

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101  
研究種目：若手研究  
研究期間：2021～2022  
課題番号：21K16659  
研究課題名(和文) 抗肉腫ヒト人工T細胞療法に向けたTCR・抗原ペア網羅的解析プラットフォーム開発  
  
研究課題名(英文) Development of the platform of comprehensive analysis of TCR-antigen pairs for adoptive T cell therapy  
  
研究代表者  
村田 憲治(MURATA, Kenji)  
  
札幌医科大学・医学部・特任助教  
  
研究者番号：80722454  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：平滑筋肉腫2症例の切除検体からTILを分離して単細胞レベルでのTCRレパトアと遺伝子発現解析を行なった。いずれもTCRのクローナリティが高いT細胞が存在し、遺伝子発現パターンからそれらは腫瘍を認識している可能性が高い細胞集団であった。複数のTCRを選択し、TCR遺伝子導入T細胞(TCR-T細胞)を各々作成した。自家腫瘍細胞株を樹立できなかったため、肉腫細胞からRNAを抽出して作成したcDNAライブラリーを、患者のHLAを過剰発現させたHEK293T細胞に遺伝子導入し標的細胞を作成した。TCR-T細胞と標的細胞を共培養して免疫応答を確認し、陽性反応の検出を試みている。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部肉腫(以下、肉腫)に対する養子免疫療法の開発は、癌腫と比べて進展しておらず、抗原特異的なT細胞受容体(TCR)遺伝子を導入したT細胞輸注療法は一部の肉腫に対してしか適応していない。肉腫に対する効果的な遺伝子改変T細胞療法の実行化に向けて、肉腫浸潤Tリンパ球(TIL)由来の肉腫反応性TCRが認識する抗原を同定するための新たな解析プラットフォームを開発する。

研究成果の概要(英文)：Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were isolated from resected specimens of two cases of leiomyosarcoma, and TCR repertoire and gene expression analysis were performed at a single-cell level. In both cases, highly clonal T cells were identified and these T cells were likely to recognize the tumor. We selected multiple TCRs and generated TCR-transduced T cells (TCR-T cells) for each of them. Since autologous tumor cell lines could not be established, cDNA libraries were constructed from RNA extracted from the tumor cells. These cDNA libraries were then transfected into HEK293T cells overexpressing the patient's HLA. Subsequently, we co-cultured TCR-T cells with these target cells to confirm immune responses and attempt to detect any positive reactions.

研究分野：骨軟部肉腫、腫瘍免疫学

キーワード：骨軟部肉腫 肉腫抗原 肉腫浸潤Tリンパ球 T細胞受容体

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫を代表とする骨軟部肉腫(以下、肉腫)はまれな悪性腫瘍だが、若年者に発症することが多く、特に化学療法不応例の予後は不良である。肉腫に対する既存の免疫療法の奏効率はいまだ低く、効果的ながん免疫療法を行うためには、治療標的として有効な肉腫抗原と抗腫瘍効果の高いエフェクター細胞が必要である。

申請者らはこれまで、悪性黒色腫の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)より単離されたT細胞受容体(TCR)が腫瘍反応性であることを報告した。これまで肉腫TILからTCRを単離した報告はないが、近年、軟部肉腫に含まれるTILが腫瘍反応性であることも示されており、悪性黒色腫と同様に肉腫TIL由来のTCRも肉腫抗原に対して反応を示す可能性が高い。

しかし、肉腫に発現する特異抗原とそれを認識するTCR遺伝子の報告は少なく、抗原特異的なTCR遺伝子を導入したT細胞輸注療法の適応は滑膜肉腫のみである。肉腫に対する養子免疫療法の適応を広げるために、新たな肉腫特異抗原とそれに反応する抗腫瘍効果の高いTCR遺伝子の同定が必要と考えられる。

## 2. 研究の目的

肉腫に対する効果的な遺伝子改変T細胞療法の実行化に向けて、肉腫TIL由来の反応性TCRを単離して認識抗原を同定する新たな解析プラットフォームを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

骨軟部肉腫の切除片を自動組織分散・破碎装置を用いて分散する。一部は細胞株樹立を目的に培養し、残った分散細胞からセルソーターでTIL(CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>)を分離する。シングルセル解析プラットフォームを用いてTCRライブラリーを調整し、次世代シーケンスによりTCRレパトア解析と遺伝子発現解析を行う。T細胞の活性化マーカーである4-1BB陽性かつPD-1陽性で、クローン性の高いTCR鎖ペア遺伝子の上位ペアを選択し、定常領域をマウスに置換したハイブリッドTCRとして各々の鎖と鎖をP2A配列で連結しpMXレトロウイルスベクターへサブクローニングする。健常人の末梢血Tリンパ球に遺伝子導入しTCR-T細胞を作成する。肉腫cDNAライブラリー導入標的細胞とTCR-T細胞を培養して免疫応答陽性の組み合わせを検出し、抗原・TCRペアの同定を行う。

