

抗原特異的 TCR 解析技術の開発と癌遺伝子治療への応用
公益財団法人 東京都医学総合研究所 疾患制御研究分野
がん免疫プロジェクト 丹野秀崇

【研究目的】

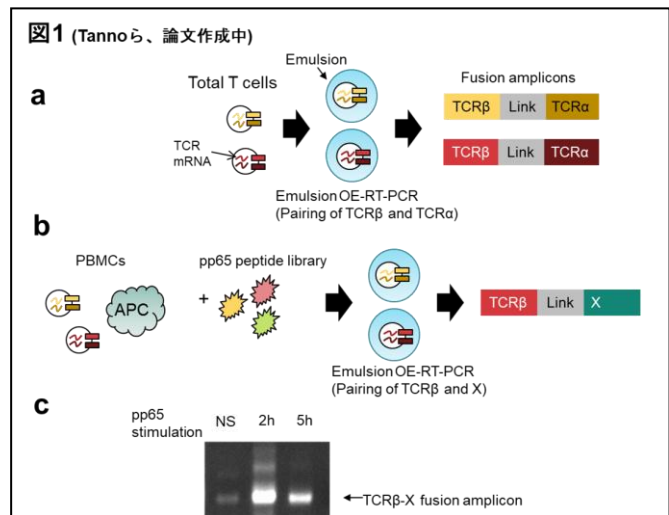
T cell receptor (TCR)を用いた癌遺伝子治療法が臨床試験において目覚ましい成果を挙げている。一方で、次の理由により遺伝子治療に活用できるTCRを発見することは未だに困難だった。第一の問題としてTCRの多様性が挙げられる。TCRは遺伝子再構成によって生成されたTCR α 鎖、TCR β 鎖で構成されており、一つ一つのT細胞がそれぞれ異なるTCR配列を発現している。従って、機能的なTCRを発見するには1細胞シーケンスが必要である。しかし、マイクロウェルプレート上へ1細胞を単離し、その配列を調べるといった従来の手法ではせいぜい数百個のT細胞しか解析できず、有用なTCRを発見することが難しい。第二の問題として抗原特異的TCRの単離技術がロースルーットなことが挙げられる。TCRはHLA上に提示されている抗原ペプチドを認識する。従って、一般的な抗原特異的TCR単離手法ではHLA上に抗原ペプチドを載せたpeptide-HLA (pHLA) テトラマーを作製し、このテトラマーに結合するT細胞を単離してTCR配列を調べていた。しかし、本手法で単離できるTCRは通常10種類未満であり、癌殺傷効果の高いTCRを発見することが難しい。また、テトラマー法で単離されたTCRはHLA拘束性を持つため、特定のHLAを発現している癌患者にしか得られたTCRを適用できない。最後の問題として、他人あるいは動物から単離された癌特異的TCRを別の患者に発現させると重篤な副作用が起こる危険性がある。

これらの問題点を解決するために、本研究では抗原特異的TCRを一斉同定できる技術の開発を提案した。本技術を用いれば任意の患者からハイスルーットに癌特異的TCRを単離可能となり、得られたTCRを用いればHLA遺伝子型に関わらずどの癌患者にも遺伝子治療を実施することが可能となる。更に、癌特異的TCRは自己由来のため、それを元の患者に過剰発現させても副作用が起こる危険性は低いと考えられる。

新規技術を開発するために次の試みを本研究開始前に実施していた。これまでに我々はTCRを1細胞レベルで網羅的に解析できる基盤技術を開発している。本技術では1細胞をエマルジョンに包み、その中でoverlap-extension RT-PCRを実施することによって、TCR α 、TCR β のmRNAを融合する(図1a)。得られたTCR α - β 融合cDNAをNGS解析することによって1細胞由来のTCR配列を高速に解析できる。更にこれまでに我々は本技術を改良することによってサイトメガロウイルス特異的TCRの単離に成功している。T細胞はTCRを介して抗原と結合するとXを発現する。そこで、

