

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19576

研究課題名(和文) 網羅的なT細胞受容体解析技術を用いた抗原特異的T細胞の機能的階層性の検討

研究課題名(英文) Investigation of functional hierarchy of antigen-specific T cells using comprehensive T cell receptor analysis technique

研究代表者

美山 貴彦 (Miyama, Takahiko)

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号：00770330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫応答システムにおいて抗原特異的T細胞レパトワがどのように基準にもとづいて構成されているかを明らかにするために、次世代シーケンサー(NGS)とシングルセルソーティング技術を用いて、サイトメガロウイルス(CMV)既感染者の末梢血に存在するCMV特異的TCRの網羅的・定量的解析と特異性・機能解析を行った。CMV特異的T細胞レパトワは各クロナタイプの定量性とそれらが保有するTCRの抗原ペプチドとの結合力、個人間の共有性には正の相関性があり、特にstem cell memory T細胞サブセットにおいて、複数の個人間での共有性の高いTCRを保有するクロナタイプが多く存在することが確認された。

研究成果の概要(英文)：To expand our knowledge of the ontogeny of the T-cell receptor (TCR) repertoire of antigen-specific T-cell subsets, we combined next-generation deep sequencing and single-cell multiplex clonotype analysis to evaluate the frequency of paired TCRs, their functions and whether clonotypic TCRs are shared among different individuals. Using a cytomegalovirus (CMV)-derived immunogenic peptide, we found that the more dominant pp65-specific TCR clonotypes in the blood of healthy donors have higher binding affinities for the CMV peptide and arise from clonotypes that are highly shared among individuals. Interestingly, these shared TCR clonotypes were abundant in the stem memory T-cell subset, and TCR diversity of the stem memory T-cell repertoire was significantly lower than in the central memory and effector memory T-cell repertoires. These results suggest that the stem memory T-cell subset may serve as a reservoir of highly shared and highly functional memory T-cells.

研究分野：免疫学

キーワード：ウイルス・腫瘍免疫 T細胞受容体 次世代シーケンサー シングルセルソーティング技術

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍や難治性感染症に対して現在より有効性の高い治療法を開発するためには、それらへの抗原特異的免疫応答を担う細胞群の生体内動態に対する深い理解が必要である。富山大学の村口・岸らのグループは、がん患者やウイルス潜伏感染者の末梢血中に存在する抗原特異的 T 細胞から T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を習得し、その抗原特異性・機能の解析を最短 10 日間で可能とするシステムを開発した (human TCR efficient cloning within 10 days : hTEC10) (Kobayashi et al. Nature Med 2013)。我々は、同研究者の協力のもとサイトメガロウイルス (CMV) が潜伏感染している健常人の末梢血に存在する CMV 特異的 T 細胞集団からシングルセルレベルで TCR 遺伝子を取得し、個々の TCR の機能解析を行ってきた。また同時に次世代シーケンサー (NGS) を用いて末梢血中の、CMV 特異的 T 細胞クロナイプの網羅的・定量的解析を行い、CMV 反応性 T 細胞クローンの存在頻度と CMV 抗原ペプチドに対する TCR の結合力には強い相関性があり、TCR の結合力が T 細胞クローンの選択的増幅に関与している可能性があることを報告した (美山、2015 年日本血液学会)。また、特に存在頻度の高い T 細胞クローンは複数の個人で共通の遺伝子配列をもつ shared (public) TCR を発現しており、それは CMV 未感染者の末梢血中にも多く存在していた (美山、2015 年米国血液学会)。これは生体防御システムの中で、抗原特異的免疫応答を担う T 細胞が個人間で一律の共通性・規則性のもとに機能していることを示唆している。

2. 研究の目的

ヒトの獲得免疫応答の主要な役割を担う T 細胞は、多様な抗原と反応するために TCR の遺伝子再構成により膨大な多様性を生み出す。これらの動態の正確なモニタリングが可能となれば、感染症・悪性腫瘍・自己免疫疾患・免疫不全症・移植医療などきわめて広範囲の医学領域に多くの新知見をもたらすことが期待される。本研究の目的は、NGS とシングルセルソーティング技術を用いた TCR 解析により、ウイルス抗原および腫瘍抗原特異的 TCR 遺伝子配列の網羅的同定・定量解析と個々の T 細胞クローンが有する TCR の機能検証を行い、ウイルス抗原・腫瘍抗原特異的 T 細胞レパトワの階層性を解析し、その中から免疫応答性の高い TCR の特性を明らかにすることにある。さらに免疫防御機構で記憶免疫系を構成する重要な T 細胞群の特性および個人間の共通性を明らかにし、さまざまな疾患発症を制御する免疫監視機構のメカニズムを包括的に理解することにより、新たなウイルス・がん免疫療法を開発するための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

