

## II. キメラ抗原受容体 (CAR) -T 細胞療法および T 細胞受容体 (TCR) -T 細胞療法に資する新規抗体・TCR 開発のための基盤技術の開発

|          |     |   |   |   |   |
|----------|-----|---|---|---|---|
| 学術研究部医学系 | 教授  | 岸 | 裕 | 幸 |   |
| 学術研究部医学系 | 助教  | 浜 | 名 | 洋 |   |
| 学術研究部医学系 | 助教  | 小 | 林 | 栄 | 治 |
| 学術研究部医学系 | 准教授 | 小 | 澤 | 龍 | 彦 |

### 【研究概要】

近年、京都大学の本庶佑教授は PD-1 分子を発見し、それが免疫細胞の抑制に関与することを見出した。腫瘍の組織中には免疫細胞が多数浸潤しており、腫瘍細胞を攻撃することで腫瘍の増殖を抑制している。一方、腫瘍は PD-1 のリガンドである PD-L1 分子を発現し、腫瘍に浸潤している免疫細胞の細胞膜上の PD-1 と相互作用させることにより免疫細胞の機能を抑制する。その結果、免疫細胞による腫瘍細胞の傷害が抑制され、腫瘍細胞が増殖するに至る。本庶佑教授は PD-1 に対する抗体を作製し、抗体によって PD-1 分子と PD-L1 分子との相互作用をブロックすることにより、腫瘍内の免疫細胞の抑制状態が解除され、免疫細胞が活性化されること、その結果、腫瘍細胞が攻撃され、腫瘍が退縮することを示し、その臨床応用により 2018 年ノーベル医学生理学賞を受賞した。これにより、がん免疫を用いた腫瘍の治療法の開発に注目が集まっている。しかし、PD-1 抗体を用いた治療（免疫チェックポイント阻害療法）は、がん患者の 2 割から 3 割にしか効果がなく、それを補完するような治療法が望まれている。その意味で、キメラ抗原受容体 (CAR) や腫瘍特異的 T 細胞受容体 (TCR) を T 細胞に発現させ、腫瘍の治療に応用する CAR-T 細胞療法や TCR-T 細胞療法の開発に期待が集まっている。機能の高い CAR-T 細胞や TCR-T 細胞を開発するためには、機能の高い腫瘍特異的 CAR や TCR を取得することが重要である。一方で、TCR の代わりにがん細胞のがん抗原（ペプチド）と MHC クラス I の複合体 (p/MHC) に特異的に結合する抗体 (TCR 様抗体) を用いた、新しい治療法が次世代のがん免疫療法として期待されている。さらに近年、ペプチド/MHC を標的とする TCR 様抗体を用いた CAR-T 細胞療法への応用が注目されており、その研究が進んでいる。

我々は、これまでに、ヒトの B リンパ球から 1 週間弱で抗原特異的ヒト抗体を取得す

るシステム（ISAAC 法）を開発し、また、抗原特異的 TCR を 10 日以内に取得するシステム（hTEC10 法）を開発してきた。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（Jin A, *Nature Medicine*, 2009; Kobayashi E, *Nature Medicine*, 2013）。本研究では、これらの単一リンパ球解析法を発展させ、腫瘍の治療に最適な高機能の TCR 様抗体および TCR を作製するためのシステムを作り出すことを目的とする。本研究により高機能の TCR 様抗体および TCR が取得できれば、TCR 様抗体による CAR-T 細胞および TCR-T 細胞を作製することにより、多くのがん患者ががん免疫療法の恩恵を被ることができると期待される。

## 【各研究者のまとめ】

### TCR の抗原同定法の開発

岸は、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を行った。令和 4 年度は EB ウイルスの BRLF1 由来ペプチドが HLA-A24 分子に提示されたものを認識する TCR を用いた、該当の抗原ペプチドを発現する酵母をスクリーニングできるかを検証した。4 回濃縮を行った結果、抗原ペプチド（TYPVLEEMF）とよく似た、VYPVLEEQF および EYPVLEELF の 2 つのペプチドを発現した酵母が濃縮された。濃縮された両ペプチドが結合した HLA-A24 分子を発現させた哺乳類細胞株は、目的の可溶化 TCR と結合することが確認された。以上、酵母の系を用いて、ランダムライブラリーから目的 TCR に結合するペプチドをスクリーニングできることが示された。今回開発した方法により TCR 遺伝子療法の副作用が予測でき、副作用が起こりにくい治療に適した TCR を選択でき、ペプチドワクチンの開発等、今後富山県の製薬業界の発展に貢献できると期待される。

### ネオ抗原特異的 TCR の同定法の開発

腫瘍細胞は患者の臓器の細胞の一部ががん化したものであり、免疫にとって自己であるため、免疫応答は起こりにくい。しかし、腫瘍細胞の遺伝子が突然変異を起こすことで生じたネオ抗原は免疫学的に非自己であるため、免疫細胞のよい標的となりう

る。浜名は、ネオ抗原特異的 TCR を効率よく同定する方法の開発を進めた。従来 TCR を T 細胞に発現させるためには、その発現ベクターを作製する必要があるが、その作製に時間がかかるため、数多くの TCR の機能を解析することができなかった。浜名は、発現ベクターを作製せずに、PCR で増幅した遺伝子断片(TAP fragment)を使って簡便に TCR を発現させるために、TAP fragment の作製法の最適化を行った。昨年度は、2 名の大腸がん患者 (CCP5, CCP15) の TIL から TCR cDNA のクローニングを行った。令和 4 年度は、クローニングした 2 名の大腸がん患者 (CCP5, CCP15) の TIL 由来 TCR の TMG 反応性の解析、および、大腸がん患者から得た TMG 反応性 TCR の標的ネオ抗原の同定を行った。結果、大腸がん患者 (CCP1) 由来の TIL TCR より 4 種類の、大腸がん患者 (CCP5) 由来の TIL TCR より 2 種類の、大腸がん患者 (CCP15) 由来の TIL TCR より 2 種類のネオ抗原反応性 TCR を取得することができた。従来から広く用いられているウイルスベクターや生体由来の細胞を用いた方法では、ネオ抗原特異的な TCR の同定までに、数ヶ月に及ぶ煩雑で労力を要する実験を実施する必要があるが、本研究で開発した方法を用いれば数週間でネオ抗原特異的な TCR の同定が可能であることが実証された。今後、取得したネオ抗原特異的 TCR を用いた TCR-T 細胞療法の実用化に向かって大きく貢献することが期待される。

