

## II. キメラ抗原受容体 (CAR) -T 細胞療法および T 細胞受容体 (TCR) -T 細胞療法に資する新規抗体・TCR 開発のための基盤技術の開発

学術研究部医学系	教授	岸	裕	幸
学術研究部医学系	助教	浜	名	洋
学術研究部医学系	助教	小	林	栄
学術研究部医学系	准教授	小	澤	龍

### 【研究概要】

近年、京都大学の本庶佑教授は PD-1 分子を発見し、それが免疫細胞の抑制に関与することを見出した。腫瘍の組織中には免疫細胞が多数浸潤しており、腫瘍細胞を攻撃することで腫瘍の増殖を抑制している。一方、腫瘍は PD-1 のリガンドである PD-L1 分子を発現し、腫瘍に浸潤している免疫細胞の細胞膜上の PD-1 と相互作用させることにより免疫細胞の機能を抑制する。その結果、免疫細胞による腫瘍細胞の傷害が抑制され、腫瘍細胞が増殖するに至る。本庶佑教授は PD-1 に対する抗体を作製し、抗体によって PD-1 分子と PD-L1 分子との相互作用をブロックすることにより、腫瘍内の免疫細胞の抑制状態が解除され、免疫細胞が活性化されること、その結果、腫瘍細胞が攻撃され、腫瘍が退縮することを示し、その臨床応用により 2018 年ノーベル医学生理学賞を受賞した。これにより、がん免疫を用いた腫瘍の治療法の開発に注目が集まっている。しかし、PD-1 抗体を用いた治療（免疫チェックポイント阻害療法）は、がん患者の 2 割から 3 割にしか効果がなく、それを補完するような治療法が望まれている。その意味で、キメラ抗原受容体 (CAR) や腫瘍特異的 T 細胞受容体 (TCR) を T 細胞に発現させ、腫瘍の治療に応用する CAR-T 細胞療法や TCR-T 細胞療法の開発に期待が集まっている。機能の高い CAR-T 細胞や TCR-T 細胞を開発するためには、機能の高い腫瘍特異的 CAR や TCR を取得することが重要である。一方で、TCR の代わりにがん細胞のがん抗原(ペプチド)と MHC クラス I の複合体(p/MHC)に特異的に結合する抗体 (TCR 様抗体) を用いた、新しい治療法が次世代のがん免疫療法として期待されている。さらに近年、ペプチド/MHC を標的とする TCR 様抗体を用いた CAR-T 細胞療法への応用が注目されており、その研究が進んでいる。

我々は、これまでに、ヒトの B リンパ球から 1 週間弱で抗原特異的ヒト抗体を取得

するシステム (ISAAC 法) を開発し、また、抗原特異的 TCR を 10 日以内に取得するシステム (hTEC10 法) を開発してきた。それぞれの技術は世界的に権威のある科学雑誌 Nature Medicine に発表し、大きな反響を生んだ (Jin A, Nature Medicine, 2009; Kobayashi E, Nature Medicine, 2013)。本研究では、これらの単一リンパ球解析法を発展させ、腫瘍の治療に最適な高機能の TCR 様抗体および TCR を作製するためのシステムを作りだすことを目的とする。本研究により高機能の TCR 様抗体および TCR が取得できれば、TCR 様抗体による CAR-T 細胞および TCR-T 細胞を作製することにより、多くのがん患者ががん免疫療法の恩恵を被ることができると期待される。

## 【各研究者のまとめ】

### TCR の抗原同定法の開発

岸は、TCR-T 細胞療法に使う TCR の抗原を効率的に同定する方法の開発のために研究を進めた。従来、TCR の抗原同定は、非常に労力・日数のかかる作業であったが、酵母を用いて迅速・簡便に TCR の抗原を同定する方法の開発を進めた。2020 年度は、実験系を立ち上げるために、モデルペプチド MHC とその TCR を用いて、酵母の膜状にモデルペプチド MHC 発現させることができる条件検討を行った。その結果、酵母の膜上にペプチド/HLA-A24 タンパク質を安定して発現させることができ、さらに、そのペプチド/HLA-A24 タンパク質と、それに特異的な可溶性 TCR との結合性が認められることを実証した。来年度以降、酵母を用いたペプチド/HLA-A24 ライブラリーを構築していく予定である。

### ネオ抗原特異的 TCR の同定法の開発

腫瘍細胞は患者の臓器の細胞の一部ががん化したものであり、免疫にとって自己であるため、免疫応答は起こりにくい。しかし、腫瘍細胞の遺伝子が突然変異を起こすことで生じたネオ抗原は免疫学的に非自己であるため、免疫細胞のよい標的となりうる。浜名は、ネオ抗原特異的 TCR を効率よく同定する方法の開発を進めた。従来 TCR を T 細胞に発現させるためには、その発現ベクターを作製する必要があるが、その作製に時間がかかるため、数多くの TCR の機能を解析することができなかった。浜名は、発現ベクターを作製せずに、PCR で増幅した遺伝子断片 (TAP fragment) を使って簡便に TCR を発現させるために、TAP fragment の作製法の最適化を行った。その結果、TAP fragment に用いるプロモーターとして、従来使っていた CMV プロモーター

よりも EF1 $\alpha$  プロモーターの方が Jurkat $\Delta\alpha\beta$  CD8 $\alpha$  細胞における TCR の発現により適していることを明らかにした。今後、TAP fragment を用いて、効率的な TCR 機能解析法を構築していく。

#### T 細胞 ISAAC による腫瘍特異的 TCR の同定法の開発

小林は、免疫学教室にて開発した単一 T 細胞解析法である hTEC10 法とマイクロウェルアレイチップを用いた「ISAAC 法」、さらに T 細胞の新規活性化機構を融合させて、抗原ペプチドのみで抗原特異的 T 細胞を同定することができる T 細胞 ISAAC 法を開発を進めた。具体的には、T 細胞 ISAAC を用いて腫瘍特異的 TCR を効率よく同定するために、T 細胞 ISSAC の高感度化を目指し、研究を進めた。その結果、マイクロウェル上で T 細胞を刺激するのに 8 時間程度の刺激で十分であること、また、回収した T 細胞からの TCR cDNA の増幅条件を最適化し、さらに TCR と同時に  $\beta$ 2-ミクログロブリンの cDNA を増幅させることにより、マイクロマニピュレーターによる細胞の回収が適切に行われたかどうか容易に判断できるようにした。今後はモデル抗原を用いて T 細胞 ISAAC の最適化の検討を行っていく。

#### TCR 様抗体の取得法の開発

小澤は、TCR と同様に、がん抗原(ペプチド)と MHC クラス I の複合体(p/MHC)に特異的に結合する TCR 様抗体の効率的取得法の開発を進めた。そのための準備として、がん抗原である  $\alpha$ -fetoprotein (AFP)由来ペプチドを結合した可溶化 HLA-A24 分子 (AFP-SCT) を作製した。作製した AFP-SCT がこれまでに取得していた AFP ペプチド/HLA-A24 特異的 TCR に結合することが示せたため、それをウサギに免疫した。免疫したウサギの血清中に AFP-SCT に結合する抗体が検出するため、ウサギよりリンパ球を調製した。今後、調製したウサギリンパ球を使って、効率的 TCR 様抗体の取得法を開発を行う。