

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19741

研究課題名（和文）先進的がん免疫療法の基盤確立

研究課題名（英文）Establish the foundation for advanced tumor immunotherapy

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）：難治がんに対し、免疫チェックポイント阻害薬が効果を挙げているが、より効果的な治療法が求められている。そこで、がん特異的T細胞受容体を検出する研究を行った。マウスモデルを用いて、がん周囲組織、リンパ組織を採取したところ、がん周囲には、T細胞の集積が認められた。また、がん周囲のリンパ組織において、がん特異的と考えられるT細胞受容体を検出することができた。さらに、T細胞受容体の網羅的解析法を確立することもできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義や社会的意義：本研究は、難治がんに対する免疫療法の効果向上および新規治療法開発への基盤を確立する研究である。マウスモデルを用いて、がんに対するT細胞受容体を、我々が構築した方法により検出することができた。本研究により、遺伝子特異的非バイアス増幅法を用いた、がんに対するT細胞受容体の検出方法を確立することができたことは、今後の臨床応用への大きな前進であって、学術的にも社会的にも意義のある成果である。

研究成果の概要（英文）：Although immune checkpoint inhibitors have been effective against intractable tumors, we hope more effective treatments. Therefore, we performed a study to detect tumor-specific T cell receptors. When mouse peripheral tissues around tumors and lymphoid tissues were collected using a tumor-bearing mouse model, T cell accumulation was observed around the tumors. In addition, it was possible to detect T cell receptors that are considered to be tumor-specific in lymphoid tissues around the tumor. Furthermore, we were able to establish a comprehensive analysis method for T cell receptors.

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

がんは未だ難治性疾患であり根治には至っていない。難治性がん治療の切り札とされる免疫療法は、外科療法、化学療法、放射線療法に次ぐ新たな治療法である。近年の免疫チェックポイント阻害剤が効果を挙げていることにより、免疫療法の期待が大いに高まっている。また、免疫チェックポイント阻害剤が効果的であるという一連の研究、および成果はがん特異的抗原の存在および傷害性T細胞の存在を示唆している。

現在、免疫チェックポイント阻害剤は奏効率が20 - 30%であるため、より効果を高めるためには、がん特異的抗原の特定や、がん傷害性T細胞の特定は必要となっている。当然、がん特異的抗原の特定や、がん傷害性T細胞の特定の両方の研究を行うことが理想ではあるものの、がん抗原の特定は困難であるため、我々は、がんを傷害するT細胞の特定、すなわち、腫瘍細胞を攻撃するT細胞受容体を明らかにすることを着想した。

### 2. 研究の目的

腫瘍細胞を攻撃するT細胞受容体を明らかにすることができれば、患者に応じたテーラーメイドの抗腫瘍治療ができるようになる可能性が高い。また、腫瘍細胞を攻撃するT細胞が判明すれば、免疫チェックポイント阻害剤を併用することで効果的利用法が確立できるようになる。これらの実現のためには、T細胞受容体の網羅的解析が必要である。

したがって、本研究では、先進的がん免疫療法の基盤となる、難治がんを攻撃する特異的T細胞受容体の特定法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) がんモデルマウス

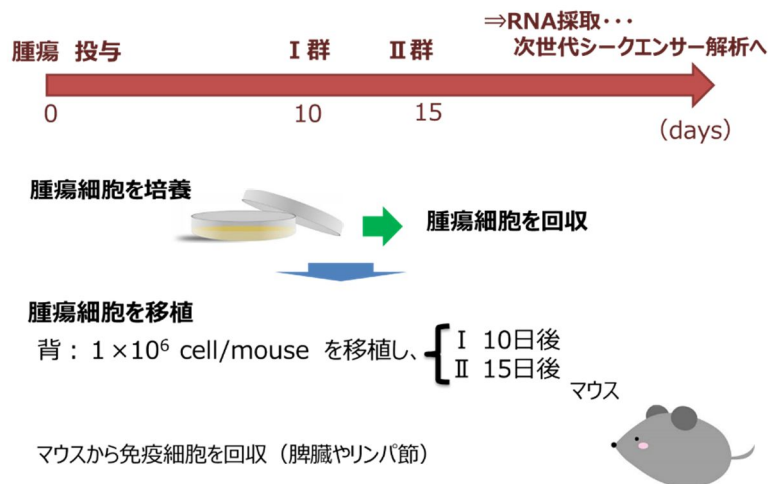
マウス可移植性腫瘍を用いて、細胞培養により細胞を増やした。1x10<sup>6</sup>個の腫瘍細胞を調整し、PBSに懸濁して移植した。移植部位は、皮下(背部) または脾臓とした。

