

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 α および TCR β の cDNA の増幅を行

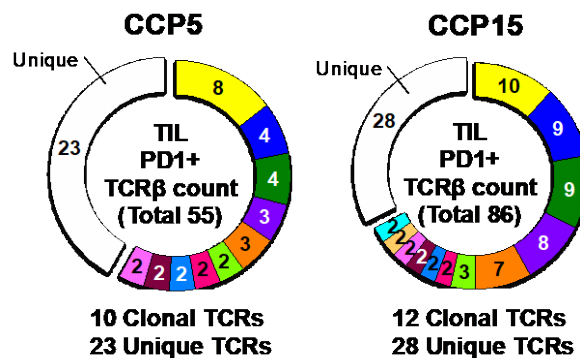


図4 CCP5 および CCP15 由来 TIL のレパートリー

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

infiltrating lymphocyte: TIL) を取り出し、体外で増やし、患者体内に戻すことで腫瘍を根絶させることを目指した TIL 療法が行われた。しかし、TIL は元々数が少なかったり、疲弊してうまく増えなかったりと期待された成果を得ることができなかった (Dudley et al. *Science* 2002)。そのような状況下、腫瘍に特異的に反応する TCR 遺伝子を同定し、健康な細胞にその TCR を発現させ、患者体内に戻すことで腫瘍を排除する TCR-T 療法が次世代がん治療として世界中で開発研究や臨床試験が盛んに行われている。しかしながら、これら TCR-T 療法は特定のヒトリンパ球抗原 (Human Leukocyte antigen: HLA) と腫瘍抗原断片 (ペプチド) の組み合わせに限定されているのが現状である。その主な理由として、がん退縮を誘導できる腫瘍特異的 TCR を同定することが困難なことが挙げられる。

従来、抗原特異的 TCR を同定するためには、数ヶ月以上を掛けて T 細胞クローンを樹立する必要があった。また、数ヶ月以上掛けても数個程度樹立できれば良い方で、全くできない場合もあり、非常に非効率だった。最近では遺伝子解析技術の発展により、単一細胞レベルの解析が行われるようになったものの、TCR α 鎖と β 鎖をペアで同定するのは依然として難しい状況である。とりわけ、腫瘍特異的 TCR は親和性が低く、効果的な腫瘍特異的 TCR の同定は非常に困難である。

そのような状況下、我々は抗原特異的 TCR の α 鎖と β 鎖を単一細胞からペアで取得し、その抗原特異性の評価を 10 日間で行うことができる革新的技術「hTEC10 法」を開発した (Kobayashi et al. *Nat. Med.* 2013)。しかしながら、hTEC10 法では抗原特異的 T 細胞の検出にはペプチド/HLA テトラマーを用いており、抗原ペプチドのみで高感度に腫瘍特異的 T 細胞を検出するのは難しかった。そこで、我々は hTEC10 法と我々独自のデバイスであるマイクロウェルアレイチップを用いた「ISAAC 法」 (Jin A et al *Nat. Med.* 2009) および T 細胞の新たな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 法の開発に取り組んでいる (図 1)。本研究テーマでは 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 ISAAC の高感度化を行う。

本研究成果により T 細胞 ISAAC 法による腫瘍特異的 TCR の同定が可能になれば、ペプチドのみで腫瘍特異的 TCR 遺伝子の効率的な同定が可能になり、TCR-T 療法の開発に大きく貢献することが期待される。

