

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07285

研究課題名(和文)細胞ディスプレイ法によるがん特異的TCRの親和性成熟とその創薬への応用

研究課題名(英文)Affinity maturation of cancer-specific TCRs by in vitro cell display methods and their application to drug discovery.

研究代表者

太田 里永子(OHTA, RIEKO)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：30452460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者において、がん組織に特異的ながん抗原が発現しているにもかかわらず、がんに対する抗体価は低く、がんに対する特異的な細胞傷害性T細胞(CTL,キラーT細胞)の頻度は低い。本研究では、日本人の約60%が有しているHLA-A24拘束性のがん抗原特異的CTLクローンの、「293T細胞ディスプレイ法」を用いたin vitroでの親和性の成熟の可能性を示した。また、膜侵襲複合体の形成を誘導する低分子抗体フラグメントscFvを構築できたことから、親和性を成熟させたがん抗原特異的TCRと繋げ合わせた新たな治療薬の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の大多数が有するHLA拘束性のがん抗原を認識するCTLクローンのTCRから、抗原に高親和性のTCRが取得できれば、日本人に適した新たながんのターゲティングが可能になると考えられる。今回、「293T細胞ディスプレイ法」を用いて、一価での親和性が低いTCRについて、高親和性TCRの取得に成功した。今後、この技術が応用され、種々のがん抗原に対する高親和性TCRを用いた薬剤の創製に寄与すると考えられる

研究成果の概要(英文)：In cancer patients, despite the expression of cancer-specific antigens in cancer tissue, serum antibody titers against cancer are low and the frequency of cancer-specific cytotoxic T cells (CTL, killer T cells) is low. In this study, we demonstrated the potential for in vitro affinity maturation of HLA-A24-restricted, which are present in approximately 60% of the Japanese population, cancer antigen-specific CTL clones using the 'method of TCR display system using 293T cells'. We were also able to construct a single chain variable fragment (scFv) that induces the formation of membrane attack complexes. Linking this scFv with high-affinity TCR mutants could lead to the development of new therapeutic reagents.

研究分野：医歯薬学

キーワード：T細胞受容体 親和性の成熟 がん特異的TCR 膜侵襲複合体 補体

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんに対する特異的な細胞傷害性 T 細胞(CTL)の働きは、制御性 T 細胞やがん細胞等に発現している PD-L1 などの制御因子によって抑制されている。免疫チェックポイント阻害剤は多種のがんに有効であり、その効果が長期間持続するなど画期的な治療である。その一方、8割以上の患者には無効であることから、新たな治療法の開発が望まれている。

本研究で着目している T 細胞受容体(TCR)分子は、細胞外抗原しか認識できない抗体と異なり、細胞内の抗原をも認識できるという利点がありながら、がんのターゲティングに利用するという試みは少ない。その理由として、抗原との親和性が低いことが考えられる。抗体と抗原の結合は強力であるのに対して、TCR と主要組織適合抗原(HLA)/抗原ペプチド複合体との結合は比較的弱い(抗体の解離定数 KD は $10^{-9} \sim 10^{-11}$ M に対して、TCR の解離定数 KD は 10^{-4} M $\sim 10^{-7}$ M)。そのため、TCR の抗原認識部位(相補性決定領域, CDR)に遺伝子変異を導入した高親和性の TCR を、患者の自己 T リンパ球に導入して作製した CTL を用いるがん免疫療法は、有望な治療法の一つであると考えられている。唯一、臨床的に成功している TCR は、海外のグループによるもので、がん抗原 NY-ES01 特異的 CTL から単離した TCR 遺伝子に変異を導入し、親和性を増強したものである。しかしながら、この TCR 療法は、すべての日本人に適應するわけではない。人種間でかたよりの多い HLA のハプロタイプが異なれば、HLA が提示しているがん抗原ペプチドも異なり、HLA に対応しない TCR は反応しないからである。それゆえ、日本人に適した HLA/抗原ペプチドに結合する、高親和性 TCR の開発が必要であった。

