

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22699

研究課題名（和文）頭頸部がん治療のパラダイムシフトへの挑戦

研究課題名（英文）Challenge to paradigm shift in head and neck cancer treatment

研究代表者

小笠原 康悦（Ogasawara, Koetsu）

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30323603

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がんの免疫療法において、免疫チェックポイント阻害薬が効果を挙げているが、奏効率が20%程度であり、より効果的な治療法が望まれている。そのためには、がん特異的な免疫反応が必要である。応募者らが開発した第3世代T細胞受容体レパートリー解析技術を用いて、がん特異的T細胞受容体を用いた、新しいがん免疫療法の基盤確立を目的とした。がん特異的T細胞受容体を用いて、これを可溶性とすることにより、標的細胞への結合を検討した。その結果、がん特異的T細胞受容体は、がん特異的に結合できることが判明した。この方法により、がん特異的なT細胞受容体療法が開発できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬の登場で、がんの免疫療法が注目されているが、奏効率が20%程度であり、より効果的な治療法が望まれていた。本研究は、応募者らが開発した第3世代T細胞受容体レパートリー解析技術を用いた、がん特異的T細胞受容体の特定について、遺伝子配列情報の提供だけでなく、実際に、がん特異的T細胞受容体が、がん細胞に結合することを示した点、T細胞受容体のヘテロダイマーを構築する技術を開発した点、可溶性T細胞受容体を作製した点に学術的意義がある。また、可溶性T細胞受容体は、新たながん治療法の開発に道筋をつけるものであり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In immunotherapy, immune checkpoint inhibitors have been effective to tumor, but the response rate is about 20%. Therefore, more effective treatment has been desired. This requires a tumor-specific immune response. Using the third-generation T cell receptor repertoire analysis technology developed by the applicants, I aimed to establish a foundation for a new tumor immunotherapy using tumor-specific T cell receptors. Using a soluble form of tumor-specific T cell receptor, binding to target cells was investigated. Tumor-specific T cell receptors could bind to target cell specifically. This method may lead to the development of new therapy using tumor-specific T cell receptor.

研究分野：免疫学

キーワード：がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの治療法として、外科療法、化学療法、放射線療法が主たる治療法とされてきた。がんの免疫療法は第4の治療法として、古くから進められてきている。がんの免疫療法の歴史は1980年代に、リンホカイン活性化キラー細胞療法 (Lymphokine-Activated killer cell) から始まったと考えられ、細胞傷害活性をもつT細胞やNK細胞を対象に、その活性化を目的として開発されてきた。近年、免疫チェックポイント阻害薬の登場により、免疫療法がにわかに注目を集めている。免疫チェックポイント阻害薬によるキラーT細胞の抑制の解除は、結果として、キラーT細胞の活性化につながり、がんを攻撃できるようになる。このように、T細胞の抑制分子を阻害する免疫チェックポイント阻害剤が効果を挙げているが、現在奏効率が20%程度であり、より効果的な治療法が望まれている。

応募者らは、細胞傷害活性を持つT細胞を特定するために、第3世代T細胞受容体レパートリー解析技術を開発している。T細胞受容体は、 $10^{18}$ 乗もの多様性を有するために、次世代シーケンサーを用いた解析が必要である。血液中やがん局所に存在するT細胞の受容体を解析するためには、PCR法による遺伝子増幅法が必要で、この遺伝子増幅において、いかにバイアスをかけずに増幅するかが、T細胞受容体を決定するために必須となる。応募者らは、「遺伝子特異的非バイアス増幅法」を開発し、ヒト、マウスにおいて、T細胞受容体を網羅的かつ高精度で解析する技術を有している。

### 2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害剤は、現在奏効率が20%程度とされ、より効果的な治療法が望まれている。免疫療法は、T細胞などの細胞傷害性をもつ免疫細胞を活性化することを指標として開発されてきた。免疫療法において、より効果を挙げるためには、がん特異的な免疫反応をおこすことが必要である。本研究は、申請者らが新たに開発した第3世代T細胞受容体レパートリー解析技術を用いて、細胞に「がん特異性」という能力を付与することにより、難治がんを攻撃する新しいがん免疫療法の基盤確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 第3世代免疫受容体解析

可移植性腫瘍を用いて、 $1 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞をマウス皮下に移植した。15日後に、腫瘍周囲組織、脾臓から、リンパ球が存在する部分を採取した。通法により、total RNAを抽出して、その後、cDNA合成を行った。このcDNAをもとに、遺伝子特異的非バイアス増幅法を用いて、library調整を行った後、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。次世代シーケンスは、Miseqシステム (Illumina社製) を用いて行った。

#### (2) 可溶型T細胞受容体の作製

T細胞受容体の塩基配列をもとに、V領域、CDR3領域、J領域の遺伝子配列とイムノグロブリン (Ig) のFc部分を結合したプラスミドを作成した。これを、T細胞受容体 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、それぞれについて作成した。IgFc部分は、Knob into hole法で $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖のヘテロダイマーとして結合できるように工夫した。これら構築したプラスミドを、293細胞へ遺伝子導入して培養することにより、タンパク質の合成を行った。

