

I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・ T細胞医薬創出のための基盤技術の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 教授 村口 篤

【背景・目的】

がんの治療法として、外科的手術、放射線治療、抗ガン剤治療などが一般的である。しかし、これらの治療に効果がみられない場合、免疫システムを用いた治療（ペプチドワクチン療法、抗体医薬、免疫細胞療法など）が試みられている。免疫システムは個々の患者により異なること、さらに、がんの性質も個々の患者で様々であることから、免疫学的治療は個々の患者に応じた治療、すなわち、テーラーメイド医療として行われることが望ましい。しかし、従来、がん患者のリンパ球を使って、がんの特異的な抗体やTリンパ球を取得するためには、2~3ヶ月を要していたことから、せっかくがんの特異的な抗体やTCRが取得できても、がんが進行してしまうため、元の患者の治療に応用することは困難であった。

我々は、近年、ヒトのBリンパ球から抗原特異的ヒト抗体を1週間弱で取得するシステム（ISAAC法）を開発し（図1）（Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012）、また、最近、抗原特異的T細胞受容体（TCR）を最短10日以内に検出・取得するシステム（hTEC10法）を開発した（図2）（Kobayashi E et al, 2013; Kobayashi E et al, 2014）。それぞれの技術は、世界的に権威のある科学雑誌Nature Medicine に発表し、大きな反響を生んだ。本研究では、これらの技術の事業への応用を視野に入れながら、これらの技術をさらに最適化することにより、個々の患者に最適な抗体医薬やTCR遺伝子を短期間で、しかも確実に取得・提供できるシステムを作り出すことを目的とする。

