

# I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・ T細胞医薬創出のための基盤技術の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学) 免疫学講座 教授 村口 篤

## 【背景・目的】

がんの治療法として、外科的手術、放射線治療、抗ガン剤治療などが一般的である。しかし、これらの治療に効果がみられない場合、免疫システムを用いた治療（ペプチドワクチン療法、抗体医薬、免疫細胞療法など）が試みられている。免疫システムは個々の患者により異なること、さらに、がんの性質も個々の患者で様々であることから、免疫学的治療は個々の患者に応じた治療、すなわち、テーラーメイド医療として行われることが望ましい。しかし、従来、がん患者のリンパ球を使って、がんの特異的な抗体やTリンパ球を取得するためには、2~3ヶ月を要していたことから、せっかくがんの特異的な抗体やTCRが取得できても、がんが進行してしまうため、元の患者の治療に応用することは困難であった。

我々は、近年、ヒトのBリンパ球から抗原特異的ヒト抗体を1週間弱で取得するシステム（ISAAC法）（図1）（Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012）を開発した。さらに、最近、抗原特異的T細胞受容体（TCR）を最短10日以内に検出・取得するシステム（hTEC10法）（図2）（Kobayashi E et al, 2013; Kobayashi E et al, 2014）を開発した。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。本研究では、これらの技術の事業への応用を視野に入れながら、これらの技術をさらに最適化することにより、個々の患者に最適な抗体医薬やTCR遺伝子を短期間で、しかも確実に取得・提供できるシステムを作り出すことを目的とする。

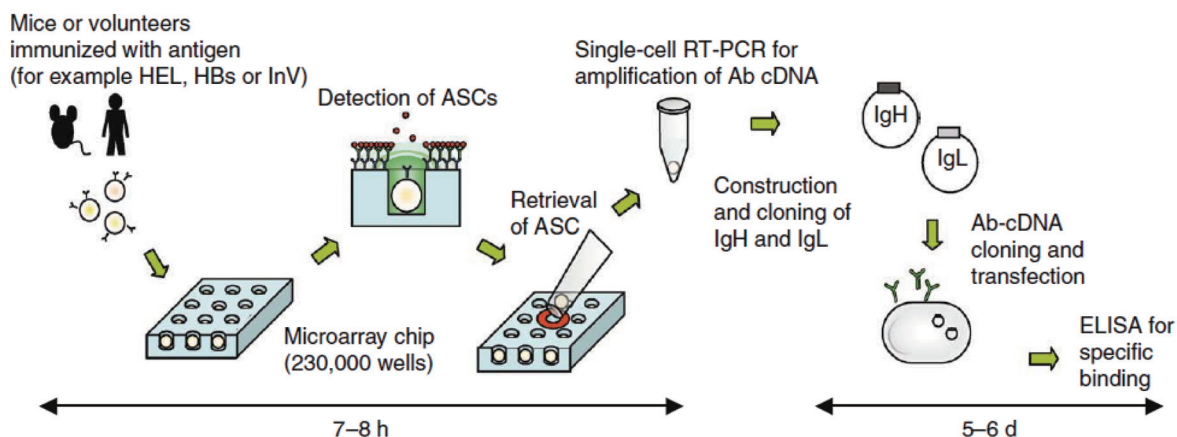


図1 ISAAC法 (Jin A et al, Nature Medicine, 2009より転載)

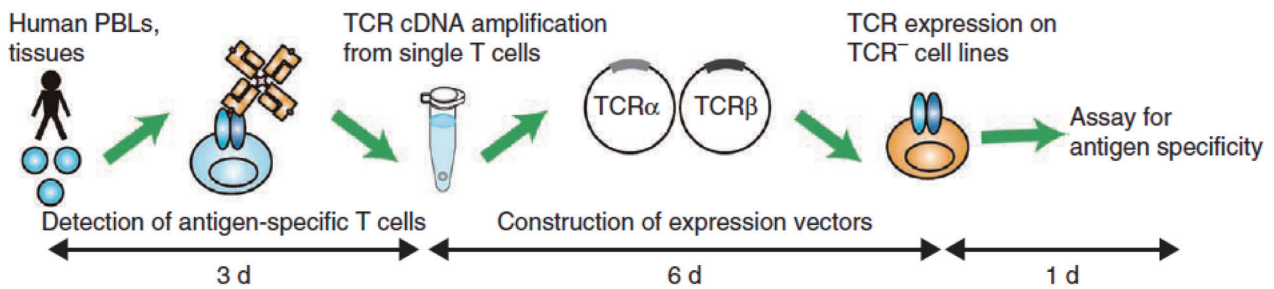


図2 hTEC10法 (Kobayashi E et al, Nature Medicine, 2013より転載)

### 【各班の概要】

村口は、チップから回収した単一 T 細胞より TCR cDNA を増幅する方法を改良し、従来より効率よく TCR を増幅できることを示し、T 細胞 ISAAC の効率を向上させた。さらに、腫瘍抗原未知の腫瘍に対して、その腫瘍特異的 T 細胞をチップを用いて検出するために、予備実験を行い、システムが動く可能性を示した。今後、このシステムを T 細胞 ISAAC に応用し、臨床サンプルを用いて、腫瘍特異的 TCR を確実に取得できるよう、システムのブラッシュアップを図っていく。

浜名は、抗原および MHC が未知の腫瘍に対して、腫瘍特異的 CTL の TCR を取得することを目的に、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の TCR を解析した。具体的にはマウスに移植したメラノーマの TIL より活性化マーカーを指標に、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を単一細胞ソートし、各リンパ球より TCR を増幅解析した。その結果、クローナルに増殖している集団が検出され、そのクローナルに増殖している集団の TCR をクローニングし、T 細胞に発現させることで、腫瘍特異的 CTL を作製できることを示した。この結果、抗原および MHC が未知の腫瘍より、腫瘍特異的 TCR を迅速・確実に取得できることが示された。

