

令和 5 年 7 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19452

研究課題名(和文) MHC交差性T細胞応答の構造生物学的基盤の解明による獲得免疫系の新しい理解

研究課題名(英文) Toward a new understanding of acquired immune system via structural analysis of MHC-crossreactive T cells

研究代表者

一戸 辰夫 (ICHINOHE, TATSUO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：80314219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数のMHC(主要組織適合性抗原)を認識するT細胞群の候補として、同種造血細胞移植後の免疫系回復過程に出現するT細胞受容体(TCR)群の次世代シーケンシングによるプロファイリングを行った。研究に参加した15名の末梢血より約273万種類のTCRを取得し、それらのうち42,436種類(1.5%)は2名以上で共有されていることが判明した。次いで、これらの「共有TCR」のうち、サイトメガロウイルス抗原への特異性を有する76種類の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて得られた知見は、「共有TCR」がMHC交差的(crossreactive)に免疫学的優位性を保有する可能性を示唆するものであり、「単一レセプター単一抗原」に代わる獲得免疫系の新たな理解への道を開くものとして、学術的に重要な意義を有する。また、本研究で開発を行ったTCR遺伝子導入用の非ウイルスベクターはわが国独自の技術による遺伝子改変T細胞医薬品の開発に貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we accumulated approximately 2.3 million T-cell receptor (TCR) beta chain clonotypes from peripheral blood in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). Of these clonotypes, 42,436 (1.5%) were proven to be shared between different recipients. Notably, whole T-cell repertoires of post-HCT recipients were predominated by “shared TCR clonotypes” irrespective of donor-recipient HLA compatibility. As a good example, we also identified two HLA-B7-restricted CMV-reactive TCR clonotypes in the TCR repertoire of HLA-B7-negative recipients. Additionally for in toto analysis of T-cell reconstitution at the individual level, we have created an MHC-partially mismatched zebrafish HCT model and found that predominant TCR clonotypes in post-transplant recipients were substantially different from those in donor graft.

研究分野：血液免疫学

キーワード：T細胞受容体 立体構造 交差反応性 免疫シーケンシング シングルセルゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らのグループは、次世代シーケンサーと単一細胞解析を用いた網羅的な免疫系解析法(網羅的免疫シーケンシング)の開発を行い、抗原応答性の高い T 細胞クローンは、特定の T 細胞亜分画に濃縮されており、それらの相補性決定領域(CDRs)のアミノ酸配列は複数の異なる個人間で共有されていることを発見した[Miyama T, *Sci Rep* 2017;7:3663]。また、極めて興味深いことに、個体の獲得免疫系の再構成が行われる同種造血幹細胞移植後には、これらの「共有クロナタイプ」を発現する T 細胞が他のクローンより優位に回復すること、「共有クロナタイプ」の中には、保有者の HLA に応じて異なる抗原を認識する交差反応性を示すものが存在することを見出した。これらの観察結果は、個体の免疫系は従来考えられていたように、「単一レセプター単一抗原」の原理で担われているのではなく、むしろ T 細胞集団は抗原応答性に関して必ずしも主要組織適合性抗原複合体(MHC)拘束的ではなく、複数の抗原に反応する MHC 交差性の「共有 TCR」群が優位となって構成されている可能性を示唆するものであり、その系統的な実証を行うため、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

主に同種造血細胞移植後レシピエントに由来する末梢血の TCR クロナタイプの網羅的解析を通じて、個体間で MHC に依存せず共有されているものを見出し、それらの生物構造学的特徴および認識抗原を明らかにする。また、「共有 TCR」が移植後レシピエントの免疫系全体における存在頻度を解析し、その免疫学的優位性を検討する。加えて、ゼブラフィッシュを用いた同種造血細胞移植モデルを作成し、これらヒトにおける造血細胞移植で観察された現象の再現性を確認する。