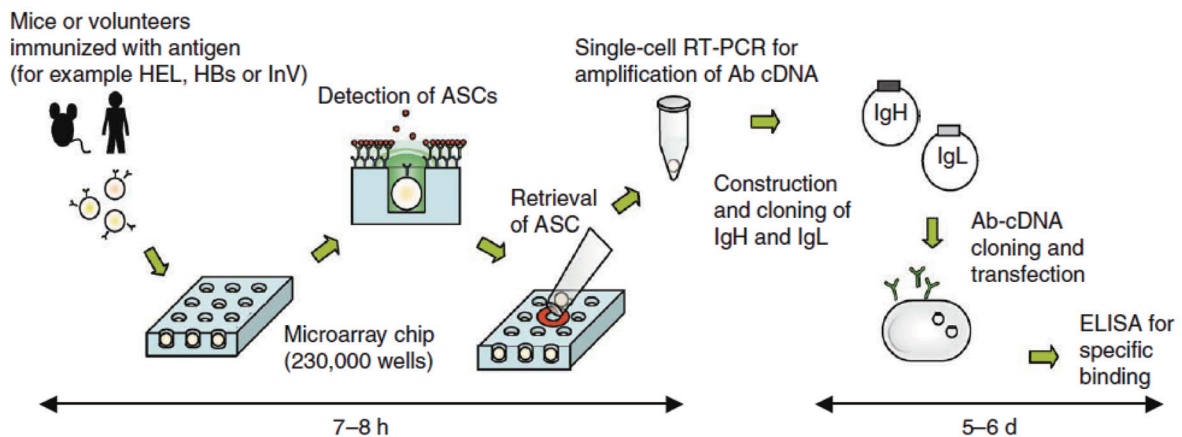


図1 ISAAC法（Jin A et al, Nature Medicine, 2009より転載）

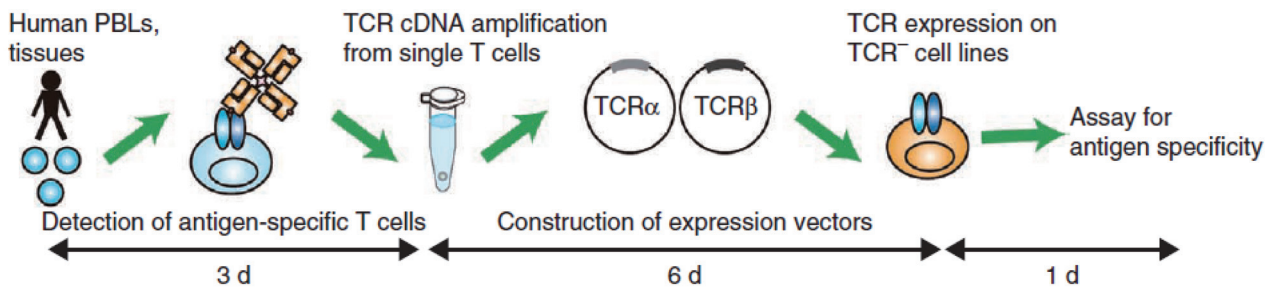


図2 hTEC10法 (Kobayashi E et al, Nature Medicine, 2013より転載)

【各班の概要】

村口は、TCR トランスジェニックマウスのT細胞を用いて、細胞チップ上で抗原ペプチドに特異的なT細胞を検出できること、すなわちT細胞ISAAC法が実質的に機能することを示した。

小林、浜名は、hTEC10法では、従来ペプチドを用いて抗原ペプチド特異的TCRを取得していたが、それを応用し、内在的に抗原が発現している抗原提示細胞に反応し、活性化されたT細胞から、抗原特異的TCRを取得できる可能性を示した。

岸は、抗原が未知のTCRの抗原を同定するためのレポータ細胞を構築し、モデルシステムでレポータ細胞が機能することを示した。

小澤は、ウサギISAACシステムを用いて、がんの増殖に関与するErbB2、特にリン酸化されたErbB2分子に対する抗体を作製するために、ウサギを免疫し、リン酸化ErbB2分子に対する抗体がウサギ血清中に産生されていることを確認した。

【結論】

以上、各研究班は計画に沿ってほぼ順調に成果を挙げている。本課題を進めていくことで、がん患者のリンパ球より、がん治療のためのTCR遺伝子を迅速・確実に取得・作製することができるようになり、がん治療用の抗体医薬の作製も進展すると期待される。これらの医療材料を元の患者の治療に応用することができるようになれば、がんの免疫学的テーラーメイド治療も可能になると期待される。

I - 1 T細胞 ISAAC の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 教授 村口 篤

【研究目的】

我々が最近開発した、hTEC10法は、フローサイトメータを用いて、ペプチド刺激に反応してサイトカインを産生するTリンパ球を検出することにより、抗原ペプチド特異的Tリンパ球を検出することができる (Kobayashi E et al, 2013)。しかし、その感度は高くなく、頻度の低いウイルス等の抗原に特異的なTリンパ球はバックグラウンドノイズの中に埋もれてしまい、ヒト末梢血リンパ球中において、抗原特異的Tリンパ球を直接検出することは困難であった。そのため、抗原ペプチド特異的Tリンパ球を検出するためには、2週間程度リンパ球をウイルス等の抗原で刺激しながら培養し、抗原特異的Tリンパ球を増殖させてから、検出する必要があった。我々は、最近、予備的検討にて、Bリンパ球に応用していたISAAC法 (Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012) で用いた細胞チップをT細胞に応用すると、*in vitro*での培養を必要とせずに、ヒトより調製した末梢血Tリンパ球から直接ウイルス等の抗原に特異的なT細胞を検出できることを示唆するデータを得ている。今後、細胞チップを用いて抗原特異的T細胞を検出する方法をT細胞ISAAC法と呼ぶこととする。本研究では、hTEC10法とT細胞ISAAC法の良い点を組み合わせて、より感度の高い、抗原特異的Tリンパ球の検出する方法を確立することを目的とする。今年度は、抗原が既知のTCRトランスジェニックマウスのT細胞を用いて、T細胞ISAAC法を確立することを目的に研究を行った。

