

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791019

研究課題名(和文)新規T細胞受容体単離システムを応用した慢性肝炎治療用ペプチドワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic hepatitis peptide vaccine using a novel T cell receptor cloning system

研究代表者

小林 栄治 (Kobayashi, Eiji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：70459733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では我々が独自に開発したT細胞受容体(TCR)遺伝子クローニングシステムを用い、C型肝炎ウイルス(HCV)特異的TCR遺伝子の網羅的なクローニングを行い、エピトープに対するそれぞれのTCRの親和性を解析する。

HCVの構成タンパク質について計90個の抗原候補ペプチドを予測した後、慢性肝炎患者でHLA-A24陽性患者10人の末梢血リンパ球を上記ペプチドカクテルで刺激し、活性化するCD8+T細胞を検出した。その結果、4人の患者から活性化したCD8+T細胞が検出された。今後はこれら活性化したCD8+T細胞からTCRのクローニングを行い、クローニングしたTCRの親和性比較を行う。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported hTEC10 system (human TCR efficient cloning within 10 day s) by which we can obtain TCR cDNAs from a single Ag-specific human T cell and determine their antigen specificity within 10 days. In this study, we applied this system to clone human Hepatitis C virus (HCV)-specific TCRs from patients with chronic hepatitis and compare affinities of cloned TCRs.

To this end, we first predicted HLA-A24-restricted candidate epitopes of HCV components (Core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4, NS5A, NS5B) using BIMAS system, then stimulated peripheral blood lymphocytes (PBLs) from the 10 patients who had HLA-A24 allele with the candidate peptide mixtures. As a result, we detected activated CD8+ T cells from PBLs of 4 patients. We are going to clone TCRs of the CD8+ T cells and compare affinities of cloned TCRs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ペプチドワクチン T細胞受容体 Cytotoxic T lymphocyte

## 1. 研究開始当初の背景

(1) C型肝炎ウイルス(HCV)感染は約70%が慢性肝炎に移行し、約20~30年の経過で慢性肝炎患者の30~40%が肝硬変に移行し、肝硬変に移行すると年率約7%でほとんど全ての患者に肝癌が発生する。日本には毎年二万数千人がHCV感染に起因する肝癌で死亡しており、社会的にも大きな問題となっている。インターフェロンとリバビリンの併用療法が導入され、C型慢性肝炎の奉効率は50%程度にまで改善されたが、より効果的な治療法の開発が急務である。

(2) 肝炎ウイルスが肝細胞に感染すると、NK細胞などによる感染細胞傷害により、肝炎ウイルスを排除するように働く。同時に樹状細胞は大量のIFN- $\gamma$ を産生し、肝炎ウイルスの増殖を抑制する。このような非特異的なウイルス免疫応答で肝炎ウイルスが排除されなかった場合は、B細胞からウイルス特異的中和抗体が産生されると同時に細胞傷害性T細胞(CTL: Cytotoxic T Lymphocyte)が感染細胞を傷害することでウイルス排除に働く。肝炎ウイルス感染に対してこれらの免疫応答が適度に応答した場合は、無症候性あるいは急性肝炎を発症しウイルスは排除されるが、応答が不十分な場合は慢性感染に移行する。中和抗体は二次感染におけるウイルス排除には重要な役割を果たすが、一次感染あるいは慢性感染でのウイルス排除に重要な役割を果たすのはCTLであると考えられている。

(3) これまでCTL応答の解析はウイルス特異的CTLを肝浸潤リンパ球から直接クローン化する方法や末梢血単核球をCTLエピトープを含むペプチドで刺激し、誘導することにより行われてきた。最近ではCTLをエピトープペプチドで刺激し、ELISPOTアッセイにより解析する方法やHLA/ペプチド複合体テトラマーをプローブにフローサイトメトリーで解析する方法が用いられるようになった。しかしながら、これらの方法では特定のエピトープに対するCTLの存在数が解析できるのみで、ウイルス特異的なCTLが発現するT細胞受容体(TCR: T cell receptor)の親和性について網羅的な解析を行うことが困難だった。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで抗原特異的リンパ球受容体を単一細胞レベルでクローニングできるシステムの開発を行ってきた。B細胞受容体(抗体)についてはすでに完成しており、このシステムを用いることでインフルエンザウイルスやB型肝炎ウイルスに対する有用な抗体を取得して報告している(jin A et al. Nat. med. 9, 1088, 2009)一方、最近になってTCRについても10日間以内という極めて短期間にクローニングから抗原特異性

