

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07175

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後の再発を抑制するメカニズムの解明と養子免疫療法への応用

研究課題名(英文) Mechanism of graft versus leukemia effect and its application to adoptive immunotherapy

研究代表者

川瀬 孝和 (KAWASE, TAKAKAZU)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30463194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年提唱されたT細胞分画のひとつである幹細胞様メモリー(記憶)T細胞(stem cell memory (SCM) T-cell)は、養子免疫T細胞療法に用いることで、より高い治療効果の得られるT細胞として注目されている。我々は、サイトメガロウイルス抗原特異的T細胞を次世代シーケンサーによる網羅的解析と、1細胞単離(シングルセルソーティング)解析による1細胞毎のT細胞受容体の、 のペアの情報を組み合わせる技術を開発した。この技術を用いてサイトメガロウイルス抗原特異的T細胞を解析し、免疫学的に重要な抗原特異的T細胞が、幹細胞様メモリーT細胞分画に濃縮されていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をとおして、T細胞を網羅的かつ、T細胞受容体の、 のペアの情報を組み合わせる技術を開発することができた。この技術を用いて、幹細胞様メモリーT細胞に免疫学的に重要な抗原特異的T細胞が多く存在することが明らかとなり、幹細胞様メモリーT細胞が単にナイーブT細胞からエフェクターT細胞へ向かう文化の一段階ではなく、免疫学的により重要な分画であることを示唆する結果を得た。この技術を用いたかいせきにより、養子免疫療法への応用を見据えた、造血幹細胞移植後の再発を抑制するT細胞受容体、がん抗原特異的T細胞受容体データベースの構築が進んでいる。

研究成果の概要(英文)：Recently, immunologic significance of stem cell memory (SCM) T-cell subset has been increasingly recognized, especially as original cell source for adoptive T-cell therapy. To comprehensively elucidate TCR clonotypes of SCM T-cells, we performed ultra-in-depth analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific TCR repertoire in various functional T-cell subsets using next generation sequencing (NGS) and single cell cloning of TCRs. CMV pp65-specific T-cells in circulating blood of healthy donors were extremely oligoclonal and most of the dominant TCRs had higher affinity to pp65-tetramer. Intriguingly, these dominant CMV-specific TCR clonotypes were highly shared among different individuals and were also present in CMV-seronegative donors. Notably, TCR diversity of SCM T-cells was significantly lower than that of CM and EM T-cell repertoire. These results suggest that SCM T-cell subset functions as a reservoir of highly-shared and highly-functional memory T-cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：T細胞受容体 次世代シーケンサー 1細胞単離解析 幹細胞様メモリーT細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サイトメガロウイルス(CMV)感染症は同種造血幹細胞移植(allo-HCT)後の免疫抑制状態となった患者において高頻度で見られる日和見感染症であり、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD)と同様に、allo-HCT の成績に影響を与える重要な合併症である。近年、CMV 感染症と GVHD・移植片対白血病 (graft-versus-leukemia, GVL)効果は独立した現象ではなく、ドナー由来の免疫細胞を介して、相互に関連していることを示唆する観察がなされており、それらが GVHD や GVL 効果を惹起・増強するという疫学的研究結果も報告されているが、その機序には不明な点が多い。

2. 研究の目的

allo-HCT 後のウイルス感染症に対する免疫応答が GVHD や GVL に関与するメカニズムを明らかにするために、ウイルス特異的 TCR、同種抗原特異的 TCR を網羅的かつ詳細に解析する免疫バイオインフォマティクス的手法を確立することを目的とする。さらに、その手法を用いて、同種抗原特異的 T 細胞とウイルス特異的 T 細胞の関係を明らかにする前段階として、CMV 特異的 TCR の特徴を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