### **T 細胞 ISAAC による腫瘍特異的 TCR の同定法の開発**

小林は、免疫学教室にて開発した単一 T 細胞解析法である hTEC10 法とマイクロウェルアレイチップを用いた「ISAAC 法」、さらに T 細胞の新規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 法の開発を進めている。令和 4 年度はこれまでの検討により最適化した T 細胞 ISAAC を用いて健常人由来 PBMC より腫瘍特異的 TCR の取得を行った。対象はこれまで高機能な TCR が報告されている HLA-A24 拘束性 Wilms tumor-1(WT1)、HLA-A24 拘束性 Melanoma-associated antigen-A4 (MAGE-A4)、HLA-A02 拘束性 NY-ESO-1、Human papilloma virus (HPV) の 4 つを対象とし、取得した TCR と既知 TCR との比較を試みた。その結果、T 細胞 ISAAC 法により WT1 特異的 TCR4 が健常人末梢血 T 細胞より取得され、これまでの臨床試験で用いられた TAK1 TCR に比べて強い細胞傷害能を誘導することが検証された。他の 3 つのペプチドに特異的な TCR は健常人末梢血 T 細胞からは得られなかった。この原因のひとつとしては、T 細胞 ISAAC 法にかける前の T 細胞を抗原ペプチドで刺激する際に T 細胞が疲弊してしまうことによるのではないかと考えられる。今後は、T 細胞の疲弊を回避する *in vitro* の T 細胞刺激法を用いることにより T 細胞 ISAAC

法の更なる高感度化を図る。

### **TCR 様抗体の取得法の開発**

小澤は、がんペプチド MHC を認識する TCR 様抗体を作製し、該当がん抗原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。がん抗原は、肝臓がんなどで高発現している  $\alpha$  フェトプロテイン(AFP)を対象とした。令和 4 年度は、これまでに作製した 2 種類の TCR 様抗体の抗原特異性を検証し、いずれの TCR 様抗体も、細胞上に発現する AFP ペプチド MHC を特異的に認識することを示した。さらにこれらの TCR 様抗体の C 末端に抗 CD3scFv (クローン OKT3)を融合させた TCR 様 BiTE を作製し、その細胞傷害活性を検証した。その結果、当該がん抗原を発現する腫瘍を傷害できることが確認された。本研究により、がん細胞を標的とする TCR 様抗体を迅速に作製し、それを応用することで標的抗原を発現する細胞を傷害できることが示された。今後、本研究の範囲を広げることで、幅広いがんに対する新たながん免疫療法の開発が期待される。

## 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。令和 4 年度は、モデル TCR を用いて、該当の抗原を発現する酵母のスクリーニングを行った。

### 〈方法〉

## 酵母のスクリーニング

酵母ライブラリーの構築、培養、及びスクリーニング、酵母からの遺伝子取得と次世代シーケンス解析は、昨年度の方法に準じて行った。

## ペプチドとの反応性の評価

哺乳類細胞株へのペプチド/MHC の発現は、以下の方法で行った。Single chain trimer (Luy et al. *N Biotechnol* 2019)の C 末端に AGIA タグ (Yano et al. *PLoS One* 2016, 11, e0156716)と膜貫通領域を融合させたプラスミドを設計し、Expi293F™ 細胞に導入した。可溶性 TCR の作製、及びフローサイトメーターを用いた反応性の評価は、一昨年度の方法に準じて行った。

## 〈結果及び展望〉

これまでに考案した構造を元に、ランダムペプチドライブラリーの構築を行った。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）を固定した。ライブラリー規模として、 $1 \times 10^8$  以上の規模を作製した。このライブラリーより F09 の可溶性 TCR と結合する酵母を MACS により回収し、回収した酵母を一旦増殖させた。再度可溶性 TCR と結合する酵母を回収、培養し、計 4 回繰り返り、各段階でサンプリングを行った。

各段階の酵母よりプラスミドを抽出し、ペプチド部分を含む DNA 断片を PCR で増幅させ、この DNA 断片の塩基配列を次世代シーケンスにより解析を行った。ペプチド部分のアミノ酸配列を解析した結果、1 回目及び 2 回目の濃縮後は得られた配列に

規則性は認められなかった(図 1)。3 回目の濃縮後は、3 番目から 7 番目のアミノ酸で元の BRLF1 のアミノ酸と同じものが出現し、4 回目の濃縮後は、そ

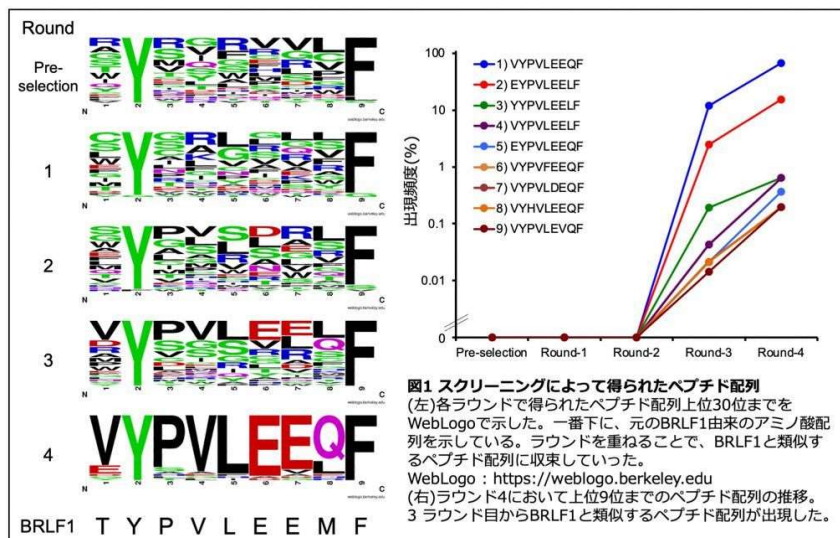
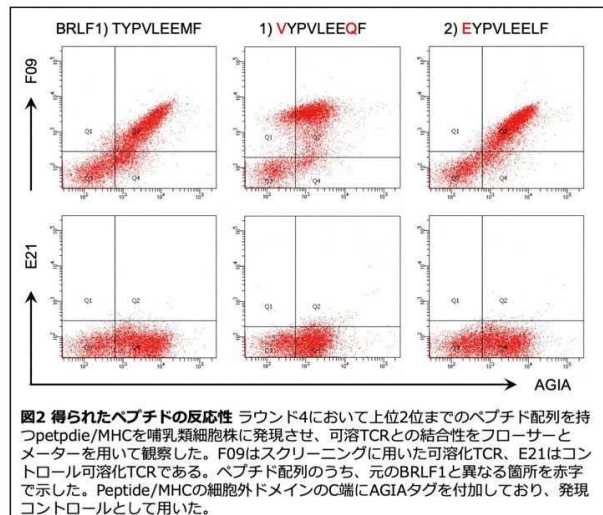


図1 スクリーニングによって得られたペプチド配列 (左)各ラウンドで得られたペプチド配列上位30位までを WebLogoで示した。一番下に、元のBRLF1由来のアミノ酸配列を示している。ラウンドを重ねることで、BRLF1と類似するペプチド配列に収束していった。 WebLogo : <https://weblogo.berkeley.edu> (右)ラウンド4において上位9位までのペプチド配列の推移。3 ラウンド目からBRLF1と類似するペプチド配列が出現した。

の殆どが元の BRLF1 のアミノ酸と同じものが出現した(図 1)。

次に、出現したペプチドの頻度を詳細に解析した。4 回目の濃縮後で 66.7%の VYPVLEEQF は、3 回目の濃縮後は 12.1%、同様に、4 回目の濃縮後で 15.3%の EYPVLEELF は、3 回目の濃縮後は 2.5%であった(図 1)。一方、いずれも 1 回目と 2 回目の濃縮後ではいずれも検出されなかった。

