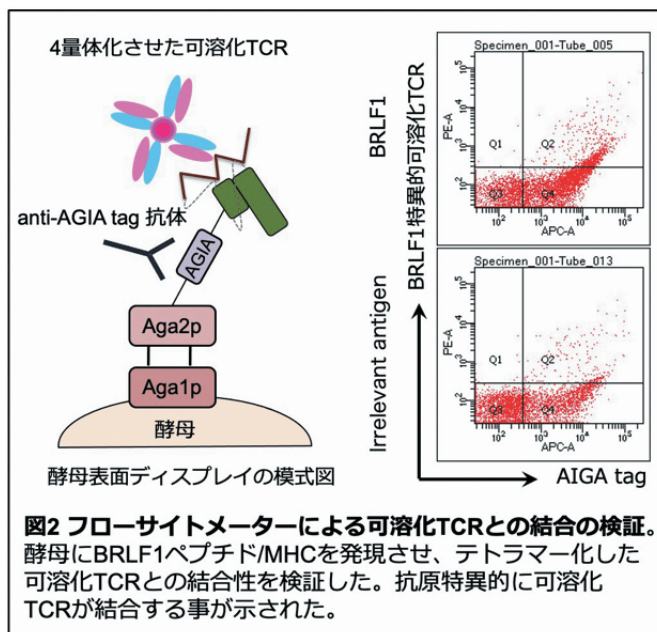
図1 可溶化TCR作製の模式図。TCRの α 鎖の細胞外ドメインとholeのFc、 β 鎖の細胞外ドメインとknobのFcを融合させることで、 α 鎖と β 鎖をknob/holeのFcによりヘテロ二量体化させた可溶化TCRが作製できる。

さらに knob の C 末端にビオチンを 1 分子付加させた。このビオチンを利用し、PE 標識されたストレプトアビジンと混合して、4 量体の可溶化 TCR を作製した。

次に酵母の膜上にペプチド MHC を発現させることができる抗原側の構造上の条件検討を行った。MHC の各ドメインであるペプチド、 $\beta 2$ ミクログロブリン、HLA の重鎖を一本鎖で繋ぎ、ドメインを繋ぐ順番、及びドメインの変異体の検討など様々な構造の発現プラスミドを作製し、これらを酵母に形質転換させた。発現誘導後それぞれ構造が異なる抗原を発現する酵母に対して、フローサイトメーターを用いて、F09 可溶化 TCR との結合を観察した。その結果、分泌シグナル-抗原ペプチド- $\beta 2$ ミクログロブリン- HLA-A24 重鎖の $\alpha 1\alpha 2$ ドメイン変異体-アフィニティータグ-酵母膜融合ドメインを一本鎖で繋いだ構造が、酵母の膜上に安定して発現し、BRLF1 ペプチド/MHC と F09 可溶化 TCR が特異的に結合することを示した(図 2)。これらの結果より、酵母の膜上にペプチド/HLA-A24 タンパク質を安定して発現でき、そしてそのペプチド/HLA-A24 タンパク質に特異的な可溶化 TCR との結合性が認められることを

実証した。

今回考案した構造を元に、現在ランダムペプチドライブラリーの作製を行っている。HLA-A24 と結合するペプチドのアンカー部分（全 9 アミノ鎖のうち、2 番目の Y、9 番目の F）を固定し、それ以外の部位はランダムな配列とした、 1×10^8 以上の規模のライブラリーの作製を行う。ライブラリーの作製後、スクリーニングの検討を行う予定である。



II-2 ネオ抗原特異的 TCR の同定法の開発

学術研究部医学系 助教 浜 名 洋

【研究概要】

免疫チェックポイント阻害薬のがん治療効果は限定的であり、その治療効果が認められない患者には、腫瘍反応性 T 細胞受容体(TCR)遺伝子を導入した T 細胞 (TCR-T 細胞) を投与する TCR-T 細胞療法が有効な治療法の 1 つだと考えられる。特に、遺伝子変異により生じるネオ抗原を標的とした TCR-T 細胞療法が、T 細胞の強い応答を誘導すると考えられることから、有望である。ネオ抗原を標的とした TCR-T 細胞療法を行うには、ネオ抗原特異的 TCR 遺伝子が必要である。我々は先行研究を参考に腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からネオ抗原特異的 TCR の取得するための研究を進めているが、従来のネオ抗原特異的 TCR の同定法は時間と労力が必要であることが、研究を進める上での課題の 1 つとなっている。