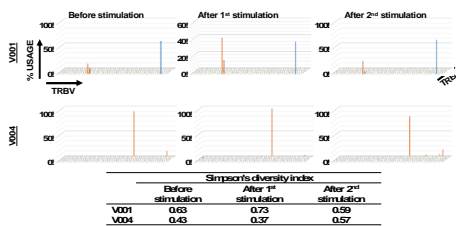
サイトメガロウイルス抗原特異的 T 細胞を次世代シーケンサーによる網羅的解析と、1細胞単離 (シングルセルソーティング) 解析による 1細胞毎の T 細胞受容体の 鎖、鎖のペアの情報を組み合わせて解析する免疫バイオインフォマティクス的手法を確立し、この手法を用いて 5人の健常ドナー (V001 - V005) の末梢血中の T 細胞分画 (エフェクター T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、ナイーブ T 細胞、幹細胞様メモリー T 細胞) を網羅的に解析する。同時に、1細胞ごとの T 細胞受容体の 鎖、鎖のペアの塩基配列を明らかにしてベクターに組み込み、抗原非特異的 T 細胞、あるいは T 細胞株 (Jurkat) に遺伝子導入して、T 細胞受容体の機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 健常人末梢血 T 細胞の多様性、及びサイトメガロウイルス抗原特異的 T 細胞の多様性

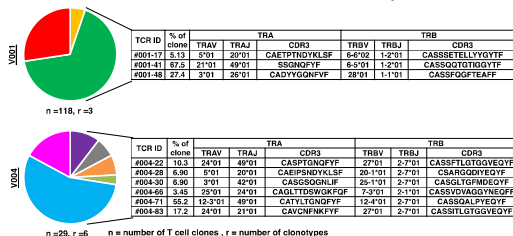
HLA-A2 を持ち、サイトメガロウイルス抗体陽性の 2 人の健常ドナーの末梢血単核球から抽出した CD8 陽性 T 細胞を、HLA-A2 拘束性のサイトメガロウイルス pp65 抗原エピートプである NLVPMVATV (NLV) ペプチドで 2 回の刺激をおこなった。刺激前の T 細胞、1 回刺激後の T 細胞、2 回刺激後の T 細胞を NLV 特異的テトラマーを用いてフローサイトメトリーで分離し、次世代シーケンサーで網羅的な解析を行ったところ、NLV 特異的 T 細胞レパトアは刺激の前後に関わらずオリゴクローナルであることがわかった (図 1)。

図1 サイトメガロウイルス特異的T細胞の多様性



また、これらの T 細胞を 1細胞ごとにフローサイトメトリーにて分離し、cDNA を抽出して 1細胞内に存在する TCR の 鎖と 鎖の遺伝子配列をサンガーシーケンス法にて決定した。V-001 では、ドミナントな 1つの T 細胞クローナルタイプと 2つのサブドミナントな T 細胞クローナルタイプが明らかとなった。また、V-004 では、ドミナントな 1つの T 細胞クローナルタイプと 5つのサブドミナントな T 細胞クローナルタイプが明らかとなった (図 2)。

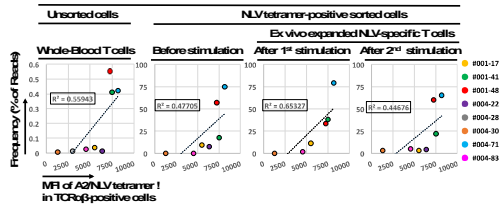
図2 サイトメガロウイルス特異的T細胞のα鎖 β鎖



(2) サイトメガロウイルス特異的T細胞の存在頻度と抗原結合能

(1)で明らかとなったCMV-NLV特異的T細胞受容体をベクターに組み込み、T細胞受容体欠損T細胞株(Jurkat)に遺伝子導入を行った。CMV-NLV特異的T細胞受容体遺伝子導入JurkatをNLV特異的テトラマーで染色しその蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定した。また、個々のCMV-NLV特異的T細胞のドナー末梢血中での存在頻度を次世代シーケンサーにて半定量的に測定した。X軸にCMV-NLV特異的テトラマーの傾向強度を、Y軸にそのCMV-NLV特異的T細胞の存在頻度をプロットすると、CMV-NLV特異的T細胞の存在頻度が高いほど、CMV-NLV特異的テトラマーへの結合能が高い傾向があることが明らかとなった(図3)。