腫瘍を移植した後、10日後、15日後に脾臓、および腫瘍移植周囲のリンパ節を採取した。

採取した免疫臓器、それぞれからリンパ球を単離して、以下の解析に供した。

図1 腫瘍特異的T細胞受容体の検出方法

## 腫瘍特異的T細胞受容体の検出



#### (2) フローサイトメトリーによる解析

免疫組織(脾臓、リンパ節)から単離した細胞を、蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。用いた蛍光標識抗体は、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗NK1.1抗体、抗B220抗体、抗TCR抗体である。

#### (3) 病理標本による解析

腫瘍周囲組織を採取、凍結標本とした後、通法により、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って病理標本とした。

#### (4) T細胞受容体解析のためのcDNAライブラリー調整

T細胞受容体を特定するために、リンパ球からtotal RNAを抽出した。Total RNAの抽出には、

RNA easy kit(Qxagen 社)を用いて行った。500 ng 程度の total RNA を用意し、Oligo dT プライマー、逆転写酵素 (SuperScript III) を用いて、total RNA から、first strand 合成を行った。引き続き、second strand 合成を行った。second strand 合成には、RNase H, DNA polymerase, DNA Ligase を用いて通法通りに合成した。これを cDNA ライブラリーとして、以下の実験に供した。

#### (5) 遺伝子特異的非バイアス増幅法

我々は、バイアスをかけずに遺伝子を増幅することができる非バイアス増幅法を開発した。この方法は、シングルチェーンアダプターを cDNA の 5' 側に結合させて、このアダプターの一部をプライマーとして PCR 増幅を行うものである。通常のアダプターは DNA 2 本鎖からなり、アンチセンス鎖に対しセンス鎖を長くしたアダプターを用意して、DNA をライゲーションすることによりアダプターを付与するものであるが、これを DNA 1 本鎖のアダプターとし、ライゲーションする方法を作成した。この方法を用いて、PCR 増幅を行った。

#### (6) T 細胞受容体解析

次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析は、Illumina 社、Miseq 次世代シーケンサーを用いて解析を行った。Miseq においては、ペアエンドシーケンスを基本とした方法であり、Miseq 次世代シーケンサーの説明書に基づいてシーケンスを行った。T 細胞受容体解析評価については、世代シーケンサーにより得られたシーケンスデータを、IMGT ホームページからアクセスしてデータ解析を行って T 細胞受容体を網羅的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脾臓への腫瘍移植モデル

がんを攻撃する特異的 T 細胞受容体を検出するためには、二次リンパ組織を採取し測定するのが効果的であると考え、まず、脾臓に腫瘍を移植するモデルを用いて行った。これは、接種した組織自体が二次リンパ組織であり、抗原提示から免疫反応がその場で行われうると考えられたからである。また、脾臓は組織としては採取しやすいため、T 細胞受容体の検出に適していると考えられたからである。マウスを開腹し、脾臓に腫瘍を接種し実験を行った。しかしながら、マウス脾臓へ腫瘍を移植する手技が安定しなかった。その結果、抗腫瘍 T 細胞受容体と考えられるものを見つげ出すことが出来なかった。

