

## II-1 TCR の抗原同定法の開発

学術研究部医学系 教授 岸 裕 幸

### 〈目的〉

腫瘍特異的 TCR を用いて TCR-T 細胞療法を行う場合、その TCR がどのような抗原を認識するかを知っておくことは、用いる TCR-T 細胞が正常組織を攻撃する可能性があるか無いか、その副作用の可能性を推定するのに必要である。TCR の抗原同定は、次世代シーケンス技術解析と、ペプチド/MHC ライブラリー作製の 2 つに大別できる。次世代シーケンス技術解析では変異を指標としているため、遺伝子の変異に基づくネオアンチゲンの候補が同定できる。しかし膨大な候補が得られるだけでなく、患者によって異なるため、数多くの患者への対応は困難である。さらに抗原の決定までには、複雑で多大な労力と費用が必要である。ペプチド/MHC ライブラリーの系は、予め作製したライブラリーを用いることで、おおよそ 1 ヶ月程度で TCR と結合するペプチドの候補が得られ、その後の解析に供することができ、次世代シーケンス技術と比べて、技術的に容易であり、労力も少なく済む。現在までに、酵母表面ディスプレイ法を用いたヒト HLA-A02 について報告があるが、特に日本人のアレル頻度が約 40%と最も多い HLA-A24 については報告がなく、ライブラリーは整備されていない。そのため HLA-A24 に焦点を当ててペプチド/MHC ライブラリーを作製して、TCR の抗原スクリーニングシステムを構築することは、日本におけるがん研究の発展のために非常に意義がある。そこで本研究では、HLA-A24 に焦点を当てて TCR の抗原を効率的にスクリーニングする技術開発を行うことを目標とした。

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こととした。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- $\beta 2$  ミクログロブリン-HLA-A24 重鎖の  $\alpha 1\alpha 2$  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。

## 〈方法〉

### MACS による酵母のスクリーニング及び培養方法

酵母ライブラリーの構築、培養、及びスクリーニングは、Chao らの方法 (Chao et al Nat Protocol 2006)を参考に行った。

ライブラリーの構築は、HLA-A24 と結合するペプチドのアンカー部分 (全9アミノ鎖のうち、2番目の Y、9番目の F) を固定し、それ以外の部分をランダムとなるように、該当部分の塩基配列を 5'-NNKTATNNKNNKNNKNNKNNKNNKTTC -3'としたプラスミドを作製した。このプラスミドをエレクトロポレーションにて出芽酵母 EBY100 に形質転換導入し、ガラクトース存在下で培養して、ランダムペプチドライブラリーの酵母を作製した。

培養及びスクリーニングは、ガラクトースを含まない液体培地で酵母を OD600nm = 6 程度となるまで 30°C、180rpm で震盪培養した。次にこの酵母溶液を回収し、ガラクトースを含む液体培地に OD600nm = 0.75 になるように移し、20°C、180rpm で 20 時間震盪培養した。培養後酵母を回収し、PBSM Buffer で洗浄後、Streptavidin beads (Miltenyi biotec)と室温で 30min 反応させた。PBSM Buffer で洗浄後、磁気カラム(Miltenyi biotec)を用いて、素通り画分を回収した。次に予め Streptavidin beads と混合させた可溶性 TCR と回収した酵母を室温で 3h 反応させ、PBSM Buffer で洗浄後、再度磁気カラムを用いて、磁気と結合した酵母を回収した。回収後ガラクトースを含まない液体培地にて 30°C、180rpm で震盪培養した。この培養と磁気カラムによる分離のサイクルを、4 回繰り返した。

### 酵母からの遺伝子取得と次世代シーケンス解析

各サイクルより分取した酵母の一部を、Easy yeast plasmid DNA isolation Kit (TaKaRa)を用いてプラスミド DNA を抽出した。鋳型として抽出したプラスミド DNA、プライマーとして Nextra OH\_U (5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCAGCT

GTAATACGACTCACT -3')及び Nextra OH\_L (5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTA TAAGAGACAGCGCCACCTCCCGAACCCAC -3')を使用し、KAPA DNA ポリメラーゼ (KAPA Biosystems)を用いて、ペプチド部分のみを下記様に PCR で増幅させた。

アガロースゲル電気泳動で単一の PCR 増幅を確認した後、DNA purification Kit (QIAgen)を用いて精製した。この PCR 産物を鋳型に、Illumina の推奨プロトコールに