【方法】

1) 細胞チップ

図3に示すように、ちょうどリンパ球が1個入る大きさ・形状の微小ウェルが規則正しく約4.5万个から23万個、1×2 cm 四方の範囲に配置されたチップ (マイクロウェルアレイチップ) を用いた。

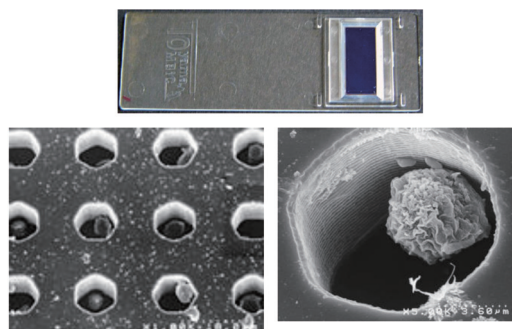


図3 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。(下左) マイクロウェルが規則正しく配置されている電子顕微鏡像。(下右) 1個のリンパ球がマイクロウェルに入っている電子顕微鏡像。

2) T細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス

本年度は、T細胞 ISAAC に用いる細胞として、ほとんどの T細胞が、特定の抗原に特異的な 1種類 の TCR を発現している TCR トランスジェニックマウスのリンパ球を用いた。すなわち、雄特異的タンパク質由来ペプチドが H-2D^b 分子の上に結合している複合体を認識する TCR を発現している H-Y TCR トランスジェニックマウスと、卵白アルブミン由来ペプチドが H-2K^b 分子の上に結合している複合体を認識する OT-1 TCR トランスジェニックマウスである。

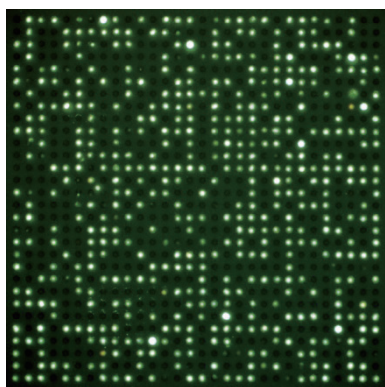
3) T細胞-ISAAC

細胞チップの表面に、サイトカイン特異的抗体 (IL-2 特異的抗体, IFN- γ 特異的抗体等) をコートし、その後、余分なタンパク質が非特異的に結合しないようにブロッキングを施した。このように前処理した細胞チップに生きた TCR トランスジェニックマウス由来 CD8 陽性 T細胞を播種し、ウェルに入らなかった余分な細胞を洗い去った。これにより、生きた T細胞が各ウェルに 1個ずつ配置される。その後、チップ上に抗原であるペプチドを加え、約 6 時間培養した。この 6 時間の間に T細胞が抗原で刺激され、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。次に、蛍光標識された別のサイトカイン特異的抗体を加え、チップ表面にトラップされているサイトカインに結合させる。その蛍光標識サイトカイン特異的抗体の結合を蛍光顕微鏡で観察する。

【結果】

1) 1個のウェルへの単一細胞の導入

図 4 は、T細胞をチップに播種し、ウェルに入らなかった細胞を洗浄により洗い去った後、ウェルに残った細胞を、生細胞内で蛍光を発するオレゴングリーンを用いて蛍光標識し、それを蛍光顕微鏡



を用いて観察したものである。図中の白っぽく光っている丸い点の 1つ1つが 1個の細胞を示している。この図のように、マイクロウェルアレイチップを用いると、生きた T細胞を 1個 1個分離された状態でチップ上に配置できることが示された。

図 4 マイクロウェルアレイチップ上への生きた Tリンパ球の配置

2) T細胞 ISAAC 法による抗原特異的 T細胞の検出

まず、OT-1 TCR トランスジェニックマウスの CD8 陽性 T細胞を図 4 のようにチップ上に播種した。次にチップ上の細胞に OT-1 ペプチドを添加し、約 6 時間培養後、抗原特異的にサイトカインの分泌が誘導されるかどうかを検討した。その結果、図 5 に示されているように、抗原刺激によりサ

