

II-3 T細胞 ISAAC による腫瘍特異的 TCR の同定法の開発

学術研究部医学系 助教 小林 栄 治

〈目的〉

免疫細胞の中で腫瘍細胞を殺傷することができるキラーT細胞 (CD8⁺T細胞) はその細胞表面に発現する T細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を用いて「正常な細胞」と何らかの原因で異常に増殖するようになった「腫瘍細胞」を区別し、腫瘍細胞のみを殺傷することができる。そこで、がん患者の腫瘍から腫瘍に浸潤した T細胞 (Tumor infiltrating lymphocyte: TIL) を取り出し、体外で増やし、患者体内に戻すことで腫瘍を根絶させることを目指した TIL 療法が行われた。しかし、TIL は元々数が少なかったり、疲弊していてもうまく増えなかったりと期待された成果を得ることができなかった (Dudley et al. *Science* 2002)。そのような状況下、腫瘍に特異的に反応する TCR 遺伝子を同定し、健康な細胞にその TCR を発現させ、患者体内に戻すことで腫瘍を排除する TCR-T 療法が次世代がん治療として世界中で開発研究や臨床試験が盛んに行われている。しかしながら、これら TCR-T 療法は特定のヒトリンパ球抗原 (Human Leukocyte antigen: HLA) と腫瘍抗原断片 (ペプチド) の組み合わせに限定されているのが現状である。その主な理由として、がん退縮を誘導できる腫瘍特異的 TCR を同定することが困難なことが挙げられる。

従来、抗原特異的 TCR を同定するためには、数ヶ月以上を掛けて T細胞クローンを樹立する必要があった。また、数ヶ月以上掛けても数個程度樹立できれば良い方で、全くできない場合もあり、非常に非効率だった。最近では遺伝子解析技術の発展により、単一細胞レベルの解析が行われるようになったものの、TCR α 鎖と β 鎖をペアで同定するのは依然として難しい状況である。とりわけ、腫瘍特異的 TCR は親和性が低く、効果的な腫瘍特異的 TCR の同定は非常に困難である。

そのような状況下、我々は抗原特異的 TCR の α 鎖と β 鎖を単一細胞からペアで取得し、その抗原特異性の評価を 10 日間で行うことができる革新的技術「hTEC10 法」を開発した (Kobayashi et al. *Nat. Med.* 2013)。しかしながら、hTEC10 法では抗原特異的 T細胞の検出にはペプチド/HLA テトラマーを用いており、抗原ペプチドのみで高感度に腫瘍特異的 T細胞を検出するのは難しかった。そこで、我々は hTEC10 法と我々独自のデバイスであるマイクロウェルアレイチップを用いた「ISAAC 法」(Jine A et al *Nat. Med.*

2009) および T 細胞の新たな活性化機構を融合させて、抗原ペプチドのみで抗原特異的 T 細胞を同定することができる T 細胞 ISAAC 法の開発に取り組んでいる(図 1)。本研究テーマでは T 細胞 ISAAC を用いて腫瘍特異的 TCR を効率よく同定するために、T 細胞 ISAAC の高感度化を行う。

本研究成果により T 細胞 ISAAC 法による腫瘍特異的 TCR の同定が可能になれば、ペプチドのみで腫瘍特異的 TCR 遺伝子の効率的な同定が可能になり、TCR-T 療法の開発に大きく貢献することが期待される。