を評価するシステムを開発することができた。そこで、本研究ではこのシステムを用いて慢性C型肝炎患者のリンパ球よりC型肝炎ウイルス特異的TCRのクローニングを行い、そのエピトープに対する親和性を解析する。この解析により高親和性のTCRを持つCTL、すなわちウイルスを効率的に排除するCTLを誘導できるエピトープペプチドを同定する。これらの解析によって、ペプチドワクチンを用いた慢性C型肝炎患者の新しい治療法を開発することが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では第一段階として日本人に最も多いアリルであるHLA-A\*2402に着目して解析を行う。HLA-A\*2402に提示される可能性が高いHCVペプチド配列をBioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS)を用いて予測する。この予測をHCVのCore, Envelope, NSタンパクの各構成タンパクについてそれぞれ行う。HLA-A\*2402に提示される可能性が高いペプチド上位20個程度についてペプチド合成を行う。各構成タンパクごとに作製したペプチドのカクテルを用いて慢性C型肝炎患者のリンパ球を刺激し、IFN- $\gamma$ を産生するHCV特異的CTLの検出を行う。同時に、HCV特異的CTLをシングルセルソーティングにより1個ずつ回収する。

(2) 回収した1個1個のリンパ球より5' RACE法によりTCRのV領域遺伝子を増幅させる。取得したTCR遺伝子をレトロウイルス発現ベクターに相同組み換え法によって組み込む。この方法は制限酵素を用いないため、TCR遺伝子に内在する制限酵素配列による制限を受けず、また従来の組み換え処理を必要としないため、短時間で効率的な発現ベクターの構築が可能になっている。作製した発現ベクターを自己のTCRを欠損するT細胞株であるTG40に導入して細胞表面に発現させる。取得したTCRを発現させたTG40とペプチドを提示させた抗原提示細胞を共培養する。発現させたTCR遺伝子エピトープならば活性化マーカーであるCD69の発現が誘導されるので、これを指標に、取得したTCRのエピトープを同定する。

(3) TCRが抗原提示細胞上のMHC/ペプチド複合体と結合することでT細胞は活性化するが、同時にTCRの発現を減少させることが知られている(Cai, Z et al. J. Exp. Med. 185, 641, 1997)。TG40においてもペプチド/MHC複合体からの刺激にともないTCRの発現が減少する。そこで、この反応を利用し、抗原ペプチド濃度依存的なTCRの発現減少を比較することで、取得したTCRの抗原に対する親和性を比較する。

(4) 取得したTCRのなかで親和性が良いものについて、健康人末梢血リンパ球にTCR遺伝

子を導入して、CTL 活性を測定する。HLA-A\*2402 を発現する細胞株 T2-A24 にペプチドを提示させ、これに対する細胞傷害活性を測定することで、導入した高親和性 TCR の CTL 活性を比較する。

(5) CTL 活性が効果的に誘導された TCR のエピトープペプチドを用いて、慢性 C 型肝炎患者のリンパ球を刺激する。刺激によって活性化した CTL の IFN- $\gamma$  分泌を ELISPOT アッセイにより測定する。また、ペプチド刺激によって活性化した患者リンパ球による細胞傷害活性を測定することで、同定したエピトープペプチドの CTL 活性化誘導を検証する。