さらに、がん患者では、たとえばがんに対する CTL を体内で誘導したり、受動的に補ったりしたとしても、CTL を抑制している制御性 T 細胞が優位になっていること、がん細胞に発現している PD-L1 などにより、CTL が抑制されること、加えて 既知の免疫チェックポイント以外の抑制機構が働いている可能性が免疫療法の成功を困難にしている。

これらの問題を解決するため、CTL のがん抗原への高度な特異性を持ちつつ、CTL によらないがん細胞を破壊する新たな薬剤の開発が必要であった。

2. 研究の目的

日本人の大多数が有する HLA 拘束性のがん抗原を認識する CTL クローンの TCR から、抗原に高親和性の TCR が取得できれば、日本人に適した新たながんのターゲティングが可能になると考えられる。TCR の親和性の成熟を *in vitro* で行った報告は、きわめて少なく、ファージディスプレイ法を用いた、イギリスの 1 つのグループからのみである。TCR は、抗体に比べて抗原との親和性が低く、そのため、抗原へのきわめて高精度な特異性があっても、一価での親和性が低い TCR では、ファージディスプレイ法による親和性の成熟は困難である。そこで、今回、ファージディスプレイ法に代わる新たな親和性の成熟方法として、「293T 細胞ディスプレイ法」を考案した。この技術を用いて、がん抗原に対する、一価での親和性が低い TCR について、高親和性 TCR の取得を目指す。

また、新たながん細胞の破壊方法として、膜侵襲複合体 MAC(membrane attack complex)に着目した。MAC は、自然免疫を担っている血清中の補体成分 C5 から C9 の複合体で、細菌や寄生虫などの細胞膜に結合し、穴を開け破壊する。CTL のターゲットの破壊時に、CTL から放出されるパーフォリンに構造的に類似している分子である。本研究では、CTL のがん抗原への特異性をもつ高親和性 TCR と、MAC 形成を誘導する補体制御膜因子阻害剤を繋げ合わせた新たな治療薬を作製し、その機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cDNA の単離および、発現ベクターの構築

HLA-A24 拘束性のがん抗原特異的 CTL クローンから、TCR 遺伝子をクローニングした。ターゲットのがん抗原は、細胞内在性の抗原 hTERT と細胞外抗原の EpCAM を用いた。TCR と TCR の cDNA を単離し、pcDNA3.1 ベクターに組み込んだ。また、T 細胞より CD3 サブユニット の cDNA を単離した。

(2) TCR 遺伝子ライブラリーの構築

TCR 及び TCR の抗原認識部位 CDR に、最大 5 個のアミノ酸にランダムに変異を導入し TCR 遺伝子ライブラリーを構築した。

(3) 293T-CD3 細胞の樹立

pEBMulti-Bsd ベクターに CD3 の 4 つのサブユニットを組み込み、293T 細胞に、遺伝子導入した。

(4) 293T-CD3 細胞ディスプレイ法を用いた高親和性 TCR の親和性の成熟

TCR 遺伝子ライブラリーを 293T-CD3 細胞に導入後、野生型の TCR と比較して、MHC テトラマーに強く結合する細胞集団を、FACS AriaIII でソーティングした。ソーティング後、細胞から TCR との plasmid を回収し、TCR 遺伝子の 2 次ライブラリーとした。ソーティングを数回行い、その後、MHC テトラマーに強く結合する TCR 遺伝子のクローニングを行った。

(5) 高親和性 TCR クローンの配列と機能解析

293T-CD3 細胞ディスプレイ法にて得られたクローンの遺伝子配列を解析した。

TCR が欠損した Jurkat 細胞由来の CD8-J2 細胞に、得られた TCR 遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて導入した。HLA-A24 拘束性の T2 細胞を、hTERT の抗原ペプチドでパルスし、得られた TCR 遺伝子を発現する CD8-J2 細胞と共培養し、IFN- γ の産生を ELISA 法にて検出した。

(6) 補体制御膜因子 CD59 を阻害する抗体を産生する抗体産生細胞より、抗体の cDNA をクローニングし、低分子抗体フラグメント scFv を作成した。発現ベクターに組み込んだ後、COS 細胞に遺伝子導入した。培養上清を回収し、scFv タンパク質の発現及び CD59 に対する結合解析を行った。

