

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07321

研究課題名(和文) がん浸潤制御性T細胞の抗原同定とそれに基づく免疫応答抑制機構の解明

研究課題名(英文) Identification of antigens of tumor-infiltrated regulatory T cells and analysis of tumor suppression systems based on the antigens

研究代表者

小林 栄治 (Kobayashi, Eiji)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：70459733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は我々が独自に開発したT細胞受容体(TCR)クローニングシステムを基盤に、がん組織に浸潤する制御性T細胞(Treg)の網羅的なレパトア解析を行い、クローナルに集積するTregが認識する抗原の同定を行うことである。そのため、B16F10細胞株を用いて、担がんマウスを作製し、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を調整し、それらTCRのレパトア解析を行った。その結果、B16F10に反応するTCRを同定することができた。また、BW細胞株を用いることで、CD8陽性T細胞の抗原同定を効率よく行う系を樹立した。今後はこの方法を発展させ、取得したTCRの抗原同定を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫応答負に制御する制御性T細胞(Treg)の抑制を解除することで、がんに対する免疫応答を強化する新たな治療法の開発が注目されている。しかし、がん組織内でTregがどのような抗原を認識し、抗原特異的にがん免疫応答を抑制しているかについては、いまだ不明な点が多い。そこで、がん組織内でクローナルに集積するTregのT細胞受容体(TCR)の網羅的な解析を行い、それらTregの抗原を同定する。さらに、同定した抗原を用いて、Tregが抗原特異的にがん免疫応答を抑制しているか否かを検証する。本研究成果はTregを標的にした新たながん免疫療法に関する重要な知見を与えられらる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to perform T cell receptor (TCR) repertoire analysis of tumor-infiltrating regulatory T cells (Treg) and determine antigens of the clonally expanded Treg cells using the TCR cloning systems that we had developed. To this end, we developed tumor-bearing mouse using B16F10 cells, prepared tumor infiltrating lymphocyte and analyzed the TCR repertoire. As a result, we determined TCRs that reacted to B16F10 cells. In addition, we have developed an antigen-determination system of CD8+ T cells which enabled us to determine antigens of CD8+ T cells. We will apply the system to determine antigens of the TCRs that we have cloned.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞受容体 制御性T細胞 がん免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) Treg 細胞のがん集積と抗原特異性

免疫系を負に制御する制御性 T 細胞 (Treg) のがん組織での集積は予後不良因子との報告が多いが、そのメカニズムについては不明な点が多い (Liu et al. **FEBS**, 2016)。これまで Treg のレパトア解析は、例えば、TCR $\alpha$  鎖を固定して、TCR $\beta$  鎖を次世代シーケンサーで網羅的に解析することにより行われてきた (Wolf et al. **PLoSone**, 2006)。しかしながら、このような方法では、Treg の多様性は解析できるものの、がん特異性は評価できない。また、これまで Treg が認識する抗原はいくつか同定されているものの、その手法は非常に煩雑である (Nisikawa et al. **PNAS**, 2003, Wang et al. **Immunity**, 2004)。したがって、Treg 細胞がどのような抗原を認識し、がん組織内で抗原特異的に免疫応答を抑制しているのかは明らかになっていない。

#### (2) T 細胞受容体クローニングシステムの樹立

これまで T 細胞受容体 (TCR) を  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖のペアで解析するためには、抗原刺激により in vitro で増殖できる T 細胞株を樹立する必要があり、最短でも数ヶ月が必要だった。さらに解析できる細胞株も数個程度に限られていた。このような状況下、我々は抗原特異的 TCR のクローニングから抗原特異性の評価を 10 日間以内という極めて短期間に行えるシステムを開発した (Kobayashi et al., **Nat Med**. 2013)。さらに、平成 27 年度から平成 29 年度基盤 B「HLA ハプロタイプの壁を越えた個の癌免疫医療の創成」にて、このシステムを発展させ、マウスモデルおよびヒト腫瘍の系で、抗原および MHC ハプロタイプに限定せず、がん浸潤細胞からがん特異的 TCR が取得できることを示した。