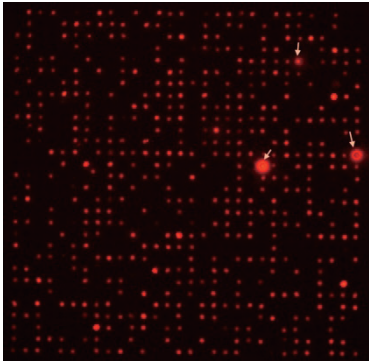
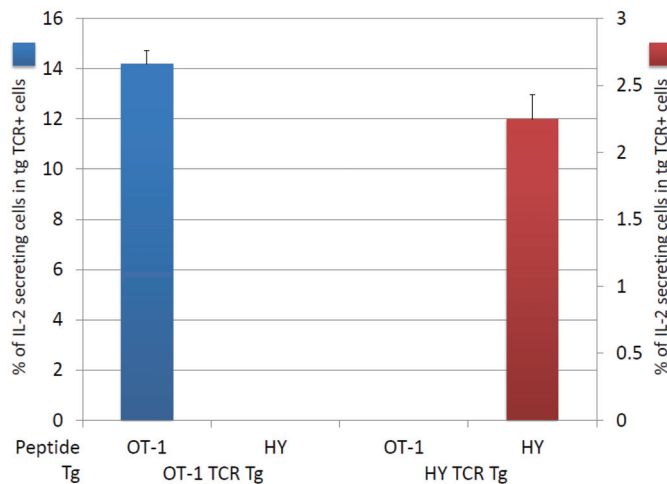


図5 T細胞ISAAC法によるT細胞からの抗原特異的サイトカイン分泌の検出

イトカインの分泌が観察された。図で小さいオレンジ色の点はウェルに配置された細胞を示している。白い矢印で示されている細胞の周囲に広がっているスポットが1個の細胞から分泌されたサイトカインを蛍光標識サイトカイン特異的抗体で検出した像である。抗原ペプチドを加えない場合には、このようなスポットは全く観察されなかった。また、抗原ではないH-Yペプチドを添加した場合もスポットは全く観察されなかった。

次に、H-Y TCR トランスジェニックマウスの CD8 陽性 T 細胞を同様に細胞チップに播種し、H-Y ペプチドと OT-1 ペプチドを用いて刺激し、サイトカインの分泌を細胞チップ上で観察した。その結果、図6に示すように、H-Y TCR トランスジェニックマウスの T 細胞は H-Y ペプチド刺激によりサイトカインを分泌したが、OT-1 ペプチドではサイトカインの分泌が全く観察されなかった。



果、図6に示すように、H-Y TCR トランスジェニックマウスの T 細胞は H-Y ペプチド刺激によりサイトカインを分泌したが、OT-1 ペプチドではサイトカインの分泌が全く観察されなかった。

図6 T細胞ISAAC法による抗原特異的サイトカイン分泌細胞の検出

【考察・結論・今後の展望】

TCR トランスジェニックマウスの T 細胞を用いた解析より、抗原に特異的に反応し、サイトカインを分泌する細胞を、T 細胞 ISAAC 法を用いて検出できることがわかった。フローサイトメータを用いたサイトカイン分泌細胞の検出では、バックグラウンドノイズが観察され、抗原ペプチドに反応する細胞の頻度が低い場合、特異的なシグナルがバックグラウンドノイズに埋もれてしまう。そのため、生体から単離したリンパ球を直接用いた解析では、抗原特異的T細胞が検出できず、抗原特異的T細胞を2週間ほど抗原ペプチドで刺激し、増殖させる必要があった。今回の T 細胞 ISAAC 法による解析では、抗原非特異的なスポットは全く観察されなかったことから、フローサイトメータによる解析に比べて、T 細胞 ISAAC のバックグラウンドノイズはほとんど0に近く、存在頻度の低い抗原特異的 T 細胞も検出できる可能性がある。今後は、ヒトの T 細胞を用いて、抗原特異的T細胞が検出されるか、検証していく。