4. 研究成果

遺伝子導入効率のよい 293T 細胞をベースに、安定して TCR が細胞表面に発現するためには、CD3 の 4 つのサブユニットが必要である。また、TCR が MHC と反応するときに、補助分子 CD8 が必要である。はじめに、293T 細胞に、CD3 の 4 つのサブユニットの遺伝子と、CD8 の 2 つの遺伝子を、ウイルスベクターを用いて導入し TCR の評価用の細胞を作成した。がん抗原 hTERT に対する野生型の TCR を、293T-CD3 細胞に遺伝子導入したところ、MHC テトラマー試薬で、検出できなかった。一方、293T-CD3-CD8 細胞に導入したところ、MHC コントロールテトラマーでも陽性に反応性を示し、抗原特異的な反応がみられなかった。CD8 は、293T 細胞上に発現させると、非特異的に MHC に結合することが考えられた。この結果から、あえて、293T 細胞に補助分子 CD8 分子を導入しない 293T-CD3 細胞を用いることで、TCR の抗原認識部位（相補性決定領域、CDR）に変異が入り高親和性になったときのみ、MHC テトラマーが反応する系が構築できるのではないかと考えられた。

次に、がん抗原 hTERT と EpCAM に対する野生型の TCR 鎖と鎖の抗原認識部位（相補性決定領域、CDR）に、最大 5 個のアミノ酸にランダムに変異を導入し、TCR 遺伝子ライブラリーを作成した。ライブラリーサイズが、理論的な DNA の多様性に匹敵する TCR 遺伝子ライブラリーが得ることができた。

hTERT-TCR 遺伝子ライブラリーを、293T-CD3 細胞に遺伝子導入し、MHC テトラマー試薬で検出したところ、MHC コントロールテトラマー試薬と比較して、強く染色される集団が鎖の CDR1 と CDR2 のライブラリーに検出された。このことから、hTERT-TCR では、TCR の鎖の CDR1 と CDR2 に抗原とのアフィニティを決定する部分があることが示唆された(図 1)。同様に、EpCAM-TCR では、TCR 鎖の CDR1 と CDR2 に、抗原とのアフィニティを決定する部位があることが示唆された。

次に、hTERT-TCR の鎖の CDR1 又は CDR2 に変異を入れたライブラリーを用いて、ソーティングを 2 回行い、クローニング後、スクリーニングを行った(図 1)。野生型の TCR と比較して、MHC テトラマーに反応性のよいクローンが 34 個取得できた。各ライブラリーで、反応性の最も良いクローンの配列を、野生型の配列に 1 つずつ戻し、どのアミノ酸が重要か検討した。CDR1 では、2A7A の配列が、CDR2 では、2D162 の配列が、MHC tetramer の反応性に重要であることがわかった。

得られた hTERT-TCR の TCR クローンが、TCR として機能的であることを確認するために、CD8-J2 細胞に、得られた TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入した。HLA-A24 拘束性の T2 細胞を、hTERT の抗原ペプチドでパルスし、得られた TCR 遺伝子を発現する CD8-J2 細胞と共培養したところ、野生型の TCR と比較して、抗原ペプチドが低濃度でも IFN- γ の産生が確認できた。このことは、我々の考案した「293T 細胞ディスプレイ法」で、機能的な高親和性の TCR が取得できたことを示している。

補体制御膜因子 CD59 を阻害する抗体を産生する抗体産生細胞より、cDNA をクローニングし、低分子抗体フラグメント scFv を産生する発現ベクターを構築した。COS 細胞に遺伝子導入して、培養上清を回収し、Western blotting により目的のタンパク質を確認できた。また、scFv の反応性を、CD59 発現 CHO 細胞を用いたフローサイトメトリー法にて確認できた。

今回、我々の結果は、日本人の約 60% が有している HLA-A24 拘束性のがん抗原特異的 CTL クローンの、「293T 細胞ディスプレイ法」を用いた in vitro での親和性の成熟の可能性を示した。また、MAC 形成を誘導する抗体の scFv の作成ができたことから、親和性を成熟させたがん抗原特異的な TCR と繋げ合わせた新たな治療薬の可能性を示した。