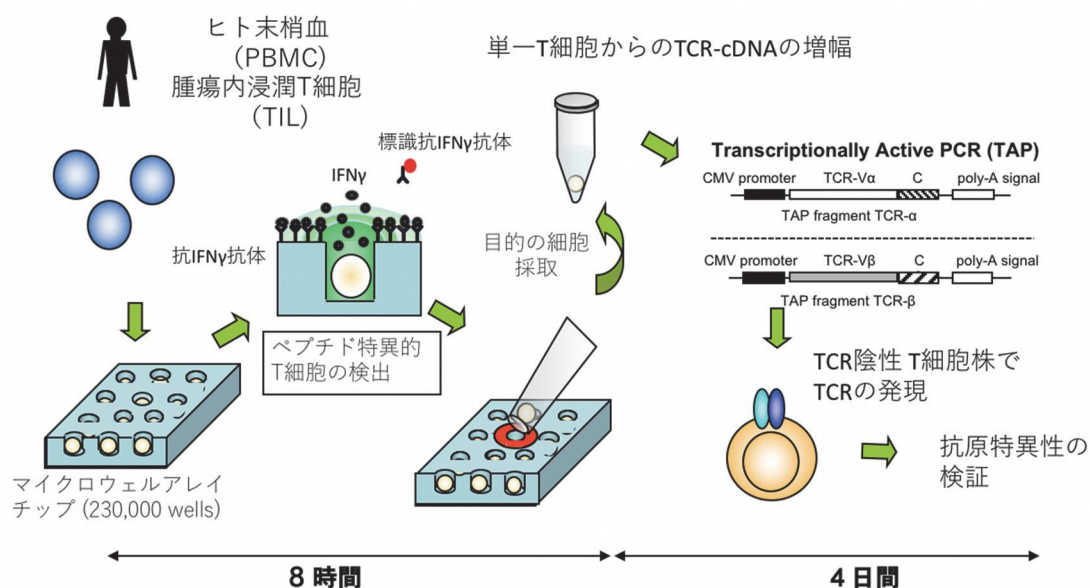


図 1 : T 細胞 ISAAC の概略図

ヒトの末梢血リンパ球 (PBMC) や腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) をマイクロウェルアレイチップに播種し、サイトカイン産生を指標に抗原特異的 T 細胞を同定し、その T 細胞 1 個 1 個から TCR 遺伝子を増幅し、TCR 陰性細胞株に発現させ、抗原特異性を検証する。この工程を 4 日以内に行うことができる。

〈方法と結果〉

1) 最適刺激時間の検討

マイクロウェルアレイチップに播種した細胞をペプチドで刺激し、サイトカインを産生させる時間は、これまで 6 時間を用いてきた。より短時間でも効率よく検出できる可能性を検討するため、刺激時間によるサイトカイン産生細胞の検出効率の比較を

おこなった。

マイクロウェルアレイチップの表面に IFN- γ 特異的抗体を加え、4°Cに一晩置いてチップ表面に抗体を結合させた。その後、抗体溶液を除き、余分なタンパク質が非特異的に結合しないように Lipidure を用いてブロッキングを施した。この前処理したチップに、以前の解析により Epstein-Barr virus (EB ウイルス)の BRLF1 特異的 T 細胞を持つことが分かっている健常人ドナーの末梢血リンパ球 (Peripheral blood mononuclear cell: PBMC) から分離した CD8 陽性 T 細胞を播種した。ウェルに入らなかった細胞を洗いさり、取り除いた。これにより、生きた細胞が各ウェルに 1 個ずつ配置される。その後、10 μ g/ml の BRLF1 ペプチドおよび抗 CD28 抗体溶液を加え刺激した。この間に抗原特異的 T 細胞は抗原で刺激され、サイトカインを分泌する。分泌されたサイトカインはウェルからチップの表面へ拡散していき、チップ表面にコートされたサイトカイン特異的抗体にトラップされる。刺激開始後、2、4、8、24 時間にペプチドおよび抗 CD28 抗体を取り除き、洗浄した。その後、チップに結合させた抗体とは異なるエピトープを持つ、ビオチン標識抗 IFN- γ 抗体を結合させた。30 分間の静置後、ビオチン標識 IFN- γ 抗体を取り除き、Cy3 で蛍光標識したストレプトアビジンを結合させた。10 分間の静置後、Cy3 標識ストレプトアビジンを取り除いた。蛍光顕微鏡下でウェルの周囲にできた赤色のスポットを計数し、それぞれの時間における IFN- γ 分泌細胞数を求めた。この結果より、刺激時間を 24 時間まで延長してもサイトカイン産生細胞は増加せず、T 細胞の刺激には 8 時間程度で十分なことが明らかになった。