## 3. 研究の方法

MHC 交差性 TCR の候補をスクリーニングするため、研究への参加に同意が得られた延べ 15 名の同種造血細胞移植後患者より移植前、移植 1,2,3,4,6,8 週間後、移植 3,6,12 ヶ月後の 10 ポイントで末梢血 20~30 ml の採取を行った。単核球分画より RNA を抽出した後、adaptor-ligation RT-PCR 法により、TCR $\alpha$  鎖遺伝子(*TRA*)V-J-C セグメントおよび TCR $\beta$  鎖遺伝子(*TRB*)V-D-J-C セグメントの cDNA を調製し、次世代シーケンシング用ライブラリを作成した。アンプリコンのシーケンシングは MiSeq で行い、専用解析プログラム(Repertoire Genesis<sup>TM</sup>)により配列を同定した。この解析により得られた全ての TCR $\beta$  鎖クロナタイプを各患者毎に比較し、2 名以上の患者に検出されるものを「共有 TCR」と定義するとともに、それらの V-CDR3-J データベースを作成した。このデータベースを既存の VDJ データベースや文献的に報告されているクロナタイプと突合し、サイトメガロウイルス(CMV)反応性 TCR を同定した。また、ゼブラフィッシュを用いた造血細胞移植は、事前に MHC クラス I 遺伝子のタイピングを行い、18 プロタイプ以上を共有する組み合わせで行い、前処置には全身放射線照射を用いた。12 個体のレシピエントに移植を行い、3 週間以上生存した個体を対象として、whole kidney marrow 由来 RNA より TRA, TRB 遺伝子の V-CDR3-J 配列を取得した。

## 4. 研究成果

15 名の移植後患者末梢血 T 細胞より TCR $\beta$  鎖クロナタイプ約 273 万種類を取得し、それらのうち 42,436 種類(1.5%)は 2 名以上で共有されていることを見出した。これらの「共有 TCR」の構造学的特徴の解析を行い、使用されている V セグメント・J セグメントには特有の傾向を認

めないものの、「非共有 TCR」と比較して短い傾向があることを発見した。次いで、β鎖の V-CDR3-J クロノタイプの検索データベースを構築し、「共有 TCR」のうち、サイトメガロウイルス抗原への特異性を有する 76 種類を同定した。これらの CMV 反応性「共有 TCR」の CDR3 長も 11~16 残基に分布しており、通常の TCR 群と比較して短い傾向が確認された。特に有力な MHC 交差性 TCR の候補として、共有頻度の高い HLA-B7 拘束性の 2 種類の CMV 特異的クロノタイプが、HLA-B7 非保有者の末梢血にも存在していることを確認した。また、CMV 反応性の「共有 TCR」では、V20-1, V29-1 などの高使用頻度 TRBV セグメントは見られず、V7 ファミリーの頻度が高いなど固有の特徴が存在することが判明した。加えて、今後、エピトープが同定された TCR を遺伝子改変 T 細胞療法に活用するため、任意の TCR カセットをゲノム編集技術を用いてヒト由来 T 細胞に導入する新規技術を開発した（特許取得：一戸辰夫ら，特許番号 7207661）。さらに、T 細胞再構築過程の *in toto* 解析を試みるため、ゼブラフィッシュの MHC 部分不適合個体間で造血細胞移植を行い、移植後の個体において増生する TCR の上位クロノタイプの解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 一戸辰夫	4. 巻 108
2. 論文標題 網羅的免疫シーケンス法の進歩と臨床医学への応用.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本内科学会雑誌.	6. 最初と最後の頁 2347-2355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Ichinohe T, Miyama T, Kawase T, Honjo Y, Kitaura K, Sato H, Shin-I T, Suzuki R.	4. 巻 9
2. 論文標題 Next-generation immune repertoire sequencing as a clue to elucidate the landscape of immune modulation by host-gut microbiome interactions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 668:1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00668.	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 -