本研究では、我々がこれまでに開発した迅速・簡便な「TCR cDNA の増幅方法」および「TCR の機能解析法」を応用し、「TIL からネオ抗原特異的 TCR 遺伝子を迅速・簡便に同定する方法」の開発を行う。開発する方法は、TCR-T 細胞療法の基礎研究および臨床応用に用いられ、TCR-T 細胞療法の発展や TCR-T 細胞の製造コストの低減に繋がり、がん免疫療法に大きく貢献することが期待される。

現在、本研究で開発を進めている「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」の概要を図 1 に示す。この方法では、腫瘍組織に含まれている TIL から PD-1+ CD137+ CD8+ な活性化 T 細胞をセルソーターを用いて単一 T 細胞として取得

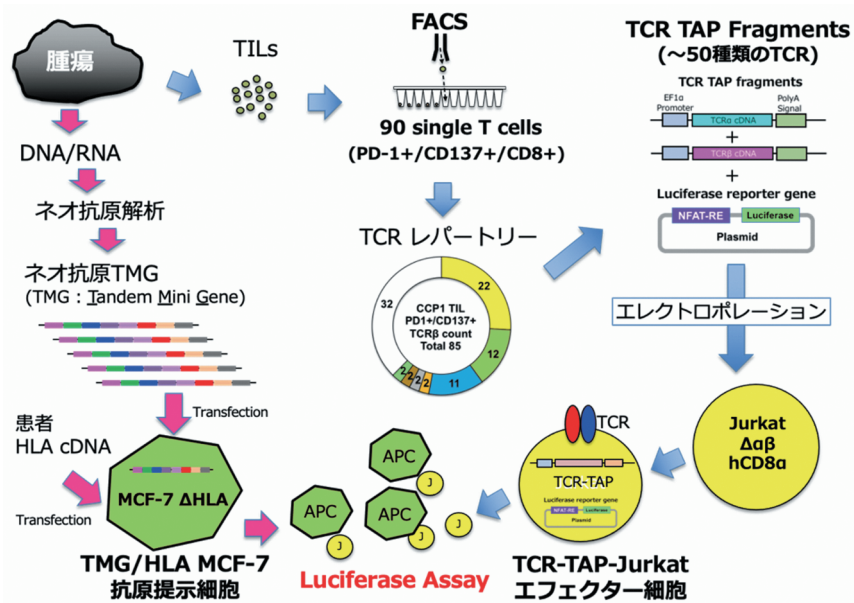


図1 「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」の概要図

し、それらが発現している TCR cDNA を我々の開発した「TCR cDNA の増幅方法」(特許第 6647197 号)を用いて増幅する。そして得られた TCR の TAP fragment を作製し、それを T 細胞株である Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞にエレクトロポレーションし、TCR を発現させたエフェクター細胞 (TCR-TAP-Jurkat) を作製する。一方、腫瘍組織から調整された DNA および RNA を用いて次世代シーケンサーによりネオ抗原解析をおこないネオ抗原 TMG (変異抗原遺伝子を連結した DNA) を作製する。この TMG を患者の HLA cDNA と共に MCF-7 Δ HLA 細胞に遺伝子導入数することで患者のネオ抗原を発現した抗原提示細胞 (TMG/HLA MCF-7) を作製する。そして、エフェクター細胞と抗原提示細胞を共培養し、TCR の活性化を Luciferase Assay により検出することで、ネオ抗原特異的 TCR をスクリーニングする。

令和 2 年度は、①大腸がん患者の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からの TCR cDNA の増幅。②大腸がん TIL から得られた TCR の TAP fragment 作製を行ったので報告する。

