

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650630

研究課題名(和文)がん治療へ向けた腫瘍特異的T細胞の超迅速検出・取得法の開発

研究課題名(英文)Detection of cancer specific T cells on a chip

研究代表者

岸 裕幸(KISHI, HIROYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：60186210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：がんの特異的な細胞障害性T細胞(CTL)を効率良く見つける方法を開発できれば、がんの免疫療法に寄与することができる。我々は、これまでに、リンパ球がちょうど1個入る大きさ・形状の微小ウェルが約25万個規則正しく配置されたマイクロウェルアレイチップを用いて、チップ上で抗原ペプチド刺激に反応しサイトカインを分泌する細胞を、単一細胞レベルで検出することにより、抗原特異的T細胞を検出するシステムを開発した。本研究をさらに発展させることで、頻度の低い、がん特異的T細胞の検出、TCRの取得などに大きな力を発揮し、がんの免疫療法の発展に寄与できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer-specific cytotoxic T lymphocytes play important roles in cancer immunity. Previously we developed microwell-array chips that have an array of about 250,000 microwells in which only single lymphocytes can be accommodated. In this study, we showed that we could detect antigen-specific T lymphocytes by culturing single lymphocytes in each microwell, stimulating them with antigenic peptides, and detecting their cytokine-secretion on the chip. By retrieving the detected single T lymphocytes, we could amplify TCRalpha/beta cDNAs, insert them in a retrovirus vector with homologous recombination, and examine their antigen-specificity by expressing them on a TCR-deficient T cell line. The whole process can be accomplished within 10 days. The system may greatly contribute to the cancer immunotherapy in the future.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：細胞免疫 細胞チップ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在日本で提供されているがんの免疫細胞療法では、サイトカイン等で非特異的に活性化・増殖させた患者の末梢血リンパ球を利用した治療が主に行われている。この方法では、がんの特異的な細胞障害性T細胞(CTL)の寄与は高くなく、効果もあまり高くない。それに対して、選択的に増殖させたがん特異的CTLを用いる治療、さらには、がん特異的TCR遺伝子を用いたTCR遺伝子治療が高い効果をあげている。がん特異的CTL及びそのTCR遺伝子を利用した治療で問題となるのは、それらの作製が困難なことである。また、がん特異的CTLが個々の患者の主要組織適合抗原(MHC)と適合している必要があるため、その利用はさらに制限される。

(2) 我々は、これまでに、直径10 µmのリンパ球がちょうど1個入る大きさ・形状の微小ウェルが約25万個規則正しく配置されたマイクロウェルアレイチップを用い、各ウェルに1個ずつ生きたリンパ球を入れ(細胞チップ)、チップ上で、抗原特異的抗体産生細胞を単一細胞レベルで効率よく検出し、迅速(1週間以内)に抗原特異的抗体を作製するシステムを開発してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞チップ技術をさらに発展させ、がん特異的T細胞及びそのTCR遺伝子を高効率・迅速(2週間以内)に取得・作製するシステムを開発する。すなわち、がん特異的T細胞を検出するために、細胞チップ上で(1) 抗原ペプチド/MHC class I 4量体及び抗原提示細胞を使わずに抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞を検出する方法を確立する。(2) 単一T細胞からの高効率・迅速なTCR遺伝子の取得法を確立する。(3) 細胞チップを用いて、がん特異的T細胞及びTCRを2週間以内に検出・取得する方法を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 抗原特異的T細胞の細胞チップを用いた超迅速検出法の開発  
マイクロウェルアレイチップを用い、チップ上でT細胞を抗原で刺激し、サイトカインの産生を指標に、単一細胞レベルで、抗原特異的T細胞を検出する、特異性の高い、高効率の方法を樹立する。我々はこれまでにマイクロウェルアレイチップのウェルに1個ずつT細胞を導入し、チップ上で細胞をPMA/ionomycinで刺激することにより、T細胞のサイトカイン産生を単一細胞レベルで検出できる方法を確立している。T細胞は抗原ペプチドを用いて*in vitro*で刺激することにより、サイトカインを分泌するが、抗原ペプチドを取り除くことにより急速にサイトカインを産生しなくなる。したがって、細胞チップ上で、T細胞を抗原ペプチドにて刺激