岸は、抗原ペプチド/MHC 複合体と TCR の cis 相互作用の系を用いた、抗原同定のためのレポーター細胞を作製した。そのレポーター細胞を用いて、モデルシステムで抗原が同定できる可能性を示した。

小澤は、がんの増殖に関与する ErbB2 の 677 番目の Threonine (ErbB2-Thr677) のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を、ウサギ ISAAC システムを用いて作製した。チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、本抗体は、分子標的薬に対する ErbB2 の感受性を解析するために有用であると期待される。

### 【結論】

以上、各研究班は計画に沿って順調に成果を挙げてきた。これまでの研究で、がん患者のリンパ球から、がん治療のための TCR 遺伝子を迅速・確実に取得・作製することは、基本的に可能になってきた。今後は、臨床へ向けてのシステムの最適化が重要な課題と考える。また、がん治療用の抗体医薬の作製も進展すると期待される。これらの医療材料を迅速に作製することで元の患者の治療に応用することができるようになれば、がんの免疫学的テーラーメイド治療が可能になると期待される。

# I - 1 T細胞 ISAAC の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 教授 村口 篤

## 【目的】

我々が最近開発した、hTEC10法は、フローサイトメータを用いて、ペプチド刺激に反応してサイトカインを産生する T リンパ球を検出することにより、抗原ペプチド特異的 T リンパ球を検出することができる (Kobayashi E et al, 2013)。しかし、その感度は高くなく、頻度の低いウイルス等の抗原に特異的な T リンパ球はバックグランドノイズの中に埋もれてしまい、ヒト末梢血リンパ球中において、抗原特異的 T リンパ球を直接検出することは困難であった。そのため、抗原ペプチド特異的 T リンパ球を検出するためには、2 週間程度リンパ球をウイルス等の抗原で刺激しながら培養し、抗原特異的 T リンパ球を増殖させてから、検出する必要があった。我々は、最近、予備的検討にて、B リンパ球に応用していた ISAAC 法 (Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012) で用いた細胞チップを T 細胞に応用すると、*in vitro* での培養を必要とせずに、ヒトより調製した末梢血 T リンパ球から直接ウイルス等の抗原に特異的な T 細胞が検出できることを示唆するデータを得ている。以下、細胞チップを用いて抗原特異的 T 細胞を検出する方法を T 細胞 ISAAC 法と呼ぶこととする。本研究では、hTEC10法と T 細胞 ISAAC 法の良い点を組み合わせて、より感度の高い、抗原特異的 T リンパ球検出法を確立することを目的とする。

昨年度は、ヒト末梢血リンパ球の中から、細胞チップを用いて、ウイルス抗原ペプチドに反応しサイトカインを産生する、T リンパ球を検出できることを示した。これまで、T 細胞 ISAAC では、取得した単一 T 細胞から 5'-RACE 法を用いて TCR cDNA を増幅していたが、増幅効率が良くなかった。今年度は、浜名が昨年度に報告した Multiplex one-step RT-PCR 法 (Hamana H et al, 2016) を用いて、T 細胞 ISAAC で取得した T 細胞から、抗原特異的 TCR の遺伝子が取得できるかを検証した。また、腫瘍に特異的な T 細胞を検出する場合、抗原が未同定ことが多い。そこで、本年度は、抗原が未知の抗原提示細胞に反応する T 細胞を、T 細胞 ISAAC を用いて検出するための工夫を行った。

## 【方法】

### 1) 細胞チップ

図 1 に示すように、ちょうどリンパ球が1個入る大きさ・形状の微小ウェルが規則正しく約4.5万個から23万個、1 × 2 cm 四方の範囲に配置されたチップ（マイクロウェルアレイチップ）を用いた。

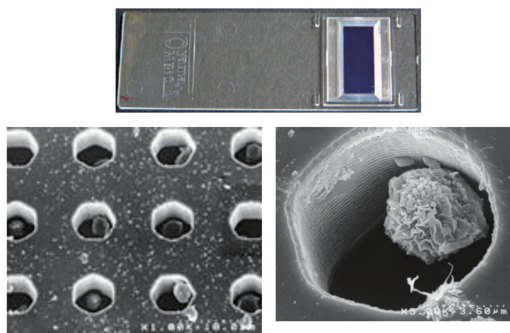


図1 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。

(下左) 拡大したマイクロウェルの電子顕微鏡像。

(下右) 1リンパ球が1ウェルに入っている電子顕微鏡像。

## 2) ヒト末梢血リンパ球由来 T 細胞

ポジティブコントロールとして、これまでに、EB ウイルスの BRLF-1 由来 T 細胞の存在をフローサイトメトリーにて確認している、HLA-A24 陽性の健康人ボランティアの末梢血リンパ球を用いた。末梢血リンパ球より、ヒト CD8+ T リンパ球分離キット (EasySep, Stemcell 社) を用いて、CD8 陽性 T 細胞を分離し、T 細胞 ISAAC に用いた。

## 3) T 細胞 ISAAC

細胞チップの表面にヒト IFN- $\gamma$  特異的抗体をコートした後、チップ表面への余分なタンパク質の非特異的結合を防ぐためにブロッキングを施した。このように前処理した細胞チップに、ヒト末梢血由来 CD8 陽性 T 細胞を播種した。ウェルに入らなかった余分な細胞を洗い去り、T 細胞を各ウェルに 1 個ずつ配置させた。その後、チップ上に抗原となる BRLF-1 由来ペプチドを加え、約 6 時間培養した。この 6 時間の間に BRLF-1 由来ペプチドに特異的な TCR を発現している T 細胞では、自身の HLA 上に BRLF-1 由来ペプチドが提示され、それが自身の TCR を活性化することで、IFN- $\gamma$  を分泌する。分泌された IFN- $\gamma$  はウェルからチップ表面へ拡散していき、チップ表面にコートされた IFN- $\gamma$  特異的抗体にトラップされる。次に、蛍光標識した別の IFN- $\gamma$  特異的抗体を加え、チップ表面にトラップされている IFN- $\gamma$  に結合させた。その蛍光標識 IFN- $\gamma$  特異的抗体の結合を蛍光顕微鏡で観察した。IFN- $\gamma$  分泌細胞を回収し、multiplex one-step RT-PCR 法により TCR cDNA を増幅した (図 2)。42 個の細胞を回収し、29 個の細胞から TCR $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の cDNA を増幅することができた (表 1)。この結果より、5'-RACE 法を使用していたときに較べて、増幅効率が向上したことが検証された。

