

# TCR 改変データと人工知能によるがん抗原特異的高親和性 TCR の特定

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御TR分野 任意研修生 福嶋恭啓

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御 TR 分野 分野長 松下博和

愛知県がんセンター研究所

システム解析学分野 分野長 山口類

## 1. 研究の背景・目的

近年、広く臨床へ応用されている免疫チェックポイント阻害薬には、がん免疫を活性化する画期的なアプローチであるが、一部の患者では効果が限定的であることもあり、がん免疫療法のさらなる発展が求められている。がん免疫療法の1つとして、がん抗原に特異的なT細胞受容体（TCR：T cell receptor）を患者由来のリンパ球に導入したTCR遺伝子導入T細胞療法がある。しかし、担がん患者からがん抗原特異的なT細胞の特定は容易ではなく、また、その抽出されたT細胞は抗原に対して低～中親和性であった。この問題を解決するため、がん・精巢抗原であるNY-ESO-1に特異的なT細胞を高親和性のTCRに改変し、治療効果を上げる試みが報告されており<sup>1</sup>、担がん患者から得られるTCRの親和性を高め、抗腫瘍効果を引き上げるための更なる開発が必要である。近年の研究では、TCRの抗原親和性を高めるために、TCRの相補鎖決定領域（CDR: complementary determining region）の遺伝子改変が行われている。特にCDR3 $\beta$ 配列は、TCRと抗原の結合特異性を決定する上で重要な役割を果たしている<sup>2</sup>。しかし、TCRの遺伝子改変は膨大な組み合わせを考慮する必要があり、人工知能を活用することで、高親和性のTCRを特定する効率を向上させることができるのではないかと考えた。近年、機械学習やDeep learning systemを用いて、ウイルスや細菌に対するTCRの予測が行われているが<sup>3</sup>、がん抗原に関してはまだ十分な研究が行われていない。本研究では、これらの方法をがん抗原に応用し、人工知能を用いてTCR遺伝子の改変を行うことで、がん抗原に対して高親和性のTCRを特定し、TCR遺伝子導入T細胞治療に応用することを目的とした。これにより、がんの種類を

超えたより効果的な治療法が提供され、個別化医療の進展に貢献することが期待される。

## 2. 研究の対象ならびに方法

当分野では肺癌検体から、がん・精巣抗原である KK-LC-1 (Kita-Kyusyu Lung Cancer Antigen-1) に対する TCR を同定している<sup>4</sup>。がん・精巣抗原は正常組織では免疫系から隔絶された精巣にのみ発現するため、がん特異的であり、がん免疫療法の有望なターゲットになりえる。同定した TCR のうち、細胞傷害活性が最も高い TCR (図1) を用いて、CDR3 $\beta$  領域の遺伝子改変をおこなった。

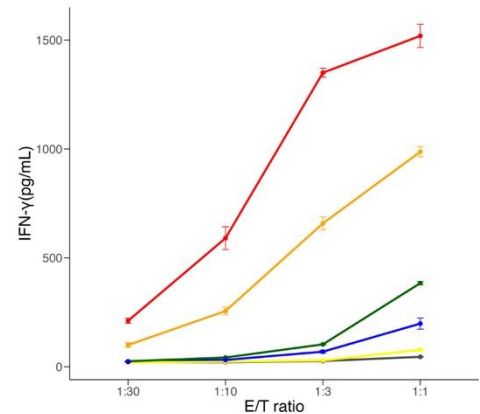


図1: IFN- $\gamma$  ELISA

### ① 遺伝子改変 TCR の作成

TCR V $\beta$  の CDR 3 領域は 13 アミノ酸で成り立っており、最初のシステインと最後のフェニルアラニンを除く、2 番目から 12 番目までのアミノ酸を、それぞれ他の 19 アミノ酸に置換し、遺伝子改変 TCR を作製した。具体的には、改変した TCR V $\beta$  をコードする人工遺伝子を PCR により増幅し、その DNA を Gibson Assembly 法によって定常領域を含むプラスミドベクターを作製した。これにより TCR  $\alpha$  と今回改変した TCR  $\beta$  の Transcriptionally active PCR (TAP) fragment を作製した。