また、本研究で開発中の方法では、TAP fragment による効率的な TCR 発現が重要なポイントとなっている。TAP fragment は、クローニングした TCR cDNA の上流に遺伝子発現プロモーターを、下流に Poly-A 付加シグナルを連結させた PCR 産物であり、これを細胞に遺伝子導入することで細胞に TCR を発現させることができる。TAP fragment は PCR で増幅可能なため、従来のプラスミドベクターを用いる方法で必要な大腸菌での遺伝子組み換え実験が不要となり、細胞での TCR の発現が迅速で簡便となる利点がある。効率的な TCR の発現には TAP fragment に用いる遺伝子発現プロモーターの選択が重要である。そこで、一般的によく用いられる CMV プロモーターと EF1 α プロモーターで TCR 発現効率の比較検討を行ったので合わせて報告する。

【方法】

TAP fragment に用いる遺伝子発現プロモーターの検討

既存の腫瘍抗原特異的 TCR である 1G4 TCR あるいは TAK-1 TCR の cDNA を pBApo-CMV プラスミドあるいは pBApo-EF1 α プラスミドに組み込んだプラスミドを作製した。そして、そのプラスミドを鋳型に PCR により [Promoter]-[TCR cDNA]-[TK Poly-A 付加シグナル] を含む DNA 断片を増幅し、TAP fragment を作製した。TCR TAP fragment をエレクトロポレーションにより Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞へ遺伝子導入し、Peptide/HLA テトラマーを用いてフローサイトメトリーにより TCR の発現量を解析した。TCR α および TCR β の TAP fragment は別々に合成した後、当量ずつ混合しエレクトロポレーションに用いた。

大腸がん患者の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からの TCR cDNA の増幅

1 名の大腸がん患者の手術切除腫瘍から調製した TIL を PD-1、CD137、CD8、CD3 に対する蛍光標識抗体により染色し、セルソーターを用いて PD-1+CD137+CD8+ T 細胞を 96 well PCR プレートに単一細胞ソートした。取得した T 細胞から、「TCR cDNA の増幅方法」(特許第 6647197 号)を用いて TCR cDNA を増幅した。具体的には、単一 T 細胞の入った各 well に One-step RT-PCR mix (Multiplex primer, dNTP, 逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ等を含む) を加え、逆転写反応と PCR 反応を連続的に行った。得られた PCR 産物を希釈し、それを鋳型に TCR α 、TCR β を別々に 2nd PCR を行い、それぞれの cDNA を増幅した。TCR cDNA の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認し、PCR 産物の DNA 配列をキャピラリーシーケンサーを用いたサンガー法により決定し

た。決定した DNA 配列を IMGT (<http://www.imgt.org>) の IMGT/V-QUEST Tool で解析し、TCR の V 遺伝子および CDR3 配列を決定し、TCR レパートリーを解析した。

大腸がん TIL 由来 TCR の TAP fragment の作製

TCR TAP fragment は我々が以前に報告した方法を用いて作製した (Hamana *et al.*, *BBRC*. 2016.)。具体的には PCR で増幅した TCR cDNA は定常領域の一部が欠失している。それを補完するために、欠失している定常領域部分の cDNA 配列を組込まずみの直鎖状プラスミドへ Gibson Assembly 法を用いて PCR 産物を挿入することで、完全長の TCR cDNA を再構築した。直鎖状プラスミドには Promoter と TK Poly-A 付加シグナルが組込んであるので、PCR 産物が挿入されると [Promoter]-[完全長 TCR cDNA]-[TK Poly-A 付加シグナル] の配列が構築される。この PCR 産物を組込んだプラスミドを鋳型に PCR を行い、TCR を発現可能な TAP fragment を増幅した。TCR α および TCR β の TAP fragment は別々に合成した。

【結果】

TAP fragment に用いる遺伝子発現プロモーターの検討

1G4 TCR は、がん抗原の一つである NY-ESO-1 由来のペプチド SLLMWITQC と HLA-A*02:01 の複合体に結合する TCR であり、市販の SLLMWITQC と HLA-A*02:01 の複合体 (NYESO-1 Tetramer)