図1bのようにサイトメガロウイルス抗原pp65をPBMCに加えると、pp65特異的T細胞はXを発現し、非特異的T細胞はXを発現しない。これらのT細胞をエマルジョンに包み、XとTCR β mRNAの融合を行うと、pp65特異的TCRを持つT細胞だけがTCR β -X融合cDNAを生成するという仕組みである。実際にpp65刺激有り、無しでTCR β -X融合cDNAを生成すると図1cの結果となった。ここからTCR β の配列をNGS解析し、13種類のTCRをクローニングしたところ、12種類がpp65との結合を示した[Tannoら論文作成中]。

今回、本手法を癌患者検体に適用することによって癌特異的TCRを迅速に単離できるかを試みた。また、抗原特異的TCRとpHLAの相互作用を網羅的に解析する基盤技術の開発にも取り組んでいる。



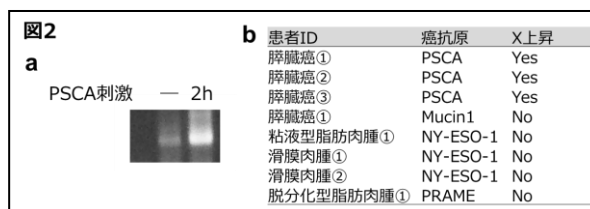
【結果および進捗状況】

1. X計測による癌抗原特異的TCRの単離

上記手法によって癌特異的TCRを単離するには癌患者検体を使用する必要があったため、その収集に時間がかかり研究計画に遅延が生じたが、最終的に多摩総合医療センター、国立がん研究センター、駒込病院から膵臓癌、粘液型脂肪肉腫、滑膜肉腫、脱分化型脂肪肉腫、肺癌患者由来の末梢血および腫瘍検体を入手した。研究計画に示した乳癌患者検体についても引き続き医療機関と交渉していく。

まず、膵臓癌患者、肉腫で過剰発現している癌抗原を患者PBMCに加え、1細胞レベルでのTCR β とXの融合を試みた。膵臓癌患者PBMCにはProstate stem cell antigen (PSCA)およびMucin1、肉腫(粘液型脂肪肉腫、滑膜肉腫、脱分化型脂肪肉腫)患者PBMCにはNY-ESO-1およびPRAMEと呼ばれる癌抗原を加えた。その結果、

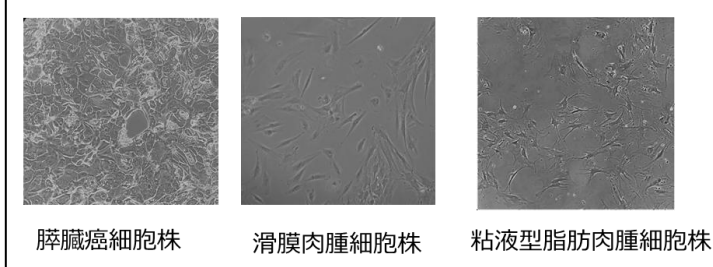
膵臓癌患者PBMCにPSCAを加えた場合、TCR β -Xの融合cDNA量が大きく上昇した(図2a)。また、この結果はその他2名の膵臓癌患者PBMCに対しても再現性良く得られた。一方で、図2bに示すようにMucin1, NY-ESO-1, PRAMEに対するXの上昇は各PBMCに対して起こらなかった。これはこれらの癌抗原に対するT細胞が末梢血にほとんど存在していないことが原因と考えられた。



PSCAに対してはTCR β -X融合cDNAの発現上昇が見られたことから、膵臓癌患者①および②の融合cDNAを精製しNGS解析を実施した。PSCA刺激無しでも融合cDNAが若干検出されたことから、刺激無し、刺激有りのcDNAをそれぞれNGS解析を行い、発現が上昇しているTCR β 配列を解析した。その結果、患者①からは4種類のTCR β 、患者②からは5種類のTCR β がPSCAを加えた際に発現上昇していた。これらのTCR配列を現在クローニングしており、完了次第実際にPSCA抗原に結合するかどうか、膵臓癌細胞を殺傷できるかどうかを検証する。

TCRが癌細胞を殺傷できるかを検証するためには、患者由来の癌細胞株が必要であるため、癌細胞株の樹立も並行して行っている。現在、図3に示す通り膵臓癌細胞株、滑膜肉腫細胞株、粘液型脂肪肉腫細胞株の樹立に成功しており、TCRの実験系に使用できる系が整った。脱分化型脂肪肉腫、肺癌に関しても培養条件を検討することによって引き続き樹立を試みる。

