

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670463

研究課題名(和文)アレイ技術革新による感染症と癌の克服への新たな挑戦：hTEC10の開発

研究課題名(英文)Challenge the infectious diseases and cancers using innovative array technology:  
Development of hTEC10

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに単一ヒトBリンパ球から抗体遺伝子を迅速に単離する技術を確立した。本研究では、その技術を応用して、ヒトの末梢血T細胞から抗原特異的T細胞を検出し、その単一細胞からT細胞受容体(TCR)を効率良く単離し、得られたTCRの機能を、特別なT細胞株を用いて迅速に評価できる「ヒトT細胞受容体迅速システム」(hTEC10:human T cell receptor Efficient Cloning within 10 days)を確立した。このシステムを用いて、肝細胞がん患者の末梢血から高いキラー活性を持つTCRを複数取得し、がんや感染症のTCR遺伝子治療への道を開いた。

研究成果の概要(英文)：We developed a rapid and efficient antibody gene cloning system from a human single B lymphocyte. In this study, by applying the system to T cell receptor, we have developed a rapid and efficient T cell receptor cloning system (hTEC10: human T cell receptor efficient cloning within 10 days), in which we are able to detect an antigen-specific T cells, to clone efficiently TCR-alpha and TCR-beta chain from a single T cell, and finally evaluate the function of T cell receptor by examining reactivity of specialized T cell line (TCR negative cell line). All of the process can be done within 10 days. Using this hTEC10 system, we have been successful in cloning the functional TCRs with high killer activity from peripheral blood lymphocytes of patients with hepatocyte cell carcinoma. This system may contribute TCR gene therapy of infectious diseases as well as various cancers.

研究分野：免疫学

キーワード：感染症 癌治療 リンパ球チップ 抗体 T cell receptor

## 1. 研究開始当初の背景

近年、インフルエンザウイルス、HIV、赤痢菌、ピロリ菌などの新興・再興感染症、日和見感染症、潜伏感染症、さらには天然痘などの細菌兵器が、人類にとっての新たな脅威となっている。人的交流のグローバル化、高齢化、地球温暖化等のさまざまな要因により、感染症は今後ますます深刻化することが懸念される。また、依然として癌に対する根治的治療法はなく、癌による死亡率は年々増加している。

我々は、1個のリンパ球を直径 10  $\mu\text{m}$  のマイクロチップに補填し、それを回収し、単一細胞の遺伝子解析、特に抗体遺伝子解析ができる画期的なシステム「リンパ球チップ」の構築に世界で初めて成功した (Yamamura S. et al. *Analytical Chemistry*, 2005)。さらにこのリンパ球チップを用いて、ヒト抗原特異的 B 細胞の同定とヒトモノクローナル抗体の迅速作製法 (ISAAC 法) を確立した (Jin A. et al, *Nature Medicine*, 2009, Jin A. et al, *Nature Protocols*, 2011)。そして、ISAAC 法を用いて、ワクチン接種されたヒト末梢血から B 型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルスに対する強力な中和活性を有する多数のヒトモノクローナル抗体を極めて短時間 (7 日以内) に作成することに成功した (Tajiri K. *Antiviral Res.* 2010, Ozawa et al. *Antiviral Res.* 2011)。

ISAAC法は、1週間でヒトモノクローナル抗体を末梢血B細胞から効率良く作成できる画期的なシステムであり、世界の研究機関や抗体製薬企業等から注目されている。この萌芽研究では、ISAAC技術を細胞性免疫の中心的役割を担う T 細胞受容体 (TCR) の取得技術に応用し、T 細胞受容体を迅速 (10日間) に単離するシステム (*hTEC10: human TCR efficient cloning 10 days*) を確立し、ウイルス感染症や癌に対する未来型細胞性免疫治療法の基盤技術の創成に挑戦する。

現在、抗原特異的リンパ球を検出するためには、フローサイトメトリーや磁気ビーズを用いる方法があるが、低頻度の抗原特異的リンパ球を検出することは不可能である。ISAAC 法 (抗体産生細胞検出システム) を用いると、極めて低頻度 (0.01%以下) の抗原特異的 B リンパ球を、ヒト末梢血から直接検出でき、抗体を用いた診断薬や医薬の開発に飛躍的な貢献が期待できる。現在までの実績として、ISAAC 法でワクチン接種後のヒト末梢血から得たインフルエンザウイルスや肝炎ウイルスに対するヒトモノクローナル抗体が海外で臨床応用の候補となっている。