#### 4. 研究成果

本研究では我々が独自に開発した TCR 遺伝子クローニングシステムを用い、HCV 特異的 TCR 遺伝子の網羅的なクローニングを行い、エピトープに対するそれぞれの TCR の親和性を解析する。この解析により、HCV に高親和性の TCR をもつ細胞傷害性 T 細胞を誘導できるエピトープペプチドを同定することが目的である。そのため、まず HCV の構成タンパク質 (Core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4, NS5A, NS5B) について各 10 個、計 90 個の候補ペプチドを BIMAS により予測し、合成した。また、抗 HLA-A24 抗体を用いて、慢性肝炎患者 13 人の末梢血リンパ球の解析を行ったところ、10 人が HLA-A24 陽性だった。HLA-A24 陽性患者 10 人の末梢血リンパ球を上記ペプチドカクテルで刺激し、IFN- $\gamma$  を産生する CTL 細胞を検出した。その結果、患者 5 では Core タンパクのペプチドカクテル、患者 7 では NS5A のペプチドカクテル、患者 10 では E2 と NS5B のペプチドカクテルの刺激により、活性化した CTL 細胞が検出された。この結果より、HCV 感染による慢性肝炎患者では患者毎にペプチドワクチンの候補エピトープが異なる可能性が示唆された。しかしながら、これらの反応性は低く、細胞のソーティングは困難だった。今後はより適切な CTL 活性化マーカーの選択および刺激方法を検討する必要がある。その後、活性化した CTL から TCR のクローニングおよび再構成を行い、ペプチドカクテルから真に反応するペプチドを決定し、クローニングした TCR の親和性比較を行う。また、CTL が効果的に誘導された TCR のエピトープペプチドを用いて、慢性 C 型肝炎患者のリンパ球を刺激することで、同定したエピトープペプチドの CTL 活性化誘導を検証する。

#### 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 6 件)

Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A.: "A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy." *Oncoimmunology*. 2014 Jan 1; 3(1): e27258.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960297/> 査読有

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.* 2014 Feb 14; 444(3): 319-24. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.049. 査読有

Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin S, Kaneko S and Muraguchi A.: "A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days" *Nat. Med.* 2013 Nov; 19(11): 1542-6. doi:10.1038/nm.3358. 査読有

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*. 2012; 7(12): e52383. doi: 10.1371/journal.pone.0052383. 査読有

K Sun X, Saito M, Sato Y, Chikata T, Naruto T, Ozawa T, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Takiguchi M.: "Unbiased analysis of TCR  $\alpha$  chains at the single-cell level in human CD8+ T-cell subsets." *PLoS One*. 2012; 7(7): e40386. doi:10.1371/journal.pone.0040386. 査読有

Ozawa T, Horii M, Kobayashi E, Jin A, Kishi H, Muraguchi A.: "The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-C antibody." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1; 422(2): 245-9. 2012 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.134. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Eiji Kobayashi, Hidetoshi Nakagawa, Hiroshi Hamana, Hiroyuki Kishi, Tatsuhiko Ozawa, Aishun Jin and Atsushi Muraguchi: "Cloning and functional analysis of human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-specific TCRs from peptide-vaccinated patients" 第 42 回日本免疫学会総会 (20131211) 幕張

E.kobayashi, Mizukoshi E., Kishi H., Hamana H., Nagai T., Ozawa T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., and Muraguchi A.: "A novel cloning system of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy" 第 72 回日本癌学会学術総会 (20131003) 横浜

Eiji Kobayashi, Eishiro Mizukoshi, Hiroyuki Kishi, Hiroshi Hamana, Terumi Nagai, Tatsuhiko Ozawa, Hidetoshi Nakagawa, Aishun Jin, Shuichi Kaneko and Atsushi Muraguchi: "Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy" 15th International Congress of Immunology, (20130822) Milan

小澤龍彦, 朴 秀虹, 小林栄治, 周越, 櫻井宏明, 安東嗣修, 金 艾順, 岸 裕幸, 村口 篤: "マイクロウェルアレイチップを用いたウサギモノクローナル抗体の迅速作製法の開発" 第 35 回日本分子生物学会年会 (20121211) 福岡

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 (20121205) 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 antibody" 第 41 回日本免疫学会学術集会 (20121205) 神戸

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 (20121205) 神戸

岸 裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 金子周一, 村口 篤: "がんの TCR 遺伝子治療にむけた候補 TCR 遺伝子の迅速クローニング法" 第 71 回日本癌学会学術総会 (20120919) 札幌

E.kobayashi, 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 (20121026) North Bethesda

小林栄治, 水腰英四郎, 岸 裕幸, 小澤龍彦, 浜名 洋, 長井輝美, 金 艾順, 金子周一, 村口 篤: "抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子の超迅速クローニングシステムの構築" 第 16 回日本がん免疫学会総会 (20120726) 札幌

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 4 件)

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: 平成 26 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/JP2013/070028  
出願年月日: 平成 25 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: 平成 25 年 3 月 6 日  
国内外の別: 国外

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 2012-164442  
出願年月日：平成 24 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：特許第 5246904 号  
取得年月日：平成 25 年 4 月 19 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 栄治 (KOBAYASHI, Eiji)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教  
研究者番号：70459733