図3 患者由来癌細胞株を樹立



2. 抗原特異的TCRおよびその認識pHLAを1対1で網羅的に同定できる技術の開発

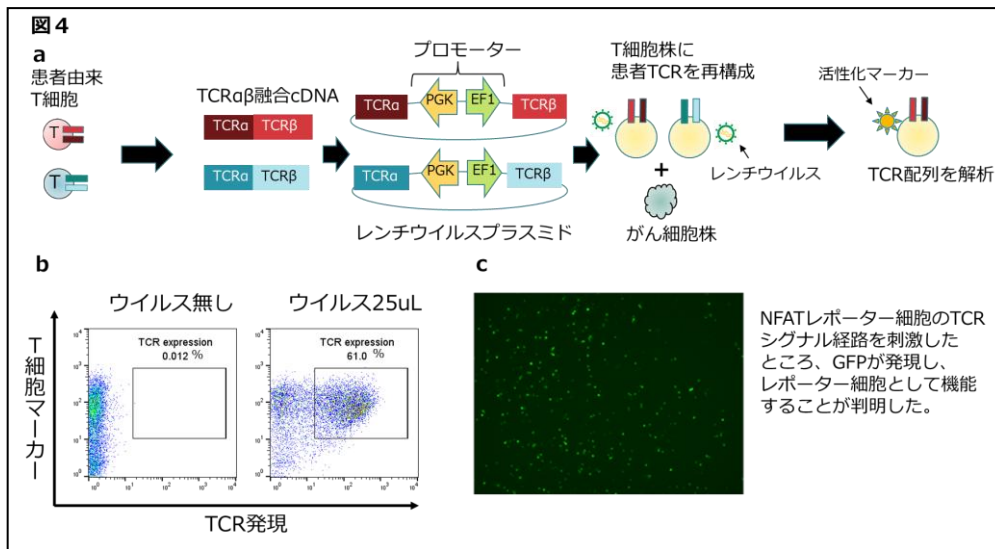
XとTCRの配列を同時計測することによってPSCA特異的TCR候補が得られた。一方で、得られたTCRがPSCA抗原のどのエピトープを認識し、何のHLAを認識しているかを把握するには、更なる技術開発が必要となる。そこで抗原特異的TCRとその認識pHLAを1対1で網羅的に同定できる技術の開発に取り組んだ。このような網羅的解析技術の開発には

- i) TCRの高速クローニング技術の開発
 - ii) TCRの認識抗原-HLA同定技術の開発
- を開発し、これらを組み合わせることによって達成できると考えている。

i) TCRの高速クローニング技術の開発

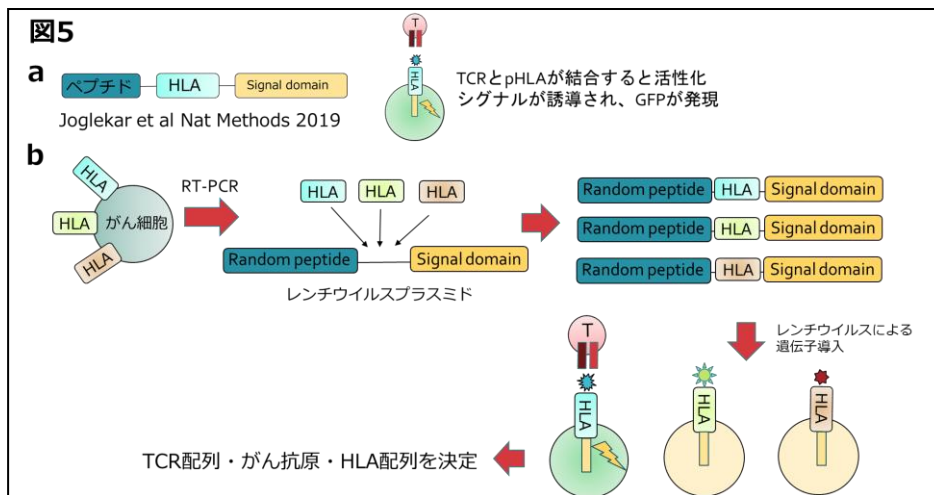
現在のところ、Xを上昇させたTCRをDNA合成し、クローニングを行っているが、時間を要する実験であるため、TCRを高速にクローニングできる手法の立ち上げを行った。具体的には次頁図4aのように患者由来T細胞から1細胞由来TCR α - β 融合cDNAを作製し、このcDNAをTCR α β の組み合わせを保ったまま、レンチウイルスプラスミドに組み込んだ。また、レンチウイルスプラスミドにはBidirectional promoter (PGK-EF1 promoter)を組み込み、TCR α 、 β のmRNAを発現できるようにした。ここから、レンチウイルスを産生させ、Jurkat T細胞に導入したところ、図4bのように患者由来のTCRをJurkat細胞に再構成することに成功した。これらのJurkat細胞と作製した癌細胞株を混ぜ合わせ、活性化したJurkat細胞をFACSソートすれば癌細胞特異的TCRが分かるという仕組みである。