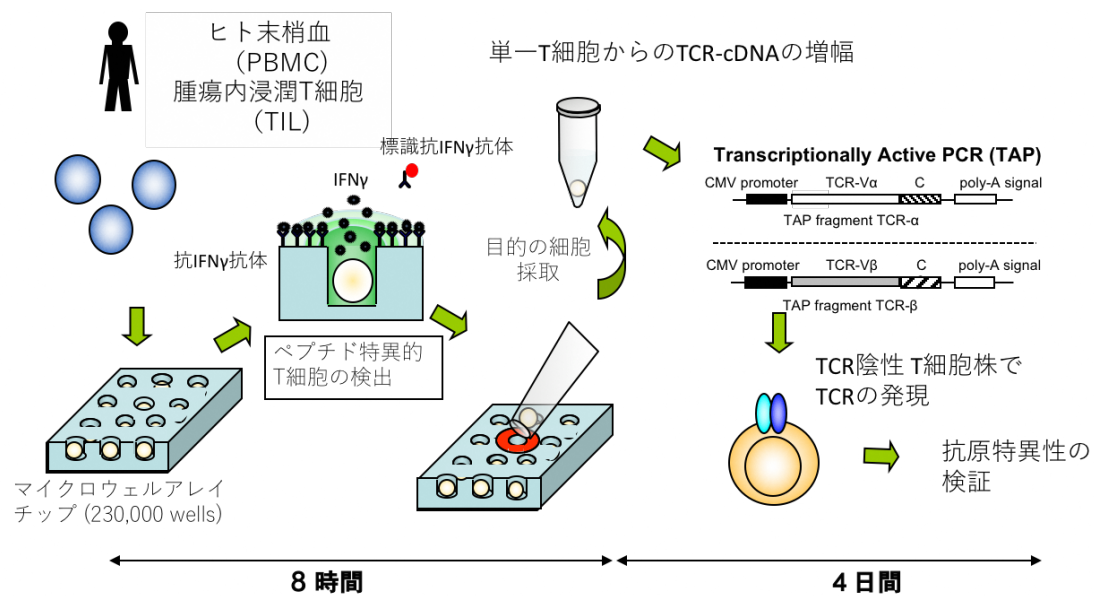


図 1 : T 細胞 ISAAC の概略図

ヒトの末梢血リンパ球 (PBMC) や腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) をマイクロウェルアレイチップに播種し、サイトカイン産生を指標に抗原特異的 T 細胞を同定し、その T 細胞 1 個 1 個から TCR 遺伝子を増幅し、TCR 陰性細胞株に発現させ、抗原特異性を検証する。この工程を 4 日以内に行うことができる。

〈方法と結果〉

1) 抗原特異的 T 細胞の *in vitro* 刺激方法の検討

1)-1 抗原特異的 T 細胞を効率よく刺激するための人工抗原提示細胞の樹立

近年、腫瘍に浸潤した T 細胞 (Tumor infiltrating lymphocyte: TIL) には腫瘍抗原 (ネオアンチゲンおよび共通抗原) 特異的 T 細胞が集積しており、PD-1 等を特異的 T 細胞マーカーとして解析が盛んに行われている。しかし、ごく最近では、腫瘍環境下において T 細胞が Bystander 効果により非特異的に活性化されており、クローナルに増殖している T 細胞のなかで真にがん特異的な T 細胞は少数であるという報告もある。

我々もこれまで独自に開発した上記 hTEC10 法を用いて、患者 TIL より多数の TCR 遺伝子を取得し、がん特異性を評価したが、がん特異的 TCR はクローナルに増殖している T 細胞の数%程度だった。さらに患者 TIL はその使用に制限があることから、抗原が明らかな場合は腫瘍抗原特異的 TCR を取得するための必ずしも有用なソースにはならないと考えられる。

一方、我々は上述の hTEC10 法を開発する過程で、健常人由来末梢血リンパ球を腫瘍抗原である α -fetoprotein (AFP) ペプチドで刺激し、AFP 特異的 T 細胞が誘導できるかどうかを検討したところ、10 人中 3 人で AFP 特異的 T 細胞の誘導されたことを確認している。さらに、これら TCR の親和性を比較したところ、その中の 1 個がペプチドワクチンを受けた肝細胞がんの患者 PBMC の TCR のうち、最も親和性の高い TCR と同程度であることが明らかになった (Nakagawa, Kobayashi et al. *Gastroenterology* 2017)。この結果は健常人由来 PBMC から、高品質の腫瘍抗原特異的 TCR を取得できることを示している。しかしながら、TIL 同様健常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、通常 *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。しかし、長期間のペプチド刺激は腫瘍抗原特異的 T 細胞を疲弊させ、サイトカン産性などの機能が阻害されることが知られている。そこで、細胞株を用いて *in vitro* で効率よく腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖させる方法の検討を行った。そのため、T 細胞を効率よく刺激することができる人工抗原提示細胞株 (artificial antigen-presenting cell: aAPC) の樹立を試みた。aAPC には自己の MHC クラス I を発現していない細胞株 K562 を用いた。この K562 細胞株に抗原を提示するための HLA-A24 と T 細胞を効率よく増殖させるための共刺激分子としてヒト CD80 および CD137L 分子を導入し、それぞれの分子を発現する細胞をソーティングすることで aAPC を樹立した。