I - 2 がん特異的T細胞検出システムの改良

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 助教 小林 栄 治 (浜名 洋)

【研究目的】

我々が、最近 Nature Medicine に報告した hTEC10 法は、既知の抗原ペプチドに反応する T 細胞を同定し、その TCR を取得する方法である (Kobayashi E et al, 2013)。T 細胞の抗原ペプチドは、抗原提示細胞上に発現している HLA 分子の上に結合して、細胞表面に提示される。現在の研究・臨床試験の主流は、既知の抗原ペプチド特異的T細胞を用いたがん免疫療法が主体である。

HLA 分子は多型性に富んだ分子であり、各個人により、そのアミノ酸配列 (ハプロタイプ) が異なる。特に、ペプチドが結合する部分および TCR と相互作用する部分のアミノ酸配列が異なる。その結果、ハプロタイプが異なると、HLA 分子上に結合するペプチドも異なってくる。HLA のハプロタイプは民族によっても偏りがある。その結果、日本なら日本、欧米なら欧米で多いハプロタイプに研究が偏る傾向がみられる。すなわち、日本では、HLA-A24 分子に結合するペプチドおよびそれに反応する T 細胞の解析が主であり、欧米では、HLA-A2 分子に結合するペプチドおよびそれに反応する T 細胞の解析が主である。従って、がんの免疫療法においても、HLA-A24 あるいは HLA-A2 以外のハプロタイプを持つ患者はがん免疫療法の恩恵に与ることができない。

一方で、現在、がん抗原ペプチドが特定されていないがんが多数存在し、そのようながんに反応する TCR を取得し、治療に応用したいという高いニーズがある。本研究では、hTEC10 法を改良し、抗原が未知のがんに反応する TCR を取得できるシステムを構築することを目的とする。今年度は、EB ウイルス由来タンパク質を内在的に発現している抗原提示細胞を用いて、EB ウイルス特異的 T 細胞が検出でき、その TCR を取得できるかどうかを検証した。

【方法】

1) 人工的抗原提示細胞の作製

ヒト赤芽球系細胞株である K562 細胞は細胞表面に HLA 分子を発現していない。この細胞に HLA-A24 分子および共刺激分子のリガンドである CD80 分子、4-1BB リガンド分子を発現させた細胞を人工的抗原提示細胞 (artificial antigen presenting cells, aAPC) として作製した。この aAPC に EB ウイルスの抗原の一つである BRLF1 cDNA を遺伝子導入し、BRLF1 タンパク質を内在的に発現する細胞を作製した。

2) 抗原提示細胞に反応する T 細胞の検出

ヒト末梢血リンパ球を分離し、BRLF1 を発現している aAPC, あるいは BRLF1 を発現していない aAPC を用いて刺激し、活性化マーカーである CD137 の発現を指標に、活性化 T 細胞を検出した。検出した活性化 T 細胞は、セルソータにより、96 ウェルの PCR 用プレートに、各ウェルに細胞が 1 個ずつ入るようにソートした。ソートした各細胞より TCR α 鎖および β 鎖の cDNA を RT-PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析し、そのアミノ酸配列を比較した。

【結果】

1) aAPC による末梢血リンパ球 (PBL) の短時間刺激

インフォームド・コンセントを受けたボランティアより提供された PBL を、BRLF1 が内在的に発現している aAPC, あるいは、BRLF1 が発現していないコントロール aAPC と一晩共培養した。翌日、CD137 分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。コントロール aAPC と共培養した PBL で CD137 分子を発現している細胞が多数観察された。しかし、BRLF1 が発現している aAPC で刺激した方が CD137 分子の発現が高かったため、CD137 分子を高発現している CD8 陽性 T 細胞を単一細胞ソートした。

