

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07260

研究課題名（和文）個別化TCR-T細胞療法の実現に向けた腫瘍反応性TCR遺伝子の迅速取得法の開発

研究課題名（英文）Rapid cloning of tumor reactive TCR genes for personalized TCR-T cell therapy

研究代表者

浜名 洋（Hamana, Hiroshi）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：90551549

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：現在、免疫チェックポイント阻害剤、CAR-T細胞療法などが一部のがんで適応可能となっており、がん免疫療法に対する期待が高まっています。そして今後期待されるがん免疫療法の一つとしてTCR-T細胞療法があります。この治療法では、がん特異的TCR遺伝子をT細胞に遺伝子導入して作製したTCR-T細胞を用います。しかし、TCR-T細胞の作製に必要ながん特異的TCR遺伝子の取得には、時間と労力が必要であることが課題でした。本研究ではTCR-T細胞療法に不可欠ながん特異的TCR遺伝子を迅速・簡便に取得する方法を開発しました。この方法を用いることで、TCR-T細胞療法の開発研究が容易になることが期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者から得られたTCR遺伝子が、がん特異的TCR遺伝子であるかを解析するために、従来法ではヒトやマウスから採取した細胞を用いて実験を行っていましたが、それらの細胞の調製には時間と労力が必要でした。そこで、本研究では、簡単に培養できる培養細胞株を用いてTCRの機能を迅速・簡便に解析する方法を開発しました。そして、その方法を用いて、大腸がん患者からネオ抗原（がん細胞特有の遺伝子変異に由来するがん抗原）に特異的なTCR遺伝子の取得に成功しました。従って、本研究の成果は、個別化されたTCR-T細胞療法に有用なTCR遺伝子取得に貢献し、新たながん免疫療法の発展に寄与することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Currently, immune checkpoint inhibitors and CAR-T cell therapy are approved for some cancers, and expectations for cancer immunotherapy are increasing. One of the promising cancer immunotherapies in the future is TCR-T cell therapy. This therapy uses TCR-T cells generated by gene transfer of cancer-specific TCR genes into T cells. However, obtaining the cancer-specific TCR gene required for the generation of TCR-T cells has been a time-consuming and labor-intensive work.

In this study, we developed a rapid and simple method to obtain the cancer-specific TCR gene, which is necessary for TCR-T cell therapy. This method is expected to facilitate the development and research of TCR-T cell therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：T細胞受容体 TCR-T細胞療法 TCR ネオ抗原 ネオアンチゲン がん免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

TCR-T 細胞は遺伝子導入した腫瘍反応性 TCR を介して、がん細胞の HLA とがん抗原ペプチドの複合体(HLA/がん抗原ペプチド)を認識し、がん細胞を傷害する。HLA は個人間で多様性があり、個々の HLA に対応した腫瘍反応性 TCR を取得するのは困難を極める。そのため欧米やアジアでは、その地域で遺伝子頻度の高い HLA-A02 や HLA-A24 からなる HLA/がん抗原ペプチドに限定して TCR-T 細胞療法の開発が行われてきた。

近年、がん患者の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)から、腫瘍反応性 TCR 遺伝子を取得できることが報告されている[1,2]。これらの研究により、TIL 中でクローン性に増殖している活性化 CD8<sup>+</sup>T 細胞の中に、腫瘍反応性 T 細胞が含まれていることが実証され、がん患者の TIL は腫瘍反応性 TCR 遺伝子の有望な遺伝子源であることが明らかとなった。

申請者らは、これまでに、抗原特異的 TCR 遺伝子を取得する画期的な技術 (hTEC10) を開発した[3]。さらに、申請者は科研費(基盤 C)15K06872 の研究において、hTEC10 システムを改良し、極めて短期間に抗原特異的な TCR 遺伝子を取得可能なシステムを構築した[4]。このシステムでは、(1)簡便・高効率に、T 細胞の取得から TCR の cDNA の取得までを最短2日間で行うことが可能になった。(2)TCR の機能評価は、申請者が遺伝子改変した 293T Luc 細胞を用いることで、96 穴細胞培養プレートで TCR の抗原反応性を最短4日間で解析することが可能となった。この技術は、数週間から数ヶ月を要していた従来法に比べ、迅速・簡便に抗原特異的 TCR 遺伝子を取得する画期的な技術である。