1)-2 人工抗原提示細胞による BRLF-1 特異的 T 細胞の増幅

次にモデル抗原として Epstein-Barr (EB) ウイルス由来 BRLF1 特異的 T 細胞の増殖を試みた。このため、樹立した aAPC に BRLF1 の全長 DNA を組み込んだ aAPC (BRLF1-full-aAPC) および HLA-A24 拘束性ペプチドを発現する mini gene を組み込んだ aAPC (BRLF1-mini-aAPC) を樹立した。比較対象は、従来法と同様に合成 BRLF1 ペプチドで刺激したものをを用いた。マイトマイシン C 処理により増殖を停止させた BRLF1-full-aAPC または BRLF1-mini-aAPC を 5×10^4 cells/well になるように 96well プレートにそれぞれ播種した。そこに 2 人の健常人ドナー (ドナー #1 およびドナー #2) の末梢血リンパ球を 2×10^5 cells/well になるように 96well プレートにそれぞれ播種した。さらに増殖因子として IL-7 (10ug/ml) および IL-12 (200 pg/ml) を加えた。4 日後、培地 100ul を捨て、IL-2 (10 U/ml) を含む培地 100ul を加えた。さらに 3 日後、培地 100ul を捨て、マイトマイシン C 処理した BRLF1-full-aAPC または BRLF1-mini-

aAPC を 5×10^4 cells/well になるように 96well プレートに加え、リンパ球の再刺激を行った。その後、3 日後と 6 日後に培地 100ul を捨て、IL-2(10 U/ml)を含む培地 100ul を加えることで、刺激を継続した。最初の刺激から 14 日後にリンパ球を回収し、マイシン C 処理した BRLF1-full-aAPC または BRLF1-mini-aAPC で刺激を行い、BRLF1/HLA-A24 テトラマーを用いて、BRLF-1 特異的 T 細胞の増殖を評価した。その結果、BRLF1-full-aAPC で Donor#1 のリンパ球を刺激した場合、刺激前では BRLF1 テトラマー陽性率は 0.26% だったのに対し、刺激 7 日後には 2.64%、刺激 14 日後には 3.32% と 10 倍以上の増殖を認めた。また BRLF1-full-aAPC による Donor#2 のリンパ球を刺激した場合、刺激前では BRLF1 テトラマー陽性率は 0.18% だったのに対し、刺激 7 日後には 1.89%、刺激 14 日後には 1.40% と 10 倍程度の増殖を認めた。一方、BRLF1-mini-aAPC による Donor#1 のリンパ球を刺激した場合、刺激 7 日後には 0.4%、刺激 14 日後には 0.76% と 4 倍程度の増殖を認めた。同様に Donor#2 のリンパ球を刺激した場合、刺激 7 日後には 0.70%、刺激 14 日後には 0.66% と 4 倍程度の増殖を認めた。従来用いられてきた合成ペプチドによる刺激の場合、Donor#1 のリンパ球では、刺激 7 日後には 0.91%、刺激 14 日後には 0.18% と一旦増加したものの、その後低下した。同様に Donor#2 のリンパ球でも、刺激 7 日後には 0.34%、刺激 14 日後には 0.01% と一旦増加したものの、その後大幅に低下した。