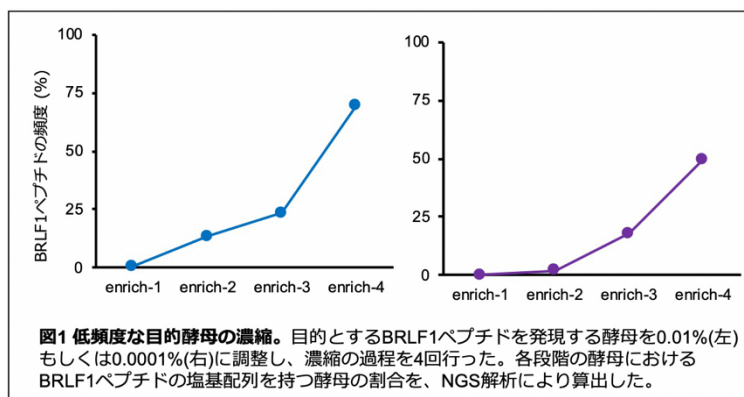
従って Nextra Index Primer (Illumina) と KAPA DNA ポリメラーゼによって再度による増幅を行った。

得られた PCR 産物を DNA purification Kit によって精製した。Illumina の推奨プロトコルに従い、Miseq Reagent Kit v2 300 cycle (Illumina) と Illumina Miseq sequence を用いて次世代シーケンスを行った。得られたデータより、ペプチド部分の DNA 配列を抽出した。この DNA 配列をアミノ酸配列に翻訳し、アミノ酸配列の出現数を計測した。

### 〈結果及び今後の予定〉

昨年度までに考案した構造を元に、ランダムペプチドライブラリーの構築を行った。HLA-A24 と結合するペプチドのアンカー部分（全 9 アミノ鎖のうち、2 番目の Y、9 番目の F）を固定した。ライブラリー規模として、 $1 \times 10^8$  以上の規模を作製した。そしてこのライブラリーの中に、BRLF1 ペプチド/MHC を発現する酵母を混合させ、BRLF1 ペプチド/MHC を発現する酵母の割合を 0.01% となるように調整した。これら混合した酵母より F09 の可溶化 TCR と結合する酵母を MACS により回収し、回収した酵母を一旦増殖させた。再度可溶化 TCR と結合する酵母を回収、培養し、計 4 回繰り返す、各段階でサンプリングを行った。

各段階の酵母よりプラスミドを抽出し、ペプチド部分を含む DNA 断片を PCR で増幅させ、この DNA 断片の塩基配列を次世代シーケンスにより解析を行った。BRLF1 ペプチドの塩基配列を持つ



酵母の割合は、1回目の濃縮後は0.6%であったが、2回目は13%、3回目は24%、4回目は69%と、濃縮の過程を行うにつれて、増加していることが確認された(図1左)。さらに、BRLF1 ペプチド/MHC を発現する酵母の割合を 0.0001% となるように調整し、同様の手順を行った。その結果、1回目の濃縮後は0.02%であったが、2回目は2.1%、3回目は17.9%、4回目は49.6%と、0.0001%からで同様に、濃縮の過程を行うにつれて、目的ペプチドを発現する酵母の割合が増加していることが確認された(図1

右)。これらの結果より、0.0001%の極めて低頻度からでも、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。

本結果より、酵母表面ディスプレイ法と可溶性 TCR を用いることで、0.0001%の極めて低頻度からでも目的の抗原を発現す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。

---

## II-2 ネオ抗原特異的 TCR の同定法の開発

学術研究部医学系 助 教 浜 名 洋

### 【研究概要】

免疫チェックポイント阻害薬のがん治療効果は限定的であり、その治療効果が認められない患者には、腫瘍反応性 T 細胞受容体(TCR)遺伝子を導入した T 細胞 (TCR-T 細胞) を投与する TCR-T 細胞療法が有効な治療法の 1 つだと考えられる。特に、遺伝子変異により生じるネオ抗原を標的とした TCR-T 細胞療法が、T 細胞の強い応答を誘導すると考えられることから、有望である。ネオ抗原を標的とした TCR-T 細胞療法を行うには、ネオ抗原特異的 TCR 遺伝子が必要である。我々は先行研究を参考に腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からネオ抗原特異的 TCR の取得するための研究を進めているが、従来のネオ抗原特異的 TCR の同定法は時間と労力が必要であることが、研究を進める上での課題の 1 つとなっている。