## 2. 研究の目的

本研究は申請者が開発した技術を発展させ、WT1 をモデル抗原として個々のがん患者の TIL から患者の HLA に対応した腫瘍特異的 TCR 遺伝子を迅速・簡便に取得できるシステムを開発し、TCR-T 細胞療法の個別化に向けた基盤を確立することを目的とする。そのために、(1)HLA 遺伝子型は限定せず、複数の WT1 陽性がん患者由来の TIL から TCR 遺伝子を取得する。(2)その中から患者の HLA/WT1 由来ペプチドに反応する TCR 遺伝子を迅速に取得する方法を開発する。(3)患者の TIL を取得してから WT1 反応性 TCR 遺伝子を取得するまでを、最短7日間(TCR 遺伝子および HLA 遺伝子の取得に3日間+腫瘍反応性の解析に4日間)で行える方法の開発を目指す。(4)得られた WT1 反応性 TCR 遺伝子を用いて、新たな WT1 ペプチドワクチン候補の創出を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) TCR cDNA の増幅および TAP fragment の合成

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中の PD1+CD137+CD8<sup>+</sup>T 細胞を単一細胞ソーティングし、それらから TCR cDNA の増幅および TAP fragment の合成を実施した。TCR cDNA は One-step multiplex RT-PCR により増幅し、得られた PCR 産物をもとに TAP fragment (遺伝子発現可能な PCR 産物) を PCR 法により合成した[4]。

### (2) TCR 発現 Jurkat レポーター細胞(TCR-Jurkat)の作製

TCR の抗原反応性を解析するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて内在性 TCR $\alpha$ /TCR $\beta$  をノックアウトした Jurkat 細胞(Jurkat $\Delta\alpha\beta$ )に、TCR TAP fragment とルシフェラーゼレポーター遺伝子 pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]プラスミド(プロメガ)をエレクトロポレーションし、TCR-Jurkat 細胞を作製した。

### (3) TMG/HLA 抗原提示細胞の作製

患者腫瘍組織および正常組織の遺伝子解析より、ネオ抗原候補となるアミノ酸変異を選定し、その変異を含むペプチド 27mer を発現する Mini-gene をタンデムに連結した Tandem Mini-gene(TM)G)を作製した。また、遺伝子解析より患者の HLA 型も同定された。次に、TMG 発現プラスミドと患者 HLA cDNA 発現プラスミドを作製し、それらを遺伝子導入試薬を用いて内在の HLA 遺伝子をノックアウトした乳がん細胞株 MCF-7(MCF7 $\Delta$ HLA)へ導入し、TMG/HLA 抗原提示細胞を作製した。

### (4) Luciferase アッセイ

TCR-Jurkat 細胞と TMG/HLA 抗原提示細胞を 16~18 時間共培養後、Steady-Glo Luciferase Assay System(プロメガ)を用いて Luciferase 活性を測定することで TCR の活性化を解析した。

## 4. 研究成果

当初の予定では 293T-Luc 細胞[4]を用いて WT1 特異的 TCR のスクリーニングを進める予定であったが、293T-Luc 細胞には TCR の発現に必要な多数の遺伝子を導入しており、細胞の継代とともにそれらの遺伝子の発現低下がおこり、機能の低下が問題となっていた。そこで、ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞の内在 TCR をノックアウトした Jurkat $\Delta\alpha\beta$  を用いた TCR 機能解析系を構築して研究を進めた。Jurkat $\Delta\alpha\beta$  は継代を重ねても機能低下は見られていない。

また、当初の予定では WT1 を標的抗原として研究を進める予定であったが、より反応性の高い TCR の取得が期待されるネオ抗原へ標的抗原を変更し研究を行った。

### (1)研究結果

#### ① TCR-Jurkat 細胞作製

大腸がん患者 1 名の TIL より TCR の cDNA を増幅し TAP fragment を合成した。TIL 中の PD1+CD137+CD8+T 細胞 90 個を単一細胞ソーティングし、TCR $\alpha$  および TCR $\beta$  の cDNA を増幅し、DNA 配列を解析した。その結果クローン性の T 細胞から 7 種類の TCR $\alpha\beta$  ペアが、非クローン性の T 細胞から 32 種類の TCR $\alpha\beta$  ペアの cDNA が得られた。それらを用いて 39 種類の TCR $\alpha$  および TCR $\beta$  の TAP fragment を作製し(図 1)、Jurkat $\Delta\alpha\beta$  へエレクトロポレーションし、39 種類の TCR-Jurkat 細胞を作製した。