を用いて、細胞に発現させた 1G4 TCR の発現量をフローサイトメーターで解析することができる。同様に、TAK-1 TCR は、がん抗原 WT-1 に結合する TCR であり、WT1 Tetramer (CYTWNQMNL/HLA-A*24:02) を用いて TAK-1 TCR の発現量を解析することができる。これらの TCR の発現には Jurkat 細胞を用いた。Jurkat 細胞は T 細胞由来の細胞株であり TCR を細胞表面に発現している。我々は、以前の研究において Jurkat 細胞がもともと発現している TCR の遺伝子を

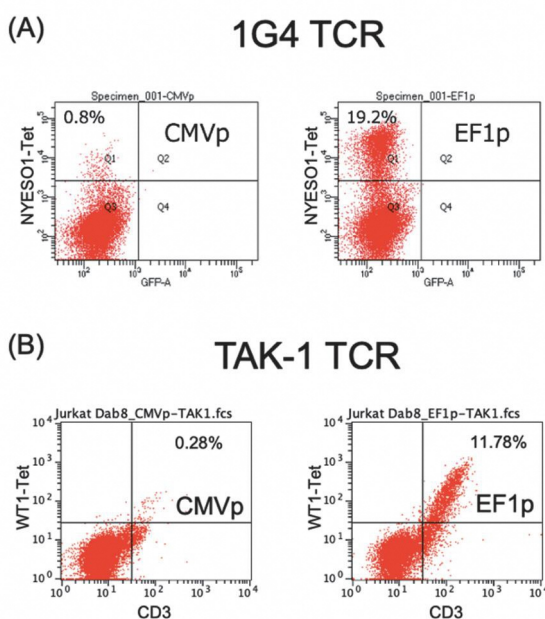


図2 プロモーターの違いによる TCR の発現量の違い

CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトした Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞を作製しており、本研究では、この細胞を用いて TIL から取得した TCR の機能解析を進めていく予定である。

これまで、我々は TCR を発現させるための TAP fragment には CMV プロモーターを用いてきたが、Jurkat 細胞では CMV プロモーター(CMVp)よりも EF1 α プロモーター(EF1p)の方が、細胞あたりの GFP 発現量が多いとの報告がある (TaKaRa バイオ)。そこで、1G4 TCR と TAK-1 TCR を用いて、CMVp-TCR TAP fragment と EF1p-TCR TAP fragment を作製し Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞に発現させ、TCR の発現効率を比較検討した。その結果、Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞においては、EF1 α プロモーター(EF1p)の方が TCR の発現効率が高いことが明らかとなった (図 2)。1G4 TCR では CMVp-TCR TAP fragment を導入した場合、1G4 TCR 発現細胞の割合が 0.8%であるのに対し、EF1p-TCR TAP fragment では 19.2%と、TCR 発現量の改善が見られた (図 2 A)。同様に、TAK-1 TCR においても、CMVp-TCR TAP fragment では 0.28%の発現細胞率であるのに対し、EF1p-TCR TAP fragment では 11.78%となり、TCR を発現した細胞の割合が CMVp に比べ高いことが示された (図 2 B)。これらの結果から EF1 α プロモーターを用いることで、TCR の発現効率を改善できることが明らかとなった。

大腸がん患者の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からの TCR cDNA の増幅

1 名の大腸がん患者 (CCP1) の TIL より 90 個の PD-1+ CD137+ CD8+ T 細胞を単一細胞として取得し、TCR α および TCR β の cDNA の増幅を行い、アガロース電気泳動で PCR 産物の増幅を確認した (図 3)。およそ 80%の細胞から TCR α および TCR β の cDNA の増幅が確認された。

次に、増幅された PCR 産物の DNA 配列を解析し、TCR のレパートリー解析を行った。その結果、7 種類の Clonal TCR と 32 種類の Unique TCR が同定された (図 4)。