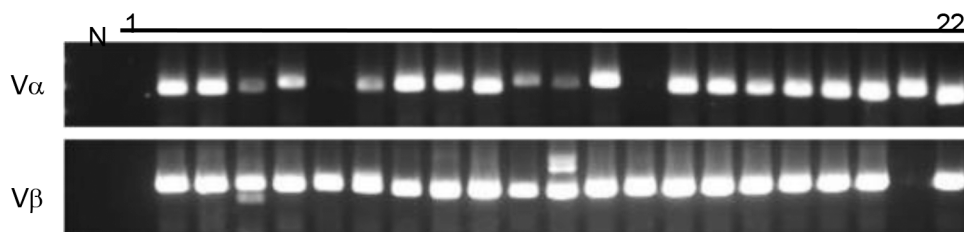


図2 単一細胞 RT-PCR による TCR-cDNA の増幅

#### 4) TCR の T 細胞株への発現および抗原特異性の確認

TCR cDNA をレトロウイルスベクターに組み込み、組換えレトロウイルスを作製し、内因性 TCR が発現していない TG40 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した T 細胞を BRLF-1 ペプチド/HLA-A24 テトラマーおよび CD3 抗体で染色し、TCR の細胞表面への発現およびその抗原特異性をフローサイトメトリーにて確認した。図 3 に示すように、TG40 細胞の細胞表面に CD3 分子が発現し、BRLF1/A24 テトラマーが結合したことから、取得した TCR が細胞表面に発現し、抗原に特異的に結合することがわかった。最終的に、表 1 にまとめたように、42 個の細胞を回収し、29 個の細胞より TCR $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の cDNA ペアを増幅させることができ、そのうち 19 個の TCR が抗原/MHC テトラマーに結合した。

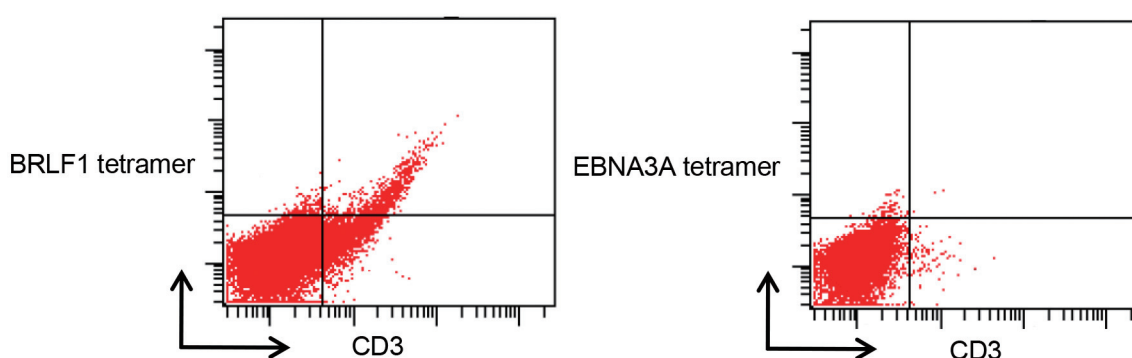


図 3 取得 TCR の抗原特異性の確認

表 1 抗原特異的 T 細胞を取得する際の T-ISAAC の効率

T-ISAAC により回収した細胞数	42細胞
TCR $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖 cDNA ペアが増幅した細胞数	29細胞
抗原/MHC テトラマーに結合した TCR の数	19個

#### 5) 抗原未知の細胞に特異的に反応する T 細胞の同定

T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  を分泌させるためには、抗原提示細胞と T 細胞を共培養することが必要である。しかし、細胞チップ上で、ウェルに入った 1 個の T 細胞を抗原提示細胞で刺激することは困難である。そこで、あらかじめ T 細胞と抗原提示細胞を混合培養した後、T 細胞をチップに播種し、IFN- $\gamma$  の分泌をチップ上で検出することで、抗原特異的 T 細胞を検出することを考えた。その予備実験として、T 細胞と抗原提示細胞を混合培養し IFN- $\gamma$  の分泌を誘導する条件を検討した。図 4 に示すように、T 細胞と抗原提示細胞を一晩培養することで、IFN- $\gamma$  の分泌を誘導することができた。現在、抗原提示細胞との共培養で刺激した T 細胞をチップに播種することにより、チップ上で IFN- $\gamma$  の分泌が検出できるか検討中である。