健常人の末梢血から CD8 陽性 T 細胞を分離し、ウイルス抗原ペプチド (サイトメガロウイルス [CMV]、EB ウイルス [EBV])、腫瘍抗原ペプチド (W-11、MART-1) を用いて各抗原特異的 T 細胞を試験内で感作増幅させた後に、MHC テトラマーで染色しフローサイトメトリーで各抗原特異的 T 細胞の検出を行った。次に各抗原特異的 T 細胞をセルソーターで 96 穴プレートの各ウェルに 1 細胞ずつ分取し、単一細胞レベルでの TCR 鎖と鎖の CDR3 遺伝子配列の同定を行った。HLA-A*02 陽性の CMV 既感染者から取得した CMVpp65 抗原由来の HLA-A*02 拘束性 NLVPMVATV (NLV) 特異的 TCR 遺伝子を CMV 未感染者から分離した T 細胞に遺伝子導入し NLV ペプチド刺激によりインターフェロン 産生の有無を検証した。また同様に各 TCR 遺伝子を TCR 欠損 T 細胞株に遺伝子導入し、発現させた TCR と NLV テトラマーとの結合力の検証を行った。次に HLA-A*02 陽性の CMV 既感染者から分離した CD8 陽性 T 細胞を NLV ペプチドで感作増幅させ、NLV テトラマー陽性細胞をセルソーターで分取し、それらの TCR 遺伝子配列を NGS で網羅的に同定しリード集計を行った。NGS で得られた結果をもとに各クロナイプの定量的解析および異なる個人間で共通の TCR 遺伝子配列をもつものを shared TCR とし、その頻度を算出した。さらに T 細胞の機能的サブセット (Naïve T cells, Stem cell memory T cells, Central memory T cells, Effector memory T cells, Terminal effector T cells) ごとに分離し、NGS で各サブセットの多様性解析と shared TCR の頻度を算出した。

4. 研究成果

(1) ウイルス・腫瘍抗原特異的 TCR 遺伝子の取得。

ウイルス抗原・腫瘍抗原から合成した抗原ペプチドを用いて健常人の末梢血に存在する各抗原特異的 T 細胞の感作増幅および検出ができ、それらからシングルセルソーティング技術を用いることにより全 108 種のウイルス・腫瘍抗原特異的 TCR ペア遺伝子配列 (CMV: 51 種, EBV: 27 種, WT-1: 12 種, MART-1: 18 種) を同定することができた (図 1)。



図1

(2) CMV 抗原特異的 T 細胞レパトワの階層性。

抗原特異的 T 細胞レパトワの中で特に CMV 既感染者の末梢血に存在する NLV 特異的 T 細胞のレパトワは、極めて多様性が低下しており、1~2種類のドミナントなクローンとそれ以外のサブドミナントなクローンで構成されていた(図2)。

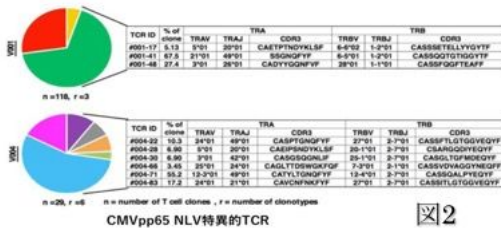


図2

CMV 未感染者の末梢血から分離した T 細胞に CMV 既感染者から取得した NLV 特異的 TCR 遺伝子を遺伝子導入したところ、NLV ペプチド特異的にインターフェロンの産生能を獲得することを確認できた(図3)。

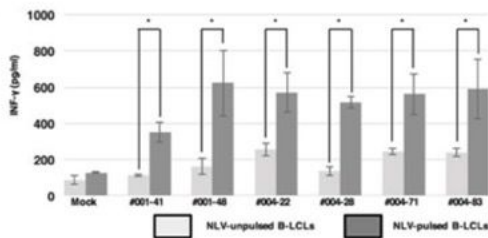


図3

次に TCR 欠損 T 細胞株に各 NLV 特異的 TCR 遺伝子を発現させ、NLV テトラマーとの結合力を検証したところ、各 TCR 間で NLV テトラマーとの結合力に差があり、特にドミナントクローンが保有していた TCR はサブドミナントクローンよりも NLV テトラマーに対して強い結合力をもつことが確認された(図4)。