本研究は、ISAAC法を改変し、感染性病原体やがん細胞に対する抗原特異的ヒト T 細胞受容体 (TCR) を迅速に単離するシステム (hTEC10) を確立し、患者の多数の TCR 分子を自在に用いた新たな免疫遺伝子治療に挑戦するものであり、国際的に極めて特色ある独創性の高い研究である。研究成果は感染症、癌などの次世代型細胞免疫遺伝子療法の開発につながり、人類の健康と福祉に大きく貢献できると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究は、我々が開発した「リンパ球チップ」という革新的なリンパ球単離技術を基盤として、感染症患者や癌患者の血液や組織から、病原菌や癌特異的ヒト T リンパ球を効率良く同定し、T 細胞受容体 (TCR) を迅速 (10日以内) に単離し、感染症と癌に対する未来型細胞性免疫遺伝子治療法の基盤技術 (hTEC10 法) を開発し、臨床に応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗原特異的 T 細胞の単一細胞の迅速検出法 (T-ISAAC) の基盤の確立

抗原である MHC/ペプチド五量体 (MHC/p) を T 細胞へ結合させ、セルソータを用いて単

一細胞を分離する方法、抗原でリンパ球を刺激しサイトカインの産生を指標にセルソータを用いて単一細胞を分離する方法、抗原でリンパ球を刺激しサイトカイン産生を細胞チップを用いて検出し、単一細胞を分離する方法 (ISAAC 法の応用: T-ISAAC) を確立する。

については、これまでに直径10 $\mu$ m のウェルに1個ずつ細胞を導入し、チップ上で細胞をホルボール 13- ミリスタート 13-アセタート/イオノマイシンで刺激することにより、23万個の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すでに確立している。T細胞は抗原ペプチドを用いてin vitro で刺激するとサイトカインを分泌するが、抗原ペプチドを取り除くと急速にサイトカイン産生が消失する。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、MHCクラス分子を発現したミセルを作製し、チップ内で刺激する方法、CD8<sup>+</sup>T細胞自身のMHCクラス分子に抗原ペプチドを負荷し、チップ内で刺激する方法の2つの方法について検討する。

これら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および H-2D<sup>b</sup> MHC クラス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。細胞チップを用いた解析法は、サイトカイン分泌のシグナルを非特異的なノイズと簡単に識別できるため、シグナルを非常に正確にかつ高感度で検出することが可能となり、検出感度は飛躍的に良くなると期待される。

## (2) 単一T細胞からの TCR 遺伝子を効率良く取得する方法の確立

単一T細胞からの TCR 遺伝子増幅は RT-PCR

法によるが、RT-PCR を行うためには TCR 5' 側の特異的プライマーを設計する必要がある。TCR 5' 側は約 50 種類以上の配列があるため最適なプライマーの設計が困難であった。本研究では、当教室で開発した単一細胞 5' -RACE 法 (Ozawa T, *BioTechniques*, 2006) を応用し、TCR 遺伝子を増幅する方法を確立する。一般的に単一細胞からの TCR 遺伝子を単離できる確率は 1/10 以下である。そこで、この困難を克服するために、T細胞をあらかじめインターロイキン2とフィトヘマグルチニンで活性化しておき、RT-PCR を行うと増幅率が飛躍的に上がる可能性がある。あるいは、前もって目的の単一細胞を CFSE で標識し、非特異的 T細胞と共培養することで、活性化された目的の CFSE 陽性細胞を取得する。

## (3) 取得 TCR の機能解析法の確立

取得した TCR の機能を解析することを目的として、増幅した TCR 遺伝子を相同組換え法により発現ベクターに組み込み、レトロウイルスを用いて TCR 欠損の T細胞株 (TG40) に TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ 遺伝子を導入し、TCR/CD3 分子を膜に発現させる。TG40 には、あらかじめ、ヒト/マウスの CD4 あるいは CD8 遺伝子を導入しておく。次に、TCR 導入 TG40 細胞を、ペプチドを発現させた抗原提示細胞あるいは MHC/ペプチドで刺激し、活性化マーカー CD69 の発現を FACS で測定、あるいは IL-2 産生能を ELISA で測定することで、TCR の機能を解析する。