4 回目の濃縮後で大部分を占めたこの 2 つのペプチドは、元の BRLF1 のアミノ酸配列と比べて、2 箇所、もしくは 1 箇所異なっている。そこで最後にこれらのペプチドがモデル TCR と結合するか検証し



た。このペプチド配列を持つペプチド/MHC を哺乳類細胞株に発現させ可溶化 TCR との結合性を、フローサイトメーターを用いて検証した結果、いずれのペプチドも、可溶化 TCR 特異的に結合することが示された(図 2)。

これらの結果より、ランダムライブラリーから TCR と結合するペプチドをスクリーニングできることが示された。一方で、元のペプチドと異なる配列のペプチドが得られた。これは、TCR は MHC 上に提示されているペプチドの 9 アミノ酸全てを認識しておらず、認識にはそのうちの数アミノ酸のみで十分なためである。即ち、TCR の認識に関与しないアミノ酸は、多少異なっても TCR は抗原として認識できる。そのため、抗原を同定するためには、スクリーニングによって得られたアミノ酸配列をもとに、BLAST などを用いて相同性検索を行い、類似するアミノ酸配列をもつタンパク質を予測することが必要となる。この検証により、TCR 遺伝子療法の副作用が予測できることから、副作用が起こりにくい治療に適した TCR を選択することができる。さらに、同定したがん抗原をもとに、がんペプチドワクチンの開発が可能になる。また、がんペプチドワクチンの製剤化や副作用の予見法などは、新たな知財として製薬業界の事業性、経済性を生む基盤になることが期待される。

## 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

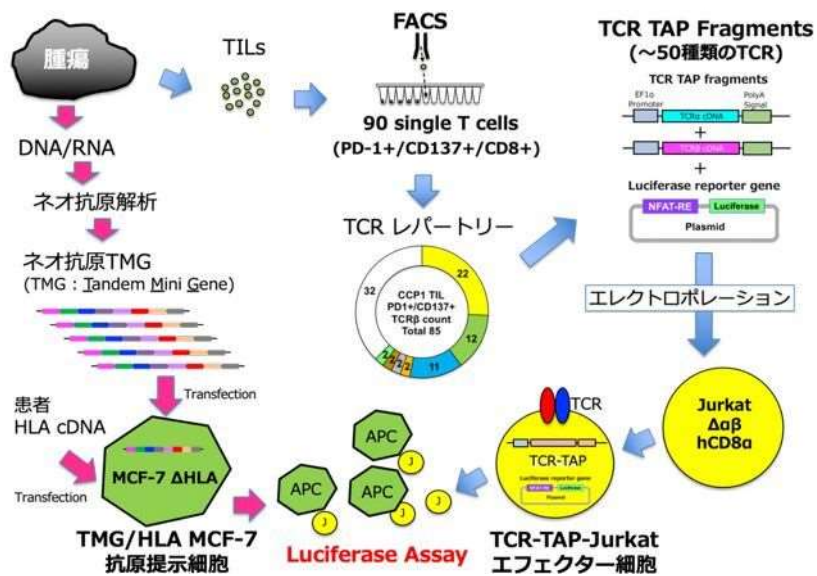


図1 「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」の概要図

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 $\alpha$  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  $\Delta$ HLA 細胞に遺伝子導入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。

昨年度（令和 3 年度）は、①1 名の大腸がん患者（CCP1）の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）から標的ネオ抗原候補を複数発現する TMG1 に反応する TCR の同定。②新たな 2 名の大腸がん患者（CCP5, CCP15）の TIL から TCR cDNA のクローニングを行った。

本年度（令和 4 年度）は、新たな 2 名の大腸がん患者（CCP5, CCP15）の TIL 由来 TCR の TMG 反応性の解析、そして②3 名の大腸がん患者から得た TMG 反応性 TCR の標的ネオ抗原の同定を行った。

## 〈方法〉

### TCR 発現 Jurkat エフェクター細胞の作製

大腸がん患者の TIL よりクローニングされた TCR  $\alpha\beta$  の TAP fragment を NFAT-Luciferase レポータープラスミドと共に、エレクトロポレーションにより Jurkat  $\Delta\alpha\beta$  CD8 $\alpha$  細胞へ遺伝子導入した。NFAT-Luciferase レポータープラスミドを細胞に遺伝子導入することで、TCR の活性化を Luciferase の発光として検出可能となる。

患者 CCP1 由来の TCR は 38 種類、CCP5 については 33 種類の TCR を、CCP15 では 43 種類の TCR について TCR 発現 Jurkat 細胞をエフェクター細胞として作製し、ネオ抗原特異的 TCR のスクリーニングおよび標的ネオ抗原の同定に用いた。

### TMG および HLA cDNA を遺伝子導入した MCF-7 ターゲット細胞の作製

大腸がん患者の腫瘍組織および正常組織の DNA および RNA 解析により、アミノ酸変異を引き起こし、腫瘍組織で発現する遺伝子変異を特定した。遺伝子発現量等を考慮し、ネオ抗原候補を絞り込んだ。CCP1 では 40 個、CCP5 では 20 個、CCP15 では 40 個のネオ抗原候補が選定された。そして、それらのネオ抗原候補の変異を含む 27 mer のペプチドを発現させるために、10 種類の変異ペプチドをコードする Mini gene を連結した Tandem mini gene (TMG) を作製した。CCP1 では 4 種 (TMG1, TMG2, TMG3, TMG4)、CCP5 では 2 種、CCP15 では 4 種の TMG を作製した。そして、各 TMG を pcDNA3.4 ベクターへ組み込み TMG 発現ベクターを作製した。また、HLA 発現ベクターについては、各患者の腫瘍細胞が発現する HLA-Class I cDNA を pcDNA3.4 ベクターへ組み込んで作製した。ターゲット細胞の作製は、1 種類の TMG と 1 種類の HLA を同時に MCF-7 ΔHLA 細胞へ遺伝子導入試薬により導入した。CCP1 では 24 種類 (4 TMG × 6 HLA)、CCP5 では 12 種類 (2 TMG × 6 HLA)、CCP15 では 20 種類 (4 TMG × 5 HLA) のターゲット細胞を製した。

### TMG 反応性 TCR のスクリーニング

$5 \times 10^4$  エフェクター細胞 (1 種類の TCR 発現 Jurkat 細胞) と  $1.2 \times 10^4$  ターゲット細胞 (6 種類の  $0.2 \times 10^4$  TMG/HLA 発現 MCF7 細胞を混合) を 96well U 底プレートで 16 時間共培養した。共培養後、TCR の活性化による Luciferase の発現を Steady-Glo Luciferase Assay System (プロメガ) を用いて解析した。

### 標的ネオ抗原の同定

TMG には 10 種類のネオ抗原候補が含まれている。TMG に反応した TCR がどのネオ抗原を標的としているのかを同定するために、①TMG を C 末端側から切り詰めた Truncated TMG を用いた標的ネオ抗原の絞り込みを行い、そして②絞り込んだ候補の変異の 1 つを正常型に戻した TMGwt を用いて標的ネオ抗原を同定した。