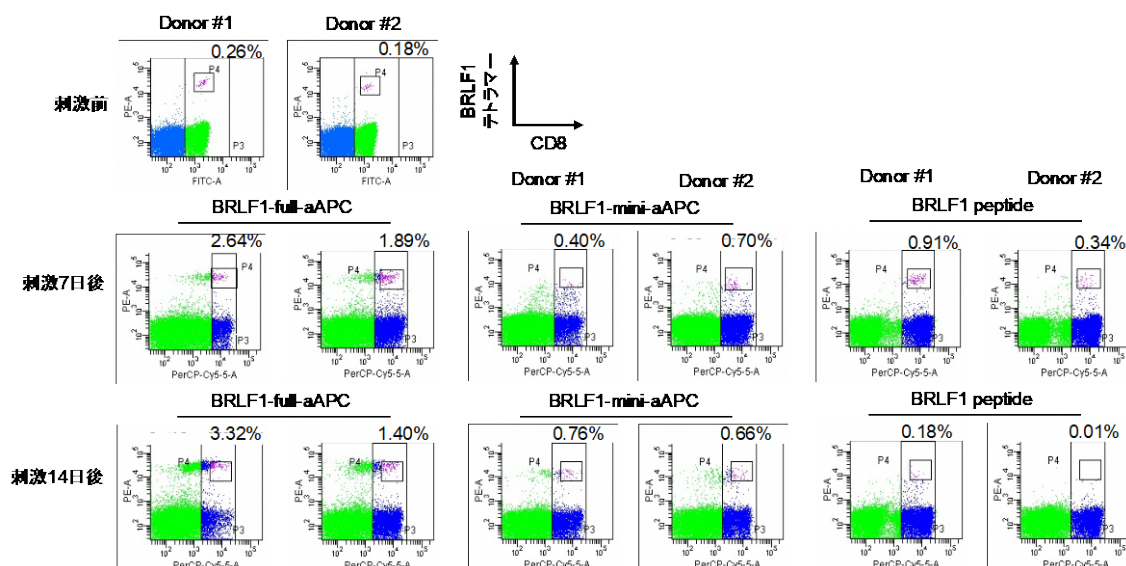


図 2 : 人工抗原提示細胞による抗原特異的 T 細胞の増殖

HLA-A24+CD80+CD137L+K562 (人工抗原提示細胞: aAPC) を用いて健康人末梢血リンパ球中の BRLF1 特異的 T 細胞を刺激し、増殖させた。刺激後 7 日目、14 日目の細胞

を CD8 抗体および BRLF1 特異的 MHC テトラマーを用いて染色し、BRLF1 特異的 T 細胞の増殖を調べた。

〈考察〉

近年、腫瘍特異的 CAR や TCR を導入し、増殖させた T 細胞の疲弊が CAR-T 療法や TCR-T 療法の大きな障害として認識されるようになり、T 細胞疲弊の回避方法や解除方法が盛んに研究されている。慶應大学の近藤らは *in vitro* 刺激中に OP9 細胞と共培養することで幹細胞様の状態で T 細胞を増殖させることができることを示している (Kondo et al. *Nat Commun* 2017)。またアメリカ NIH の Mo らは改変型 IL-2 を用いることで T 細胞を分化させずに増殖する方法を開発している (Mo et al. *Nature* 2021) さらにスタンフォード大学の Weber らは脱リン酸化剤を用いることで、疲弊した T 細胞が回復することを明らかにしている (Weber et al. *Science* 2021) など抗原特異的 T 細胞の疲弊回避方法や解除方法に関する多くの研究成果が報告されている。

通常、健常人末梢血リンパ球のみならず、腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocyte: TIL) 中においても腫瘍抗原特異的 T 細胞は極めて低頻度である。そのため、腫瘍抗原特異的 T 細胞を検出するためには、*in vitro* において効率よく増殖させる必要がある。しかしながら、腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖させるためには、これまで主に合成ペプチドが用いられてきたが、この方法では腫瘍抗原特異的 T 細胞が増えたとしても、上記 CAR-T 療法 TCR-T 細胞療法の様に、T 細胞が疲弊している可能性が高い。腫瘍抗原特異的 T 細胞が疲弊していた場合、マイクロアレイチップ上で再度刺激してもサイトカインがほとんど産生されないことから T 細胞 ISAAC による検出は困難になると予想される。そこで本年度は効率よく腫瘍抗原特異的 T 細胞を *in vitro* で増殖させる方法の開発を行った。合成ペプチドで刺激した場合、7 日後に増殖していたものの、14 日後には BRLF1 抗原特異的 T 細胞はほとんど検出されなかった。これは強い刺激が継続的に入ったため、T 細胞にアポトーシスが誘導された可能性が考えられた。しかしながら、BRLF1-full-aAPC および BRLF1-mini-aAPC を用いた場合、刺激 14 日後でもはっきりと BRLF1 特異的 T 細胞が検出されている。このことから、aAPC を用いて刺激・増殖させると効率よく腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖できる可能性が示唆された。一方、予想外にも BRLF1-full-aAPC の方