### 2. 研究の目的

我々が独自に開発した TCR クローニングシステムを基盤に、がん組織内にクローナルに集積する Treg の TCR を網羅的に取得する。また、抗原を効率的に同定する系を樹立し、取得した Treg の抗原を同定する。さらに、同定した抗原を用いて Treg が抗原特異的にがん免疫応答を抑制しているか否かを明らかにする。本研究成果によりがん組織内にクローナルに集積する Treg がどのような抗原を認識し、抗原特異的にがん免疫応答を抑制しているか否かが明らかになる。また、Treg が認識する抗原を除去することでがん免疫応答を活性化できるかどうかを検証できるようになると考えられる。将来的には、本研究成果を発展させ、「ヒト Treg のがん組織内における抑制メカニズム」の解明につなげたい。

### 3. 研究の方法

本研究は (1) がん組織内に集積する Treg の TCR の特異的抗原を同定するために、Treg の TCR を網羅的に解析し、その抗原の同定を行う。さらに(2)同定した抗原を用いて抗原特異的な抑制効果の検証を行う。

#### (1)- シングルセル T 細胞の FoxP3 遺伝子の増幅

Treg の抑制機能には FoxP3 遺伝子の発現が重要だが、細胞固定が必要であるため TCR 遺伝子のクローニングと同時に FoxP3 遺伝子を検出することがこれまでできなかった。そこで、プラ

イマー等の検討により TCR $\alpha$  鎖と TCR $\beta$  鎖のクローニングと同時に FoxP3 遺伝子もシングルセル T 細胞から検出できるようにする。これにより、細胞表面マーカーに加えて、FoxP3 の発現有無により Treg の選別が可能となる。

#### がん浸潤 Treg の TCR レパトア解析

メラノーマ細胞株 B16F10 細胞を C57BL/6 マウス側腹に移入し、腫瘍を形成させる。その後、腫瘍から Treg を CD4+CD137+ を指標に (Bacher et al. *Cell*, 2017) シングルセルソーティングにより回収し、TCR レパトアを解析する。同時に FoxP3 遺伝子を増幅し、FoxP3+細胞を Treg として扱う。

#### 取得 TCR のがん特異性の評価

取得した TCR 遺伝子をマウス脾臓から調整した T 細胞に導入し TCR 遺伝子を発現させる。同時に骨髄由来樹状細胞 (BMDC) に B16F10 より調整した mRNA を導入する。取得した TCR を導入した T 細胞と BMDC を共培養し、活性化マーカーを指標に導入した TCR の B16F10 特異性を評価する。

#### Treg-TCR の抗原同定

Treg が認識する抗原を MHC クラス II に効率よく提示させるために、抗原をインバリアント鎖との融合タンパクとして発現させる (Wang et al, *Science*, 1999)。すなわち、本研究では B16F10 細胞より作製した cDNA をインバリアント鎖との融合タンパクとして発現するライブラリーを作製し、作製したライブラリーを MHC クラス II 分子である I-A<sup>b</sup> 発現 HEK293T 細胞に導入する。この HEK293T 細胞と取得した Treg の TCR を導入した T 細胞を共培養する。サイトカイン産生を指標に、目的の抗原を含むウェルを同定する。同定したウェルに対応する cDNA ライブラリープールを希釈し、再度同様の操作を行う。上記操作を 3 回程度繰り返すことで、目的の cDNA を同定する。さらに、同定した抗原のオーバーラップペプチドを作製し、同様の操作でエピトープ部分を同定する。

#### (2)- 抗原刺激による Treg の免疫抑制効果 (*in vitro*)

我々は、基盤 B「HLA ハプロタイプの壁を越えた個の癌免疫医療の創成」の研究で、B16F10 に特異的に反応する TCR を取得している。そこで、この腫瘍特異的 TCR を導入した CD8<sup>+</sup>キラー T 細胞と本研究で取得した Treg の TCR を発現させた Treg、および同定した抗原ペプチドを用いて、CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を指標に Treg の免疫抑制効果を検証する。

#### 抗原刺激による Treg の免疫抑制効果 (*in vivo*)

B16F10 細胞の腫瘍をマウスに形成させる。先行研究で *in vivo* にて B16F10 腫瘍の退縮効果を示した TCR を発現させた CD8<sup>+</sup>キラー T 細胞と、本研究で取得した Treg の TCR を発現させた Treg を担がんマウスに移入し、Treg による抑制効果を検証する。加えて、同定した抗原を CRISPR/Cas9 により除去した B16F10 細胞株を作成し、Treg の抑制効果が消失するかを検証する。