### 【結果】

#### CCP1 TIL 由来 TCR の TMG 反応性の解析

患者 CCP1 の TIL よりクローニングされた 38 種類の TCR の TMG1、TMG2、TMG3、TMG4 への反応性を解析した。その結果、4 種類の TCR が TMG1 に対してのみ反応性を示すことが明らかとなった (図 2)。TCR-01 と TCR-04 は、解析した TIL 中に高頻度に存在す

る T 細胞クローンに発現しているクローン性 TCR であった。一方、TCR-64 と TCR-83 は、解析した TIL 中で、1 個の T 細胞のみが発現する非クローン性 TCR（低頻度 TCR）であった。

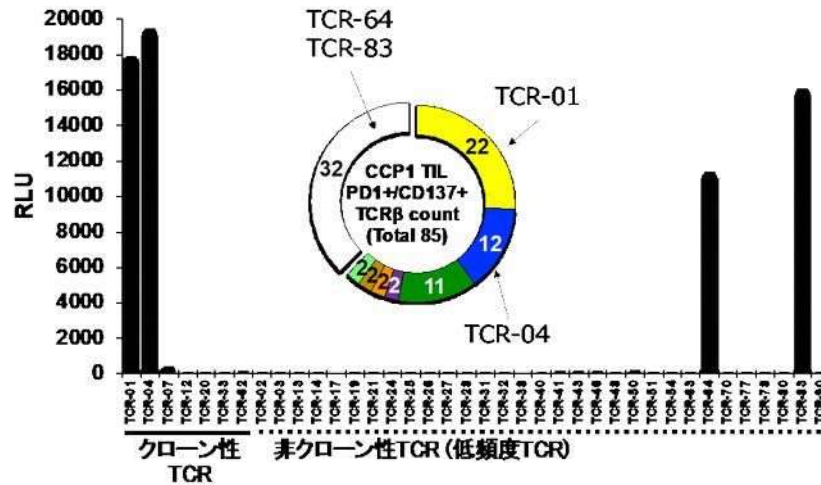


図2 TMG 反応性 TCR のスクリーニング

各 TCR を発現させた Jurkat エフェクター細胞と TMG1/HLA を発現させた MCF7 ターゲット細胞 (6 種類の混合) を共培養し、TCR の活性化を Luciferase アッセイにより解析した。クローン性 TCR の 2 種類 (TCR-01, TCR-04) と非クローン性の低頻度 TCR の 2 種類 (TCR-64, TCR-83) において、TCR の活性化による Luciferase の発光が認められ高い RLU 値を示した。

次に、TMG1 に反応した 4 つの TCR の HLA 拘束性解析を行った。そのために、各 TCR を発現させた Jurkat 細胞と TMG1 と HLA を 1 種類のみ発現したターゲット細胞を共培養し、TCR の反応性を解析した。その結果、すべての TCR が、TMG1 と HLA-A11:01 を発現したターゲット細胞のみに反応性を示した (図 3)。この結果から、TMG1 に含まれる 10 種類のネオ抗原のいずれかが HLA-A11:01 に提示されて、これらの 4 つの TCR を活性化していることが明らかとなった。

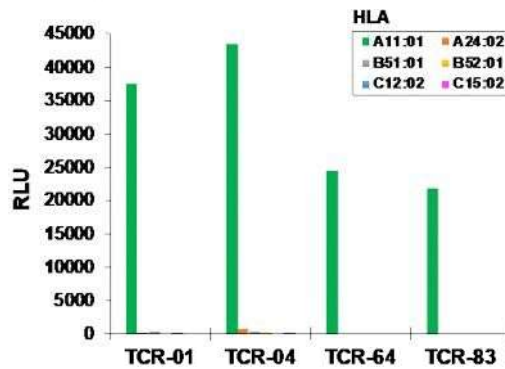


図 3 TMG1 反応性 TCR の HLA 拘束性

## CCP1 TIL 由来 TCR の標的ネオ抗原同定

Truncated TMG を用いて標的ネオ抗原の絞り込みを行った。3種類の Truncated TMG, TMG1-3, TMG1-6, TMG1-9 (図4 上段) に対する各 TCR の反応性を解析したところ、4つの TCR 全てにおいて、CREBBP-DDX59-DIP2A の配列を欠損した TMG1-6 に対して顕著な TCR の反応性の消失が検出され、3つのいずれかのネオ抗原に反応していることが明らかとなった(図4 下段グラフ)。次に、CREBBP, DDX59, DIP2A のそれぞれを正常型の配列に戻した TMGwt を3種類作製し(図5 上部)、TCR の反応性を解析した。その結果、CREBBP の変異アミノ酸残基を正常型のアミノ酸残基に戻した TMG CREBBPwt に対して、すべての TCR の反応性が失われた(図5 棒グラフ 矢印)。図6に CREBBP の変異部位のアミノ酸配列を示す。これらの結果から、患者 CCP1 の TIL より得られた4種類の TCR は全て HLA-A11:01 拘束性に CREBBP の変異(R>C)に由来するネオ抗原に反応する TCR であることが示された。

Truncated TMG

|           |  |
|-----------|--|
| TMG1-3    | ACAP3-ADCY5-ANKFY  |
| TMG1-6    | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5                         |
| TMG1-9    | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5-CREBBP-DDX59-DIP2A      |
| TMG1-Full | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5-CREBBP-DDX59-DIP2A-DNM2 |

Luciferase assay with truncated TMG1

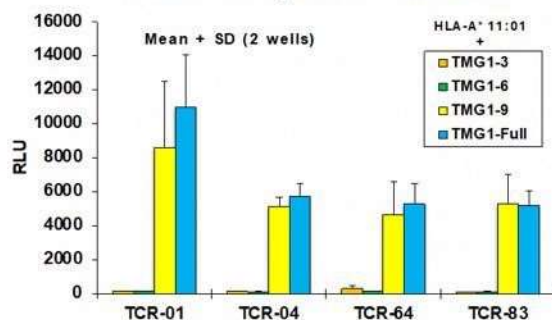


図4 Truncated TMG に対する TCR の反応性

TMGwt

|          |  |
|----------|--|
| TMG1     | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5-CREBBP-DDX59-DIP2A-DNM2   |
| CREBBPwt | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5-CREBBPwt-DDX59-DIP2A-DNM2 |
| DDX59wt  | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5-CREBBP-DDX59wt-DIP2A-DNM2 |
| DIP2Awt  | ACAP3-ADCY5-ANKFY-CARD10-CHD4-COG5-CREBBP-DDX59-DIP2Awt-DNM2 |

TAP fragment/Jurkat vs TMG1&HLA/MCF802d

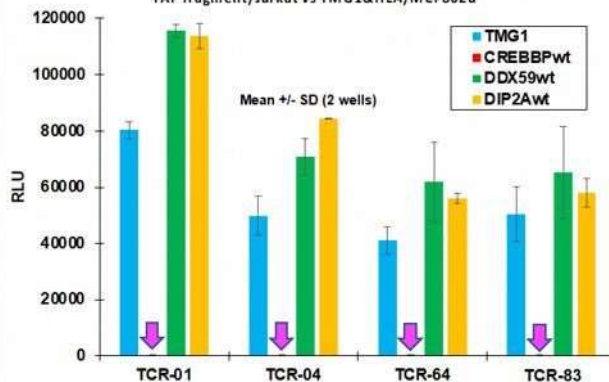


図5 TMGwt に対する TCR の反応性

CREBBP<sup>mu</sup> NGTASQSTSPSQPC<sup>K</sup>KKIFKPEELRQAL  
 CREBBP<sup>wt</sup> NGTASQSTSPSQPR<sup>R</sup>KKIFKPEELRQAL