が BRLF1-mini-aAPC よりも数倍程度良い結果になった。これは抗原提示細胞上に提示される抗原ペプチド量には最適があることを示唆している。

今後は aAPC を用いた刺激により増殖させた抗原特異的 T 細胞の状態を PD-1 等の疲弊マーカーを用いて検証する。aAPC 刺激による疲弊状態が確認された場合は、上述の方法を組み合わせることなどにより、疲弊状態を回避した *in vitro* 刺激方法を開発する。その後、最適化 aAPC を用いた刺激により、*in vitro* により腫瘍抗原特異的 T 細胞を増殖させ、T 細胞 ISAAC により検出を行い、腫瘍抗原特異的 TCR の取得を試みる。

〈今後の展望〉

これらの成果により、ペプチド MHC 複合体を用いずに、腫瘍抗原特異的 TCR の効率的な取得が可能になれば、現在特定の HLA および腫瘍抗原の組み合わせに限定されている TCR-T 療法の適応拡大につながり、その意義は大きいと期待される。

II-4 TCR 様抗体の取得法の開発

学術研究部医学系 准教授 小澤龍彦

〈目的〉

近年 TCR に代わり、TCR と同様にペプチド/MHC を特異的に認識する TCR 様抗体を用いて、キメラ抗原受容体 T 細胞(CAR-T)や二重特異性抗体(BiTE)などに改変し、がん免疫療法へ応用する研究が注目されている。TCR 様抗体は、がん細胞に対して高い特異性を持つため、副作用の低いがん免疫療法の提供が期待される。しかし TCR 様抗体は、様々な技術が発達した現在においてもその取得が極めて難しく、TCR 様抗体を用いたがん免疫療法への応用は未だ限定的である。

我々は、これまでに抗原特異的なリンパ球を単一細胞レベルで同定・回収できる、リンパ球が丁度 1 個入る大きさのウェルが 6 万個以上並んだリンパ球チップを世界で初めて開発してきた。それを用いて、抗原特異的抗体を分泌する B 細胞を網羅的にスクリーニングし、抗原特異的抗体遺伝子を 1 週間程度でクローニングできる画期的な

システム「ISAAC 法」を開発し、これまでに取得が困難な抗体を数多く取得してきた。さらに、ISAAC 法にブロッキング法を併用することで、エピトープの微細な構造の差異を識別する低頻度の抗体産生細胞を、容易にスクリーニングできることを実証した。

そこで我々は、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 の作製を目指した。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、該当がん抗原ペプチド MHC 特異的 TCR 様モノクローナル抗体の取得を行った。