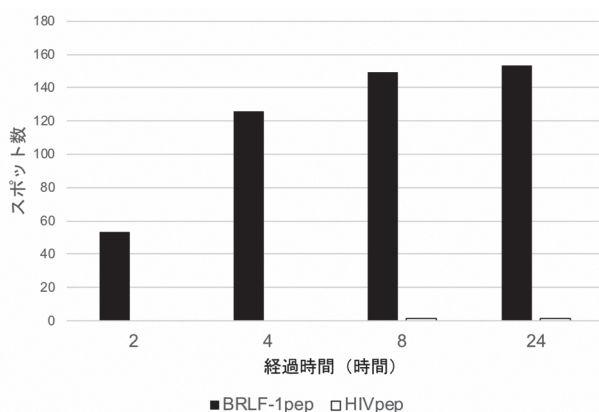


図 2 抗原刺激時間による T 細胞 ISAAC におけるサイトカイン分泌細胞の検出数変化

BRLF1 ペプチド刺激時間の増加に伴ってサイトカイン分泌細胞数が増加しているが、8 時間と 24 時間では大きな差は認められない。また陰性コントロールの HIV ペプチドではいずれもサイトカイン分泌細胞は検出されていない。

2) T 細胞サブセットによる検出効率の検討

これまで T 細胞 ISAAC には Human CD8+T cell isolation ki を用いて健康人末梢血中の CD8 陽性 T 細胞を用いていた。しかしながら、健康人末梢血中にはナイーブ T 細胞に加え、メモリー T 細胞など種々のポピュレーションが存在しており、それぞれ刺激による応答性が異なることが報告されている。特にメモリー T 細胞は抗原刺激により、早期にサイトカイン産生などエフェクター機能を発揮することが知られている。そこで、メモリー T 細胞を用いた場合、より高感度に抗原特異的 T 細胞を検出できるかどうかの検討を行った。

我々の以前の解析結果により HLA-A24 拘束性の BRLF-1 特異的 T 細胞を持つことが分かっている健康人ドナーより PBMC を調整し、Human CD8+Memory T cell isolation kit を用いてネガティブ選択により CD8 陽性メモリー T 細胞を分離した。抗原特異的 T 細胞の割合を、分離する前の PBMC とメモリー CD8 T 細胞を簡易的に比較するため、BRLF1/HLA-A24 テトラマーで染色した。その結果、メモリー T 細胞の分離により、抗原特異的 T 細胞の割合は分離前に比べ 4 倍に増加することが明らかになった。一方、細胞数は 20 分の 1 程度にまで減少していた。この結果より、T 細胞 ISAAC を用いて腫瘍特異的 TCR を取得する際、細胞数が十分にある条件ではメモリー細胞の分離が有効である可能性が考えられた。

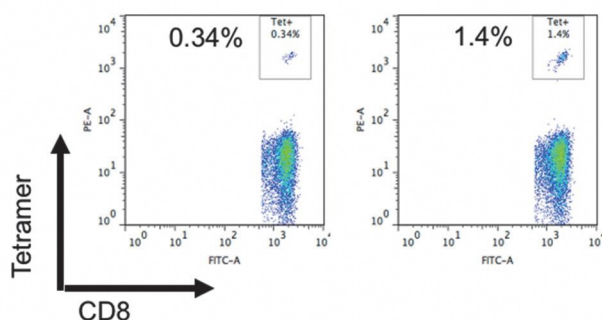


図3 T細胞サブセットによる抗原特異的 T細胞の検出効率の比較

メモリー CD8 陽性 T 細胞に分離することにより抗原特異的 T 細胞が分離前 (左) に比べ、4 倍程度増加している (右)。

3) 回収した抗原特異的 T 細胞から TCR 遺伝子の増幅条件の検討

サイトカインを産生した抗原特異的 T 細胞をマイクロマンピュレーターでチューブに回収し、PCR 反応を行うまで -80°C で保存した。取り出した細胞に逆転写 (Reverse transcription: RT) 反応液を加え、RT 反応を行った。さらに、RT 反応液にプライマー

やポリメラーゼを含む Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応液を加え、PCR 反応を行い TCR 遺伝子を増幅させた。増幅した TCR をアガロースゲル電気泳動により確認した。我々が以前に開発した方法 (Hamana et al. *BBRC* 2016) をベースに、PCR 条件やプライマー配列の検討などを行い最適化した。またマイクロマニピュレーターによる細胞採取を容易に確認するために $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2M$) 特異的プライマーを加え、TCR と $\beta 2M$ が同時に効率よく増える条件の検討を行った。その結果、TCR が効率よく増幅するようになった。また $\beta 2M$ を同時に増幅させることで、細胞回収の確認が容易になった。