本研究では、我々がこれまでに開発した迅速・簡便な「TCR cDNA の増幅方法」および「TCR の機能解析法」を応用し、「TIL からネオ抗原特異的 TCR 遺伝子を迅速・簡便に同定する方法」の開発を行う。開発する方法は、TCR-T 細胞療法の基礎研究および臨床応用に用いられ、TCR-T 細胞療法の発展や TCR-T 細胞の製造コストの低減に繋がり、がん免疫療法に大きく貢献することが期待される。

現在、本研究で開発を進めている「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」の概要を図 1 に示す。この方法では、腫瘍組織に含まれている TIL から PD-1+ CD137+ CD8+

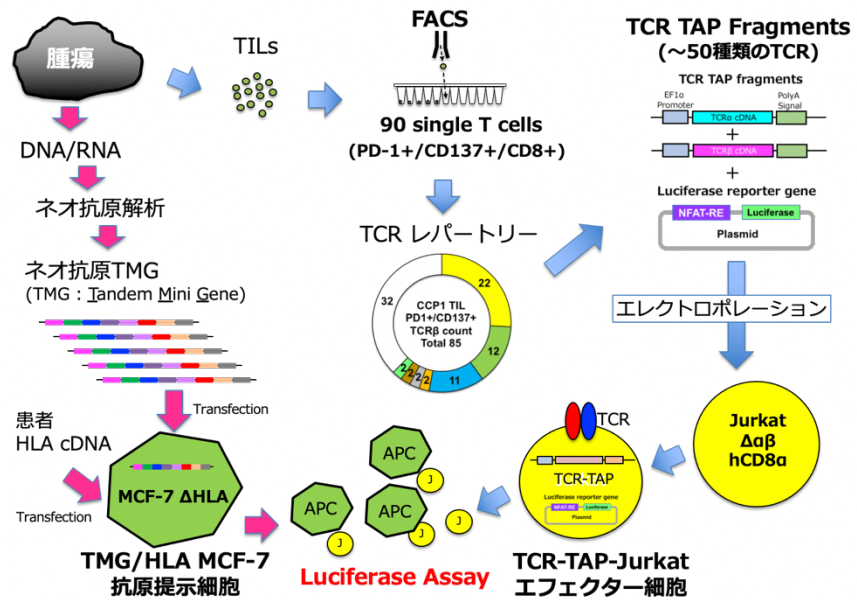


図1 「ネオ抗原特異的 TCR の同定法」の概要図

な活性化 T 細胞をセルソーターを用いて単一 T 細胞として取得し、それらが発現している TCR cDNA を我々の開発した「TCR cDNA の増幅方法」(特許第 6647197 号)を用いて増幅する。そして得られた TCR の TAP fragment を作製し、それを T 細胞株である Jurkat Δαβ CD8α 細胞にエレクトロポレーションし、TCR を発現させたエフェクター細胞 (TCR-TAP-Jurkat) を作製する。一方、腫瘍組織から調整された DNA および RNA を用いて次世代シーケンサーによりネオ抗原解析をおこないネオ抗原 TMG (変異抗原遺伝子を連結した DNA) を作製する。この TMG を患者の HLA cDNA と共に MCF-7 ΔHLA 細胞に遺伝子導入することで患者のネオ抗原を発現した抗原提示細胞 (TMG/HLA MCF-7) を作製する。そして、エフェクター細胞と抗原提示細胞を共培養し、TCR の活性化を Luciferase Assay により検出することで、ネオ抗原特異的 TCR をスクリーニングする。

昨年度 (令和 2 年度) は、①1 名の大腸がん患者の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からの TCR cDNA の増幅。②TIL から得られた TCR の TAP fragment 作製を行った。

本年度（令和3年度）は、昨年度の②で作製した TCR の TAP fragment を Jurkat  $\Delta\alpha\beta$  CD8 $\alpha$  細胞にエレクトロポレーションして TCR を発現させ、TMG を遺伝子導入した MCF-7  $\Delta$ HLA 細胞をターゲット細胞として、①ネオ抗原特異的 TCR のスクリーニングを実施した。また、②新たに2名の大腸がん患者の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）からの TCR cDNA の増幅を実施した。

## 【方法】

### TCR 発現 Jurkat エフェクター細胞の作製

大腸がん患者(CCP1)の TIL よりクローニングされた 38 種類の TCR $\alpha\beta$  の TAP fragment を NFAT-Luciferase レポータープラスミドと共に、エレクトロポレーションにより Jurkat  $\Delta\alpha\beta$  CD8 $\alpha$  細胞へ遺伝子導入した。NFAT-Luciferase レポータープラスミドを細胞に遺伝子導入することで、TCR の活性化を Luciferase の発光として検出可能となる。得られた 38 種類の TCR 発現 Jurkat 細胞をエフェクター細胞として、ネオ抗原特異的 TCR のスクリーニングを実施した。