図6 CREBBP の変異アミノ酸残基

上段の CREBBP<sup>mu</sup> が患者 CCP1 のがん組織から同定された変異型のネオ抗原候補のアミノ酸配列となる。

下段が正常型(wt: 野生型)のアミノ酸配列。

### CCP5 TIL 由来 TCR の TMG 反応性の解析

患者 CCP5 の TIL より得た 33 種類の TCR の TMG1、TMG2 への反応性を解析した。その結果、TMG1 に反応する 2 種類の TCR が得られ、そのいずれもが HLA-C\*08:01 拘束性に TMG1 に反応性を示すことが明らかとなった (図 7 右)。反応した TCR-01 および TCR-21 はクローン性の TCR であったが、比較的低頻度の TCR であった (図 7 左)。

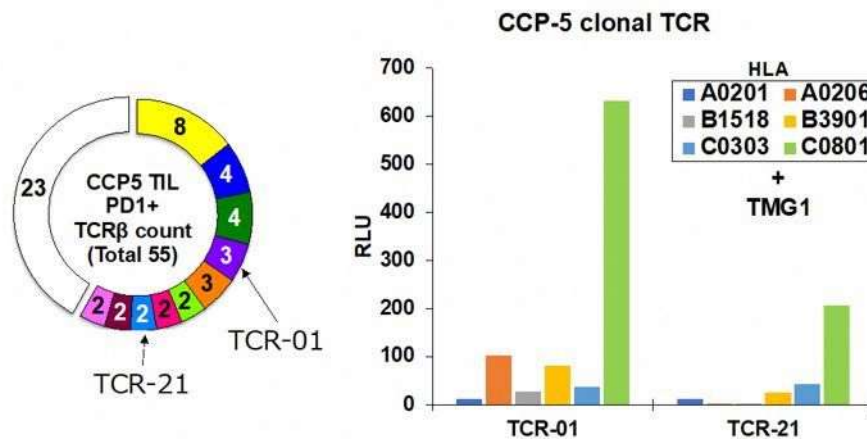


図7 TMG1 に反応した TCR の頻度と HLA 拘束性の解析結果

### CCP5 TIL 由来 TCR の標的ネオ抗原同定

Truncated TMG を用いて標的ネオ抗原の絞り込みを行った後、4 種類の TMGwt (図 8 上

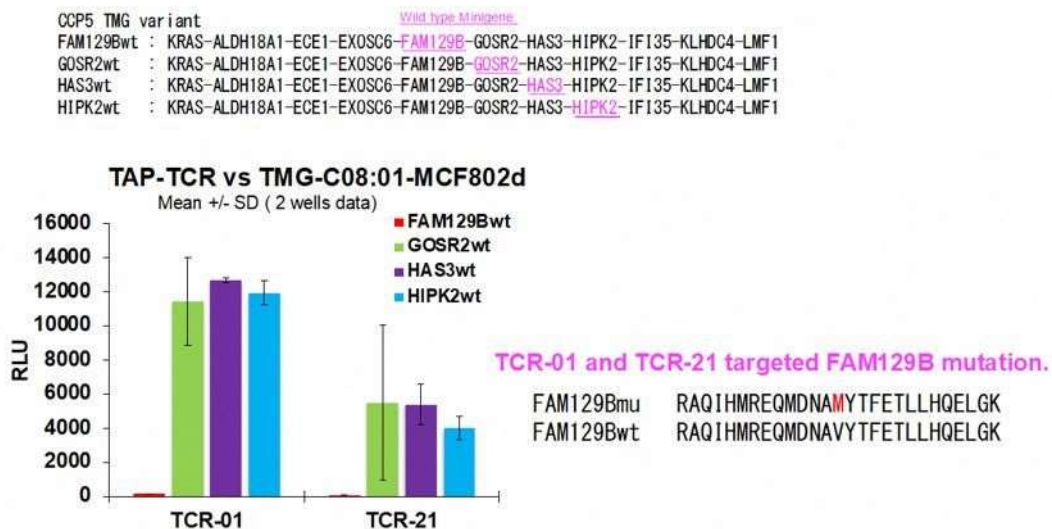


図8 CCP5 TCR の標的ネオ抗原解析の同定

段) を作製し、それらに対する TCR の反応性を解析した。その結果、2 つの TCR 共に FAM129Bwt に反応しないことから (図 8 棒グラフ)、これらは FAM129 変異由来のネオ抗

原に反応することが明らかとなった（図8）。

### CCP15 TIL 由来 TCR の TMG 反応性の解析

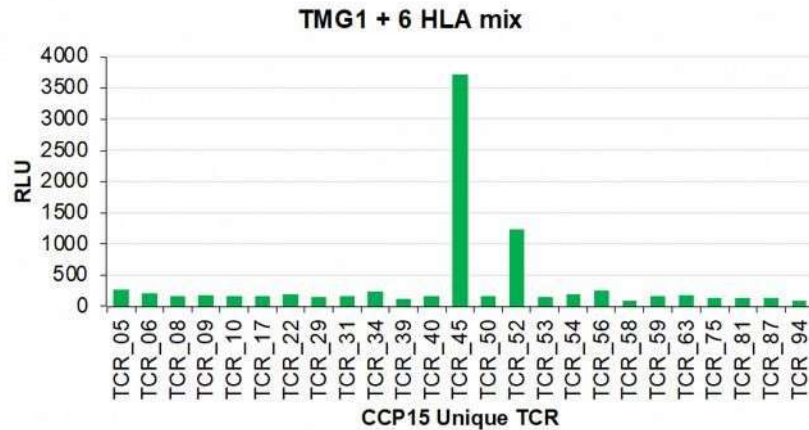


図9 TMG 反応性 TCR のスクリーニング

患者 CCP15 の TIL より得た 43 種類の TCR の TMG1、TMG2、TMG3、TMG4 への反応性を解析した。その結果、TMG1 に反応する 2 種類の TCR が得られた（図 9）。TMG1 に反応性を示した TCR-45 および TCR-52 は、いずれも Unique な TCR であった。

これら TCR の HLA 拘束性の解析から、いずれの TCR も HLA-A\*33:03 拘束性に TMG1 に反応していることが示された（図 10 左）。また、標的ネオ抗原の解析では ABCF1wt で

