

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22783

研究課題名(和文) 高親和性HTLV1特異的TCRの網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive detection of high affinity TCRs specific for HTLV-1

研究代表者

菅田 謙治 (Sugata, Kenji)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特定事業研究員

研究者番号：10650616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ATLの新規治療法の開発を目的とし、本研究では近年がん患者で治療成果をあげているT細胞移入療法に適した高親和性HTLV1特異的TCRの探索をシングルセル解析より得られたTCR配列を元に行った。ATL患者やHAM患者由来の検体を用いて行ったシングルセル解析結果からTCRレパトアが優位に増加しているCD8T細胞クローン由来のHLA-I拘束性TCRの配列情報を抽出した。得られたTCRをPrimary T細胞で発現させてHTLV-1抗原の探索を行ったところ、特にHAM患者由来のTCRがHLA-A\*24:02拘束性Tax301-309に特異的なTCRであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATLに対しては化学療法やヒト化CCR4抗体などの治療法が試みられているものの、有効な治療法が見つからない。近年、がん患者に対して腫瘍抗原T細胞を使用した移入療法が効果をあげている。申請者は高親和性HTLV-1特異的TCRの探索を行い、HAM患者検体から7種類のHLA-A\*24:02拘束性Tax301-309特異的TCRを検出した。HLA-A24陽性ATLでの優位に増加しているCD8T細胞クローンではそれらの特異的T細胞を検出できなかったことから、それらの特異的T細胞がATLの発症に寄与している可能性が示唆された。現在、得られたTCRの解析を進めるとともに特許申請を視野に研究進めている。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown effectiveness and feasibility of adoptive transfer therapies for treatment of patients with cancers. In this study, we focused on high affinity TCRs (eligible for the therapies) specific for HTLV-1 antigen based on single cell analysis data from HTLV-1 patients. HLA-I restricted TCRs from CD8 T cells, which expanded in TCR repertoire, were transduced into primary T cells. Using cytokine production assay, we detected that the cloned TCRs can recognize HLA-A24:02-restricted Tax301-309 on antigen presenting cells. Furthermore, we found that the HTLV-1 specific TCRs were frequently detected from PBMCs and cerebrospinal fluid of HAM patients. On the other hand, CD8 T cells derived from ATL patients did not show the specific response against HLA-A24/Tax complexes, suggesting that HLA-A24/Tax specific CD8 T cells might affect ATL onset in HTLV-1 carriers. We are ongoing further analysis of the Tax specific TCRs focusing affinity of TCR-peptide/MHC complex.

研究分野：がん免疫

キーワード：HTLV-1 高親和性T細胞受容体(TCR) 成人T細胞白血病(ATL) HTLV-1関連脊髄症(HAM) HLA class-I CD8 T細胞 次世代シーケンス解析

## 1. 研究開始当初の背景

CD4T 細胞に感染したヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は長い潜伏期間(60 年以上)の後、感染者に悪性腫瘍である成人 T 細胞白血病 (ATL) や慢性炎症性疾患 (HTLV-1 関連脊髄症: HAM) を惹起する。日本では九州を中心に約 100 万人の HTLV-1 キャリアが存在し、その 2-5% は ATL を発症すると予想されている。HTLV-1 は CD4T 細胞に感染し、ウイルス抗原として Env, Gag, Tax, HBZ など を発現する。感染初期に生体内での HTLV-1 感染細胞は Gag, Pol, Tax を強く発現する。一方でそれら を発現する感染細胞は細胞障害性 T 細胞 (CTL) の標的となり、発現の弱い感染細胞のクローンが形成されていく。感染細胞内での HBZ の発現は Gag, Pol, Tax に比べれば弱いものの、感染初期から恒常的に保たれている。これまで HTLV-1 特異的 CTL の解析は腫瘍原性を持つ Tax と HBZ を中心に行われており、生体内で Tax 特異的 CTL は主に感染初期に、HBZ 特異的 CTL は感染後期にそれぞれ HTLV-1 感染細胞の増殖をコントロールしていると考えられている。

