

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390264

研究課題名(和文)リンパ球チップを用いたウイルス感染症に対する個の免疫医療の基盤技術の開発

研究課題名(英文) Establishment of personalized immunotherapy method for virus-infected diseases using lymphocyte chip

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) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：近年、トリインフルエンザ、エイズ等の新興・再興感染症や日和見感染症、持続・潜伏感染症が、人類にとっての新たな脅威となってきた。これらの感染症の治療戦略として免疫遺伝子治療が期待されている。我々は、「リンパ球チップ」という革新的な抗原特異的リンパ球単離技術を応用し、感染症患者の血液や組織から、病原菌特異的ヒトTリンパ球/Bリンパ球を効率良く同定し、そのリンパ球からT細胞受容体(TCR)/抗体遺伝子を迅速(1-2週間)に単離し、ウイルス感染症に対する個の免疫医療の道を開くための基盤技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Recently, the emerging and re-emerging infectious diseases such as avian flu and AIDS, and other opportunistic or latent infectious diseases are threatening human beings. Immunotherapy via virus-specific monoclonal antibody and cytotoxic T cells is the most likely candidate to treat these fearful infectious diseases. We had developed a novel and innovative method, called "lymphocyte chip", to isolate human antigen-specific antibody-secreting cells from peripheral blood of patients with infectious diseases. In this research, we improved the lymphocyte chip method to clone efficiently and rapidly (within 10 days) antigen specific-antibody or TCR genes from individual lymphocytes of virus-infected patients as well as cancer patients, which may facilitate personalized immunotherapy for infectious diseases as well as cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症治療学

キーワード：感染症 リンパ球チップ 免疫治療 抗体遺伝子 TCR遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、SARS、トリインフルエンザ、エイズ等の新興・再興感染症や日和見感染症、持続・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きた。これらの感染症や細菌兵器の治療戦略として免疫遺伝子治療が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、我々が世界に先駆けて独自に開発した「リンパ球チップ」という革新的な抗原特異的リンパ球単離技術を応用し、感染症患者の血液や組織から、病原菌特異的ヒトTリンパ球/Bリンパ球を効率良く同定し、そのリンパ球からT細胞受容体(TCR)/抗体遺伝子を迅速(1-2週間)に単離し、ウイルス感染症に対する個の免疫医療の道を開くための基盤技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)リンパ球チップの改良:従来リンパ球を細胞チップ上の微小ウェルに導入するのに、重力沈降のみを利用していたため、少数の細胞を効率よくチップにアレイすることが困難であった。本研究では、磁気盤をチップに配置した磁気チップを種々の磁気ビーズを細胞に付着させ、どのようなサイズ・形状の磁気盤と磁気ビーズの組合せが細胞のウェルへの導入に最適化であるかを検証する。

(2)ISAAC法の改良:Nature Medicineに発表したISAAC法による抗原特異的抗体産生細胞の検出のためには、ボランティアにワクチン等を接種する必要があった。ワクチン等の接種による血液提供者への負担及び接種可能な抗原に限られているということから、ISAAC法のヒトへの応用は限定されていた。その欠点を改善し、ISAAC法を発展させるために、リンパ球を*in vitro*にてサイトカイン等で刺激することにより、それらの細胞を効率よく抗体分泌細胞へ分化させる系を確立する。

(3)抗原特異的T細胞の単一細胞レベルでの検出法(T-ISAAC)の確立:抗原特異的T細胞の検出することを目的として、以下の3種類の検出法を検討する。すなわち、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)の3つである。

(4)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T細胞株(TG40)にTCR α /TCR β 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。

4. 研究成果

(1)リンパ球チップの改良:これまでに、ウェルと同数の細胞をチップに添加した場合、約20%のウェルにしか細胞を導入することができなかったが、磁気ビーズと磁気チップの組合せにより約60~70%のウェルに細胞を導入できた。この結果、今後より微量のサンプルをチップで解析することが可能になり、患者を含め血液提供者の負担をより軽減でき、抗体医薬開発と抗原特異的T細胞治療を加速できる。