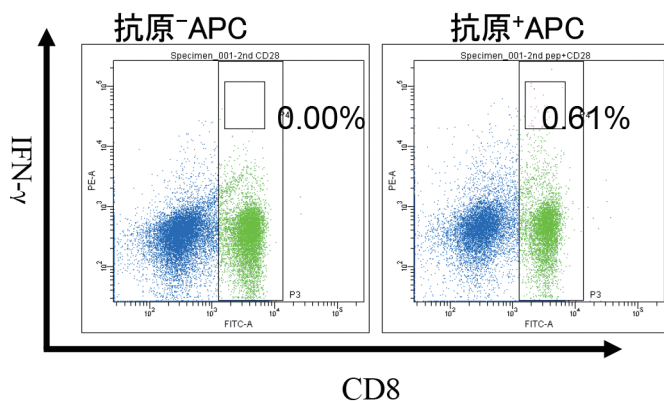


図3 抗原提示細胞刺激によるIFN- $\gamma$ 分泌誘導

### 【結論と今後の展望】

本年度は、チップより回収したT細胞からTCR遺伝子を増幅する方法として、これまで使用していた5'-RACE法に替えて、multiplex one-step RT-PCR法を採用することで、取得T細胞からのTCR cDNA取得の効率を大幅に向上させることができた。これにより、T細胞ISAAC法の臨床サンプルへの応用へ向けて前進したと考える。また、抗原提示細胞とT細胞を共培養することで、T細胞に刺激特異的にIFN- $\gamma$ 分泌を誘導する条件を確立することができた。このようにして刺激したT細胞をチップに播種することで、IFN- $\gamma$ の分泌をチップ上で検出し、抗原提示細胞に反応するTCRをT細胞ISAAC法で取得できると期待される。実際の臨床の現場では、腫瘍抗原が未知のことが多いため、抗原情報が未知でも腫瘍特異的TCRをT細胞ISAAC法で取得できるようになれば、T細胞ISAAC法を応用した腫瘍の個別化治療へ向けての大きな一歩となると期待される。今後も、T細胞ISAAC法を用いて、腫瘍特異的TCRを迅速に取得する条件を確立していきたい。

## I - 2 がん特異的T細胞検出システムの改良

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 助教 浜 名 洋

### 【目的】

我々が、最近 Nature Medicine に報告した hTEC10法は、既知の抗原ペプチドに反応する T 細胞を同定し、その T 細胞受容体 (TCR) を取得する方法である (Kobayashi E et al, 2013)。T 細胞の抗原ペプチドは、抗原提示細胞上に発現している human leukocyte antigen (HLA) 分子の上に結合して、細胞表面に提示される。現在の研究・臨床試験の主流は、既知の抗原ペプチド特異的 T 細胞を用いたがん免疫療法が主体である。

HLA 分子は多型性に富んだ分子であり、各個人により、そのアミノ酸配列 (ハプロタイプ) が異なる。特に、ペプチドが結合する部分および TCR と相互作用する部分のアミノ酸配列が異なる。その結果、ハプロタイプが異なると、HLA 分子上に結合するペプチドも異なってくる。HLA のハプロタイプは民族によっても偏りがある。その結果、日本なら日本、欧米なら欧米で多いハプロタイプに研究が偏る傾向がみられる。すなわち、日本では、HLA-A24分子に結合するペプチドおよびそれに反応するT細胞の解析が主であり、欧米では、HLA-A2分子に結合するペプチドおよびそれに反応するT細胞の解析が主である。従って、がんの免疫療法においても、HLA-A24あるいはHLA-A2以外のハプロタイプを持つ患者はがん免疫療法の恩恵に与ることができない。

一方で、現在、がん抗原ペプチドが特定されていないがんが多数存在し、そのようながんに反応する TCR を取得し、治療に応用したいという高いニーズがある。本研究では、hTEC10法を改良し、抗原が未知のがんに反応する TCR を取得できるシステムを構築することを目的とする。

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) には、がん細胞を特異的に殺傷する T 細胞が存在することが知られている。従って、TIL からクローニングした TCR 遺伝子の中から、がん細胞に反応する TCR 遺伝子を選択することができれば、がん抗原ペプチドが特定されていなくとも、がんの特異的な TCR 遺伝子を取得することが可能となる。TIL の中でも、T 細胞活性化マーカーである PD-1 あるいは CD137を発現し、かつクローナルに増殖している TIL が、がん特異的 T 細胞の有力な候補である。そこで、本年度は、昨年度に報告した TCR cDNA を迅速・簡便に増幅可能な Multiplex one-step RT-PCR 法を用いて、マウス・メラノーマ腫瘍に浸潤した CD137<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞の TCR レポートリー解析を行い、クローナルに増殖している TIL を同定した。そして、そのクローナルな TIL からクローニングした TCR 遺伝子を用いて TCR のがん細胞に対する反応性を調べ、「TIL の TCR レポートリー解析」により、