図3 サイトメガロウイルス特異的T細胞の頻度と機能



(3) T細胞クロナタイプの存在頻度と個人間での共有

5人の健常ドナーの末梢血T細胞をフローサイトメトリーにてエフェクターT細胞(EFF)、エフェクターメモリーT細胞(EM)、セントラルメモリーT細胞(CM)、ナイーブT細胞(Naive)、幹細胞様メモリーT細胞(SCM)に分離し、次世代シーケンサーにて解析を行った。X軸に個々のT細胞クロナタイプの存在頻度の順位を、Y軸にそのT細胞クロナタイプの次世代シーケンサーでのリード数をプロットした。また個々のT細胞クロナタイプで個人間での共有が多いクロナタイプほどそのクロナタイプを示すバブルを大きなバブルを用いてグラフ化した(バブルプロット:図4)。つまり、5人のドナー全ての末梢血中存在するT細胞クロナタイプ(パブリッククロナタイプ)を一番大きなバブルで示し、他のドナーと共有のないT細胞クロナタイプ(プライベートクロナタイプ)を一番小さなバブルで示した。結果として、統計学的有意差を持って、多くのドナーで共有されるT細胞クロナタイプほど末梢血中での存在頻度が高いことが明らかとなった。CMV特異的T細胞での解析でも同様の結果であった(図5)。

図4 T細胞クロナタイプの頻度と個人間での共有

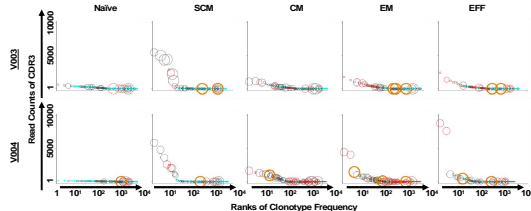
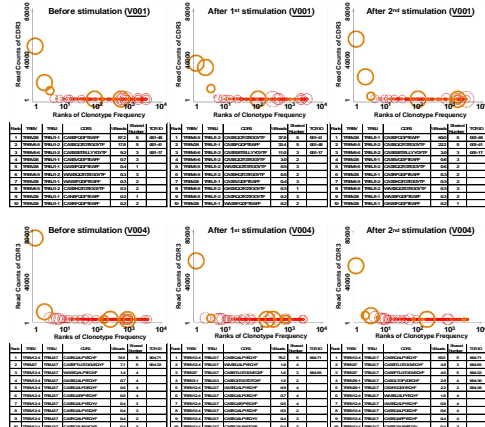


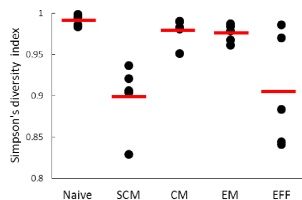
図5 CMV特異的T細胞クロナタイプの頻度と個人間での共有



(4) 各T細胞分画におけるT細胞の多様性

5人の健常ドナーの末梢血T細胞分画の次世代シーケンサーで解析し、多様性インデックス(Simpson's diversity index)を検討した。T細胞はナイーブT細胞からメモリー細胞を経てエフェクターT細胞に分化すると考えられており、この順でT細胞クロノタイプの多様性が低くなると考えられている。実際に今回の解析でも古典的なT細胞分画であるナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、エフェクターT細胞はこの順で多様性が低下していった。しかし近年新たに提唱された幹細胞様メモリーT細胞では、細胞表面マーカーはナイーブT細胞に近く、また自己複製能を持つにもかかわらず、その多様性は他のメモリーT細胞より低いことが明らかとなった(図6)。