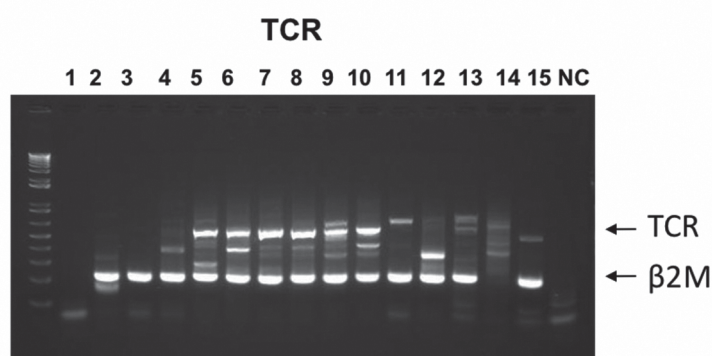


図 4 取得した抗原特異的 T 細胞から増幅した TCR の電気泳動像

PCR 条件の検討により単一細胞から TCR 遺伝子が効率よく増幅するようになった。また、TCR に加え、 $\beta 2M$ も同時に増幅させることにより、マイクロマニピュレーターによる細胞採取の確認が容易になった。

〈考察と今後の展望〉

腫瘍に反応する TCR は低親和性であり、抗原刺激により産生されるサイトカインの検出は非自己抗原に比べ非常に困難になることが予想される。そこで、本年度は 1) 最適刺激時間の検討、2) T 細胞サブセットによる検出効率の検討、3) 回収した抗原特異的 T 細胞から TCR 遺伝子の増幅条件の検討を行うことで、T 細胞 ISAAC 法の高感度化を行った。1) 最適刺激時間の検討では 8 時間と 24 時間刺激で大きな差を認めなかったことから、8 時間程度の刺激で十分であることが確認できた。2) T 細胞サブセットによる検出効率の検討ではメモリーサブセットに分離することにより、検出効率は増加することが示唆されたが、細胞数が大幅に減少することから、メモリーサブセットの分離は細胞数が十分量確保できる場合には有効であると考えられた。3) 取得した T 細胞から TCR 遺伝子の増幅条件の検討では当教室の浜名が開発した one-step RT-PCR (Hamana et al. *BBRC* 2016) をベースにサイクル数や反応液量などの PCR 条件を検討することによ

り増幅効率を上げることができた。特に TCR 用のプライマーに β 2M 用プライマーを加え、同時に増幅させることにより、マイクロマニピュレーターによる細胞の回収が適切に行われたかどうか容易に判断できるようになった。

今年度検討した条件をもとに、今後はモデル抗原を用いて T 細胞 ISAAC の最適化の検討を行う。更に、検討した結果をもとに高感度化した T 細胞 ISAAC を用いて腫瘍特異的 TCR の取得を試みる。

これらの成果により、ペプチドのみで腫瘍特異的 TCR の効率的な取得が可能になれば、現在特定の HLA および腫瘍抗原の組み合わせに限定されている TCR-T 療法の適応拡大につながり、その意義は大きいと期待される。

II-4 TCR 用抗体の取得法の開発

学術研究部医学系 准教授 小澤 龍彦

〈目的〉

近年 TCR に代わり、TCR と同様にペプチド/MHC を特異的に認識する TCR 様抗体を用いて、キメラ抗原受容体 T 細胞(CAR-T)や二重特異性抗体(BiTE)などに改変し、がん免疫療法へ応用する研究が注目されている。TCR 様抗体は、がん細胞に対して高い特異性を持つため、副作用の低いがん免疫療法の提供が期待される。しかし TCR 様抗体は、様々な技術が発達した現在においてもその取得が極めて難しく、TCR 様抗体を用いたがん免疫療法への応用は未だ限定的である。