がん特異的な TCR 遺伝子を取得可能であることを検討した。

## 【方法】

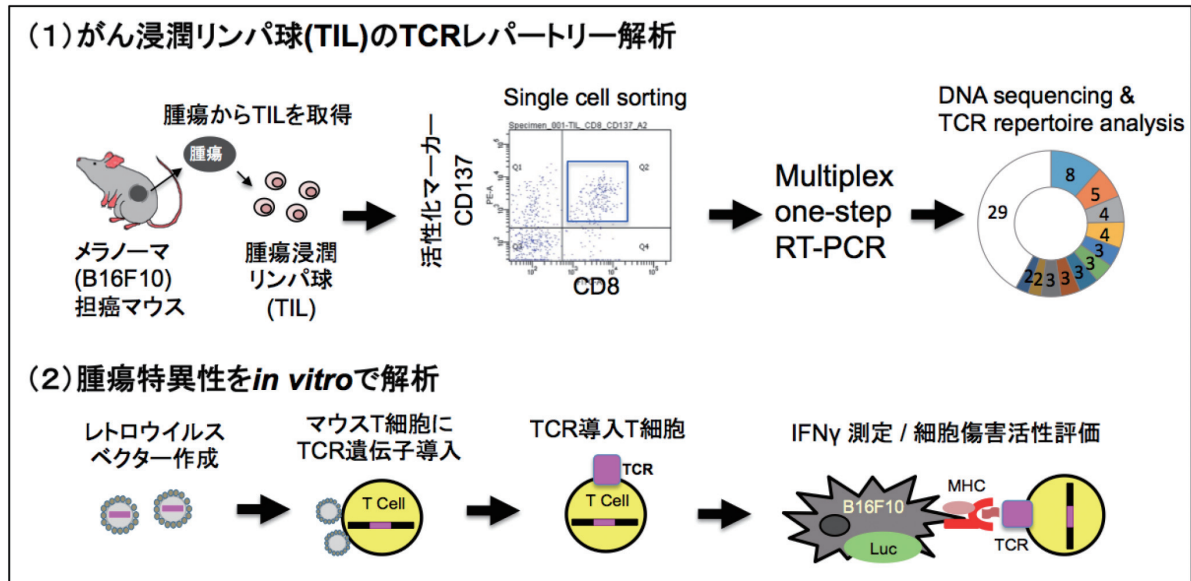


図1 実験の概要

### TIL の TCR レパートリー解析 (図1-(1))

マウスのメラノーマ細胞株である B16F10細胞を C57BL/6 マウスの皮下へ移植し、10日後に腫瘍を摘出し TIL を調製した。調整した TIL を抗マウス CD137抗体および抗マウス CD8 抗体で染色し、セルソーターを用いて CD137<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TIL を96well PCR プレートに Single cell sorting した。Multiplex one-step RT-PCR 法により TCR $\alpha$  及び TCR $\beta$  の cDNA を増幅し、得られた PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い TCR 遺伝子の DNA 配列を決定した。その DNA 配列情報を IMGT (<http://www.imgt.org>) で解析し、TCR の V-gene および CDR3 の配列を同定し、TILのクローナリティを決定した。

### TCR の腫瘍特異性の *in vitro* 解析 (図1-(2))

クローナルな TIL 由来の TCR 遺伝子を用いてレトロウイルスベクターを作成し、マウス脾臓由来のT細胞に遺伝子導入した。作製した TCR 遺伝子導入 T細胞と B16F10メラノーマ細胞を共培養し、IFN- $\gamma$  の産生量を測定し、TCR の活性化を評価した。また、ルシフェラーゼを発現するB16F10細胞 (B16F10-Luc) を用いて、TCR 遺伝子導入 T細胞のB16F10細胞傷害活性を解析した (ルシフェラーゼ活性と生細胞数との間に相関があることを利用した解析法を用いた)。



## 【結果】

5匹のメラノーマ担癌マウスより TIL を調整し、CD137<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TIL の TCR レポートリーを解析した。図2に TCRβ のレポートリー解析の結果を示す。Mouse-1 では、32個の TIL から TCRβ の cDNA 配列が決定され、その内22個の TIL からは同一 DNA 配列の TCRβ cDNA がクローニングされた。すなわち、この22個の TIL (Gp1) は、腫瘍内でクローナルに増殖した TIL であることが明らかとなった。一方、残りの10個の TIL はユニークな TCRβ 遺伝子を発現しており、クローナルな TIL ではないことが示された。Mouse-2 では、53個

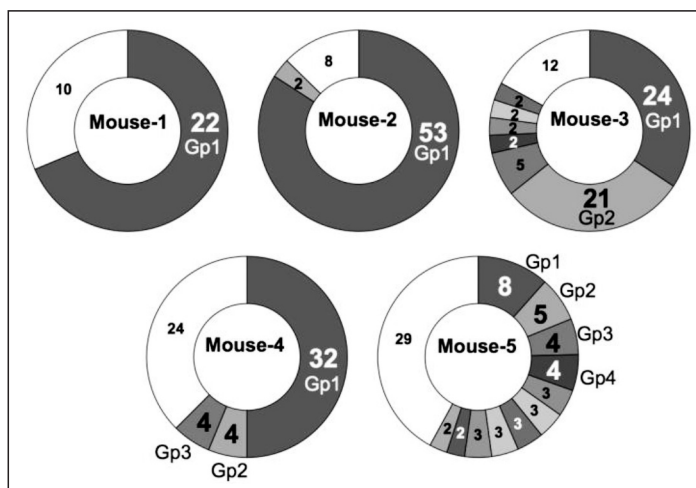


図2 CD137<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TIL の TCRβ レポートリー  
図中の色の塗られた画分の数字は同一の TCRβ を発現していた TIL の数を示している。色を塗られていない画分の数字はユニークな TCRβ を発現していた TIL の数を示している。

の TIL が高頻度でクローナルに増殖している様子が観察された。同様に Mouse-3, -4, -5 においても頻度の違いはあるが、クローナルに増殖している CD137<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TIL が同定された。次に、各マウスの TIL においてクローナリティの高い TIL (Gp~Gp4) から TCRα cDNA をクローニングし、TCRα と TCRβ を発現させるためのレトロウイルスベクターを作製した。Mouse-1 では 1Gp1-TCR, Mouse-2 では 2Gp1-TCR, それぞれ 1 種類を、Mouse-3 では 2 種類 (3Gp1, 3Gp2), Mouse-4 は 3 種類 (4Gp1, 4Gp2, 4Gp3), Mouse-5 は 4 種類 (5Gp1, 5Gp2, 5Gp3, 5Gp4) の TCR 発現用ウイルスベクターを作成し、それらのウイルスベクターを用いて、マウス脾臓由来の T 細胞に TCR 遺伝子を導入した。TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10 細胞を共培養し、活性化 T 細胞が産生する IFN-γ の量を測定した。その結果、ネガティブコントロールである OT-1 TCR 遺伝子導入 T 細胞に比べ、4Gp1, 4Gp2, 4Gp3, 5Gp1, 5Gp2-TCR を遺伝子導入した T 細胞において、顕著な IFN-γ の産生が見られ、これらの TCR が B16F10 細胞に反応し、T 細胞が活性化することが明らかとなった。一例として、図 3A に Mouse-4 TIL 由来の TCR を遺伝子導入した T 細胞の IFN-γ の産生を示す。更に、IFN-γ の産生が見られた TCR 遺伝子導入 T 細胞が B16F10-Luc に対して細胞傷害活性を示すかどうかを検討した。図 3B に、その結果を示す。Mouse-4 TIL 由来の TCR を遺伝子導入した T 細胞が B16F10-Luc に対して細胞傷害活性を示すことが確認された。