## 2. 研究の目的

ATL や HAM に対しては化学療法やヒト化 CCR4 抗体などの治療法が試みられ、一部の患者で効果を上げている。しかし、それら多くの HTLV-1 感染者には有効な治療法が見つからない。本研究では新たな抗がん治療法として効果が期待される T 細胞移入療法に適した高親和性 HTLV1 抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) の探索を行った。近年、多くのがん患者に対して様々な免疫療法が試みられており、特に T 細胞移入療法はがん抗原特異的 TCR や chimeric antigen receptor を導入した T 細胞を自家移植する方法で、それらが直接腫瘍細胞を攻撃する事が出来ることもあり一定の効果を挙げている。その為、抗原特異的 TCR を用いた T 細胞移入療法では、内在性のがん抗原に対して反応できるような高親和性 TCR を用いて移入細胞を作成することが治療効果を上げる要因となっている。

これまでの解析で HTLV-1 感染者はウイルス抗原 (Tax, HBZ, Env) に対して T 細胞応答を持つ事が数多く報告されているにもかかわらず、実際に HTLV-1 抗原特異的 T 細胞が持つ TCR 配列まで解析する研究者は非常に少なかった。本研究では高親和性 TCR を獲得する為に HTLV-1 感染者 (ATL や HAM 患者) での次世代シーケンサー解析により得られていた TCR レパトア情報から優位に増加している CD8T 細胞クローンの TCR 配列情報を抽出し、それらの TCR を T 細胞株に発現させることで抗原特異的 T 細胞を作成した。それらの抗原指向性は人工抗原提示細胞を用いて解析を行うスクリーニング系の確立に挑戦した。

この方法によりシングルセル解析のデータベースから得られた情報を元に、実際の患者細胞を用いずに TCR が認識する抗原ペプチドと HLA-I アリルの情報を網羅的に得る事が可能になると考えられた。

## 3. 研究の方法

本研究ではシングルセル解析のデータセットを用いて HTLV-1 感染者 (ATL や HAM) に由来する CD8T 細胞クローンが持つ TCR 配列情報を抽出し、その TCR が認識する HTLV-1 抗原と HLA-I アリルを決定する。また、T 細胞移入療法に適した高親和性 HTLV1 抗原特異的 TCR を探索するためにサイトカイン産生を測定することでペプチド/HLA-I 複合体への親和性の評価を

行う。

1、次世代シーケンサーを用いたシングルセル解析では ATL や HAM 患者の PBMCs や脳脊髄液に由来する CD8T 細胞の TCR $\alpha\beta$ の配列情報( complementary determining region 3( CDR3 ) やそれぞれの VDJ 領域) を抽出する。

2、それらの情報を元に TCR $\alpha\beta$ を遺伝子合成する。  $\alpha\beta$ 鎖を同時に発現させるために両方の遺伝子の間に 2A 自己切断ペプチド ( P2A 配列) を挿入する。

3、作成した TCR 遺伝子を TCR 欠損 Jurkat 細胞株や PrimaryT 細胞に導入することで抗原特異的 T 細胞を作成する。

4、一方で HTLV-1 感染者が持つ HLA-I アリルを HLA-null K562 細胞に発現させることで人工抗原提示細胞を作成する。

5、その HLA-I 発現 K562 細胞に HTLV-1 抗原 ( ウイルス遺伝子に由来するオーバーラッピングペプチド) をパルスし、TCR 発現 T 細胞と共培養を行う

6、TCR 発現 T 細胞からのサイトカイン産生を ELISPOT アッセイ ( Enzyme-Linked ImmunoSpot assay ) を行うことで HTLV-1 抗原認識の有無を確認する。