〈方法〉

ブロッキング法を併用した ISAAC 法

AFP-SCT を免疫したウサギ由来末梢血リンパ球を用いて、ISAAC 法による AFP ペプチド MHC 特異的 TCR 様モノクローナル抗体の取得を行った。ISAAC 法は Ozawa T et al, 2021 Eur J Immunol に記載されている方法に従い行った。具体的には、保存していた末梢血リンパ球を、Anti-Rabbit IgG マイクロビーズと磁気カラム（いずれもミルテニーバイオテク社）を用いて IgG+細胞を濃縮した。リンパ球チップ（立山科学）の表面に 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗ウサギ IgG Fc 抗体（MP Biomedicals）を乗せ 4°C で一晩インキュベーションすることで固相化させた。翌日リンパ球チップの表面をリン酸緩衝液（PBS）で洗浄し、0.01%のリピディア（日本油脂）を乗せ、室温で 1 時間インキュベーションし、ブロッキングした。濃縮した IgG+細胞をリンパ球チップに播種し、10% FCS を含む RPMI にて 37°C、5%CO₂ の条件下で 3 時間培養した。培養後、細胞チップを PBS で緩やかに洗浄し、20 $\mu\text{g/ml}$ の EB ウイルス由来抗原である EBNA3A ペプチド MHC（EBNA3A-SCT）を加えて室温で 30 分インキュベーションする事で、 β 2 ミクログロブリンや HLA の α 鎖など、AFP ペプチド MHC-TCR 様抗体以外をブロッキングさせた。その後 PBS で軽く洗浄し、ビオチン標識した 5 $\mu\text{g/ml}$ の AFP-SCT を加えて室温で 30 分インキュベーションした。その後 PBS で軽く洗浄し、1 $\mu\text{g/ml}$ の Cy3 標識されたストレプトアビジン（シグマ-アルドリッチ）を加えて室温で 30 分インキュベーションすることで、AFP ペプチド MHC-TCR 様抗体産生細胞の検出を行った。その後 PBS で洗浄し、1 μM の Cell Trace Oregon Green（モレキュラープローブ）を加えて室温で 5 分インキュベートすることで細胞

を染色した。染色したリンパ球チップを蛍光顕微鏡（BX51WI、オリンパス）で観察し、マイクロマニピュレーター（TransferMan NK2、エッペンドルフ）を用いて細胞の回収を行った。

回収した個々の細胞由来の抗体遺伝子の増幅、抗体遺伝子のクローニングと塩基配列の決定、及びそのリコンビナント抗体の作製は、Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている方法に従って行った。

モノクローナル抗体の評価

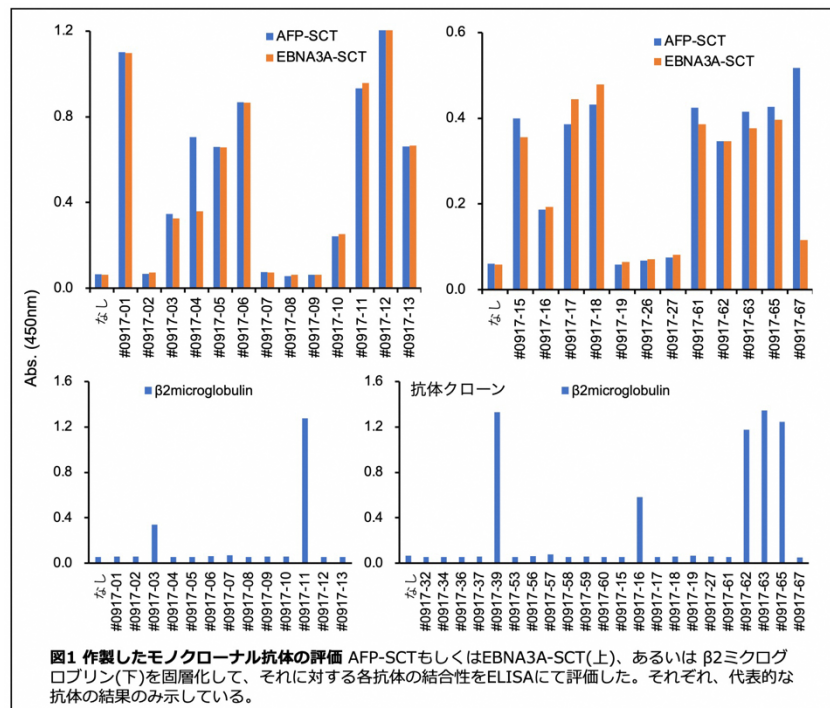
結合性の評価は、以下の方法で行った。ELISA用maxi sorpプレート（サーモフィッシュャー）のウエルに2 µg/mlのAFP-SCT、EBNA3A-SCT、もしくはβ2ミクログロブリン（Alpha Diagnostic International）を加え、4°Cで一晩インキュベーションすることで固相化させた。翌日タンパク質を固相化した各ウエルを0.1% Tween-20を含んだリン酸緩衝液（PBST）で洗浄し、3%(w/v) BSAを含んだPBST（PBST/BSA）で室温にて1時間ブロッキングした。その後各ウエルをPBSTで洗浄し、得られた培養液を加え、室温にて1時間インキュベーションした。PBSTで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギFc抗体（シグマ-アルドリッチ）を加え、室温にて1時間インキュベーションした。PBSTで洗浄後にTMB基質（SeraCare Life Sciences）を用いて呈色させ、OPTIMAプレートリーダー（BMG LABTECH）を用いて450 nmで吸光度を測定した。