### TMG および HLA cDNA を遺伝子導入した MCF-7 ターゲット細胞の作製

大腸がん患者(CCP1)の腫瘍組織および正常組織の DNA および RNA 解析により、アミノ酸変異を引き起こし、腫瘍組織で発現する遺伝子変異を特定した。遺伝子発現量等を考慮し、最終的に 40 種類のアミノ酸変異に絞り込んだ。個々の変異を含む 27 mer のペプチドを発現させるために、10 種類の変異ペプチドをコードする Mini gene を連結した Tandem mini gene(TMG)を 4 個(TMG1, TMG2, TMG3, TMG4)作製した。そして、各 TMG を pcDNA3.4 ベクターへ組み込み 4 種類の TMG 発現ベクターを作製した。また、HLA 発現ベクターについては、患者 CCP1 の腫瘍細胞が発現する 6 種類の HLA-Class I (A11:01, A24:02, B51:01, B52:01, C12:01, C15:02)に対応するため、各 HLA cDNA を pcDNA3.4 ベクターへ組み込み、6 種類の HLA 発現ベクターを用いた。ターゲット細胞の作製は、1 種類の TMG と 1 種類の HLA を同時に MCF-7  $\Delta$ HLA 細胞へ遺伝子導入試薬により導入した。合計で、24 種類（4 TMG × 6 HLA）のターゲット細胞を作製した。

## TMG 反応性 TCR のスクリーニング

5x10<sup>4</sup> エフェクター細胞（1 種類の TCR 発現 Jurkat 細胞）と 1x10<sup>4</sup> ターゲット細胞（6 種類の TMG/HLA 発現 MCF7 細胞を混合）を 96well U 底プレートで 16 時間共培養した。共培養後、TCR の活性化による Luciferase の発現を Steady-Glo Luciferase Assay System（プロメガ）を用いて解析した。

## 大腸がん患者の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）からの TCR cDNA の増幅

1 名の大腸がん患者の手術切除腫瘍から調製した TIL を PD-1、CD137、CD8、CD3 に対する蛍光標識抗体により染色し、セルソーターを用いて PD-1+ CD137+ CD8+ T 細胞を 96 well PCR プレートに単一細胞ソートした。取得した T 細胞から、「TCR cDNA の増幅方法」（特許第 6647197 号）を用いて TCR cDNA を増幅した。具体的には、単一 T 細胞の入った各 well に One-step RT-PCR mix (Multiplex primer, dNTP, 逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ等を含む) を加え、逆転写反応と PCR 反応を連続的に行った。得られた PCR 産物を希釈し、それを鋳型に TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$  を別々に 2nd PCR を行い、それぞれの cDNA を増幅した。TCR cDNA の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認し、PCR 産物の DNA 配列をキャピラリーシーケンサーを用いたサンガー法により決定した。決定した DNA 配列を IMGT (<http://www.imgt.org>) の IMGT/V-QUEST Tool で解析し、TCR の V 遺伝子および CDR3 配列を決定し、TCR レパートリーを解析した。

## 【結果】

### TCR の TMG 反応性の解析

患者 CCP1 の TIL よりクローニングされた 38 種類の TCR について、それら TCR の TMG1、TMG2、TMG3、TMG4 への反応性を解析した。その結果、4 種類の TCR が TMG1 に対してのみ反応性を示すことが明らかとなった（図 2）。TCR-01 と TCR-04 は、解析した TIL 中に高頻度に存在する T 細胞クローンに発現しているクローン性 TCR であった。一方、TCR-64 と TCR-83 は、解析した TIL 中で、1 個の T 細胞のみが発現する非クローン性 TCR（低頻度 TCR）であった。

次に、TMG1 に反応した 4 つの TCR の HLA 拘束性解析を行った。そのために、各 TCR を発現させた Jurkat 細胞と TMG1 と各 HLA を発現したターゲット細胞を共培養し、TCR の反応性を解析した。その結果、すべての TCR が、TMG1 と HLA-A11:01 を発現したターゲット細胞のみに反応性を示した（図 3）。