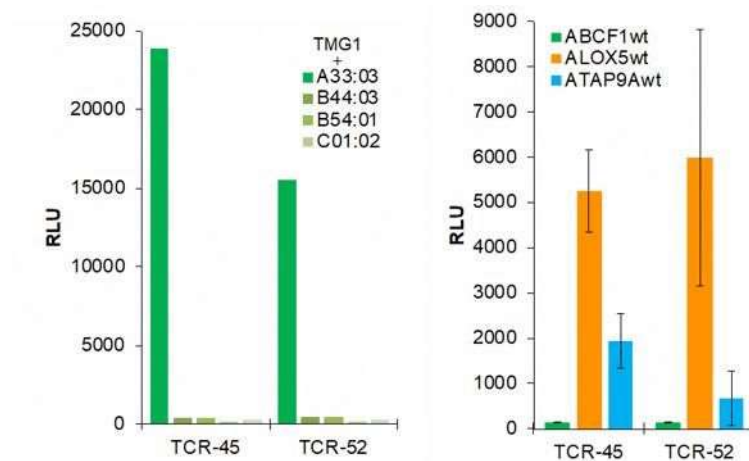


図 10 TCR の HLA 拘束性と標的ネオ抗原解析

TCR の反応性の顕著な低下が認められており（図 10 右）、ABCF1 のネオ抗原が 2 つの TCR の標的抗原である可能性が高い。しかし、ATAP9Awt でも反応性の低下が見られて

おり、より詳細な解析が必要であると思われる。

### 〈考察と今後の展望〉

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課題である。そこで、本研究では迅速で簡便なネオ抗原特異的 TCR の同定法の開発を行った。そのために、我々がこれまでに開発した「TCR cDNA の増幅方法」および「TCR の機能解析法」を組み合わせた方法を用いて、大腸がん患者 3 名の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)からネオ抗原特異的 TCR の同定を試みた。その結果、患者 3 名の TIL からネオ抗原特異的 TCR の cDNA を複数個、同定することに成功した。

従来から広く用いられているウイルスベクターや生体由来の細胞を用いた方法では、ネオ抗原特異的な TCR の同定までに、数ヶ月に及ぶ煩雑で労力を要する実験を実施する必要がある。本研究では、我々の方法を用いれば数週間でネオ抗原特異的な TCR の同定が可能であることが実証された。また、我々の方法では遺伝子改変した Jurkat 細胞と MCF-7 を用いていることができるので、簡便に安定した実験が可能となっている。

今後は、より多数の大腸がんや他のがん種の検体に対しても、我々の開発した方法が有効であるのかを検証し、改良などを進め、より実用性の高いネオ抗原特異的 TCR 取得法を確立していく予定である。

## 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、効果的に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 T細胞クローンを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 $\alpha$  鎖と  $\beta$  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  $\alpha$  鎖と  $\beta$  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」(Jin 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だ (図 1)。

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、抗原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。

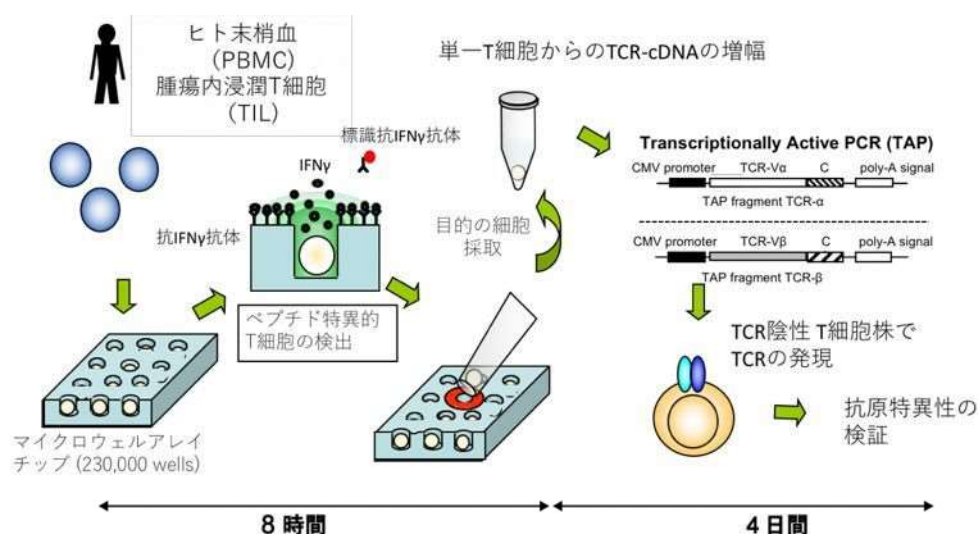


図 1 : T 細胞 ISAAC の概略図

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) T 細胞 ISAAC を用いた腫瘍特異的 TCR の取得

腫瘍に浸潤した TIL には腫瘍抗原 (ネオアンチゲンおよび共通抗原) 特異的 T 細胞が集積しているとの考えから、PD-1 等を特異的 T 細胞マーカーとして解析が盛んに行われてきた。しかし、ごく最近では、腫瘍環境下において T 細胞が Bystander 効果により非特異的に活性化されており、クローナルに増殖している T 細胞のなかで真にがん特異的な T 細胞は少数であるという報告もある (Simoni et al, *Nature* 2018, Duhon et al. *Nat. Commun.* 2018)。我々もこれまで独自に開発した上記 hTEC10 法を用いて、患者 TIL

より多数の TCR 遺伝子を取得し、がん特異性を評価したが、がん特異的 TCR はクローナルに増殖している T 細胞の数%程度だった。さらに患者 TIL はその使用に制限があることから、抗原が明らかな場合は腫瘍抗原特異的 TCR を取得するための必ずしも有用なソースにはならないと考えられる。

一方、我々は上述の hTEC10 法を開発する過程で、健常人由来末梢血リンパ球 (PBMC) を腫瘍抗原である  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) ペプチドで刺激し、AFP 特異的 T 細胞が誘導できるかどうかを検討したところ、10 人中 3 人で AFP 特異的 T 細胞が誘導されたことを確認している。さらに、これら TCR の親和性を比較したところ、その中の 1 個がペプチドワクチンを受けた肝細胞がんの患者 PBMC の TCR のうち、最も親和性の高い TCR と同程度であることが明らかになった (Nakagawa, Kobayashi et al. *Gastroenterology* 2017)。この結果は健常人由来 PBMC から、高品質の腫瘍抗原特異的 TCR を取得できる可能性を示している。そこで、本年度はこれまでの検討により最適化した T 細胞 ISAAC を用いて健常人由来 PBMC より腫瘍特異的 TCR の取得を行った。対象はこれまで高機能な TCR が報告されている HLA-A24 拘束性 Wilms tumor-1(WT1)、HLA-A24 拘束性 Melanoma-associated antigen-A4 (MAGE-A4)、HLA-A02 拘束性 NY-ESO-1、Human papilloma virus (HPV) の 4 つを対象とし、取得した TCR と既知 TCR との比較を試みた。

### 1)-1 HLA-A24 拘束性 WT1 特異的 TCR の取得

健常人 4 人の PBMC を WT1 ペプチドで刺激した結果、1 人の PBMC から WT1 ペプチド特異的 T 細胞の増殖が確認された (図 2)。

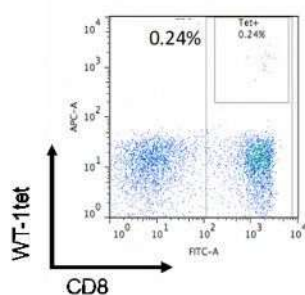


図2: WT1ペプチドで刺激したPBMCの解析

健常人由来PBMCをHLA-A24拘束性のWT1ペプチドで2週間刺激した。刺激したPBMCをWT1テトラマーとCD8抗体を用いて解析した。健常人4人中1人のPBMCからWT1特異的T細胞の誘導が確認された。