この解析法が可能になれば、抗原特異的 T細胞の検出から、TCR 遺伝子の取得・機能検証までを全体として 10 日間以内で行える画期的なシステムが確立される。

## (4) 可溶性 TCR 作製法の確立

TCR は抗体と同様に抗原に特異的に反応するが、抗体と異なり膜型蛋白であるために、T細胞に発現させる形でしか扱うことができない

い。それを可溶化型にすることでモノクローナル抗体と同様に病変部位の検出や治療に応用できる可能性がある。そこで、sTCR (V領域とC領域を含む2量体)とscFv-TCR(単鎖可変領域からなる1量体)のTCR遺伝子を構築し、この遺伝子を大腸菌あるいはCHO細胞などに発現させ、可溶化TCRを得る。この研究で生じうる問題点は、ベクターを大腸菌で発現させた場合、可溶化型TCRの構造が不安定であることである。そのため、膜型TCR(GPIアンカー型)をCHO細胞等に発現させた後に、細胞からPLCで切り離すなどの工夫が必要である。

#### (5) HIV特異的TCRあるいは癌特異的TCRの迅速作製と治療への応用

エイズウイルスに対する細胞性免疫治療の報告は少ない。本研究遂行のために、アメリカ国立感染研究所(NIH)と共同研究を行う。具体的には、患者検体(HIV感染者でエイズ未発症者)の提供などで共同研究を行う。方法は、患者よりリンパ球を採取し、エイズウイルス特異的T細胞をT-ISAAC法を用いて検出し、TCRを取得し、特異性およびCTL活性を解析する。NIHにて、エイズの治療に応用すべく研究を進めていく。

また、金沢大学(金子研究室)では、肝臓がんを中心にペプチドワクチン療法を進めている。金沢大学と共同し、効果が確認された患者よりリンパ球を採取し、ペプチドワクチン特異的T細胞をT-ISAAC法を用いて検出し、TCRを取得し、抗原特異性およびCTL活性を上記(4)の方法で解析する。金沢大学(水腰研究室)にてがんの治療に応用すべく研究を進めていく。

## 4. 研究成果

### (1) T-ISAAC法の基盤の確立

MHCクラスI分子を発現したミセルを作製し、チップ内で刺激する方法は、均一サイズ

のミセルの作製に困難が生じた。不均一な状態で、チップ内の抗原特異的T細胞を刺激したが、コントロールに比較して特異的なスポットは得られなかった。

そこで、マウスの系で、H-2Kb MHC class I分子に結合した卵白アルブミン(OVA)ペプチド特異的TCRを発現したOT-1 TCRトランスジェニックマウスおよびH-2Db MHCクラス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て、リンパ球チップで、ペプチド刺激によるサイトカイン産生を検出した結果、ペプチド特異的、濃度依存的にスポットを検出できた。

次に、シングルT細胞を回収し、TCR遺伝子を解析することができた。これまで、当教室で開発した単一細胞5'-RACE法(Ozawa T, *BioTechniques*, 2006)遺伝子の増幅率の低さが課題であったが、今回、新しい増幅術の開発(ONE STEP RT-PCR法)により増幅率を格段にあげることが可能となった。約80%の単一細胞からTCR/TCR遺伝子を増幅することが可能となった。

次に、ヒト健常人のEBV潜伏感染者の末梢血CD8陽性Tリンパ球をEBVペプチドでチップ内で刺激した結果、ペプチド特異的にスポットを検出することができた。シングル細胞からTCR遺伝子を解析した結果、ペプチド特異的TCR候補を多数、獲得できた。すなわち、T-ISAACの基盤が確立できた。

### (2) 抗原特異的T細胞の単一細胞の迅速検出法(hTEC10法)の確立と臨床での検証

我々の単一細胞の遺伝子単離技術の基盤を応用し、MHC/ペプチド五量体(MHC/p)をT細胞へ結合させ、セルソータを用いて単一細胞を分離し、単一細胞から、5'-RACE法を用いてTCR/TCR遺伝子を効率良く増幅し、得られたTCR機能を細胞株等を用いて短期間に解析するシステム(hTEC10)の確立を目指

した。その結果、次に述べる2つの研究成果を得た。

ヒトのEBV特異的TCR遺伝子を相同組換え法により発現ベクターに組み込み、TCR欠損CD3陽性CD8陽性T細胞株(変異TG40)にEBV特異的TCR/CD3分子を細胞表面に発現させた。次に、TCR導入変異TG40細胞を、EBVペプチドを発現させた抗原提示細胞あるいはMHC/ペプチドテトラマーで刺激し、活性化マーカーCD69の発現をFACSで測定、同時にIL-2産生能をELISAで測定した。その結果、EBVペプチド特異的にEBV特異的TCRを発現させたTG40変異細胞にCD69が発現し、またIL-2産生が見られた。このように、抗原特異的T細胞の検出からTCR遺伝子の取得・機能検証までを全体として10日間以内で行える画期的なhTEC10システムを確立できた。