ソートした T 細胞より TCR cDNA を増幅し、TCR のアミノ酸配列を解析した。今回解析に用いたボランティアの T 細胞は、これまでの EB ウイルス由来ペプチド/HLA-A24 複合体四量体 (テトラマー) を用いた解析より、BRLF1 特異的な TCR はただ 1 種類の TCR が検出されることを確認している。増幅した TCR のアミノ酸配列を比較したところ、BRLF1 ペプチド/HLA-A24 複合体テトラマーにより得られた TCR のアミノ酸配列と同一の TCR も一部得られたが、ほとんどは異なる TCR であった。一晩という短時間の刺激では、抗原特異的 T 細胞は検出されるものの非常に効率が悪く、実用には耐えられないレベルであることが明らかになった。

2) aAPC による PBL の長期間刺激

そこで、BRLF1 を発現した aAPC と PBL とを 2 週間共培養し、さらに一晩 BRLF1 を発現した aAPC, 及びコントロール aAPC で再刺激を行った。CD137 分子の発現をセルソータにて解析し、それを指標に細胞を単一細胞ソートした。今回も、コントロール aAPC で刺激した細胞群においても CD137 分子の発現が多数観察され、バックグラウンドノイズが高かった。しかし、BRLF1 が発現した aAPC で刺激した細胞において、CD137 が高発現している T 細胞が観察されたため、CD137 高発現細胞を単一細胞ソートし、TCR cDNA を RT-PCR 法により増幅した。増幅した TCR cDNA の塩基配列を解析し、取得した TCR のアミノ酸配列を比較した。今回は、取得した TCR の 85% (図 7 青く塗りつぶさ

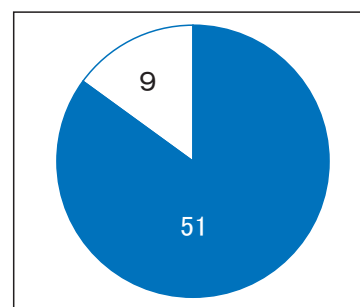


図 7 TCR レパートリー

れた部分)が、BRLF1 ペプチド/HLA-A24 複合体テトラマーを用いて解析した時に得られた TCR と同じアミノ酸配列を有する TCR であった。

【考察・結論・今後の展望】

内在的に抗原を発現している抗原提示細胞とヒト末梢血リンパ球を、2 週間共培養することで、内在性抗原に反応する T 細胞の TCR を取得することができた。今回、コントロール aAPC の刺激でも CD137 を発現する細胞が多数確認された。これは、目的の抗原ではなく、aAPC に元から発現している抗原により活性化された T 細胞によるものと思われる。このことは、BRLF1 発現 aAPC で刺激して取得した TCR の中に、コントロール aAPC で刺激してソートしてきた T 細胞の TCR と同じアミノ酸配列のものが存在したという結果からも裏付けられる。

バックグランドノイズが高いと、存在頻度の低い抗原特異的 T 細胞の検出が難しくなるため、バックグランドノイズをいかに軽減するかが課題の一つである。

今回は、1 人のボランティアの末梢血リンパ球を用いて実験を行ったが、今後は、他のボランティアの末梢血リンパ球でも同じ結果が得られるか、再現性をチェックしていく。

I - 3 T細胞抗原探索システムの開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸

【研究目的】

がんの免疫学的治療において、新規がん抗原の同定が喫緊の課題である。いかに良い標的を選択するかが、がんの免疫学的治療の成否を握っているからである。現在、用いられている T 細胞の抗原の同定法は非常に複雑な方法で、その時々で、トライアンドエラーで、最適な方法を探しながら行う必要がある。我々は、非常にシンプルで確実に機能する「T 細胞抗原探索システム」を開発する。この新規システムの開発により、がん抗原をシンプルに再現性良く同定できれば、新たながんワクチンの開発やがんのテーラーメイド医療にも貢献できる。