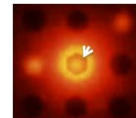
する系を確立する必要がある。そのために以下の2つの方法を検討する。すなわち、(i) MHC class I分子を発現したミセルを作製し、それを用いて刺激する方法、及び、(ii) CD8<sup>+</sup> T細胞自身のMHC class I分子に抗原ペプチドを負荷し、刺激する方法である。この2つの方法の効果を検証するために、H-2K<sup>b</sup> MHC class I分子に結合した卵白アルブミン(OVA)ペプチドを認識するTCRを発現したOT-1 TCRトランスジェニックマウス、及び、H-2D<sup>b</sup> MHC class I分子に結合した雄特異的H-Y抗原を認識するTCRを発現したH-Y TCRトランスジェニックマウスを用いる。

(2) TCRの取得・機能解析最速法の確立  
単一細胞5'-RACE法を用いて単一T細胞からTCR cDNAを増幅し、発現ベクターに組み込む。それをT細胞株で発現させて、抗原特異性、機能の解析までを最短2週間でできる実験系を構築する。機能を解析するためのT細胞株は、理研 斎藤隆らのグループが開発した、TCR欠損T細胞株TG40を用いる。

(3) ヒトにおける抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の細胞チップを用いた取得法の開発  
ヒト抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の検出法を開発する。モデルシステムとして、大半の日本人に不顕性感染していることが知られている、Epstein Barrウイルス、あるいは、サイトメガロウイルスのペプチドを抗原として用いる実験系を採用する。

## 4. 研究成果

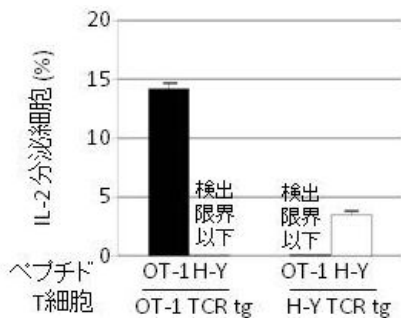
(1) 抗原特異的T細胞の細胞チップを用いた超迅速検出法の開発  
チップ上でサイトカイン産生細胞の検出  
チップ表面に抗サイトカイン抗体をコートし、その後、生きたリンパ球をウェルに添加し、PMA/ionomycinの存在下で培養した。培養後に、蛍光標識抗サイトカイン抗体で分泌されたサイトカインを検出すると上図のように、単一リンパ球が分泌したサイトカインを検出することができた。



抗原ペプチド/MHC class I 4量体を用いた抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の検出  
上記実験で、PMA/ionomycinの代わりに、抗原ペプチド/MHC class I 4量体を用いて、サイトカイン分泌細胞を単一細胞レベルで検出できるかを検討した。OT-1 TCRトランスジェニックマウスのT細胞をチップに播種し、OVAペプチド(OT-1p)が結合したH-2K<sup>b</sup>分子の4量体を用いて細胞を刺激した。その結果、OT-1p/H-2K<sup>b</sup> 4量体刺激特異的にサイトカイン分泌細胞を検出することができた。

抗原ペプチドを用いた抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の検出

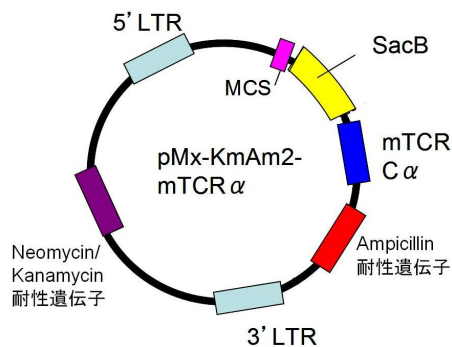
CD8<sup>+</sup> T細胞に抗原を提示するMHC class I分子はCD8<sup>+</sup> T細胞の細胞表面にも発現している。CD8<sup>+</sup> T細胞の細胞表面のMHC class I分子に抗原ペプチドを結合させ、同一細胞表面上に発現しているTCRを介して、T細胞を活性化できるかを検証した。この実験と同様にOT-1 TCRトランスジェニックマウスのT細胞をチップに播種し、OT-1pをチップに添加した。その結果、OT-1p刺激特異的にサイトカインの分泌を誘導することができた。また、抗原ペプチド特異性を調べるために、H-Y TCRトランスジェニックマウスのT細胞も用いて検討した。その結果、下図に示すように



OT-1pはOT-1 TCRトランスジェニックマウスのT細胞を、H-YpはH-Y TCRトランスジェニックマウスのT細胞をそれぞれ特異的に活性化し、サイトカインの分泌を誘導した。この結果より、チップ上で抗原特異的にCD8<sup>+</sup> T細胞を活性化できることが示された。