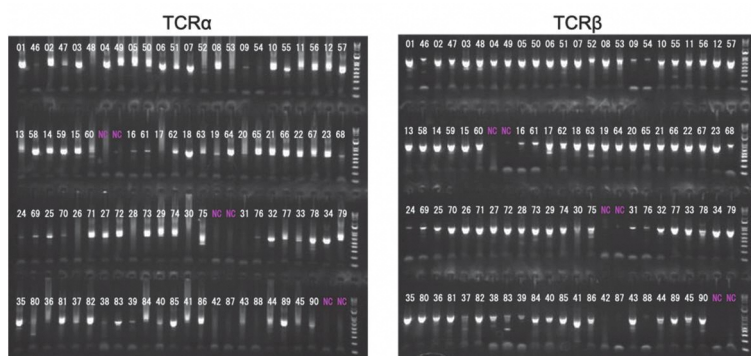


図3 アガロースゲル電気泳動による TCR cDNA の増幅確認

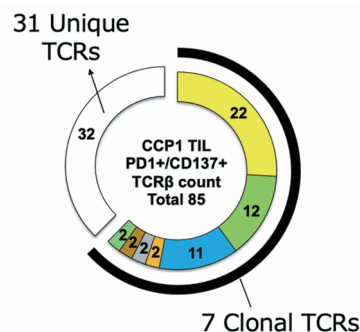


図4 TCRレパートリー

大腸がん TIL 由来 TCR の TAP fragment の作製

TIL から得られた TCR のうち、TCR α および TCR β がペアで得られた 7 種類の Clonal TCR と 31 種類の unique TCR (図 4) について TAP fragment を合成しアガロースゲル電気泳動で増幅を確認した (図 5)。TAP fragment は EF1 α プロモーターを用いて作製し、ほぼ全ての TCR で TAP fragment の合成が確認された。

【考察と今後の予定】

令和 2 年度では、TAP fragment に用いるプロモーターの検討を行い、これまで用いていた CMV プロモーターよりも EF1 α プロモーターの方が Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞における TCR の発現により適していることが明らかになった。今後、EF1 α プロモーターを TAP fragment に用いることで、効率よく TCR の機能解析が進むと期待される。また、大腸がん患者 (CCP1) の TIL からの TCR cDNA の取得および、その TAP fragment の作製は問題なく完了した。令和 3 年度は、他の大腸がん患者 TIL からの TCR cDNA の取得、および患者のネオ抗原の TMG 作製を実施し、研究を進めていく予定である。

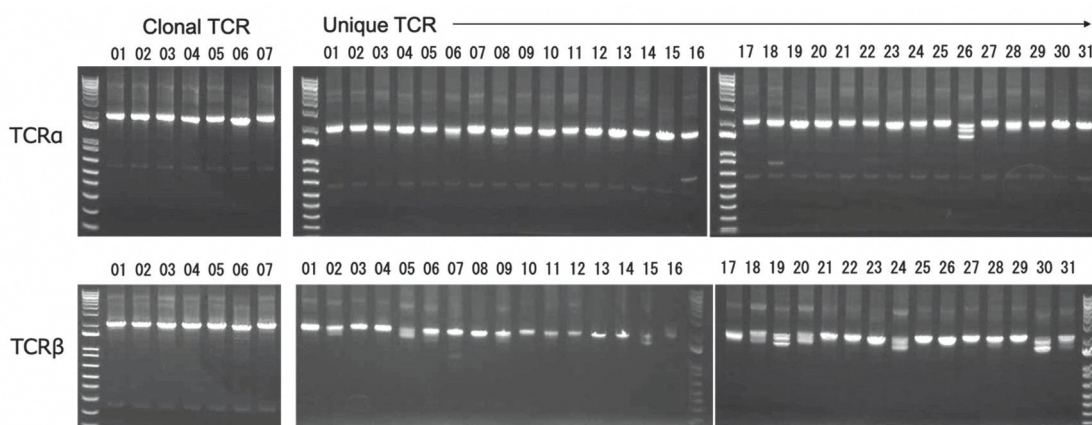


図5 アガロースゲル電気泳動による TAP fragment の増幅確認