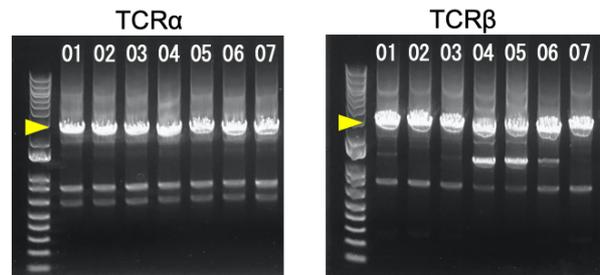


図1 TAP fragmentの合成

7種類のクローン性TCRのTAP fragmentをPCRにより合成した。合成したTAP fragmentの長さを電気泳動で確認した。矢頭で示した長さのバンドがTCRを発現可能なDNAとなる。

#### ② TMG/HLA 抗原提示細胞の作製

患者腫瘍組織の遺伝子解析から同定された変異より、発現量や HLA への結合能に基づいて、40 種類のネオ抗原候補が選別され、10 種類の Mini-gene を連結した TMG を 4 種類作製した(TMGI~TMG4)。また、この患者の HLA 型は、A11:01, A24:02, B51:01, B52:01, C12:02, C15:02 の 6 種類であった。従って 26 種類の TMG と HLA の組み合わせが存在し、全ての組み合わせに対応した 26 種類の TMG/HLA 抗原提示細胞を作製した(図 2)。

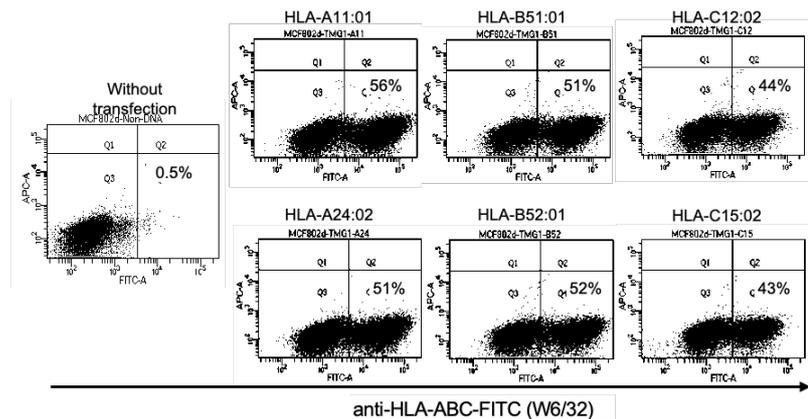


図2 TMG/HLA 抗原提示細胞の作製

TMG1を用いた例を示す。TMG1発現プラスミドと各HLAの発現プラスミドを混合したものを、MCF7 $\Delta$ HLA細胞にトランスフェクションした。48時間の培養後、細胞を回収しHLA-ClassII抗体(W6/32クローン)で染色し、フローサイトメーターによりHLAの発現を解析した。

#### ③ 反応性 TCR の同定

初めに、26 種類の TMG/HLA 抗原提示細胞を TMG ごとに 4 群に分け、群内の 6 種類の TMG/HLA 抗原提示細胞を混合し、TMG1/HLA $\alpha$ 6 細胞群、TMG2/HLA $\alpha$ 6 細胞群、TMG3/HLA $\alpha$ 6 細胞群、TMG4/HLA $\alpha$ 6 細胞群を調整し、これらの細胞群に対して 39 種類の TCR-Jurkat 細胞の反応性を解析した。その結果、TMG1/HLA $\alpha$ 6 細胞群に対して 4 種類の TCR、TCR-01, 04, 64, 83 で反応が見られた(図 3)。