### ② Luciferase Assay による活性の評価

TAP fragment と pGL4.30 (luc2P/NFAT-RE/Hygro) ベクターを Jurkat 細胞にエレクトロポレーションで形質転換した。5.0 $\times 10^4$  cells の Jurkat-Luc-TCR 細胞と 2.0 $\times 10^4$  cells の Lymphoblastoid Cell Line を、peptide である KK-LC-1 の有無で一晩共培養を行った。NFAT の活性化を Steady-Glo Luciferase Assay System で測定した。

### ③ MHC tetramer による結合力の評価

TAP fragment を Jurkat 細胞にエレクトロポレーションで形質転換し、48 時間培養した。2.0 $\times 10^5$  cells の Jurkat -TCR 細胞を使用して、tetramer-PE を加え、氷上で 30 分染色した後に、更に TCR  $\alpha\beta$ -APC を加え、氷上で 30 分染色した。染色した細胞を LSRFortessa X-20 フローサイトメーターを使用して分析し、データは FlowJo を使用して解析した。

### ④ TCR model2 による立体構造の予測

近年、deep learning をベースとした立体構造の予測、特に AlphaFold はアミノ酸列から単量体および多量体タンパク質の構造予測に著しく成功していることが証明されている<sup>5</sup>。TCRmodel2 は AlphaFold ベースとして、高い精度で TCR-pMHC 複合体のモデルを生成す

ることができる<sup>6</sup>。TCRmodel2 の Web サーバー(<https://tcrmodel.ibbr.umd.edu/>)から TCR-pMHC 複合体を予測し、PyMOL を使用して、立体構造の解析を行った。

### 3. 研究結果

Luciferase Assay では、改変 TCR のルシフェラーゼ活性を、peptide の有無により、それぞれ Fold change を行い、Wild type と比較した。MHC tetramer では、TCR  $\alpha \beta^+$  tetramer<sup>+</sup> の細胞をゲーティングした後に、tetramer の平均傾蛍光強度：Mean Fluorescence Intensity (MFI) を測定し、Wild type と比較した。結果を右に示す (図 2~4)。

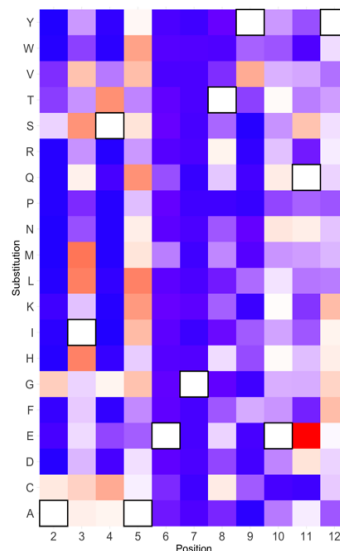


図 2: Luciferase assay

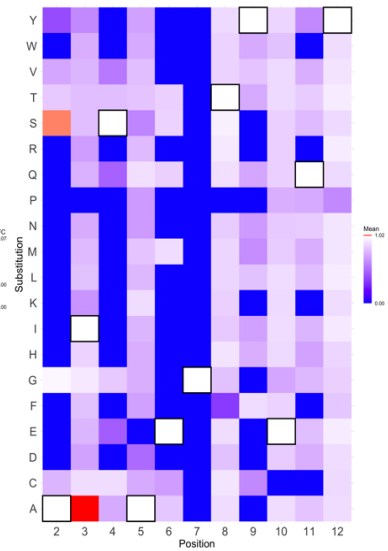


図 3: MHC tetramer

活性については、Wild type と比較して、概ね低下あるいは維持されている遺伝子改変が多かったが、中には Wild type より上昇した遺伝子改変があった。結合力については、Wild type と比較して、多くの遺伝子改変で低下あるいは維持されている程度で、上昇する遺伝子改変はほとんどなかった。特に G7 については全てのアミノ酸置換で活性および結合力の低下が認められた。活性が上昇した遺伝子改変においては、結合力は 75 ~ 95% で維持されていた。逆に、結合力が同様に維持されているものの、活性が低下する遺伝子改変も認められた。