#### (2) TCRの取得・機能解析最速法の確立

単一T細胞より増幅・回収したTCR cDNAが抗原特異的であるかどうかを迅速に検証するために、増幅したTCR cDNAを相同組換え法を使って、レトロウイルスベクターに導入するためのベクターを作製した。(下図)

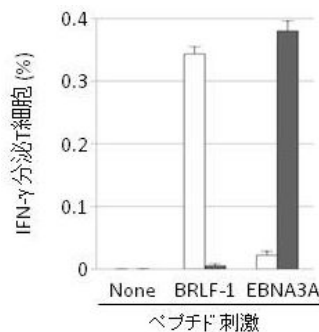


その結果、TCR cDNAを増幅して、上記レトロウイルスベクターに相同組換えし、組換えレトロウイルスを作製し、TCRを発現していないTG40 T細胞に遺伝子導入し、取得したTCRを発現させ、その抗原特異性を検証するまでを、最短10日間で行うことができた。

#### (3) ヒトにおける抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の細胞チップを用いた取得法の開発

ヒト抗原特異的T細胞を細胞チップ上で検出し、そのTCRを取得できるかを検証するために、日本人の大部分の健康人に不顕性感染

しているEpstein Barr (EB) ウイルス特異的なT細胞をチップ上で検出できるか検討した。すなわち、予め、EB ウイルス由来ペプ



チド(BRLF-1およびEBNA3A)がHLA-A24分子に結合した4量体を使い、末梢血中にEBウイルス特異的CD8<sup>+</sup> T細胞を検出できる健康人より、末梢血リンパ球を調製し、チップに播種した。チップ上で、BRLF-1ペプチドおよびEBNA3Aペプチドで刺激したところ、マウスリンパ球と同様に、ペプチド刺激特異的に、サイトカインを分泌するTリンパ球を検出することができた。チップ上で検出した抗原特異的T細胞の出現頻度は、抗原ペプチド/MHC 4量体を用いて検出した抗原特異的T細胞の出現頻度とほぼ同じであった。さらに、がん抗原であるα-fetoprotein (AFP) 由来ペプチドを用いて、AFPペプチド刺激特異的にサイトカインを分泌するCD8<sup>+</sup> T細胞をチップ上で検出することができた。さらに、検出したT細胞から(2)の方法でTCRを回収することができた。

#### (4) まとめ

細胞チップを用い、チップ上で抗原ペプチド刺激に反応しサイトカインを分泌する細胞を、単一細胞レベルで検出することにより、抗原特異的T細胞を検出することができた。現在、回収したT細胞からのTCR cDNAの増幅効率が悪く、今後改善していく必要がある。また、当初抗原特異的CD4<sup>+</sup> T細胞もチップ上で検出できるようにしようとしたが、うまく検出できなかった。これも今後の課題である。細胞チップを用いた、抗原特異的T細胞の検出は、抗原ペプチド/MHC 4量体を用いた検出法に比べて、バックグラウンドノイズが低く、TCR cDNAの増幅効率が改善すれば、頻度の低い、がん特異的T細胞の検出、TCRの取得などに大きな力を発揮すると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8件)

Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Horii M, Hamana H, Nagai T, Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 444: 319-324, 2014.

doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.049.  
Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 査読無 3:e27258, 2014. doi: 10.4161/onci.27258  
Ikeda M, Tsuno S, Sugiyama T, Hashimoto A, Yamoto K, Takeuchi K, Kishi H, Mizuguchi H, Kohsaka S, Yoshioka T. Ca<sup>2+</sup> spiking activity caused by the activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels mediates TNF- $\alpha$  release from microglial cells under chronic purinergic stimulation. *Biochim Biophys Acta*. 査読有 1833: 2573-2585, 2013. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.022.  
Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nat Med*, 査読有 19:1542-1546, 2013. doi: 10.1038/nm.3358.  
Ohnaga T, Shimada Y, Moriyama M, Kishi H, Obata T, Takata K, Okumura T, Nagata T, Muraguchi A, Tsukada K. Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells. *Biomed Microdevices*. 査読有 15:611-616, 2013. doi: 10.1007/s10544-013-9775-7.  
Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Zhou Y, Sakurai H, Andoh T, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. *PLoS One*. 査読有 7(12):e52383, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0052383.  
Sun X, Saito M, Sato Y, Chikata T, Naruto T, Ozawa T, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Takiguchi M. Unbiased Analysis of TCR $\alpha/\beta$  Chains at the Single-Cell Level in Human CD8<sup>+</sup> T-Cell Subsets. *PLoS One*. 査読有 7: e40386. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0040386.  
Ozawa T, Horii M, Kobayashi E, Jin A, Kishi H, and Muraguchi A: The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C $\beta$  antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有 422: 245-249, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.134.