(2)ISAAC法の改良:リンパ球を*in vitro*にてサイトカイン等で刺激することにより、感染症から回復した患者血液中のリンパ球から約100倍効率よくウイルス特異的抗体分泌細胞を検出することができた。これらの成果により、今後目的の抗体を保有している健康人ないし患者に大きな負担をかけることなく、少量(5~10 mL)の血液より抗原に制限されることなく目的の抗体を取得することが可能になり、抗体医薬開発に大きく貢献できることが期待される。

(3)抗原特異的T細胞の単一細胞レベルでの検出法(T-ISAAC)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、および、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は、目的細胞の頻度が低い場合、バックグランドノイズに隠れてしまうということが実証された。

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)の方法は、細胞を分離するのに約半日費やすが、シグナルの形状でシグナルかノイズかを判別できるため、目的細胞の頻度が非常に低

い場合でも確実に目的細胞を検出できた。さらに、患者からの少量のサンプルに対応できた。従って、最終成果として、T-ISAAC 法により、50%以上の正確性で、抗原特異的 T 細胞を取得できる方法の確立できた。

(4) 取得 TCR の機能解析法の確立：増幅した TCR 遺伝子を発現ベクターに組み込み、あらかじめ、ヒト/マウスの CD4 あるいは CD8 遺伝子を導入した TCR 欠損 T 細胞株 (TG40) に TCR α /TCR β 遺伝子を導入し、TCR/CD3 分子を膜に発現させ、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とが可能となった。この成果により、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約 10 日間で行える画期的なシステムを確立することができた。従来法では、抗原特異的 TCR 遺伝子を取得するまでに約 3 カ月以上も要したので、約 1/10 の期間で TCR 遺伝子を取得することが可能となり、本方法は画期的といえる。

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 20 件)

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.* 査読有, 444: 319-324, 2014.
doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.049.
Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology.* 査読有, 3: e27258, 2014.
doi:10.4161/onci.27258
Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nat Med.* 査読有, 19:1542-1546, 2013. doi: 10.1038/nm.3358.
Ohnaga T, Shimada Y, Moriyama M, Kishi H, Obata T, Takata K, Okumura T, Nagata T, Muraguchi A, Tsukada K. Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells. *Biomed*

Microdevices. 査読有, 15:611-616, 2013.
doi: 10.1007/s10544-013-9775-7.

Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Zhou Y, Sakurai H, Andoh T, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. *PLoS One.* 査読有, 7(12):e52383, 2012.

doi:10.1371/journal.pone.0052383.
Sun X, Saito M, Sato Y, Chikata T, Naruto T, Ozawa T, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Takiguchi M. Unbiased Analysis of TCR α/β Chains at the Single-Cell Level in Human CD8⁺ T-Cell Subsets. *PLoS One.* 査読有, 7: e40386. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0040386.
Ozawa T, Horii M., Kobayashi E., Jin A., Kishi H, and Muraguchi A.: The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C β antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 422: 245-249, 2012.

doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.134.
Jin A., Ozawa T, Tajiri K., Obata T., Kishi H, Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nat. Protoc.*, 査読有, 6: 668-676, 2011.
doi:10.1038/nprot.2011.322.

Ozawa T, Jin A., Tajiri K., Takemoto M., Okuda T., Shiraki K., Kishi H, Muraguchi A. Characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus. *Antiviral Res.*, 査読有, 91: 283-287, 2011.
doi:10.1016/j.antiviral.2011.06.012.

[学会発表](計 41 件)

Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Kobayashi E, Ozawa T, Muraguchi A. Cis-interaction of TCR and antigenic peptides with MHC class I molecules on a CD8⁺ T-cell. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 千葉 .
Ozawa T, Piao X, Kobayashi E, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. Rapid generation of rabbit monoclonal antibodies against phosphorylated peptides and G-protein coupled receptor. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 千葉 .
Kobayashi E, Nakagawa H, Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Jin A, Muraguchi A. Cloning and functional analysis of human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-specific TCRs from peptide-vaccinated patients. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 千

葉.

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 ; 千葉.