第一に、C57BL/6 マウスに B16F10 細胞を播種し、腫瘍を形成させ、その腫瘍から腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を回収し、TCR レパトアの解析と腫瘍への反応性を評価した。具体的には B16F10 細胞をマウスに播種後、7 日後、10 日後、14 日後のマウスから所属リンパ節、spleen および腫瘍から TIL を調整した。その後、活性化マーカーには CD137 と Treg のマーカーには CD25 を用いて、細胞をシングルセルソーティングし、TCR のレパトアを解析した。その結果、TIL および一部のリンパ節にはクローナルに増殖している T 細胞が存在していたが、spleen にはクローナルな T 細胞はほとんど観察されなかった。

取得した CD4 陽性 T 細胞の TCR の抗原特異性を評価するために、TCR の発現ベクターを作製し、レトロウイルス発現系を用いて、マウス脾臓由来 T 細胞に取得した TCR を発現させた。これら取得した TCR を発現させたマウス脾臓 T 細胞と H-2K<sup>b</sup> の発現を増強させた B16F10 細胞と共培養したところ、TCR を発現させたマウス脾臓 T 細胞から特異的な IFN- $\gamma$  の産生が確認された。これにより取得した TIL 由来 T 細胞には確かに腫瘍特異的 TCR が含まれることが確認できた。さらに、効率よく標的抗原を発現する抗原提示細胞を準備するため、C57BL/6 マウスの骨髄より樹状細胞 (BMDC) を誘導する系を確立した。誘導した BMDC に OVA を取り込ませ、OVA 特異的 TCR (OT-I) を発現させた T 細胞と共培養したところ、IFN- $\gamma$  の発現が確認された。