[学会発表](計 8件)

Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Kobayashi E, Ozawa T, Muraguchi A. *Cis*-interaction of TCR and antigenic

peptides with MHC class I molecules on a CD8<sup>+</sup> T-cell. 第 42 回日本免疫学会学術集会; 2013 Dec 11-13; 千葉.

岸 裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 浜名 洋, 長井輝美, 中河秀俊, 金 艾順, 金子周一, 村口 篤. 末梢血リンパ球中の抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞および T 細胞受容体の網羅的・迅速解析. 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会; 2013 Aug 24; 名古屋.

Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Nagai T, Muraguchi A. Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; Milan.

Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Nagai T, Muraguchi A. Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. Measuring Antigen-Specific Immune Responses (MASIR) 2013; 2013 May 29-Jun 1; Dubrovnik.

岸 裕幸, 金 艾順, 小林栄治, 小澤龍彦, 浜名 洋, 村口 篤: Detection of antigen-stimulated cytokine secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸.

Kishi H, Obata T, Takami S, Kazui M, Ogawa A, Ozawa T, and Muraguchi A: Analysis of cellular responses at single cell levels with a hybrid magnetic microwell array chip. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012, 11, 27-28, Kyoto.

岸 裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 金子周一, 村口 篤: がんの TCR 遺伝子治療にむけた候補 TCR 遺伝子の迅速クローニング法. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19-21, 札幌.

Kishi H: A direct T cell receptor cloning system from single human primary T cells confers the candidate for prospective gene therapy. Gordon Research Conference 'Immunochemistry & Immunobiology', 2012, 6, 10-15, Les Diablerets, Switzerland.

[図書](計 1件)

Kishi H, Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, and Muraguchi A: Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Single Cell Analysis, Methods in Molecular Biology* 853, editors, Lindström S. and AndersonSvahn H., 141-150, Humana Press, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 6件)

名称：TCR cDNA の増幅方法  
発明者：浜名洋，岸 裕幸，村口 篤，  
下岡清美  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：未定  
出願年月日：2014年5月30日  
国内外の別：国内

名称：抗原特異的T細胞受容体の取得方法  
発明者：小林栄治，岸 裕幸，村口 篤  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-007576  
出願年月日：2014年1月20日  
国内外の別：国内

名称：T細胞受容体のクローニング方法  
発明者：村口 篤，岸 裕幸，小林栄治，  
小澤龍彦  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2014/52950  
出願年月日：2013年7月24日  
国内外の別：国外

名称：T細胞の刺激方法およびその利用  
発明者：岸 裕幸，村口 篤，浜名洋，  
小林栄治，小澤龍彦  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2013/056076  
出願年月日：2013年3月6日  
国内外の別：国外

名称：T細胞受容体の抗原同定法および  
同定用レポーター細胞  
発明者：岸 裕幸，村口 篤  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-023710  
出願年月日：2013年2月8日  
国内外の別：国内

名称：T細胞受容体のクローニング方法  
発明者：村口 篤，岸 裕幸，小林栄治，  
小澤龍彦  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特願 2012-16444  
出願年月日：2012年7月25日  
国内外の別：国内

○取得状況(計 1件)

名称：外来遺伝子導入用ベクター及び外  
来遺伝子が導入されたベクターの製造方  
法

発明者：堀井雅恵，岸 裕幸，小林栄治，  
小澤龍彦，村口 篤  
権利者：国立大学法人富山大学  
種類：特許  
番号：特許 5246904  
取得年月日：2013年4月19日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岸 裕幸 (KISHI, Hiroyuki)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
准教授  
研究者番号：60186210

### (2)研究分担者

村口 篤 (MURAGUCHI, Atsushi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授  
研究者番号：20174287

小澤 龍彦 (OZAWA, Tatsuhiko)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教  
研究者番号：10432105

小林 栄治 (KOBAYASHI, Eiji)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教  
研究者番号：70459733

### (3)連携研究者

金子 周一 (KANeko, Shuichi)  
金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・  
教授  
研究者番号：60185923

水腰 英四郎 (MIZUKOSHI, Eishiro)  
金沢大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90345611