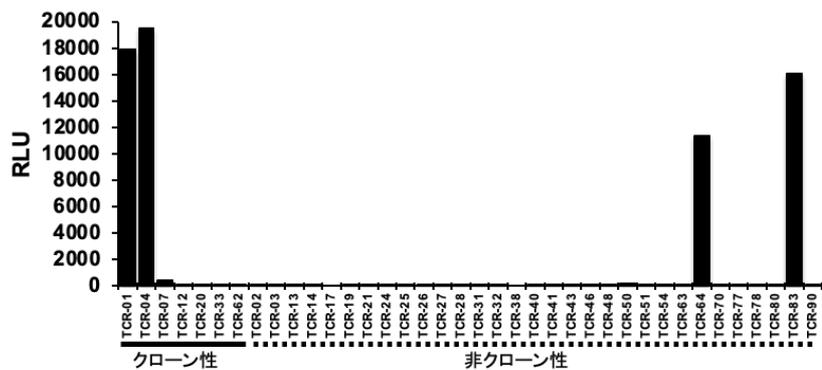


図3 TMG1反応性TCRの解析

TMG1/HLA $\alpha$ 6細胞群(6種類のTMG1/HLA抗原提示細胞の混合細胞)と、各TCRを発現させたTCR-Jurkat細胞を16時間共培養し、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種類と非クローン性TCRの2種類でTCRの活性化が認められた。

#### ④ TCRのHLA拘束性の解析

TMG1 に反応した 4 種類の TCR の HLA 拘束性を決定するために、6 種の TMG1/HLA 抗原提示細胞 (TMG1/A11, TMG1/A24, TMG1/B51, TMG1/B52, TMG1/C12, TMG1/C15) 個々に対する反応性を解析した。その結果、4 種類の TCR の全てが TMG1/A11 への反応性を示し、HLA-A11:01 拘束性に TMG1 へ反応していることが明らかとなった (図 4)。

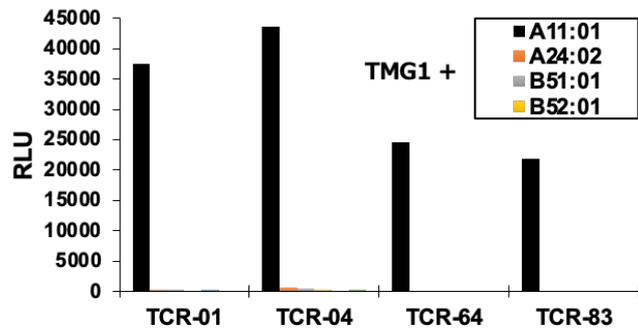


図4 TCRのHLA拘束性の解析

6種類のTMG1/HLA抗原提示細胞と、各TCRを発現させたTCR-Jurkat細胞を16時間共培養し、TCRの活性化をLuciferaseアッセイにより解析した。4種類すべてのTCRがTMG1/HLA-A11:01抗原提示細胞に反応性した。

#### ⑤ 標的ネオ抗原の同定

TMG1 反応性 TCR の標的変異抗原の同定を行った。まず TMG1 を C 末端側から削って短くした抗原に対する TCR の反応性を解析した。その結果、CREBBP、DDX5、DIP2A の 3 つの変異抗原にまで標的抗原が絞り込まれた。次に、変異アミノ酸残基を正常型にもどした 3 種類の TMG1 (CREBBPwt, DDX5wt, DIP2Awt) に対する反応を解析したところ、4 種類全ての TCR において、CREBBPwt に対する応答のみが消失することから、これらの TCR が CREBBP の変異アミノ酸を含んだ抗原に反応していることが明らかとなった (図 5)。