今年度は、モデルシステムとして、EB ウイルス由来ペプチドに反応する T 細胞受容体を用い、抗原ペプチドにより活性化された細胞を同定できるリポーター細胞を作製する。

【方法と結果】

図 8 に示すように、HLA-A24 cDNA の細胞質部分を CD3ζ鎖の細胞質部分と置換した、HLA-A24/ζキメラ遺伝子を作製し、TG40 細胞に遺伝子移入した。

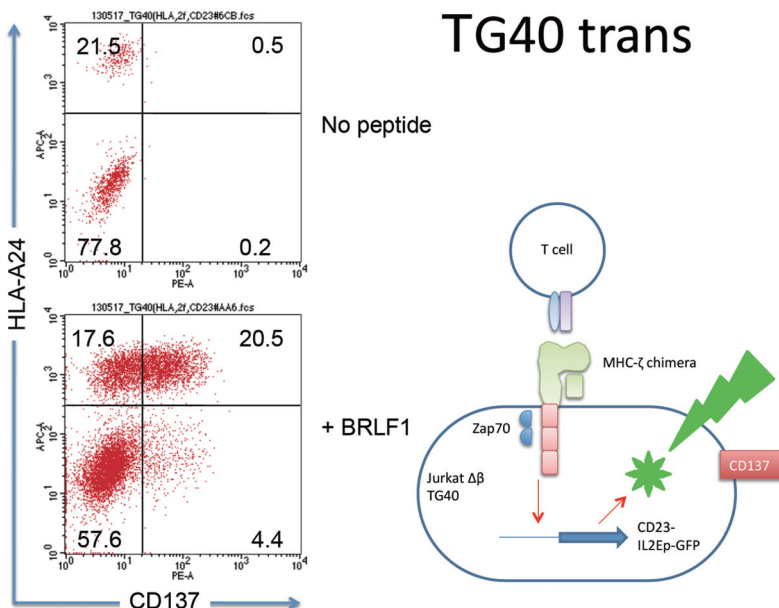


図 8 抗原特異的 T 細胞によるリポーター細胞の活性化

次に、作製したリポーター細胞と EB ウイルス由来 BRLF1 ペプチド/HLA-A24 分子複合体に特異的な TCR を発現させた TG40 細胞を、BRLF1 ペプチドの非存在下・存在下で一晩培養し、活性化マーカー CD137 の発現を解析した。

その結果、図 8 に示すように、抗原ペプチドの存在下において、CD137 の発現が特異的に増強することが確認された。

【考察】

TCR を発現した TG40 細胞，リポーター細胞，抗原ペプチドの共存下で CD137 の発現が増強したことから，リポーター細胞の HLA-A24 分子に抗原ペプチドが結合し，それに TG40 細胞表面の TCR が結合して HLA-A24/ζ キメラ分子を架橋することで，ζ の細胞質部分より細胞内にシグナルが伝達され，CD137 分子の発現が増強されたものと考えられる。

また，図 8 において，HLA-A24 陰性の TCR を発現した TG40 細胞においても CD137 の発現増強が観察された。これは，リポーター細胞の HLA-A24 分子に抗原ペプチドが結合したものを，TCR を発現した TG40 が認識し，活性化されたものと考えられる。

【結論・今後の展望】

今後，ペプチド発現ライブラリーを構築し，作製したリポーター細胞と抗原特異的 TCR 発現細胞とを用いることにより，TCR の抗原ペプチドが同定されると期待される。

本研究により，シンプルで信頼性の高い抗原探索システムを作製することができれば，新規がん抗原を同定し，より効果の高いがんワクチンを製造することが可能になる。さらに，個々の患者におけるがん抗原を同定することにより，がんのテーラーメイド医療にも貢献すると期待される。

I - 4 ウサギ ISAAC を用いた抗体開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 助教 小澤 龍彦