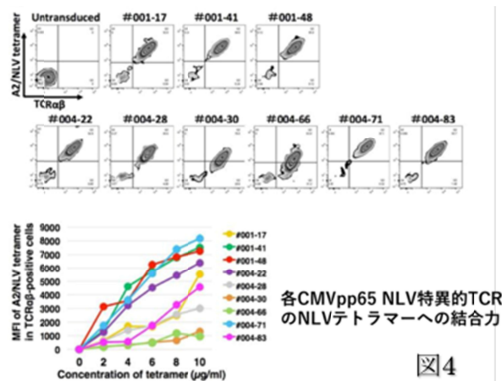


図4

さらに NLV ペプチド刺激で感作増幅させた細胞で各 TCR の存在頻度を NGS で解析したところ、TCR の結合力の強さとそれら TCR を有する T 細胞クローンの存在頻度には正の相関性を認めており、これらの結果は抗原ペプチ

ドに対して結合力が強い TCR を有する T 細胞クローンほど抗原刺激による増幅性が高いことを示唆するものと考えられた(図5)。

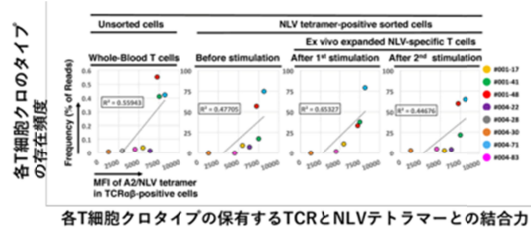


図5

(3) Shared TCR を保有する T 細胞クローンの優位性。

まず、はじめに 5 人の健常者の末梢血検体を用いて全 T 細胞における shared TCR を保有するクローンの頻度を解析した。shared TCR を保有するクローンは全 T 細胞の 0.6~8.7% と低頻度であることが確認された(図6)。

全末梢血T細胞におけるshared TCRの頻度

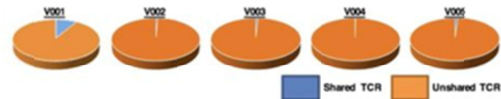


図6

次に、CMV 既感染者の NLV テトラマー陽性 T 細胞における shared TCR の頻度を解析したところ同様に shared TCR の頻度は低頻度(2.5~5.3%)であったが、定量的に上位を構成するクローンほど、より多くの個人間で共有された TCR (Highly shared TCR) を保有する傾向が確認できた(図7)。これらの結果は個人間で共有性の高い TCR を保有する T 細胞クローンほど抗原刺激による選択的に増幅性が高いことを示唆するものと考え

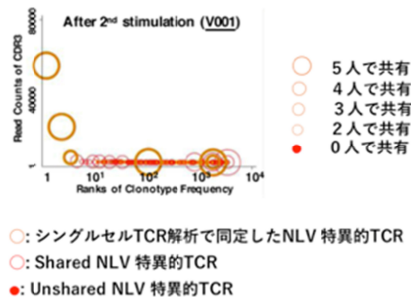


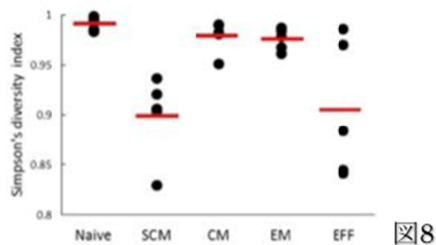
図7

えられた。

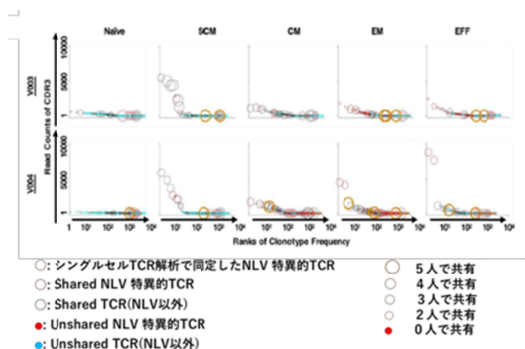
(4) Stem cell memory T cell サブセットが保有する共有性の高い shared TCR。