### (3) フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析には、Ovalbumin (OVA) を発現する E.G7 細胞、あるいは、EL4 細胞に Ovalbumin ペプチド、SIINFEKL を加えた細胞を用いた。可溶性 T 細胞受容体はビオチン化し、Phycoerythrin で蛍光標識した Streptavidin (Streptavidin-PE) を用いて染色し、実験に供した。フローサイトメトリーは、FACS Lyric™ (BDBioscience 社製) を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 可溶性 T 細胞受容体の作製

T 細胞受容体は、B 細胞受容体と同様に、特異性は非常に高い。しかし、T 細胞受容体は、B 細胞受容体に比べ抗原への結合力が低く、抗体のように利用するためには工夫が必要である。そこで、T 細胞受容体の V J 領域と抗体の Fc 部分を結合し、さらに、α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーとなるように工夫した可溶性 T 細胞受容体を作成した。

まず、OVA を認識する T 細胞受容体 α 鎖、β 鎖において、T 細胞受容体とイムノグロブリン Fc 部分との融合タンパク質を作製した。実際の T 細胞受容体と同じ構造にするため、T 細胞受容体 α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーを Knob into hole 法を用いて作製した(図 1)。このプラスミドを 293 細胞に遺伝子導入して、可溶性 T 細胞受容体を作製した。培養上清から、タンパク質の精製を行い、可溶性 T 細胞受容体を作成できているか否かを SDS-PAGE で確認した。図 2 で示されるように、非還元下では、可溶性 T 細胞受容体は約 120kDa、還元下では、60kDa 程度であることが判明した。このことは、α 鎖、β 鎖の単体では、予想通り 60kDa 程度であり、非還元下では、α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーで存在する可能性が高いことが明らかとなった。このことから、α 鎖、β 鎖のヘテロダイマーとなる可溶性 T 細胞受容体を作成する方法を開発することができたと考えられた。

### (2) 可溶性 T 細胞受容体による抗原特異的結合

T 細胞受容体は、MHC と抗原の複合体を認識する。MHC class I に提示される OVA ペプチド特異的 T 細胞受容体の遺伝子配列から、可溶性 T 細胞受容体を作製した。MHC class I を発現する腫瘍細胞 EL4 または、OVA 遺伝子を遺伝子導入して、MHC class I 上に OVA ペプチドが提示される E.G7 細胞を用いて、可溶性 T 細胞受容体が、MHC と抗原の複合体に結合できるか否かを検討した。

図 1 可溶性 T 細胞受容体の作製

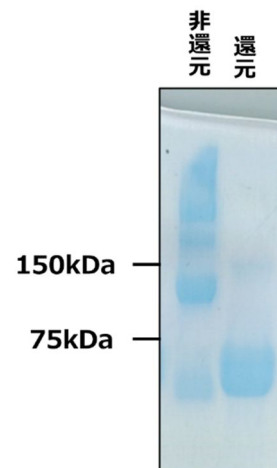
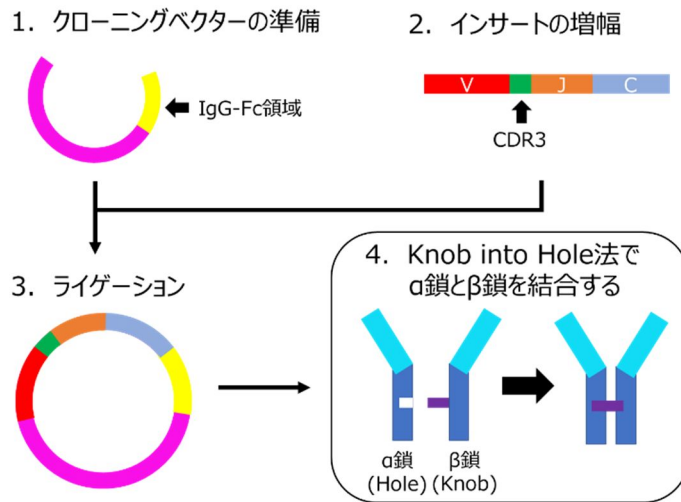
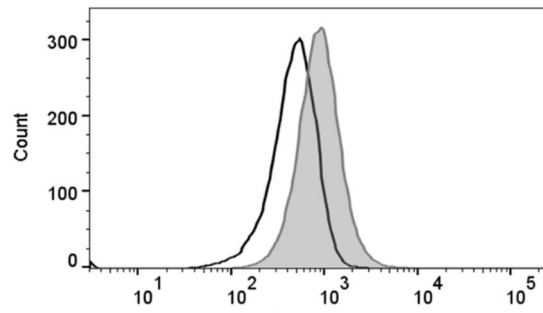


図 2 SDS-PAGE解析

図3で示すように、可溶性T細胞受容体を加えた群では、対照群に比べて明らかに蛍光強度が高くなっていることが判明し、可溶性T細胞受容体はE.G7細胞に結合できることが明らかとなった。また、EL4細胞にOVAペプチドを加えた細胞について、同様の実験を行ったところ、OVAペプチド特異的に結合が認められることが判明した。このことにより、可溶性T細胞受容体は、抗体のように用いることができ、新たながん治療法となる基盤を開発することができた。



**図3 可溶性T細胞受容体を用いた検出**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 霧孝太郎、小笠原康悦
2. 発表標題 可溶性T細胞受容体を用いた検出システムの開発
3. 学会等名 第74回 日本細菌学会 東北支部会学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	霧 孝太郎  (Kotaro Tsuru)	東北大学・医学系研究科・大学院修士1年  (11301)	

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