

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	治
学術研究部医学系	准教授	小	澤	龍	彦

【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出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 の抗原をスクリーニングする方法として、酵母表面ディスプレイ法を利用する。具体的には、抗原であるペプチドをランダムな配列にしてライブラリー化したペプチド MHC を酵母の膜上に発現させ、可溶化した TCR を用いて特異的なペプチド MHC を発現している酵母をスクリーニングする系である。令和 3 年度は、令和 2 年までに考案した構造 (分泌シグナル-抗原ペプチド-β2 ミクログロブリン-HLA-A24 重鎖の α1α2 ドメイン変異体-アフィニティータグ-酵母膜融合ドメインを一本鎖で繋いだ構造) を元に、ランダムペプチドライブラリーの構築を行った。そして、このライブラリーに低頻度の目的抗原を発現する酵母を混合させ、その酵母がスクリーニングできるかの検証を行った。その結果、目的とするペプチドを発現している酵母が 0.0001% (10⁶ 個に 1 個) の極めて低頻度の場合においても、目的とするペプチドを発現している酵母を濃縮できることが示された。次の段階として、ランダムライブラリーからのスクリーニング、即ち目的の抗原を発現する酵母を混ぜない場合からのスクリーニングを行う予定である。

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。令和 2 年度は、1 名の大腸がん患者 CCP1 の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からの TCR cDNA を増幅し、TIL から得られた TCR の TAP fragment 作製を行った。令和 3 年度は、昨年度作製した TCR の TAP fragment を Jurkat $\Delta\alpha\beta$ CD8 α 細胞にエレクトロポレーションして TCR を発現させ、CCP1 のネオ抗原の遺伝子をタンデムに配置した tandem minigene (TMG)を遺伝子導入した MCF-7 Δ HLA 細胞をターゲット細胞として、ネオ抗原特異的 TCR のスクリーニングを実施した。その結果、患者 CCP1 の TIL 由来 TCR の TMG への反応性を解析し、HLA-A11:01 拘束性に TMG1 に反応する TCR を同定することに成功した。この結果は、浜名の方法が「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」として機能することを示す大きな成果である。次年度では、今回同定された TCR が、TMG1 に含まれるどのネオ抗原に反応しているのかを解析し、各 TCR の標的ネオ抗原を同定する予定である。また患者 CCP5 および CCP15 の TIL 由来の TCR についても、CCP1 と同様に解析を進め、我々の「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」の有用性について検証していく予定である。

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 法の開発を進めている。T 細胞 ISAAC で腫瘍抗原特異的 TCR を取得する材料として健康人末梢血リンパ球中にある腫瘍抗原特異的 T 細胞を考えている。しかし、健康人末梢血リンパ球中にある腫瘍抗原特異的 T 細胞は極めて低頻度であるため、*in vitro* で腫瘍抗原ペプチドにより刺激することで増殖させる必要がある。そこで、令和 3 年度は *in vitro* で効率よく腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖させるのに必要な人工抗原提示細胞株を樹立した。さらに樹立した人工抗原提示細胞株を用い、Epstein-Barr (EB) ウイルス由来 BRLF1 特異的 T 細胞の増殖を試み、細胞調製の条件を設定した。

TCR 様抗体の取得法の開発

小澤は、がんペプチド MHC を認識する TCR 様抗体を作製し、該当がん抗原を発現する腫瘍が傷害できる CAR-T や BiTE の作製を目指す。がん抗原は、肝臓がんなどで高発現している α フェトプロテイン(AFP)を対象とした。令和 3 年度は、令和 2 年までにがん抗原ペプチド MHC を免疫したウサギ由来リンパ球より、AFP ペプチド/HLA-A24 特異的 TCR 様モノクローナル抗体の取得を行った。AFP-SCT を免疫したウサギよりリンパ球を分離し、ブロッキング法を併用した ISAAC 法を用いて、27 種類のユニークな配列を持つ抗体遺伝子を取得し、リコンビナント抗体を作製した。そのうち 2 種類の抗体は、AFP-SCT に対する結合は、EBNA3A-SCT と比べて強いことが認められた。また、13 種類の抗体は β 2 ミクログロブリンと結合することが認められた。ELISA で検討した段階であるが、2 種類の抗体は AFP-SCT に対する結合が、EBNA3A-SCT に対する結合と比べて強いことから、AFP ペプチド/HLA-A24 特異的 TCR 様抗体であることが示唆される。また、親和性も $2\sim 3\times 10^{-9}$ M であり、他の高親和性の TCR 様抗体と同程度であることから(Ozawa et al 2021 Eur J Immunol)、今回作製した TCR 様抗体も、高親和性であると考えられる。これまではタンパク質レベルでの結果であるため、今後は細胞レベルの解析を行い、得られた TCR 様抗体の評価を進める予定である。