1. 著者名 Honjo Y, Ichinohe T.	4. 巻 116
2. 論文標題 Characterization of novel zebrafish MHC class I U lineage genes and their haplotype.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dev Comp Immunol.	6. 最初と最後の頁 103952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2020.103952.	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15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Honjo Y, Ichinohe T.
2. 発表標題 Characterization of novel major histocompatibility complex genes in zebrafish.
3. 学会等名 Nanopore community meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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.
2. 発表標題 In-depth immunosequencing of human stem memory T cell repertoire and its comparison with other memory T cell populations.
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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.
2. 発表標題 Comprehensive T cell receptor (TCR) repertoire analysis of new T cell subsets with naive phenotype.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一戸辰夫, 本庶仁子, 福島伯泰.
2. 発表標題 網羅的免疫シーケンシングによる同種造血細胞移植後のT細胞多様性再構築の解析.
3. 学会等名 第52回日本無菌生物ノートバイオロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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.
2. 発表標題 Mapping of immunoglobulin T-cell exposed motifs during B cell reconstitution after allogeneic HCT.
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Honjo Y, Ichinohe T.
2. 発表標題 Haplotype characterization of novel major histocompatibility complex U genes in zebrafish.
3. 学会等名 London Calling Nanopore Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Honjo Y, Kawase T, Miyama T, Sato H, Suzuki R, Sakuma T, Yamamoto T, Ichinohe T.
2. 発表標題 Platinum TALEN-mediated non-viral T cell receptor gene knock-in facilitates universal T cell genome editing for manufacturing of therapeutic immune cells.
3. 学会等名 The 24th Congress of the European Hematology Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一戸辰夫.
2. 発表標題 造血幹細胞移植におけるHLA関連検査の進歩.
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川瀬孝和, 吉田奈央, 田辺季佐, 小林美咲, 長谷川七穂, 北浦一孝, 鈴木隆二, 一戸辰夫.
2. 発表標題 高い自己複製能とメモリー機能を持つ新たなT細胞サブセットの網羅的T細胞受容体 (TCR) 解析.
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一戸辰夫.
2. 発表標題 網羅的免疫シーケンスによる造血細胞移植後の免疫再構築の解析.
3. 学会等名 第28回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川瀬孝和, 本庶仁子, 土石川佳世, 美山貴彦, 佐藤寛之, 鈴木隆二, 佐久間哲史, 山本 卓, 一戸辰夫.
2. 発表標題 より安全なT細胞免疫療法を目指した遺伝子改変T細胞の作成.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本庶仁子, 一戸辰夫.
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ新規組織適合性抗原クラスI遺伝子の解析.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一戸辰夫.
2. 発表標題 網羅的免疫シーケンシング法による同種造血細胞移植後の免疫再構築の解析.
3. 学会等名 第53回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ichinohe T, Kawase T, Fujino K, Edahiro T, Toishigawa K, Mino T, Yoshida T, Nagoshi H, Fukushima N, Nakamura Y, Kitaura K, Shin-I T, Suzuki R, Homan JE, Bremel RD.
2. 発表標題 Longitudinal analysis of B cell repertoire after allogeneic HCT by comprehensive immunosequencing.
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川志穂, 川瀬孝和, 吉田奈央, 小林美咲, 田辺季佐, 本庶仁子, 土石川佳世, 美山貴彦, 佐藤寛之, 鈴木隆二, 佐久間哲史, 山本卓, 一戸辰夫.
2. 発表標題 TALENによるゲノム編集技術を用いた内在性TCR遺伝子のノックアウト及び目的遺伝子の導入.
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗原特異的受容体遺伝子を環状DNAを用いてT細胞ゲノムに導入する方法	発明者 一戸辰夫, 山本卓, 佐久間哲史, 本庶仁子, 他5名	権利者 国立大学法人広島大学 Repertoire
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-206448	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Platinum TALENを用いたT細胞受容体の完全置換技術	発明者 一戸辰夫, 山本卓, 佐久間哲史, 本庶仁子, 他5名	権利者 国立大学法人広島大学 Repertoire
産業財産権の種類、番号 特許、2018-167954	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	本庶 仁子  (Honjo Yasuko)  (80614106)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師    (15401)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	川瀬 孝和  (Kawase Takakazu)		
研究協力者	山下 和男  (Yamashita Kazuo)		
研究協力者	ジェイン ホーマン  (Jane Homan)		
研究協力者	ロバート プレメル  (Robert Bremel)		
連携研究者	鈴木 隆二  (Suzuki Ryuji)  (70373470)	独立行政法人国立病院機構 相模原病院臨床研究センター・ 病態総合研究部 診断・治療検査室・室長  (82710)	
連携研究者	高木 淳一  (Takagi Junichi)  (90212000)	大阪大学・たんぱく質研究所・教授  (14401)	
連携研究者	有森 貴夫  (Arimori Takao)  (80582064)	大阪大学・たんぱく質研究所・助教  (14401)	

## 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			
米国	ioGentetics			