## 4. 研究成果

平滑筋肉腫2症例の切除検体からTILを分離して単細胞レベルでのTCRレパトアと遺伝子発現解析を行なった。症例No.1においてはTCRのクローナリティが高いT細胞が存在し、上位2つのクロナタイプが全体の50%を占めていた(図1)。遺伝子発現パターンからそれらは腫瘍を認識している可能性が高い細胞集団であった。複数のTCRをレトロウイルスベクターへサブクローニングし、TCR-T細胞を各々作成したところ、導入効率は50%以上であった(図2)。

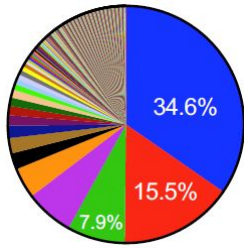


図 1. TCR レパトア解析 (症例 No.1)

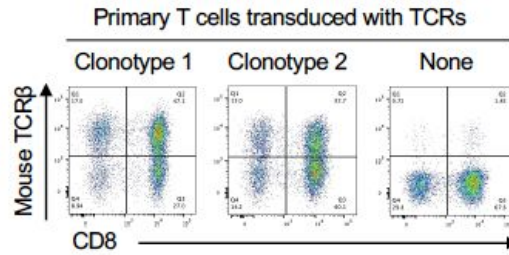


図 2. TCR-T 細胞の作成 (症例 No.1)

自家腫瘍細胞株を樹立できなかったため、肉腫細胞から RNA を抽出して作成した cDNA ライブラリーを、患者の HLA を過剰発現させた HEK293T 細胞へ一過性に遺伝子導入し標的細胞を作成した。TCR-T 細胞と標的細胞を共培養して免疫応答 (4-1BB) を確認したところ、クロナタイプ 1 では HLA-C で、クロナタイプ 2 では複数のアレルで陰性コントロール (ライブラリープール No.68-70) よりも 4-1BB の陽性率が高かった (図 3)。しかし、サイトカイン産性能や脱顆粒マーカー (CD107a) 検出では陽性反応を確認できず、偽陽性という結果であった。

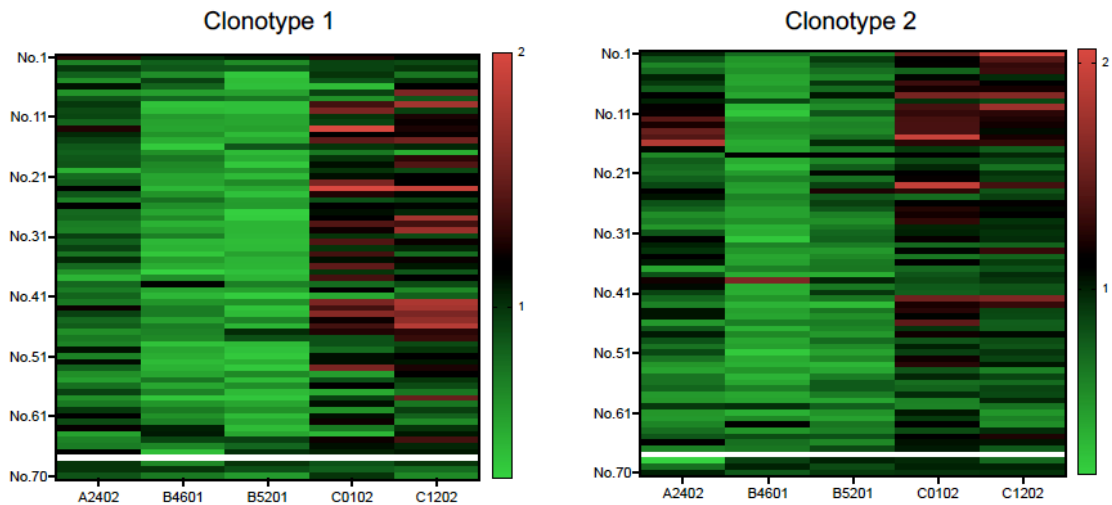


図 3. TCR-T 細胞と cDNA ライブラリー導入標的細胞の反応性評価(4-1BB 陽性率)

今後、cDNA ライブラリーのプール数を増加し、さらに TCR-T 細胞の種類も増やすことで陽性反応を検出する。さらに抗原候補を単一遺伝子へ絞り込み、エピトープの同定を行い、TCR の抗腫瘍効果の検討へと繋げる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------