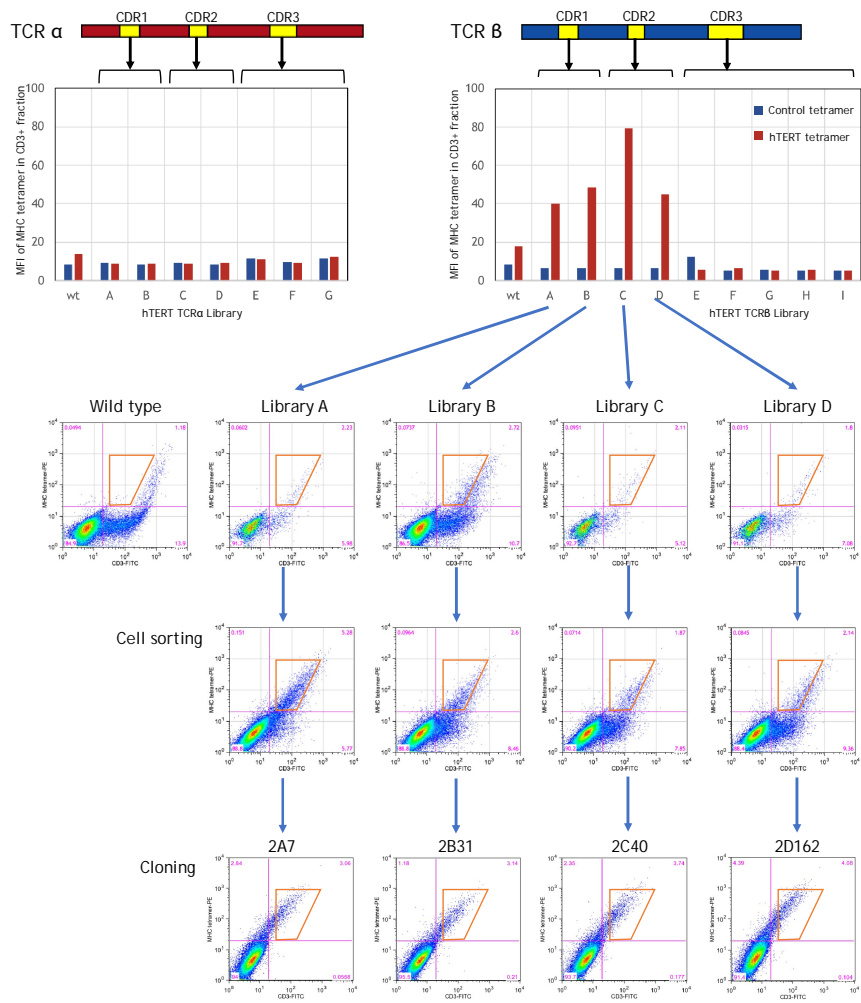


図1 293T細胞ディスプレイ法によるhTERT TCRの親和性の成熟

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohta Rieko, Demachi-Okamura Ayako, Akatsuka Yoshiki, Fujiwara Hiroshi, Kuzushima Kiyotaka	4. 巻 466
2. 論文標題 Improving TCR affinity on 293T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jim.2018.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masaki Imai, Rieko Ohta, Sayuri Yamazaki
2. 発表標題 Expression of complement anaphylatoxin receptor in the various subsets of dendritic cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村 剛至、太田 里永子、山本 博之、今井 優樹、安野 伸浩
2. 発表標題 新規活性型カルボキシペプチダーゼRの一次構造予測
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田里永子、岡村 文子、赤塚 美樹、葛島 清隆
2. 発表標題 ヒト培養細胞を用いたTCR親和性成熟システムの樹立
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	葛島 清隆 (KUZUSHIMA KIYOTAKA) (30311442)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫応答研究分野・分 野長 (83901)	
研究 分担者	今井 優樹 (IMAI MASAKI) (30440936)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師 (23903)	
研究 分担者	岡村 文子(出町文子) (OKAMURA AYAKO) (10546948)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫応答研究分野・主 任研究員 (83901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------