我々は、これまでに抗原特異的なリンパ球を単一細胞レベルで同定・回収できる、リンパ球が丁度 1 個入る大きさのウェルが 6 万個以上並んだリンパ球チップを世界で初めて開発してきた。それを用いて、抗原特異的抗体を分泌する B 細胞を網羅的にスクリーニングし、抗原特異的抗体遺伝子を 1 週間程度でクローニングできる画期的なシステム「ISAAC 法」を開発し、これまでに取得が困難な抗体を数多く取得してきた。さらに、ISAAC 法にブロック法を併用することで、エピトープの微細な構造の差異を識別する低頻度の抗体産生細胞を、容易にスクリーニングできる

ことを実証した。

そこで我々は、ブロッキング法を併用した ISAAC 法を用いてがん抗原由来ペプチド MHC を認識する TCR 様抗体を取得し、該当のがんペプチド MHC を発現する腫瘍が傷害できる CAR-T や BiTE の作製を目指した。

〈方法〉

ペプチド/MHC の作製

抗原であるペプチド/MHC は、我々が考案した Single chain trier (SCT) の構造として作製した。AFP 抗原ペプチド、 $\beta 2$ ミクログロブリン、MHC の α 鎖を一本鎖で繋ぎ、続いて部位特異的にビオチンを付加させるための AviTag、精製に用いるための HisTag を融合させた遺伝子断片 (以下、AFP-SCT) を、pcDNA3.4 ベクターにクローニングした。こ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 Expi293FTM 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、HisTag 精製用のバッファー対して透析した。透析後、Ni-NTA カラムを用いてビオチン化 AFP-SCT を精製した。

また、BirA とビオチン非存在下で AFP-SCT を産生させ、ビオチン化されていない AFP-SCT を精製した。

AFP-SCT 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 AFP-SCT を 1:4 のモル比で混合し、PE 標識 AFP-SCT テトラマーを作製した。

マウスの T 細胞株である TG40 細胞に、レトロウイルスを用いて AFP ペプチド/MHC を認識する TCR、1-14 を発現させた (1-14/TG40)。この 1-14/TG40 に、PE 標識 AFP-SCT を反応させ、フローサイトメーターを用いて AFP-SCT の特異性を検証した。

ウサギへの免疫

ウサギを用いた実験は、富山大学動物実験委員会に動物実験の申請を行い、承認されている (承認番号: 第 A2018MED-2 号)。

初回免疫は、500 μ g のビオチン化されていない AFP-SCT をフロイントの完全アジュバンドと混合して、抗原のカクテルを作製し、ウサギ (ニュージーランドホワイト種、12 週齢、メス) に免疫した。追加免疫は 500 μ g のビオチン化されていない AFP-SCT を

フロイントの不完全アジュバンドと混合して、抗原のカクテルを作製し、2週間間隔でウサギに免疫した。計4回免疫を行い、最終免疫後7日目に血漿を回収した。併せて末梢血や脾臓、骨髄などのリンパ組織を取り出し、リンパ球に分離した。

〈結果及び今後の予定〉

がん抗原は、肝臓がんなどで高発現している α フェトプロテイン(AFP)を対象とした。AFPペプチド/MHCは、我々が考案したSingle chain trier (SCT)の構造として作製した。SCTは、抗原ペプチド、 β 2ミクログロブリン、MHCの α 鎖を一本鎖で繋いだ構造であり、さらには、従来大腸菌で作製した場合に必要なリフォールディングの工程を必要としない方法である。この方法を用いることで、2週間程度でペプチドMHCを容易かつ廉価に作製することができる。本方法を用いて、AFP-SCTを3mg以上作製した。

作製したAFP-SCTが機能的であるかを検証するため、AFPペプチド/MHCを認識するTCR(1-14)を発現させたマウスT細胞株(TG40)に、PE標識AFP-SCTテトラマーを反応させた。フローサイトメーターの結果より、AFP-SCTは、1-14/TG40に特異的に結合することが認められた(図1)。

次に、AFP-SCTをウサギに免疫した。免疫終了後、血漿を回収した。併せて末梢血、脾臓、骨髄よりそれぞれリンパ球を分離した。現在、得られた血漿を用いて、AFP-SCT特異的抗体が誘導されているかの確認を行っている。その後、ブロッキング法を併用したISAAC法により、AFPペプチド/MHC特異的抗体の取得を行う予定である。