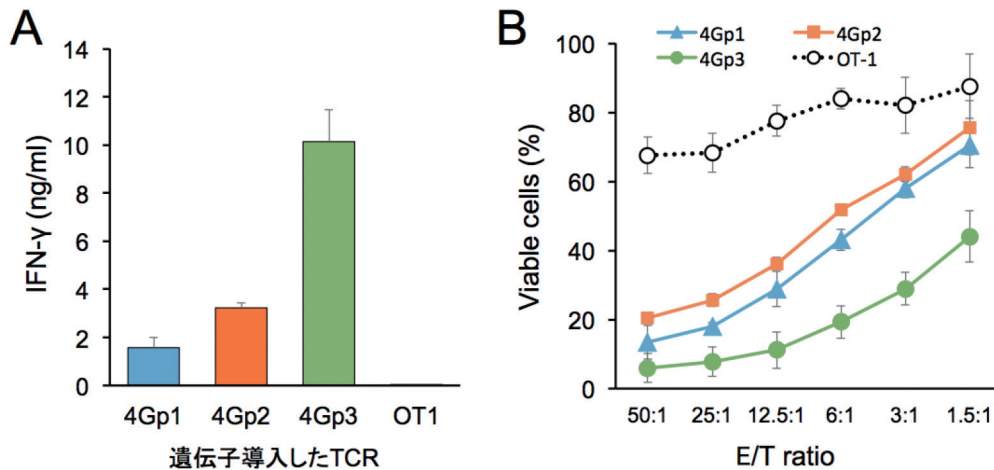


図3 TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた B16F10 細胞に対する TCR の反応性の解析

A: TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10細胞を共培養し、その培養上清中に分泌される IFN- $\gamma$  の濃度をELISAによって測定した。B: TCR 遺伝子導入 T 細胞と B16F10-Luc 細胞を共培養した後、B16F10細胞内のルシフェラーゼ活性を測定し、TCR 遺伝子未導入の T 細胞と共培養した B16F10-Luc のルシフェラーゼ活性との比較により生細胞数の割合を算出した。

### 【考察と今後の展望】

本年度、我々は本研究で改良した Multiplex one-step RT-PCR 法を用いて、マウス・メラノーマ腫瘍の活性化 TIL の TCR レパートリー解析を行い、クローナルに増殖している TIL を迅速・簡便に同定することが可能であることを確認した。そして、そのクローナルな TIL から取得した TCR 遺伝子を用いて、クローニングした TCR のがん特異性やがん細胞に対する細胞傷害活性の誘導能を検討した。その結果、複数のマウス由来の TIL から複数のがん特異的な TCR 遺伝子を取得する事に成功した。すなわち、「活性化 TIL の TCR レパートリー解析」により、MHC や抗原に関係なく、がん特異的 TCR が取得可能であることが実証された。

現在、我々はヒトの TIL から同様の方法で、がん特異的 TCR を取得する研究を進めている。我々の方法は「迅速・簡便」が特徴である。HLA ハプロタイプに関係なく、全てのがん患者を対象に、迅速・簡便な TCR 遺伝子治療を提供することを目標に研究を発展させていきたい。

# I - 3 T細胞抗原探索システムの開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸

## 【目的】

がんの免疫学的治療において、新規がん抗原の同定が喫緊の課題である。いかに良い標的を選択するかが、がんの免疫学的治療の成否を握っているからである。現在、用いられているT細胞の抗原の同定法は非常に複雑な方法で、その時々で、トライアンドエラーで、最適な方法を探しながら行う必要がある。我々は、本研究において、非常にシンプルで確実に機能する「T細胞抗原探索システム」を開発する。この新規システムの開発により、がん抗原をシンプルに再現性良く同定できれば、新たながんワクチンの開発やがんのテーラーメイド医療にも貢献できる。

昨年度は、抗原提示細胞に抗原遺伝子を導入し、抗原特異的 T 細胞が接触すると、抗原提示細胞にシグナルが導入され、蛍光タンパク質の発現を指標に抗原遺伝子が導入された抗原提示細胞を検出する方法を検討した。今年度は、村口教授が開発している T-ISAAC の原理を応用し、抗原特異的 T 細胞に抗原遺伝子を導入して、cis の相互作用により TCR からのシグナルを導入することで、活性化マーカー CD137の発現を検出し、それを指標に抗原遺伝子が導入された T 細胞を検出するシステムを検討する。モデルシステムとしては昨年度と同様に、EBウイルス由来ペプチドに反応する TCR を用い、抗原 cDNA が導入された T 細胞を同定できるかを検証する。

## 【方法と結果】

図 1 に示すように、TG40細胞にBRLF-1 特異的 TCR および HLA-A24分子を発現させた。その細胞に BRLF-1 ペプチドを発現する遺伝子を導入したところ、図 1 右の図のように、CD137分子の発現が上昇した。この結果より、cis 相互作用のシステムを使い、抗原探索システムが構築できることが示唆された。

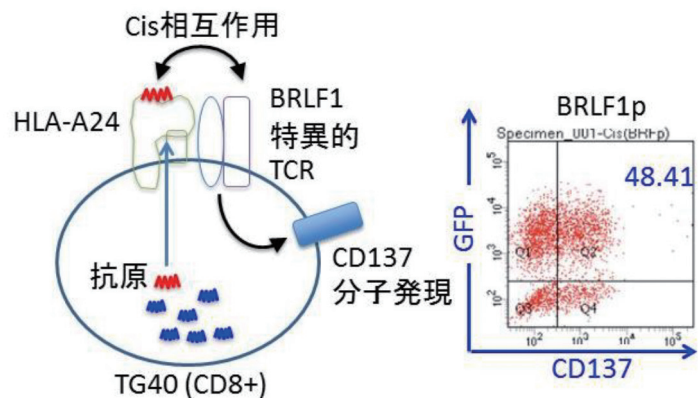


図 1 cis 相互作用を用いた抗原探索用レポーター

次に、BRLF-1 ペプチドを発現するレトロウイルスベクターを作製した。そのベクターを空のウイルスベクターで希釈し、1倍、10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍の希釈系列を作り、