そこで、樹立した粘液型脂肪肉腫細胞株とTCR発現Jurkatを混ぜ合わせ、Jurkat活性化マーカーの一つであるCD69を計測したが、現在のところ活性化したJurkat細胞は得られていない。粘液型脂肪肉腫患者のT細胞に癌細胞特異的TCRが少ない可能性が考えられたため、膵臓癌検体を用いて患者TCR発現Jurkatの構築を行っている。また、CD69より鋭敏なTCR活性化マーカーとしてNFATが挙げられる。そこでTCRが活性化されるとNFAT経路によってGFPが発現するレポーター細胞株の樹立も行った(図4c)。今後はこのレポーター細胞に患者由来TCRを発現させスクリーニングに使用していく予定である。



ii) TCRの認識抗原-HLA同定技術の開発

TCRが認識するpHLAを高速に同定する技術開発も行った。これまでに図5aのように抗原ペプチド、HLA、Signal domainを連結すると、このpHLAがTCRと結合した場合、活性化シグナルを誘導出来ることが報告されている[Joglekar et al Nat Methods 2019]。ヒトは最大で12種類の古典的HLA遺伝子型を1個人で発現するが、本論文では2種類のHLA遺伝子型についてのみ解析を行っていた。そこで、本技術を改良することによって、様々なpHLAを一挙に作製することを試みた。具体的な実験概要は図5bのようになる。まず、癌細胞からRNAを抽出し、RT-PCRを実施し、癌細胞が発現しているHLAをクローニングする。そして得られたHLA libraryをランダムペプチド、signal domainを有するレンチウイルスプラスミドに組み込む。このようにして作製したpHLA-signal domain libraryからレンチウイルスを作製し、一つ一つの細胞株に異なるpHLA-signal domainを発現させる。ここにTCRを発現させたJurkatと混ぜ合わせ、pHLAが結合すれば活性化シグナルが誘導されるため、TCRの認識pHLAが分かるという原理である。具体的にはHLAをクローニングするプライマーを作製し、現在患者HLAのレンチウイルスプラスミドへのクローニングを行っている。



【総括および今後の展開】

PSCA特異的TCR候補が実際にPSCAを認識することを確認し、その癌殺傷効果を培養細胞レベル、動物実験レベルで検証する。また、研究提案したネオ抗原特異的TCRの単離も実施していく。TCRの高速クローニング技術の立ち上げに成功した。HLAのディスプレイ技術が確立後、これら二つの技術を組み合わせ、TCRとpHLAの相互作用を網羅的に解析出来る基盤技術を確立する。

今回の研究結果において、PSCAに対して末梢血T細胞が強く反応していたことから、PSCA陽性の膵臓癌に対する診断マーカーとして活用できないかと考えその検証を行っている。具体的には膵臓癌患者PBMC、健常者PBMCにそれぞれPSCAを加え、Xの発現上昇をqRT-PCRにより解析しており、まとめ次第こちらも論文発表を行う。

【謝辞】 本研究に対し、公益財団法人アステラス病態代謝研究会からの助成を頂戴したことに心から感謝申し上げます。貴重な助成金により、研究室の立ち上げ、研究の推進が可能となりました。ご支援に心より感謝いたします。