【研究目的】

ウサギの抗体はマウスなどの抗体に較べて、抗原に非常に特異的かつ強力に結合することが知られている。がんの治療においても、がんの特異的に、かつ強力に結合する抗体の開発が必要とされている。我々は、最近、細胞チップを用いて、ウサギ由来モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に取得する「ウサギ ISAAC 法」を開発した (Ozawa T et al, 2012)。本研究では、「ウサギ ISAAC 法」を用いて、がん抗原に対するウサギモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてがん細胞の傷害や検出法などに応用可能か検証する。

チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、ErbB2 の活性調節機構の解明は、分子標的薬に対する感受性や耐性獲得などに関する重要な知見となる。中でも677番目のスレオニン残基 (ErbB2-Thr677) のリン酸化は、ErbB2 シグナルの下流の ERK 活性に関与している可能性が示唆されており、この ErbB2-Thr677 のリン酸化を測定することは、ErbB2 活性評価に繋がる。

そこで今回我々は、ErbB2-Thr677 のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いた乳がん患者の組織染色などからがん細胞分子標的薬に対する感受性や悪性化の予測プロトコルの確立を目指す。

【方法】

1) ウサギの免疫

ウサギ (ニュージーランドホワイト種) への免疫及びリンパ球の回収は、承認された動物実験計画に従って行った。ErbB2 由来リン酸化ペプチド (p-ErbB2pep) を免疫したウサギよりリンパ球を回収した。初回は完全フロイントアジュバンドと混合した 500 μ g のペプチドを免疫した。その後、2週間間隔で3回、不完全フロイントアジュバンドと混合した 500 μ g のペプチドを免疫し、経時的に採血を行い、血漿を回収した。4回目の免疫の1週後に末梢血リンパ球、脾臓細胞、骨髓細胞を採取し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

2) 抗体価の測定

抗体価の測定するために、10 μ g/ml の p-ErbB2pep もしくは10 μ g/ml のリン酸化されていないErbB2-pep を96ウェルプレートに4 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、固相化を行った。固相化後、3%ウシ血清アルブミンを含むPBSで1時間ブロッキングした後、免疫前、免疫開始後3週目、5週目の血漿を希釈して1時間インキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ヒトIgG-Fc 特異的抗体を1時間インキュベートし、再度洗浄した後にアルカリホスファターゼの基質を反応させ、発色後にプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度を測定した。

【結果及び考察】

3週目及び5週目の血清を用いた場合、発色が認められたことから、血漿中に抗 p-ErbB2-pep 抗体が誘導されていることが示唆された(図9)。

また3週目よりも5週目の血漿の抗体価が高いことから、ペプチドで免疫することで特異的に抗体が誘導されたと考えられる。

リン酸化されていないErbB2-pep に対する抗体価も上昇しているが、

ErbB2-pep に対する抗体価よりも、p-ErbB2-pep に対する抗体価の方が高いことから、リン酸化部位特異的な p-ErbB2-pep に対する抗体が誘導されていることが示唆された。



図9 血漿中の p-ErbB2-pep 抗体価

【結論・今後の展望】

p-ErbB2-pep を免疫することで、目的とするリン酸化部位特異的 p-ErbB2 抗体を誘導できた。今後ウサギ ISAAC 法を用いて、抗 p-ErbB2-pep モノクローナル抗体の取得を行い、得られた後にその抗体の評価を行う。

【参考文献】

- 1 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., *Kishi H. and Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nature Medicine*, 15:1088-1092, 2009.
- 2 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kishi H., Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-

- secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nature Protocol* 6:668-676, 2011.
- 3 Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Muraguchi A. Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Methods Mol Biol.* 853:141-150, 2012.
 - 4 Ozawa T., Piao X., Kobayashi E., Zhou Y., Sakurai H., Andoh T., Jin A., Kishi H., Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. *PLoS One.* 7:e52383, 2012.
 - 5 Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*, 19:1542-1546, 2013.
 - 6 Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology.* 3:e27258, 2014.