Piao X, Hamana H, Kishi H, Kobayashi E, Ozawa T, Muraguchi A. Construction of T cell antigen-exploring system. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 千葉 .

Tsuda R, Ozawa T, Kobayashi E, Taki H, Kishi H, Muraguchi A. Functional analysis of anti-cyclic citrullinated protein antibodies derived from rheumatoid arthritis. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 千葉 .

Nakagawa H, Kobayashi E, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. Comparison of a-fetoprotein-specific TCR repertoires from hepatocellular carcinoma patients after peptide vaccine treatment and healthy donors. 第 42 回日本免疫学会学術集会 ; 2013 Dec 11-13 ; 千葉.

Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Nagai T, Muraguchi A. Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; Milan.

Ozawa T, Tuda R, Kobayashi E, Hounoki H, Shinoda K, Taki H, Tobe K, Kishi H, Muraguchi A. A monoclonal CCP-antibody derived from RA patients binds to several citrullinated antigens in the human cellular components. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; Milan.

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. 15th International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; Milan.

Kishi H, Jin A, Hamana H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Nagai T, Muraguchi A. Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. Measuring Antigen-Specific Immune Responses (MASIR) 2013; 2013 May 29-Jun 1; Dubrovnik.

Piao X, Muraguchi A, Hamana H, Ozawa T, Kobayashi E, Jin A, Kishi H. Rabbit ISAAC (rabbit immunospot array assay on a chip) allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. Keystone Symposia 'Antibodies as

Drugs'; 2013 Jan 27-Feb 1; Vancouver.

岸 裕幸, 金 艾順, 小林栄治, 小澤龍彦, 浜名 洋, 村口 篤 : Detection of antigen-stimulated cytokine secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip .第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸 .

小澤龍彦, 小林栄治, 金 艾順, 岸 裕幸, 村口 篤 : The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C β antibody . 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸 .

小林栄治, 岸 裕幸, 浜名 洋, 小澤龍彦, 中河秀俊, 金 艾順, 村口 篤 : Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy .第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸 .

浜名 洋, 小林栄治, 岸 裕幸, 小澤龍彦, 金 艾順, 村口 篤 : Comparison of TCR repertoires in EBV-specific T cells detected by three different staining methods .第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸 .

朴 秀虹, 小澤龍彦, 小林栄治, 岸 裕幸, 村口 篤 : Rapid generation of super-antibodies using rabbit ISAAC . 第 41 回日本免疫学会学術集会 ,2012 ,12 , 5-7 , 神戸 .

Kishi H., Obata T., Takami S., Kazui M., Ogawa A., Ozawa T., and Muraguchi A.: Analysis of cellular responses at single cell levels with a hybrid magnetic microwell array chip. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012, 11, 27-28, Kyoto.

Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Hamana H., Nagai T., Ozawa T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., and Muraguchi A.: A novel human TCR efficient cloning system confers candidate for TCR gene therapy within 10 days. 27th Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer, 2012, 10, 26-28, North Bethesda, USA.

Kishi H.: A direct T cell receptor cloning system from single human primary T cells confers the candidate for prospective gene therapy. Gordon Research Conference 'Immunochemistry & Immunobiology', 2012, 6, 10-15, Les Diablerets, Switzerland.

- ② Muraguchi A., Ozawa T., Jin A., Tajiri K., Kishi H. Generation and characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus: a candidate for antibody therapeutics for a wide range of influenza A viruses. IBC's 22nd Annual International Conference 'Antibody Engineering', 2011, 12,

4-8, San Diego.