親和性の測定は、Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている ELISA およびスキヤッチャードプロット分析を用いて評価した方法に従って行った。具体的には、0.2 nM の抗体を 1.5~400 nM の AFP-SCT（抗原）と室温で1時間インキュベートした。その後 AFP-SCT と結合していない遊離の抗体の濃度を、ELISA 法を用いて算出した。そのために、ELISA 用 maxi sorp プレートに 5 µg/ml の AFP-SCT を加えて、4°Cで一晩インキュベートして固相化した。翌日タンパク質を固相化した各ウエルを PBST で洗浄後、0.1%の Tween-20 と 3%BSA を含む PBS を加えて室温で1時間インキュベートすることで非特異的結合を抑制した。その後 PBST で洗浄し、先に調整した抗体と AFP-SCT の混合液を加え、室温で1時間インキュベートした。PBST で洗浄後、固相化された AFP-SCT タンパク質に結合した抗体をペルオキシダーゼ標識抗ウサギ Fc 抗体および TMB 基質を用いて呈色させ、OPTIMA プレートリーダーを用いて 450 nm で吸光度を測定した。

〈結果及び今後の予定〉

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、60 ウェルより細胞を回収し、それらから単一細胞 RT-PCR 法により、43 ペアの抗体 VH 及び VL 遺伝子断片が得られた。これら遺伝子断片を発現ベクターに組み込み、クローニングを行いそれぞれの塩基配列を決定したところ、全部で 27 種類のユニークな配列を持つ抗体に分類された。これらを哺乳類細胞株へ遺伝子導入を行い、リコンビナント抗体を作製した。

次にこれらリコンビナント抗体の特異性を評価するために、目的の抗原である AFP-SCT とブロッキングに用いた EBNA3A-SCT に対する各抗体の結合性の比較を ELISA にて行った。#0917-04 及び #0917-67 以外の抗体は、AFP-SCT と EBNA3A-SCT に対する結合が同程度であ



ったのに対し、#0917-04 及び #0917-67 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(図 1 上)。また、#0917-04 及び #0917-67 以外の抗体のうち、13 種類は $\beta 2$ ミクログロブリンと結合することが認められた(図 1 下)。

次に、#0917-04 及び #0917-67 について AFP-SCT に対する結合親和性 (KD) を、ELISA とスキャッチャードプロット解析により算出した。その結果、#0917-04 は 3.24×10^{-9} M、#0917-67 は 2.67×10^{-9} M であった (図 2)

ELISA で検討した段階であるが、#0917-04 及び#0917-67 は AFP-SCT に対する結合は、EBNA3A-SCT と比べて強いことから、AFP ペプチド MHC 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

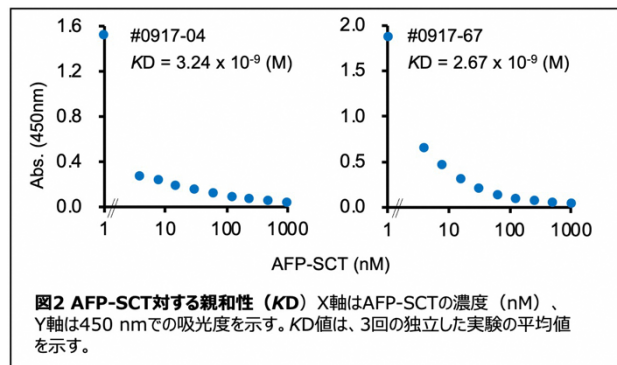


図2 AFP-SCTに対する親和性 (KD) X軸はAFP-SCTの濃度 (nM)、Y軸は450 nmでの吸光度を示す。KD値は、3回の独立した実験の平均値を示す。

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。