図6 各T細胞分画におけるT細胞の多様性



このように、本研究では次世代シーケンサーと1細胞単離の方法を駆使して、T細胞レパトアを網羅的かつ詳細に解析する免疫バイオインフォマティクス的手法を確立し、その方法を用いて、T細胞レパトアの新たな特徴を明らかにした。引き続きこの手法を用いて、同種抗原特異的T細胞、ガン抗原特異的T細胞の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Ichinohe T, Miyama T, Kawase T, Honjo Y, Kitaura K, Sato H, Shin-I T, Suzuki R: Next-Generation Immune Repertoire Sequencing as a Clue to Elucidate the Landscape of Immune Modulation by Host-Gut Microbiome Interactions. *Front Immunol*, 9:668, 2018 (査読あり)
2. Kikuchi J, Kuroda Y, Koyama D, Osada N, Izumi T, Yasui H, Kawase T, Ichinohe T, Furukawa Y: Myeloma Cells Are Activated in Bone Marrow Microenvironment by the CD180/MD-1 Complex, Which Senses Lipopolysaccharide. *Cancer Res*, 78(7):1766-1778, 2018 (査読あり)
3. Miyama T, Kawase T, Kitaura K, Chishaki R, Shibata M, Oshima K, Hamana H, Kishi H, Muraguchi A, Kuzushima K, Saji H, Shin-I T, Suzuki R, Ichinohe T: Highly functional T-cell receptor repertoires are abundant in stem memory T cells and highly shared among individuals. *Sci Rep*, 7(1):3663, 2017 (査読あり)

[学会発表](計17件)

1. 一戸辰夫, Robert D. Bremel, 北浦一孝, 中村征史, 川瀬孝和, 美山貴彦, 本庶仁子, 新井理, 鈴木隆二, E. Jane Homan. Mapping of immunoglobulin T-cell exposed motifs during B cell reconstitution after allogeneic HCT. 第41回日本造血細胞移植学会総会. 大阪府大阪市, 2019年3月8日.
2. Kanda J, Kawase T, Tanaka H, Uchida N, Nagafuji K, Matsushashi Y, Ohno Y, Onizuka M, Tanaka J, Ichinohe T, Atsuta Y. Effect of haplotype matching on outcomes after adult single cord blood transplantation. 60th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego CA, U.S.A., December 2, 2018.
3. Kisa Tanabe, Takakazu Kawase, Kazutaka Kitaura, Takahiko Miyama, Misaki Kobayashi, Mayu Sato, Takayuki Oda, Aoi Sakamoto, Kiyoto Tanaka, Kiyotaka Kuzushima, Kazuo Yamashita, Tadasu Shin-I, Ryuji Suzuki, Tatsuo Ichinohe. Comprehensive T cell receptor (TCR) repertoire analysis of new T cell subsets with naive phenotype. 第80回日本血液学会学術集会, 大阪府大阪市, 2018年10月12日.