次に、金沢大学(金子研究室)との共同により、hTEC10システムを用いて、肝細胞がん患者の末梢血T細胞からフェトプロテイン(AFP)特異的TCRの取得を行った。ペプチドワクチン療法で効果が認められた肝細胞がん患者の末梢血T細胞を得て、AFPペプチド・MHCテトラマーに反応するT細胞からTCR遺伝子を単離し、我々が確立したhTEC10法で機能を解析した。

その結果、数個のペプチドワクチン特異的TCRを獲得できた。次に、このTCRを末梢血T細胞に遺伝子導入してTCRを発現させ、AFPペプチドを負荷した抗原提示細胞を標的として細胞傷害活性(キラー活性)を測定したところ、ペプチド特異的にキラー活性を認めた。

このことは、hTEC10システムにより、がん患者からキラー活性を持つTCRを極めて短期間に取得できることを実証したものであり、がんのTCR遺伝子治療への道を開くものとして注目すべき成果である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, Hu C, Yi W, Liu D, Khadem F, Okwor I, Jia P, Shitaoka K, Wang S, Ndao M, Petersen C, Chen J, Rafati S, Louzir H, Muraguchi A, Wilkins JA, Uzonna JE. Identification of broadly conserved cross-species protective Leishmania antigen and its responding CD4+ T cells. *Sci Transl Med*. 2015, 7(310), 310ra167. 査読有. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5477.

Mizukoshi E, Nakagawa H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Fushimi K, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Kaneko S. Immunological features of T cells induced by human telomerase reverse transcriptase-derived peptides in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2015, 364(2), 98-105. 査読有.

DOI: 10.1016/j.canlet.2015.04.031.

Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nakagawa H, Jin A, Lin Z, Muraguchi A. A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 453(4), 798-803. 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.024.

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*. 2014, 444(3), 319-24. 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.049.

Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H,  
Ozawa T, Hamana H, Nagai T,  
Nakagawa H, Jin A, Kaneko S,  
Muraguchi A. A new cloning and  
expression system yields and validates  
TCRs from blood lymphocytes of  
patients with cancer within 10 days.  
Nat Med. 2013, 19(11), 1542-6. 査読有.  
DOI: 10.1038/nm.3358.

[学会発表](計46件)

Kishi H, Hamana H, Shitaoka K,  
Ozawa T, Muraguchi A. Assessment of  
T cell receptor function. 第44回日本免  
疫学会学術集会; 2015 Nov 18-20; 札幌  
コンベンションセンター(札幌市).

岸 裕幸, 村口 篤. プライマリー腫瘍  
浸潤リンパ球を用いた腫瘍特異的 T細胞  
受容体同定の試み. 第74回日本癌学会学  
術総会; 2015 Oct 8-10; 名古屋国際会議  
場(名古屋市).

Hamana H, Kishi H, Ozawa T,  
Muraguchi A. Development of simple  
and efficient method for amplification of  
TCR  $\alpha\beta$  cDNA from single human T  
cells. 第43回日本免疫学会学術集会;  
2014 Dec 10-12; 国立京都国際会館(京  
都市).

岸 裕幸, 小林栄治, 杉山大介, 西川博  
嘉, 坂口志文, 村口 篤. メラノーマ患  
者および健康人 PBMC 中の CD4<sup>+</sup> T細胞  
の単一細胞レベルでのレパトリー解析.  
第73回日本癌学会学術総会; 2014 Sep  
25-27; パシフィコ横浜(横浜市).

Muraguchi A. Rapid generation of  
human monoclonal Abs and TCRs from  
single human lymphocyte: application  
for gene therapy of infectious diseases  
and cancer. The 6th China-Russia  
International Conference on Medicine;

2014 Jul 1-3; Harbin (中国).

Hamana H, Kobayashi E, Kishi H,  
Ozawa T, Nakagawa H, Jin A,  
Muraguchi A. hTEC4 system that  
enable us to clone TCR cDNA from  
antigen specific single T cells with in 4  
days. 第42回日本免疫学会学術集会;  
2013 Dec 11-13; 幕張メッセ(千葉市).

Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H,  
Hamana H, Nagai T, Ozawa T,  
Nakagawa H, Jin A, Kaneko S,  
Muraguchi A. Cloning of human  
antigen-specific TCRs can confer the  
candidates for cancer gene therapy. 15<sup>th</sup>  
International Congress of Immunology;  
2013 Aug 22-27; Milan(イタリア).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 連携研究者

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

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