#### (2) 腫瘍周囲へのリンパ球の集積

脾臓への腫瘍移植モデルが、予想通りにはいかなかったことから、皮下への腫瘍移植モデルを用いることにした。図 1 で示すように、可移植性腫瘍を  $1 \times 10^6$  個に調整し、マウス皮下に移植して 10 日後、15 日後、腫瘍周囲組織、脾臓、リンパ節を採取した。腫瘍周囲組織から、リンパ球を単離して、フローサイトメトリー、病理標本でリンパ球の集積を検討した。フローサイトメトリー解析では、抗 CD3 抗体陽性の細胞集団が検出され、T 細胞が集積していることが明らかになった。また、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いた染色において、腫瘍周囲には、CD4T 細胞、CD8T 細胞の両方の細胞集団が集積していることも判明した。さらに、病理標本を作製して、ヘマトキシリン-エオジン染色したところ、リンパ球と思われる単核球が、腫瘍周囲に存在していることが明らかとなった。これらの結果より、腫瘍周囲には、T 細胞が集積することが判明し、がん特異的 T 細胞が存在することが示唆された。

#### (3) 腫瘍に対する T 細胞受容体の検出

マウス可移植性の腫瘍を皮下に移植した、担がんマウスモデルを用いて研究を行った。マウスに腫瘍を移植後、経時的にがん周囲組織、がん近傍の所属リンパ節、脾臓、を採取した。これらサンプルから、total RNA を抽出して、通法により cDNA ライブラリーを作成した。我々が独自に開発した、遺伝子特異的非バイアス増幅法を用いて、T 細胞受容体のみを選択的かつバイアスをかけずに増幅し、T 細胞受容体遺伝子ライブラリーを作成した。次世代シーケンサーを用いて、T 細胞受容体を網羅的に解析した (第三世代 T 細胞受容体解析法)。その結果、皮下移植したがん周囲には、T 細胞の浸潤が確認された。第三世代 T 細胞受容体解析法による詳細解析によって、それら浸潤 T 細胞と思われる、いくつか特徴的な T 細胞受容体を見出すことができた。

#### (4) T 細胞受容体の特定法の確立

本目的の 1 つである、T 細胞受容体の特定法を確立についても、以下の成果を上げることができた。

マウスモデルを用いた T 細胞受容体解析技術の検証。

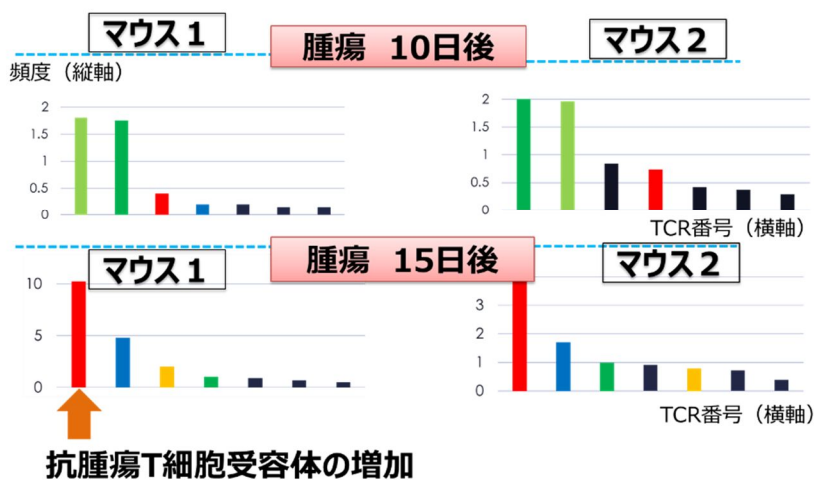
図 1 のように、マウスに腫瘍を移植して、10 日後、15 日後にリンパ組織を採取した。これらサ

サンプルから、T細胞受容体の網羅的解析を行ったところ、腫瘍に対するT細胞受容体と考えられる受容体を検出することができた。

T細胞受容体解析技術の改良。  
T細胞受容体解析技術の効率向上のために、短鎖長の遺伝子増幅産物にならないように、PCR実験条件を検討し、目標値であるリード長が得られ、T細胞受容体解析技術の改良をはかることができた。

図2 腫瘍に対するT細胞受容体の検出

## 腫瘍に対するT細胞受容体の検出



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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kouetsu Ogasawara
2. 発表標題 New TCR analysis for cancer Immunotherapy
3. 学会等名 The 34th Nagoya International Cancer Treatment Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	佐藤 直毅  (Sato Naoki)  (50625043)	東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師    (11301)	
研究協力者	伊藤 甲雄  (Ito Koyu)		