4. 川瀬孝和, 田辺季佐, 美山貴彦, 本庶仁子, 山下和男, 北浦一孝, 鈴木隆二, 一戸辰夫. In-depth immunosequencing of human stem memory T cell repertoire and its comparison with other memory T cell populations. 第22回日本がん免疫学会総会, 岡山県岡山市, 2018年8月3日.
5. 川瀬孝和, 田中秀則, 内田直之, 大橋一輝, 福田隆浩, 小澤幸泰, 小川啓恭, 衛藤徹也, 森毅彦, 宮本敏浩, 高梨美乃子, 熱田由子, 一戸辰夫, 神田善伸, 諫田淳也. 高頻度 HLA ハプロタイプ (HP) は臨床的サイトメガロウイルス (CMV) 再活性化リスクを低減させるか?. 第40回日本造血細胞移植学会総会. 北海道札幌市, 2018年2月3日.
6. 美山貴彦, 川瀬孝和, 枝廣太郎, 鈴木源晟, 土石川佳世, 森岡健彦, 名越久朗, 今川潤, 三原圭一朗, 福島伯泰, 本庶仁子, 北浦一孝, 新井理, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーを用いた同種造血幹細胞移植後に残存する微小レシピエント T 細胞クローンの解析. 第40回日本造血細胞移植学会総会. 北海道札幌市, 2018年2月2日.
7. Takahiko Miyama, Takakazu Kawase, Yasuko Honjo, Kazutaka Kitaura, Tadasu Shin-I, Ryuji Suzuki and Tatsuo Ichinohe. Landscape of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation is superdominated by distinct T cell populations bearing T-cell receptor clonotypes shared among different individuals. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, U.S.A, December 11, 2017.
8. 美山貴彦, 川瀬孝和, 本庶仁子, 北浦一孝, 新井理, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植後に残存するレシピエント由来微小 T 細胞クローンの解析. 第26回日本組織適合性学会大会, 広島県広島市, 2017年10月27日.
9. Takahiko Miyama, Yasuko Honjo, Takayuki Oda, Mayu Sato, Kiyoto Tanaka, Aoi Sakamoto, Ren Chishaki, Masashi Shibata, Takakazu Kawase, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto. TALEN-mediated T-cell receptor gene editing as a novel tool for adaptive T-cell immunotherapy. 第79回日本血液学会学術集会, 東京都, 2017年10月21日.
10. Yasuko Honjo, Takahiko Miyama, Takakazu Kawase, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Tatsuo Ichinohe. T-cell receptor gene editing by transcription activator-like effector nuclease (TALEN) as a novel tool for adoptive T-cell immunotherapy. The Joint Congress of The 19th International Symposium on Gnotobiology, The 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and The 39th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Tokyo, June 9, 2017.
11. 川瀬孝和, 坂本葵, 樗木錬, 美山貴彦, Masashi Shibata, 田中清人, 北浦一孝, 大島久美, 浜名洋, 岸裕幸, 葛島清隆, 田中秀則, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーと single cell sorting を用いた同種抗原反応性 T 細胞の網羅的解析と高頻度クローンの同定. 第39回日本造血細胞移植学会総会, 島根県松江市, 2017年3月3日.
12. 美山貴彦, 川瀬孝和, 田中清人, 柴田真志, 樗木錬, 坂本葵, 土石川佳世, 森岡健彦, 大島久美, 本庶仁子, 田中秀則, 北浦一孝, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 同種造血幹細胞移植後の末梢血免疫再構築における shared TCR の優位性. 第39回日本造血細胞移植学会総会, 島根県松江市, 2017年3月3日.
13. Takahiko Miyama, Yasuko Honjo, Takakazu Kawase, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Tatsuo Ichinohe. T-cell receptor transgenic primary T cells using TALEN-mediated TCR gene editing as a novel tool to correct immunodeficiency caused by radiation damage. The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science-Scientific Underpinning for restoration from a Radiation Disaster-, Hiroshima, February 21-22, 2017.
14. 川瀬孝和, 美山貴彦, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーと single cell sorting を用いた T 細胞受容体 (TCR) の網羅的解析. 第25回日本組織適合性学会大会, 北海道札幌市, 2016年10月23日.
15. 美山貴彦, 田中清人, 柴田真志, 川瀬孝和, 樗木錬, 坂本葵, 北浦一孝, 大島久美, 浜名洋, 岸裕幸, 葛島清隆, 田中秀則, 鈴木隆二, 一戸辰夫. サイトメガロウイルス反応性 T 細胞レパトワ形成に与える HLA-A*02 の影響の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析. 第25回日本組織適合性学会

大会，北海道札幌市，2016年10月23日。

16. Takahiko Miyama, Takakaza Kawase, Kazutaka Kitaura, Ren Chishaki, Masashi Shibata, Kumi Oshima, Hiroshi Hamana, Hiroyuki Kishi, Kiyotaka Kuzushima, Hiroh Saji, Ryuji Suzuki, Tatsuo Ichinohe. Stem cell memory T-cells are a reservoir of functional T-cells highly shared among individuals. 第78回日本血液学会学術集会，神奈川県横浜市，2016年10月14日。
17. 川瀬孝和，坂本葵，樗木錬，美山貴彦，柴田真志，田中清人，北浦一孝，大島久美，浜名洋，岸裕幸，葛島清隆，佐治博夫，鈴木隆二，一戸辰夫。次世代シーケンサーとsingle cell sortingを用いた同種抗原反応性T細胞の網羅的解析。第20回日本がん免疫学会総会，大阪府大阪市，2016年7月28日。

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：一戸 辰夫

ローマ字氏名：Tatsuo Ichinohe

所属研究機関名：広島大学

部局名：原爆放射線医科学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：80314219

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。