また、抗原同定法を開発するため、まず MHC class I 拘束性の抗原を同定できる系の開発に取り組んだ。モデル抗原として OT-I TCR とマウス H-2K<sup>b</sup> を用いて、効率よく取得した TCR の抗原を同定することができる抗原同定法の開発に取り組んだ。そのため、OT-I TCR と H-2K<sup>b</sup> の発現ベクターを作製し、レトロウイルスを用いてマウスハイブリドーマ株である BW 細胞に導入し、ソーティングにより OT-I TCR および H-2K<sup>b</sup> を発現する細胞株を樹立した。その後、OVA の cDNA を発現するベクターをエレクトロポレーション法により樹立した BW 細胞株に導入し、IL-2 を産生する細胞をソーティングした。ソーティングした細胞よりベクターを抽出し、目的のインサートサイズをもった cDNA ベクターの配列をシーケンスにより解析したところ、すべてのベクターが OVA の配列だった。これにより MHC class I 拘束性抗原を同定する方法ができた。今後はこの方法を応用し、MHC class II 拘束性抗原を効率よく同定する方法を樹立し、取得した Treg の抗原を同定する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Keiko, Tsuda Sayaka, Kobayashi Eiji, Hamana Hiroshi, Tsuda Kei, Shima Tomoko, Nakashima Akitoshi, Ushijima Akemi, Kishi Hiroyuki, Saito Shigeru	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of TCR Repertoire and PD-1 Expression in Decidual and Peripheral CD8+ T Cells Reveals Distinct Immune Mechanisms in Miscarriage and Preeclampsia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sukegawa Kenta, Shitaoka Kiyomi, Hamana Hiroshi, Kobayashi Eiji, Miyahara Yoshihiro, Fujii Keisuke, Tsuda Kei, Saeki Shiori, Nagata Takuya, Ozawa Tatsuhiko, Saito Shigeru, Fujii Tsutomu, Muraguchi Atsushi, Shiku Hiroshi, Kishi Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Relationship between T cell receptor clonotype and PD 1 expression of tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1580 ~ 1590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/eji.201948399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田恵子, 津田さやか, 小林栄治, 浜名 洋, 津田 桂, 島 友子, 中島彰俊, 岸 裕幸, 齋藤 滋
2. 発表標題 正常妊娠と異常妊娠における脱落膜CD8+T細胞のTCRレパートリーとPD-1の発現についての検討
3. 学会等名 第28回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜名 洋, 宮原慶裕, 下岡清美, 祐川健太, 小林栄治, 小澤龍彦, 村口 篤, 藤井 努, 珠玖 洋, 岸 裕幸
2. 発表標題 Jurkat細胞を用いたTCRのネオアンチゲン反応性解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤龍彦, 小林栄治, 浜名 洋, 村口 篤, 岸 裕幸
2. 発表標題 ISAAC法を用いたTCR様抗体の迅速作製とその応用
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 KOBAYASHI Eiji, OZAWA Tatsuhiko, HAMANA Hiroshi, MURAGUCHI Atsushi, KISHI Hiroyuki
2. 発表標題 Development of a novel tumor antigen-specific TCR cloning system using a microarray chip
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸 裕幸, 下岡清美, 小林栄治, 宮原慶裕, 津田 桂, 佐伯しおり, 長田拓哉, 村口 篤, 珠玖 洋
2. 発表標題 大腸がん浸潤リンパ球におけるTCRクロノタイプとPD-1の発現
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi E, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Muraguchi A, Kishi H.
2. 発表標題 A novel TCR cloning system of peptide-specific T cells using immunospot array assay on a chip(T-ISAAC) technology
3. 学会等名 International Conference on Lymphocyte Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜名 洋, 下岡 清美, 祐川 健太, 佐伯しおり, 長田任一哉, 小林 栄治, 小澤 龍彦, 藤井 努, 村口 篤, 岸 裕幸
2. 発表標題 患者HLA遺伝子導入乳がん細胞株を用いた乳がん患者TIL中の腫瘍反応性TCRの探索
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 祐川 健太, 佐伯しおり, 下岡 清美, 浜名 洋, 宮原 慶裕, 小林 栄治, 長田任一哉, 小澤 龍彦, 藤井 努, 珠玖 洋, 村口 篤, 岸 裕幸
2. 発表標題 腫瘍浸潤CD8+ T細胞におけるPD-1の発現はTCRレパトアに規定される
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田 桂, 浜名 洋, 中島 彰俊, 森田 恵子, 津田さやか, 島 友子, 下岡 清美, 小林 栄治, 小澤 龍彦, 村口 篤, 岸 裕幸
2. 発表標題 Clonally expanded populations of cytotoxic T cell in TILs and peripheral blood in endometrial cancer patients
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸 裕幸, 祐川 健太, 下岡 清美, 浜名 洋, 小林 栄治, 津田 桂, 長田任一哉, 佐伯しおり, 小澤 龍彦, 齋藤 滋, 藤井 努, 村口 篤
2. 発表標題 腫瘍浸潤CD8+ T細胞のTCRとPD-1の発現との関連：大腸癌における考察。
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamana H, Shitaoka K, Sukegawa K, Saeki S, Nagata T, Kobayashi E, Ozawa T, Fujii T, Muraguchi A, Kishi H
2. 発表標題 Screening of tumor-reactive TCRs from TILs of breast cancer patients using a patients' HLA-transduced breast cancer cell line.
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morita K, Kobayashi E, Tsuda S, Shitaoka K, Ozawa T, Hamana H, Saito S, Kishi H
2. 発表標題 Common TCR repertoire was found in both decidual and peripheral CD8+ T cells in normal term pregnancy
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobayashi E, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Muraguchi A, Kishi H
2. 発表標題 Cloning of tumor antigen-specific TCRs using immunospot array assay on a chip (T-ISAAC) technology
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuda K, Hamana H, Nakashima A, Tsuda S, Shima T, Shitaoka K, Kobayashi E, Ozawa T, Kishi H
2. 発表標題 TCR repertoire analysis of cytotoxic T cells in tumor-infiltrated lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in endometrial cancers
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 KOBAYASHI Eiji, MURAGUCHI Atsushi, KISHI Hiroyuki
2. 発表標題 TCR repertoire analysis of peptide-specific T cells using immunospot array assay on a chip (T-ISAAC) technology
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 KOBAYASHI Eiji, OZAWA Tatsuhiko, HAMANA Hiroshi, SHITAOKA Kiyomi, MURAGUCHI Atsushi and KISHI Hiroyuki
2. 発表標題 TCR repertoire analysis of peptide-specific T cells using immunospot array assay on a chip (T-ISAAC) technology
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018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	岸 裕幸  (Kishi Hiroyuki)  (60186210)	富山大学・学術研究部医学系・教授   (13201)	
研究協力者	浜名 洋  (Hamana Hiroshi)  (90551549)	富山大学・学術研究部医学系・助教   (13201)	

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