- ②② 岸 裕幸, 小林栄治, 小澤龍彦, 浜名 洋, 長井輝美, 田尻和人, 村口 篤: 細胞チップを用いた抗原特異的サイトカイン分泌 T 細胞の単一細胞レベルでの検出. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011, 11, 27-29, 千葉.
- ②③ 小澤龍彦, 小林栄治, 岸 裕幸, 村口 篤: 可溶性 TCR の作製と機能解析. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011, 11, 27-29, 千葉.
- ②④ 小林栄治, 浜名 洋, 長井輝美, 小澤龍彦, 岸 裕幸, 村口 篤: 単一細胞解析に基づく迅速な抗原特異的 T 細胞受容体クローニングシステム. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011, 11, 27-29, 千葉.
- ②⑤ 朴 秀虹, 小澤龍彦, 小林栄治, 岸 裕幸, 村口 篤: ISAAC 法を用いた迅速かつハイスループットなウサギモノクローナル抗体作成法の開発. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011, 11, 27-29, 千葉.
- ②⑥ 浜名 洋, 小林栄治, 長井輝美, 小澤龍彦, 岸 裕幸, 村口 篤: 迅速な TCR cDNA クローニングシステムを用いた EBV 特異的単一 T 細胞の TCR α/β レパートア解析. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011, 11, 27-29, 千葉.
- ②⑦ Kishi H., Kobayashi E., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Tajiri K., Muraguchi A.: Detection of antigen-stimulated cytokine-secretion in T-cells at single cell levels on a live cell chip. 26th Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer, 2011, 11, 4-6, North Bethesda, USA.
- ②⑧ Ozawa T., Kobayashi E., Tajiri K., Jin A., Kishi H., Muraguchi A.: The novel method to detect single antibody-secreting B-cells and single cytokine-secreting T-cells using a cell-microarray chip. Cold Spring Harbor Meeting, 2011, 7, 22-24, New York.
- ②⑨ Kobayashi E., Hamana H., Nagai T., Horii M., Ozawa T., Kishi H., Muraguchi A.: Single T cell analysis system for rapid cloning and functional evaluation of antigen-specific T cell receptors. Cold Spring Harbor Asia Conference, 2011, 5, 24-28, Suzhou, China.

〔図書〕(計 2 件)

Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., and Muraguchi A.: Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. Single Cell Analysis, Methods in Molecular Biology 853, editors, Lindström S. and AndersonSvahn H., 141-150, Humana Press, 2012.

小澤龍彦, 岸 裕幸, 村口 篤: シン

グル細胞チップと抗体医薬への応用. 「ナノ融合による先進バイオデバイス」民谷栄一監修, 50-57, シーエムシー出版, 東京, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

名称: TCR cDNA の増幅方法

発明者: 浜名洋, 岸 裕幸, 村口 篤, 下岡清美

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 未定

出願年月日: 2014 年 5 月 30 日

国内外の別: 国内

名称: 抗原特異的 T 細胞受容体の取得方法

発明者: 小林栄治, 岸 裕幸, 村口 篤

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-007576

出願年月日: 2014 年 1 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: T 細胞受容体のクローニング方法

発明者: 村口 篤, 岸 裕幸, 小林栄治, 小澤龍彦

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/52950

出願年月日: 2013 年 7 月 24 日

国内外の別: 国外

名称: T 細胞の刺激方法およびその利用

発明者: 岸 裕幸, 村口 篤, 浜名洋, 小林栄治, 小澤龍彦

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/056076

出願年月日: 2013 年 3 月 6 日

国内外の別: 国外

名称: T 細胞受容体の抗原同定法および同定用レポーター細胞

発明者: 岸 裕幸, 村口 篤

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-023710

出願年月日: 2013 年 2 月 8 日

国内外の別: 国内

名称: T 細胞受容体のクローニング方法

発明者: 村口 篤, 岸 裕幸, 小林栄治, 小澤龍彦

権利者: 国立大学法人富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-16444

出願年月日: 2012 年 7 月 25 日

国内外の別: 国内

取得状況（計 1 件）

名称：外来遺伝子導入用ベクター及び外来遺伝子が導入されたベクターの製造方法

発明者：堀井雅恵, 岸 裕幸, 小林栄治, 小澤龍彦, 村口 篤

権利者：国立大学法人富山大学

種類：特許

番号：特許 5246904

取得年月日：2013 年 4 月 19 日

国内外の別：国内

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) 研究分担者

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

北島 勲 (KITAJIMA, Isao)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50214797

二階堂 敏雄 (NIKAIDO, Toshio)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50180568