A

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

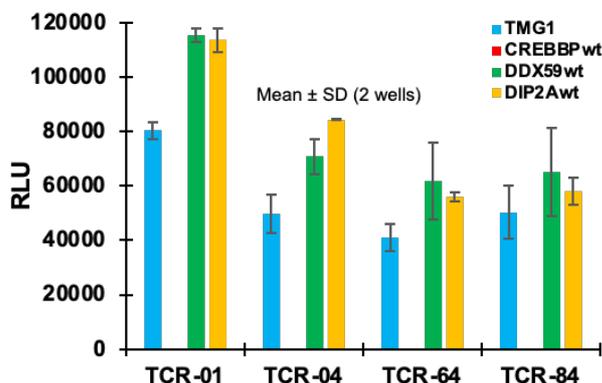
図5 標的ネオ抗原の同定

変異アミノ酸残基を正常なアミノ酸残基に戻したTMG1を用いてTCRの反応性を解析した。

(A) TMGの構成を示している。下線で示したMini geneが正常型のアミノ酸配列となっている。

(B) 4種類のTMG1に対するTCRの反応性を示している。CREBBPwtでのみTCR反応の消失が見られた。

B



#### (2)結論

本研究では、培養細胞を用いて迅速に TCR の機能を解析する方法を開発し、大腸がん TIL に含まれる PD1+CD137+CD8+T 細胞由来の TCR のネオ抗原候補に対する反応性を解析した。その結果、ネオ抗原および、それに特異的な TCR 遺伝子の取得に成功した。本研究で開発された方法により、ネオ抗原の同定やネオ抗原特異的 TCR 遺伝子の取得が、従来法に比べ格段に迅速で簡便となった。

本研究の成果を応用することで、TCR-T 細胞療法に有用な TCR 遺伝子の取得が容易になり、ネオ抗原を標的とした個別化 TCR-T 細胞療法の研究開発の推進が期待される。

#### <引用文献>

- [1] Gros *et al.*, Clin. Invest. 2014
- [2] Parkhurst *et al.*, Clin. Cancer Res., 2017
- [3] Kobayashi *et al.*, Nature Medicine, 2013
- [4] Hamana *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sukegawa Kenta, Shitaoka Kiyomi, Hamana Hiroshi, Kobayashi Eiji, Miyahara Yoshihiro, Fujii Keisuke, Tsuda Kei, Saeki Shiori, Nagata Takuya, Ozawa Tatsuhiko, Saito Shigeru, Fujii Tsutomu, Muraguchi Atsushi, Shiku Hiroshi, Kishi Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Relationship between T cell receptor clonotype and PD 1 expression of tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1580 ~ 1590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201948399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iizumi Susumu, Ohtake Junya, Murakami Naoko, Kouro Taku, Kawahara Mamoru, Isoda Fumiko, Hamana Hiroshi, Kishi Hiroyuki, Nakamura Norihiro, Sasada Tetsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Novel HLA Class II-Restricted Neoantigens Derived from Driver Mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 266 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11020266	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜名 洋、宮原慶裕、祐川健太、下岡清美、小林栄治、小澤龍彦、村口 篤、藤井 努3、珠玖 洋、岸 裕幸
2. 発表標題 Jurkat細胞を用いたTCRのネオアンチゲン反応性解析
3. 学会等名 第24回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜名 洋、下岡清美、祐川健太、佐伯しおり、長田任一哉、小林栄治、小澤龍彦、藤井 努、村口 篤、岸 裕幸
2. 発表標題 患者HLA遺伝子導入乳がん細胞株を用いた乳がん患者TIL中の腫瘍反応性TCRの探索
3. 学会等名 第23回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐川健太、佐伯しおり、下岡清美、浜名 洋、宮原慶裕、小林栄治、長田任一哉、小澤龍彦、藤井 努、珠玖 洋、村口 篤、岸 裕幸
2. 発表標題 腫瘍浸潤CD8+ T細胞におけるPD-1の発現はTCRレパトアに規定される
3. 学会等名 第23回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Hamana, Kiyomi Shitaoka, Kenta Sukegawa, Shiori Saeki, Takuya Nagata, Eiji Kobayashi, Tatsuhiko Ozawa, Tsutomu Fujii, Atsushi Muraguchi, Hiroyuki Kishi
2. 発表標題 Screening of tumor-reactive TCRs from TILs of breast cancer patients using a patients' HLA-transduced breast cancer cell line
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 Kiyomi Shitaoka, Hiroshi Hamana, Atsushi Muraguchi, Hiroyuki Kishi
2. 発表標題 A new epitope is identified derived from envelope protein of an endogenous murine leukemia virus
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 Hiroshi Hamana, Tatsuhiko Ozawa, Eiji Kobayashi, Kiyomi Shitaoka, Atsushi Muraguchi, Hiroyuki Kishi
2. 発表標題 A rapid and simple protocol for cDNA clonig of tumor antigen-specific TCR
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (福岡, 12/10-12/12)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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