この PBMC をマイクロウェルアレイチップに播種し、WT1 ペプチドで刺激し、サイトカインを産性させた。サイトカイン産性によりウェルの周囲が赤く染色された細胞を回収した。回収した細胞から single-cell RT-PCR により TCR  $\alpha$  鎖と TCR  $\beta$  鎖を増幅した。その後、増幅した TCR の配列をシーケンシングにより確認した。次に、増幅し

た TCR 遺伝子の TAP フラグメントを作成し、TCR 陰性 T 細胞株に発現させ、WT1 特異性を検証した (図 3)。その結果、取得した TCR はペプチドを加えていない群と比較して強い反応を示した。特に TCR-4 はこれまでに TCR-T 療法の臨床試験に用いられた TAK-1-TCR より強い反応を示した。

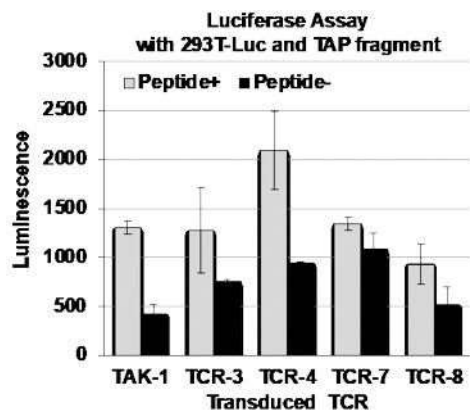


図3:取得したTCRの抗原特異性の検証

T細胞ISSAC法により取得したWT1特異的TCRのTAPフラグメントを作製し、TCR陰性細胞株に発現させ、WT1ペプチドで刺激した。特異性はルシフェラーゼの発現を指標に評価した。

次に、TCR 発現ベクターを作製し、健常人 T リンパ球に発現させ、ペプチド濃度依存的な IFN- $\gamma$  産性を比較した (図 4)。その結果、TAK1, TCR-4 共に低濃度のペプチド刺激でも強い反応を示した。特に、TCR-4 はペプチドを加えていない標的細胞 (K562) に対しても反応していたことから、内在の WT1 抗原に反応している可能性が示唆された。

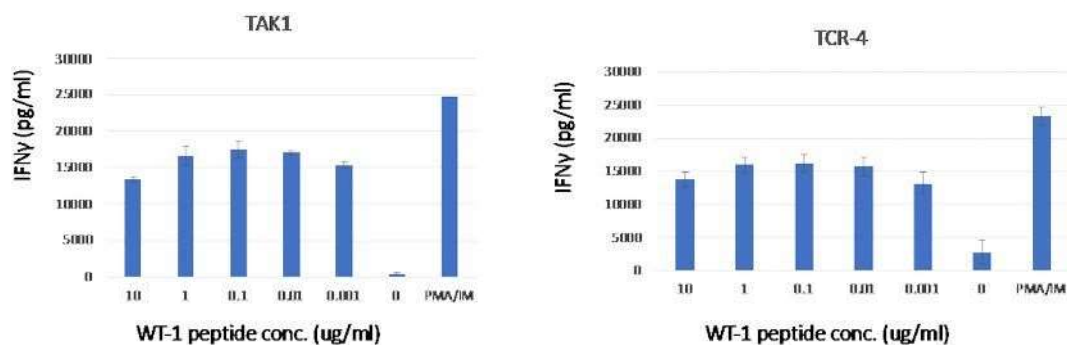


図4:取得したTCRの親和性の比較

T細胞ISSAC法により取得したWT1特異的TCR (TCR-4) と臨床試験に使用されたWT1特異的TCR(TAK1)の発現ベクターを作製し、健常人Tリンパ球に発現させ、種々の濃度のWT1ペプチドで刺激した。培養上清中に産生されたIFN $\gamma$ の量をELISA法により測定した。

そこで、次に TCR を発現させた健常人 T リンパ球の細胞傷害活性を比較した (図 5)。TCR を発現させた T リンパ球を用いて、内在に WT1 を発現する K562 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。その結果、TCR-4 は TAK1 に比べて標的細胞に強い細胞傷害を起こすことが明らかになった。

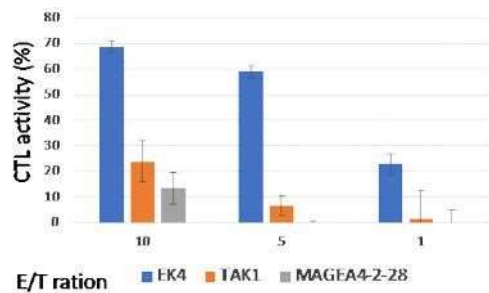


図5:取得したTCRの細胞傷害活性の比較

T細胞ISSAC法により取得したWT1特異的TCR (TCR-4) と臨床試験に使用されたWT1特異的TCR(TAK1)を發現させた健常人Tリンパ球を用いて、内在にWT1を發現するK562細胞に対する細胞傷害活性を測定した。陰性コントロールにはMAGE-A4特異的TCRを用いた

### 1)-2 その他の腫瘍抗原ペプチド特異的 TCR の取得

WT1 特異的 TCR 以外に HLA-A24 拘束性 Melanoma-associated antigen-A4 (MAGE-A4)、HLA-A02 拘束性 NY-ESO-1、Human papilloma virus (HPV)に関しても同様に健常人 PBMC を各抗原ペプチドで刺激したが、抗原ペプチド特異的 T 細胞は確認されなかった。

#### 〈考察〉

通常、健常人末梢血リンパ球(PBMC)のみならず、腫瘍浸潤リンパ球(Tumor infiltrating lymphocyte: TIL)中においても腫瘍抗原特異的 T 細胞は極めて低頻度である。そのため、腫瘍抗原特異的 T 細胞を検出するためには、in vitro において効率よく腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖させる必要がある。そのため、抗原ペプチドで継続的に刺激する必要があるが、この方法では腫瘍抗原特異的 T 細胞が増えたとしても、T 細胞が疲弊している可能性が高い。もし腫瘍抗原特異的 T 細胞が疲弊していた場合、マイクロアレイチップ上で刺激してもサイトカインがほとんど産生されないことから T 細胞 ISAAC による検出は困難になる。事実、検出された WT1 特異的 T 細胞のサイトカイン産生量もウイルス抗原特異的 T 細胞に比較するとずっと弱かった。また、このことは WT1 以外の抗原ペプチド特異的 TCR が検出されなかった 1 つの原因かもしれない。