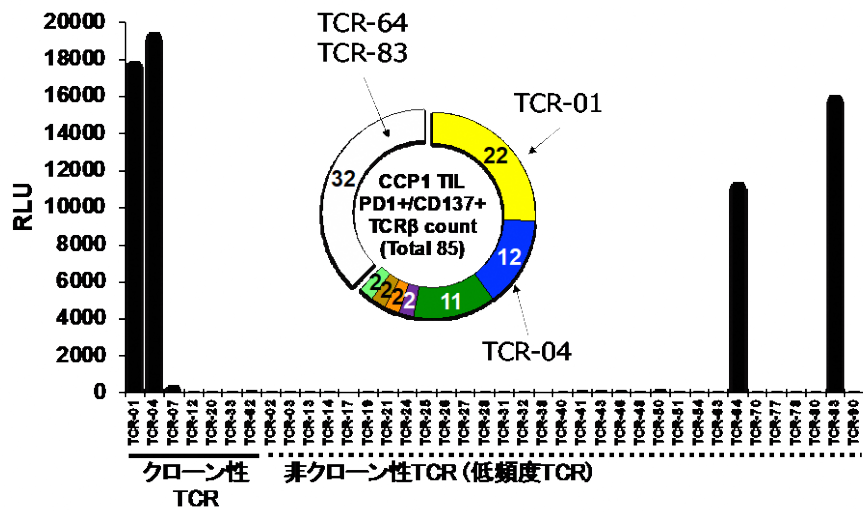


図2 TMG1 反応性 TCR のスクリーニング

各 TCR を発現させた Jurkat エフェクター細胞と TMG1/HLA を発現させた MCF7 ターゲット細胞 (6 種類の混合) を共培養し、TCR の活性化を Luciferase アッセイにより解析した。クローン性 TCR の 2 種類 (TCR-01, TCR-04) と非クローン性の低頻度 TCR の 2 種類 (TCR-64, TCR-83) において、TCR の活性化による Luciferase の発光 (RLU) が認められた。

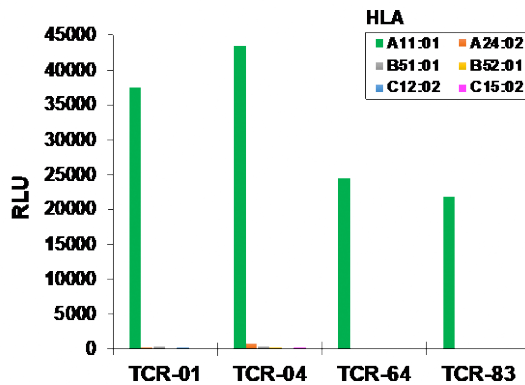


図3 TMG1 反応性 TCR の HLA 拘束性



## 大腸がん患者（追加）の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）からの TCR cDNA の増幅

新たに、2 名の大腸がん患者（CCP5、CCP15）の TIL より 90 個の PD-1+ CD137+ CD8+ T 細胞を単一細胞として取得し、TCR $\alpha$  および TCR $\beta$  の cDNA の増幅を行

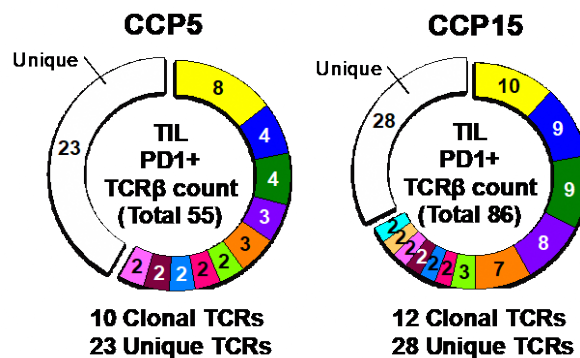


図4 CCP5 および CCP15 由来 TIL のレパートリー

い、TCR のレパートリー解析を行った。その結果、CCP5 においては、10 種類の Clonal TCR と 23 種類の Unique TCR が同定された（図 4 左）。また、CCP15 では、12 種類の Clonal TCR と 28 種類の Unique TCR が同定された（図 4 右）。

### 【考察と今後の予定】

本年度は、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、我々の方法が「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。

## II-3 T 細胞 ISAAC による腫瘍特異的 TCR の同定法の開発

学術研究部医学系 助教 小林 栄 治

### 〈目的〉

免疫細胞の中で腫瘍細胞を殺傷することができるキラーT細胞（CD8+T細胞）はその細胞表面に発現するT細胞受容体（T cell receptor: TCR）を用いて「正常な細胞」と何らかの原因で異常に増殖するようになった「腫瘍細胞」を区別し、腫瘍細胞のみを殺傷することができる。そこで、がん患者の腫瘍から腫瘍に浸潤したT細胞（Tumor