次に、NGS を用いて T 細胞の機能的分化サブセット (Naïve T cells[Naïve-T], Stem cell memory T cells[SCM-T], Central memory T cells[CM-T], Effector memory T cells[EM-T], Terminal effector T

cells[EFF-T])ごとにTCRレパトワの解析をNGSで行った。SCM-TサブセットのTCRレパトワの多様性はNaive-T, CM-T, EM-Tよりも低い傾向が確認された(図8)。



また各サブセットに認められる shared TCRは、いずれのサブセットにおいても定量的に上位を構成するクローンほど共有性が高い TCR を有していたが、特に SCM T cell サブセットにおいては顕著な傾向を認めた



(図9)

CMV 既感染者における NLV 特異的 T 細胞レパトワの多様性は極めて低下しており、抗原刺激に対して高い増幅性を示すクローンが保有する TCR ほど抗原ペプチドとの結合力が強く、また個人間で共有性の高い遺伝子配列をもっている傾向が確認できた。これらの結果は、個人間で保存されている共有された TCR が免疫応答において優勢クローンを形成するのに重要な働きをもつことを示唆すると考えられる。SCM-T は、近年、新たに同定された T 細胞サブセットであるが、高い自己複製能と多分化能を有していることから、免疫記憶の根幹を形成する重要な T 細胞群であると考えられている。NGS を用いた TCR レパトワ解析により SCM-T サブセットの TCR レパトワの多様性は他のサブセットよりも低下しており、その中に定量性の高い T 細胞クローンタイプが存在し、定量性の高クローンタイプほど個人間で共有性の高い TCR を保有する傾向が明らかとなった。

以上の研究成果は CMV に対して強い免疫応答をもつ TCR の特性を明らかにしたものであるが、今後、他のウイルスや腫瘍抗原に対する TCR でも同様の傾向があるかを確認する必要がある。NGS とシングルセルソーティング技術を組み合わせた TCR 解析は、TCR 遺伝子配列を高速解析することが可能であるだけで

なく、機能的検証をもとに免疫応答性の高い TCR 遺伝子配列を同時に同定することが可能である。機能的検証をもとに TCR を選択することにより患者個人の疾患(ウイルス感染症や悪性腫瘍)に適したテラメド養子免疫療法(TCR 遺伝子導入 T 細胞療法)に応用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Miyama T, Kawase T, Kitaura K, Chishaki R, Shibata M, Oshima K, Hamana H, Kishi H, Muraguchi A, Kuzushima K, Saji H, Shin-I T, Suzuki R, Ichinohe T. Highly functional T-cell receptor repertoires are abundant in stem memory T cells and highly shared among individuals. *Sci Rep.* 2017; 7, 3663. doi:10.1038/s41598-017-03855-x

[学会発表](計 6 件)

美山 貴彦. 次世代シーケンサーを用いた同種造血幹細胞移植後に残存する微小レシピエントT細胞クローンの解析. 第40回日本造血細胞移植学会総会, 札幌, 2018年2月2日.(口頭)

美山 貴彦. Landscape of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation is superdominated by distinct T cell populations bearing T-cell receptor clonotypes shared among different individuals. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, U.S.A, December 11, 2017. (ポスター)

美山 貴彦. 骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植後に残存するレシピエント由来微小T細胞クローンの解析. 第26回日本組織適合性学会大会, 広島, 2017年10月27日.(口頭)

美山 貴彦. TALEN-mediated T-cell receptor gene editing as a novel tool for adaptive T-cell immunotherapy. 第79回日本血液学会学術集会, 東京都, 2017年10月21日.(口頭)

美山 貴彦. T-cell receptor transgenic primary T cells using TALEN-mediated TCR gene editing as a novel tool to correct immunodeficiency caused by radiation damage. The 1st International Symposium of the

network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science-Scientific Underpinning for restoration from a Radiation Disaster-, Hiroshima, February 21-22, 2017. (ポスター)

美山 貴彦. Stem cell memory T-cells are a reservoir of functional T-cells highly shared among individuals. 第78回日本血液学会学術集会, 神奈川県横浜市, 2016年10月14日. (口頭)

[その他]

ホームページ等

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/rbm/news/40259>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美山 貴彦 (MIYAMA Takahiko)

広島大学病院 医科診療医

研究者番号 : 00770330

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()