近年、腫瘍特異的 Chimeric antigen receptor (CAR)や TCR を導入した T 細胞の疲弊が CAR-T 療法や TCR-T 療法の大きな障害として認識されるようになり、T 細胞疲弊の回避方法や解除方法が盛んに研究されている。慶應大学の近藤らは in vitro 刺激中に OP9 細胞と共培養することで幹細胞様の状態で T 細胞を増殖させることができることを示している (Kondo et al. *Nat Commun* 2017)。またアメリカ NIH の Mo らは改変型 IL-2 を用いることで T 細胞を分化させずに増殖する方法を開発している (Mo et al. *Nature* 2021) さらにスタンフォード大学の Weber らは脱リン酸化剤を用いることで、疲弊した

T細胞が回復することを明らかにしている（Weber et al. *Science* 2021）。今後は、上記方法と組み合わせ、疲弊状態を回避した *in vitro* 刺激方法と T-ISAAC 法を組み合わせることで、T細胞 ISAAC 法の更なる高感度化を図る。

#### 〈今後の展望〉

我々が開発した T細胞 ISAAC 法より、ペプチド HLA 複合体を用いない腫瘍抗原特異的 TCR の取得が可能になった。T細胞 ISAA 法のさらなる高感度化により、より効率的な腫瘍抗原特異的 TCR の取得が容易になると考えられる。このことは、これまで特定の HLA および腫瘍抗原の組み合わせに限定されてきた TCR-T 療法の適応拡大につながりと期待される。

## II-4 TCR 様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 個入る大きさのウエルが 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 法にブロッキング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、がんペプチド MHC を認識する TCR 様抗体を作製し、該当がん抗原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。がん抗原は、肝臓がんなどで高発現している  $\alpha$  フェトプロテイン(AFP)を対象とした。令和 4 年度は、令和 3 年までに得られたがん抗原ペプチド MHC 特異的 TCR 様モノクローナル抗体の評価を行った。

### 〈方法〉

#### 結合性の評価

結合性の評価は、過去に報告されている方法(Ozawa et al Eur. J. Immunol. 2021)に従って行った。具体的には、T2A24 細胞株を AFP ペプチドもしくはコントロールペプチド

(BRLF1 ペプチド)と共培養した。その T2A24 細胞を回収し、それぞれのペプチドと共培養した T2A24 細胞に対する結合活性をフローサイトメーターにて評価した。

## 細胞傷害活性の評価

TCR 様抗体 BiTE の作製は、過去に報告されている方法(Ozawa et al *Eur. J. Immunol.* 2021)に従って行った。具体的には TCR 様抗体の C 端に抗 CD3scFv を融合させたプラスミドベクターを構築した。このプラスミドを Expi293F 細胞に導入し、TCR 様 BiTE を産生させ、プロテイン G カラムを用いて精製した。

細胞傷害活性の評価は、過去に報告されている方法(Ozawa et al. *Eur. J. Immunol.* 2021)に従って行った。具体的には、 $2 \times 10^4$  個のペプチドと共培養したルシフェラーゼ発現 T2A24 細胞、 $5 \mu\text{g/ml}$  の TCR 様 BiTE、 $5 \times 10^5$  個の健常人由来 CD3<sup>+</sup>細胞を共培養した。7 時間後ルシフェラーゼの活性を、OPTIMA プレートリーダーを用いて測定した。健常人由来細胞の扱いに関しては、富山大学倫理審査委員会にて承認されている(承認番号 R2021033)。昨年度までに作製した AFP ペプチド MHC 特異的 TCR 様抗体である #0917-04 及び #0917-67 の結合特異性を、評価した。TAP 欠損かつ HLA-A24 を発現する T2A24 細胞株にペプチドをパルスし、抗原提示細胞を準備した。この細胞に対してフローサイトメーターによる解析を行った結果、#0917-04 及び #0917-67 いずれの TCR 様抗体も、AFP ペプチドをパルスした T2A24 細胞との結合性が認められた(図 1)。一方コントロールペプチドをパルスした T2A24 細胞とは結合性が認められなかった(図 1)。この結果より、いずれの TCR 様抗体も、細胞上に発現する AFP ペプチド MHC を特異的に認識することが示された。

最後に、この TCR 様抗体の細胞傷害活性を評価した。そのために、TCR 様抗体重鎖の C 末端に抗 CD3scFv (クローン OKT3)を融合させた TCR 様 BiTE を作製した。ル

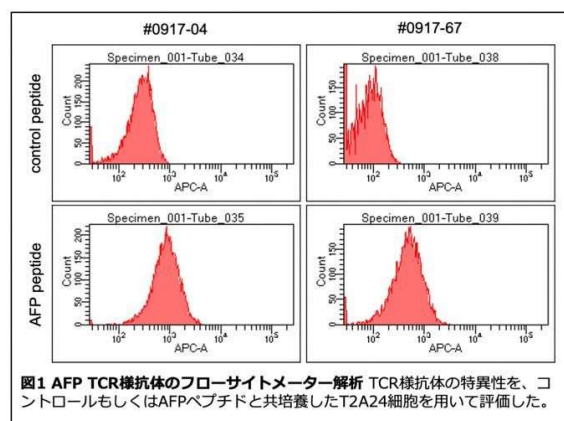


図1 AFP TCR様抗体のフローサイトメーター解析 TCR様抗体の特異性を、コントロールもしくはAFPペプチドと共培養したT2A24細胞を用いて評価した。

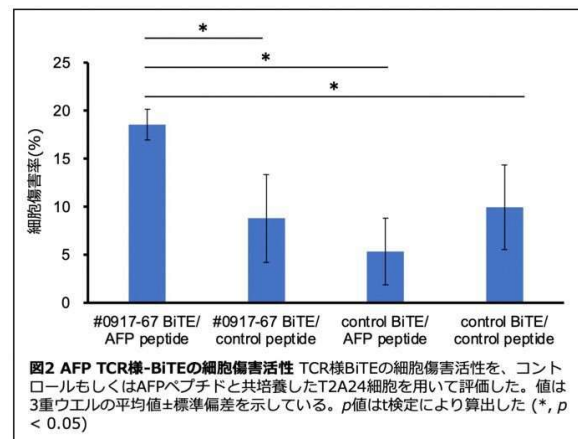


図2 AFP TCR様-BiTEの細胞傷害活性 TCR様BiTEの細胞傷害活性を、コントロールもしくはAFPペプチドと共培養したT2A24細胞を用いて評価した。値は3重ウエルの平均値±標準偏差を示している。p値は検定により算出した(\*,  $p < 0.05$ )

シフェラーゼを発現する T2A24 細胞にペプチドをパルスし、この抗原提示細胞と TCR 様 BiTE、健康人由来 CD3<sup>+</sup>細胞を共培養した。共培養後、ルシフェラーゼ活性を指標に傷害された T2A24 細胞の割合を算出した結果、#0917-67 BiTE は、抗原特異的に該当細胞を傷害することが認められた(図 2)。これらの結果より、当初の目標であるがんペプチド MHC を認識する TCR 様抗体を作製し、該当がん抗原を発現する腫瘍が傷害できる BiTE の作製を達することができた。

本研究により、がん細胞を標的とする TCR 様抗体を迅速に作製し、それを応用することで標的抗原を発現する細胞を傷害できることが示された。本研究の範囲は、対象抗原が限られていることと、*in vitro* での評価に留まっているが、本研究の範囲を広げる研究を行うことで、幅広いがんに対する新たながん免疫療法の開発が期待される。