レポーター細胞に導入した。遺伝子導入後、一晚培養し、活性化マーカー (CD137) の発現を解析した。

その結果、図 2 に示すように、 $10^4$  分の 1 の頻度で抗原ペプチド発現ベクターがレポーター細胞に導入された場合にも、CD137 の発現が特異的に増強することが確認された。

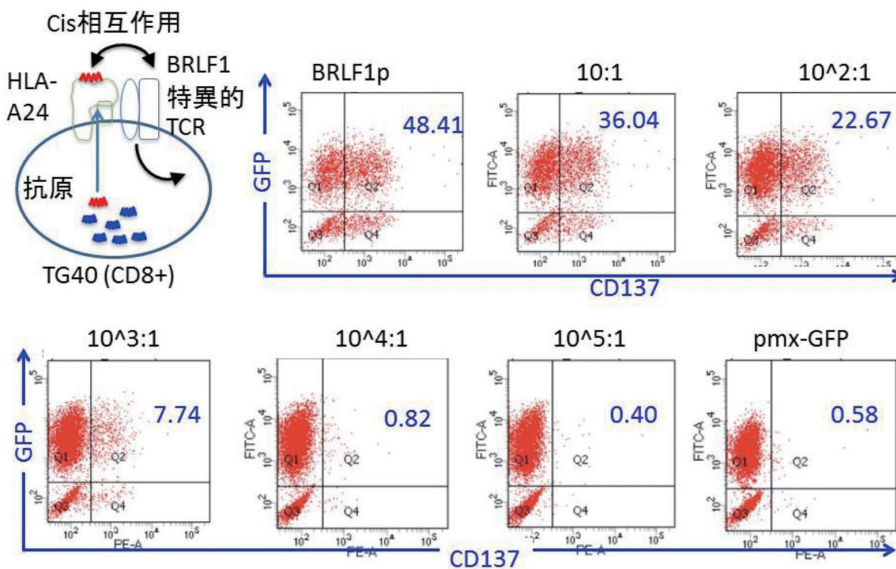


図 2 抗原ペプチドベクターの希釈系列に対するレポーター細胞の反応

### 【考察と今後の展望】

実際に、cDNA 発現型ライブラリーを作製して抗原のスクリーニングを行う時には、 $10^5$  程度の独立したクローンを含むライブラリーを作製する必要があることが明らかとなった。今回の結果は、 $10^4$  個に 1 個の割合で目的のクローンが存在していれば、レポーター細胞を用いて目的の抗原 cDNA を検出できるということを示している。従って、 $10^5$  個のライブラリーを、 $10^4$  個を 1 グループとして 10 グループに分け、それらを解析すれば、目的の抗原が同定できる可能性があるということであり、十分実現可能なシステムが構築できたと考えられる。

今回の結果より、作製したレポーター細胞を用いることで、ペプチド発現ライブラリーより、目的の TCR の抗原ペプチドが同定される可能性が示された。今後、実際のライブラリーを作製して、抗原 cDNA が取得できるか、検証していきたい。本研究により、シンプルで信頼性の高い抗原探索システムを作製することができれば、新規がん抗原を同定し、より効果の高いがんワクチンを製造することが可能になる。さらに、個々の患者におけるがん抗原を同定することにより、がんのテーラーメイド医療にも貢献すると期待される。

## I - 4 ウサギ ISAAC を用いた抗体開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 免疫学講座 助教 小澤 龍彦

### 【研究目的】

ウサギの抗体はマウスなどの抗体に較べて、抗原に非常に特異的かつ強力に結合することが知られている。がんの治療においても、がんの特異的に、かつ強力に結合する抗体の開発が必要とされている。我々は、最近、細胞チップを用いて、ウサギ由来モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に取得する「ウサギ ISAAC 法」を開発した (Ozawa T et al, 2012)。本研究では、「ウサギ ISAAC 法」を用いて、がん抗原に対するウサギモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてがん細胞の傷害や検出法などに応用可能か検証する。

チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、ErbB2 の活性調節機構の解明は、分子標的薬に対する感受性や耐性獲得などに関する重要な知見となる。中でも677番目のスレオニン残基 (ErbB2-Thr677) のリン酸化は、ErbB2シグナルの下流の ERK 活性に関与している可能性が示唆されており、この ErbB2-Thr677のリン酸化を測定することは、ErbB2 活性評価に繋がる。

そこで今回我々は、ErbB2-Thr677のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いた乳がん患者の組織染色などからがん細胞分子標的薬に対する感受性や悪性化の予測プロトコルの確立を目指す。

### 【方法】

#### ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体のスクリーニング

平成27年度までに、取得した抗体遺伝子の H 鎖と L 鎖の両方の可変部領域をウサギ抗体の H 鎖及び L 鎖の定常部領域を持つプラスミドにそれぞれ組み込み、抗体発現プラスミドを作製した。得られたプラスミドを Expi293F 細胞（サーモフィッシャー）に導入し、5日間培養を行い、培養液中に抗体を産生させた。プラスミドの構築と抗体の発現は、Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている方法に従った。

得られた培養液を用いて ELISA を行い ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体を発現するプラスミドの選別を行った。具体的には、ELISA 用 maxi sorp プレート（サーモフィッシャー）に 1µg/ml の

ErbB2 由来リン酸化ペプチド (p-ErbB2pep, オペロンバイオテクノロジーズ, 配列: EPLpTPSGAMP, pT はリン酸化スレオニン) 及び ErbB2 由来非リン酸化ペプチド (ErbB2pep, オペロンバイオテクノロジーズ, 配列: EPLTPSGAMP) 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。翌日ペプチドを固相化した各ウェルを0.05% 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。その後各ウェルを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, アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ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1mg/ml アルカリフォスファターゼ基質 (パラニトロフェニルリン酸, シグマ-アルドリッチ) を加えて反応させ, 405nmの吸光度を測定した。

### ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体の解析

抗体遺伝子の塩基配列は, genetic analyzer 3130 (サーモフィッシャー) と BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシャー) を用いて解析した。