#### 4 . 研究成果

図 1 : シングルセル解析で得られたデータセットから TCR $\beta$ 鎖 CDR3 の配列に基づいて CD8T 細胞の割合を算出することで TCR レパートアの中で優位に増加しているクローンを調べた。HAM 患者の脳脊髄液中での最も検出された CD8T 細胞の TCR 配列情報 ( TCR-1 ) を用いて TCR $\alpha\beta$ 鎖を合成し、Primary T 細胞に遺伝子導入を行い、抗原特異的 T 細胞を作成した。

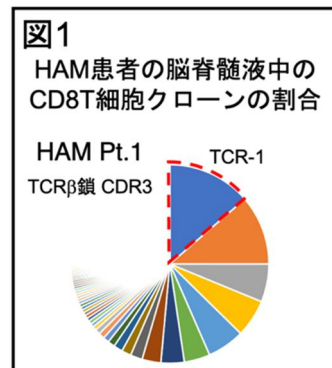


図 2 : 作成した TCR 導入 Primary T 細胞を用いて ELISPOT アッセイを行い、HTLV-1 抗原に対する反応性を解析した。この HAM 患者は HLA-A\*24:02 のアリルを所持していた為、HLA-null K562 細胞に HLA-A\*24:02 遺伝子を導入することで人工抗原提示細胞を作成した。一方、HTLV-1 抗原として Tax, HBZ, Env, Gag, Pol のオーバーラッピングペプチド ( 20mer, 6mer offset ) を作成し、4-5 ペプチドを 1 プールとして人工抗原提示細胞へのパルスを行った。それらの抗原提示細胞は TCR 導入 Primary T 細胞との共培養を行うことで IFN- $\gamma$ 産生を測定した。その結果、HAM Pt.1 TCR-1 は HLA-A24 拘束性に Tax-p13 で刺激した際に IFN- $\gamma$ を産生することがわかった。一方で他のペプチドプールではそれらの産生は観察されなかった。

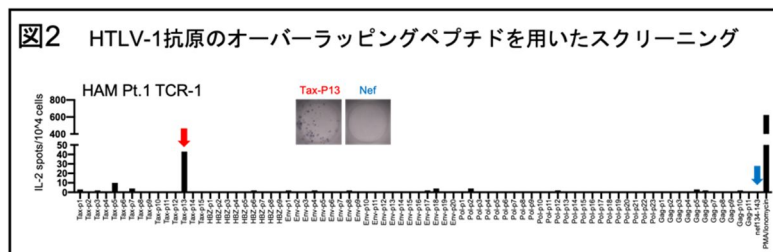


図 3 : HAM Pt.1 TCR-1 は Tax のペプチドプール p13 で反応したことから次に個々のペプチドに対する反応の観察を行った。Tax-p13 には Tax<sub>289-321</sub> の領域を含む 4 つのペプチドが含まれて

いた。それらのペプチドを個々で人工抗原提示細胞にパルスを行い、再度 TCR 導入 Primary T 細胞からのサイトカイン産生を測定したところ Tax<sub>295-309</sub> と Tax<sub>301-315</sub> で特異的な IFN- $\gamma$  産生が観察された。また、過去の報告で HLA-A\*24:02 陽性の HTLV-1 感染者では Tax<sub>301-309</sub> に対して T 細胞応答が観察されることが報告されており、それら今回同定した 2 つの Tax ペプチドには Tax<sub>301-309</sub> の領域が含まれていることが分かった。その為、HAM Pt.1 TCR-1 は HLA-A\*24:02 拘束性に Tax<sub>301-309</sub> を認識していることが考えられた。