塩基配列を解析したプラスミドを Expi293F 細胞に導入し, 7日間培養を行い, 培養液中に抗体を大量に産生させた。得られた培養液からプロテインGカラム (GEヘルスケア) を用いて精製した。

HEK293細胞に野生型 ErbB2 及び T677A ErbB2 を発現させ, 24時間後に12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート (TPA) を10分間作用させ ErbB2 のリン酸化を誘導した。これら細胞より細胞抽出液を調整し, SDS-PAGE による分離を行い, 膜に転写後, 精製した抗体を用いて, ウェスタンによる解析を行った。

### 【結果及び考察】

得られていた20個のH鎖, L鎖の可変部領域を定常部領域に繋ぎ, 抗体の産生を行い, p-ErbB2pepとの結合特異性を解析した結果, ELISAにより8種類の抗体がp-ErbB2pepと特異的に結合することが示された (図1)。これら抗体の塩基配列を決定し, 抗体の大量調整を行った。これら抗体が細胞レベルで結合するかを検討した結果, #18-1 及び #18-4 は TPA によってリン酸化が誘導された ErbB2 と特異的に

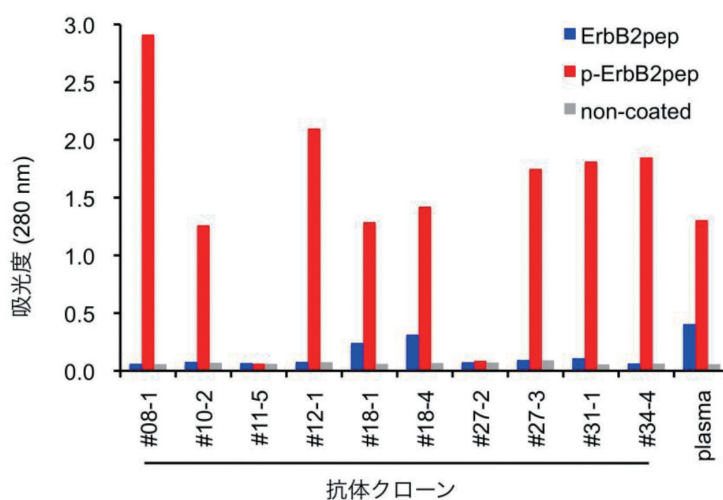


図1 抗体クローンのスクリーニング。作製した抗体クローンを用いELISAにてp-ErbB2pepとの結合性をELISAにて検証した。Plasmaは、p-ErbB2pepを免疫したウサギより分離した血漿で行った。

結合し、該当するリン酸化部分をアラニンに変異させた T677A とは結合しないことがウエスタン解析によって示された (図 2)。残りの 7 種類の抗体は、ウエスタン解析では結合しなかった。これらの結果より、今回作製した #18-1 及び #18-4 は細胞内における ErbB2-Thr677 のリン酸化部位を特異的に検出できる事が示された (Kawasaki et al, 2016)。

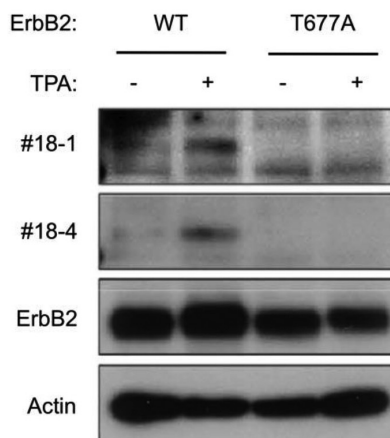


図2 作成した#18-1及び#18-4抗体を用いたウエスタン解析。野生型ErbB2及びT677A ErbB2を発現させたHEK293細胞に、TPAを10分間作用させた細胞抽出液をSDS-PAGEにより分離し、膜に転写後、図に示した抗体を用いてウエスタンによる解析を行った。

### 【結論・今後の展望】

ErbB2 はシグナル伝達の重要な受容体であり、その伝達にはリン酸化が関与していることが知られている。一方で全てのリン酸化部位は特定されておらず、今回対象とした ErbB2-Thr677 のリン酸化は、ErbB2 シグナルの下流のERK活性に関与している可能性が示唆されているものの、ErbB2-Thr677 にリン酸化が起こっていることが証明されていなかった。今回の研究で、ErbB2-Thr677 のリン酸化部位を特異的に検出できる抗体、#18-1 及び #18-4 を作製することができたことから、ErbB2-Thr677 にリン酸化が起こっていることが証明され、さらには、下流シグナルである ERK の活性評価を通して ErbB2 活性評価に繋がることが期待される。

タンパク質全体の中で、リン酸化される場所は170,000箇所以上あると推計されている。しかしながら実際に出回っている抗体はその0.1-5%程度に過ぎず、特にシグナル伝達の研究者から、リン酸化特異的抗体の供給が望まれている。本方法を用いる事で、改めてリン酸化特異的抗体を容易に得ることが示された。本方法は今後、このような研究者が望んでいるリン酸化特異的抗体の供給の一助になることも期待される。また、チロシンキナーゼ型受容体であるErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、本抗体は ErbB2 に対する分子標的薬の効果を解析するためにも有用であると考えられる。

### 【参考文献】

- 1 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., \*Kishi H. and Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nature Medicine*, 15:1088-1092, 2009.
- 2 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kishi H., Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nature Protocol* 6:668-676, 2011.

- 3 Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Muraguchi A. Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Methods Mol Biol.* 853:141-150, 2012.
- 4 Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*, 19:1542-1546, 2013.
- 5 Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 3:e27258, 2014.
- 6 Hamana H, Shitaoka K, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. A novel, rapid and efficient method of cloning functional antigen-specific T-cell receptors from single human and mouse T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 474:709-714, 2016.
- 7 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.* 7:e52383, 2012.
- 8 Kawasaki Y, Sakimura A, Park CM, Tomaru R, Tanaka T, Ozawa T, Zhou Y, Narita K, Kishi H, Muraguchi A, Sakurai H. Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. *Sci Rep.* 6:31502, 2016.