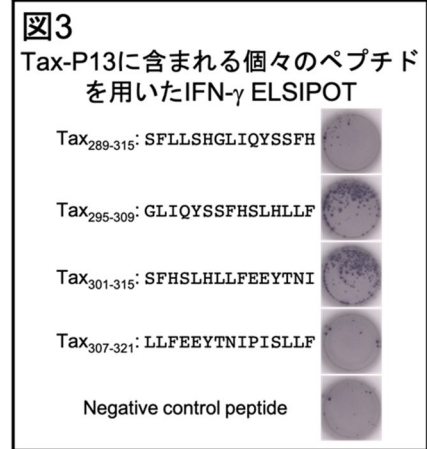


図4：HAM Pt.1 TCR-1 が HLA-A\*24:02 拘束性 Tax<sub>301-309</sub> を認識している可能性が考えられた為、HAM Pt.1 由来の 3 つの TCR-1, -2 -3 を TCR 欠損 Jurkat 細胞に遺伝子導入を行った。それらの細胞は HLA-A\*24:02/Tax<sub>301-309</sub> テトラマーでの染色を行うことで TCR による Tax ペプチドの認識の有無を判定した。その結果、図3で想定したように TCR-1 は A24/Tax テトラマーで染色されることがわかった。一方で TCR-2 と-3 は染色されず、この HAM 患者由来検体では HLA-A24/Tax 特異的 CD8T 細胞が増加していることがわかった。

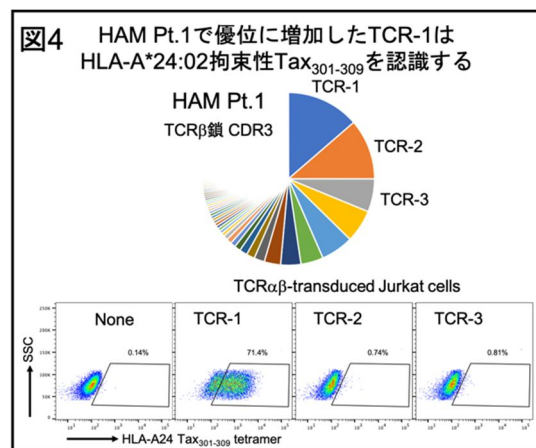
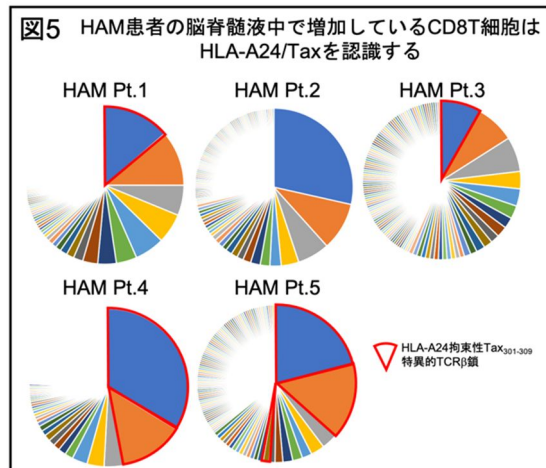


図5：HAM Pt.1 では HLA-A24/Tax 特異的 CD8T 細胞が増加していたことが図4で示された。次に他の HAM 患者の検体を用いて HLA-A\*24:02 拘束性 Tax<sub>301-309</sub> に対する認識の有無を解析したところ、HLA-A\*24 陽性の HAM 患者 5 例中 4 例で HLA-A24/Tax 特異的 CD8T 細胞が脳脊髄液中で増加していることがわかった。一方で同様の方法を用いて ATL 患者でも解析を行ったところ、HLA-A24/Tax 特異的 CD8T 細胞を検出することはできなかった。



本研究では、実際の患者由来細胞を用いずにシングルセル解析のデータを用いて多くの HTLV-1 抗原特異的な TCR を同定することができた。現在、それらの中で HLA-A\*24:02 拘束性 Tax<sub>301-309</sub> に対して高親和性を持つ TCR の選定を進めているところである。また、得られた TCR 配列の特許申請も視野に解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuo Misaki, Ueno Takaharu, Monde Kazuaki, Sugata Kenji, Tan Benjy Jek Yang, Rahman Akhinur, Miyazato Paola, Uchiyama Kyosuke, Islam Saiful, Katsuya Hiroo, Nakajima Shinsuke, Tokunaga Masahito, Nosaka Kisato, Hata Hiroyuki, Utsunomiya Atae, Fujisawa Jun-ichi, Satou Yorifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification and characterization of a novel enhancer in the HTLV-1 proviral genome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30029-9	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 Tan Benjy J.Y., Sugata Kenji et al.	4. 巻 131
2. 論文標題 HTLV-1 infection promotes excessive T cell activation and transformation into adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI150472	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 該当する

1. 著者名 Izaki Mikiko, Yasunaga Jun-ichirou, Nosaka Kisato, Sugata Kenji, Utsunomiya Hayato, Suehiro Youko, Shichijo Takafumi, Yamada Asami, Sugawara Yasuhiko, Hibi Taizo, Inomata Yukihiko, Akari Hirofumi, Melamed Anat, Bangham Charles, Matsuoka Masao	4. 巻 17
2. 論文標題 In vivo dynamics and adaptation of HTLV-1-infected clones under different clinical conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009271	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenji Sugata, Yoshihisa Yamano, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Integrated analysis of HTLV-1 specific CD8 T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid based on TCR sequences
3. 学会等名 22nd KUMAMOTO AIDS Seminar
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅田謙治, Rajib Md Samiul Alam, Benjy Tan Jek Yang, Omnia Reda, 徳永 雅仁, 佐藤 知雄, 宇都宮 與, 山野 嘉久, 佐藤賢文
2. 発表標題 TCR配列に基づいた末梢血と脳脊髄液中のHTLV-1特異的CD8+T細胞の包括的解析
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Benjy Jek Yang Tan, Kenji Sugata, Omnia Reda, Misaki Matsuo, Kyosuke Uchiyama, Paola Miyazato, Vincent Hahaut, Hitoshi Suzushima, Hiroo Katsuya, Masahito Tokunaga, Yoshikazu Uchiyama, Hideaki Nakamura, Eisaburo Sueoka, Atae Utsunomiya, Masahiro Ono and Yorifumi Satou
2. 発表標題 HTLV-1 hijacks T-cell activation mechanisms for leukemic transformation as revealed through single-cell RNA-seq
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Benjy Jek Yang Tan, Kenji Sugata, Omnia Reda, Misaki Matsuo, Kyosuke Uchiyama, Paola Miyazato, Vincent Hahaut, Hitoshi Suzushima, Hiroo Katsuya, Masahito Tokunaga, Yoshikazu Uchiyama, Hideaki Nakamura, Eisaburo Sueoka, Atae Utsunomiya, Masahiro Ono and Yorifumi Satou
2. 発表標題 HTLV-1 hijacks T-cell activation mechanisms for leukemic transformation as revealed through single-cell RNA-seq
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Benjy Jek Yang Tan, Kenji Sugata, Omnia Reda, Misaki Matsuo, Kyosuke Uchiyama, Paola Miyazato, Vincent Hahaut, Hitoshi Suzushima, Hiroo Katsuya, Masahito Tokunaga, Yoshikazu Uchiyama, Hideaki Nakamura, Eisaburo Sueoka, Atae Utsunomiya, Masahiro Ono and Yorifumi Satou
2. 発表標題 HTLV-1 hijacks T-cell activation mechanisms for leukemic transformation as revealed through single-cell RNA-seq
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Benjy Jek Yang Tan, Kenji Sugata, Omnia Reda, Misaki Matsuo, Kyosuke Uchiyama, Paola Miyazato, Vincent Hahaut, Hitoshi Suzushima, Hiroo Katsuya, Masahito Tokunaga, Yoshikazu Uchiyama, Hideaki Nakamura, Eisaburo Sueoka, Atae Utsunomiya, Masahiro Ono and Yorifumi Satou
2. 発表標題 HTLV-1 hijacks T-cell activation mechanisms for leukemic transformation as revealed through single-cell RNA-seq
3. 学会等名 第50回日本エイズ学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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