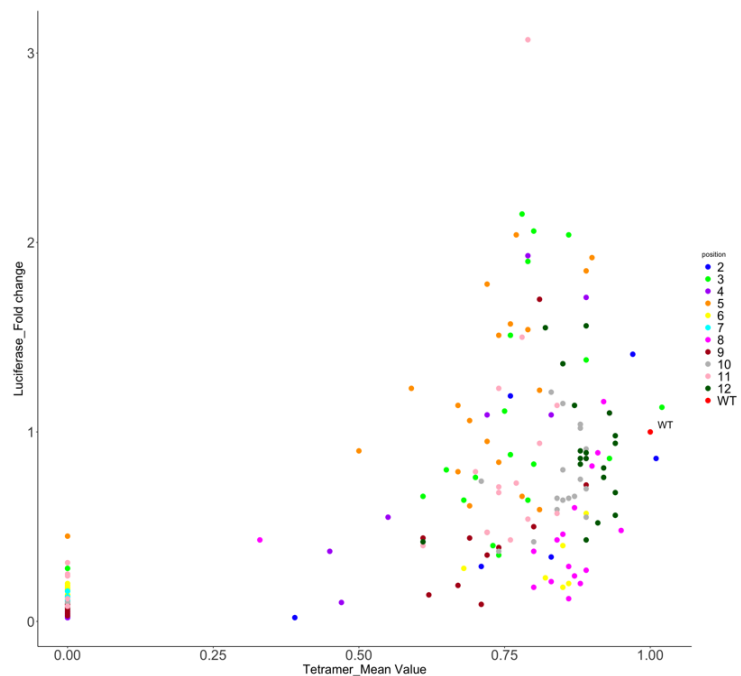


図 4: 活性と結合力の散布図

次に、この TCR の立体構造予測を行った(図 5)。TCR の CDR3 領域のうち、中心部に近い位置のアミノ酸はエピートープとの距離も近くなると報告されており<sup>2</sup>、実際の予測でも CDR3 $\beta$ において、中心部に近い位置のアミノ酸、特に G7 でエピートープと最も接近していた。グリシンは側鎖が水素(-H)のみで最も小さく、唯一の不斉炭素原子をもたないアミノ酸である。このグリシンを他のアミノ酸へ置換することで、側鎖が大きくなってしまう。それにより、側鎖が epitope と衝突してしまうことで、pMHC と TCR が結合できなくなってしまったのではないかと考えられた。

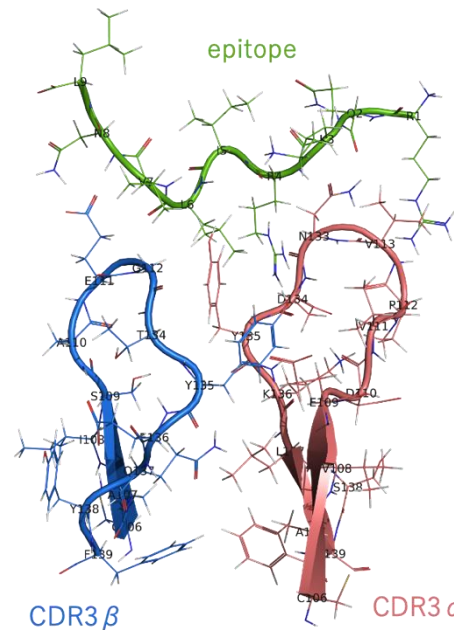


図 5: pMHC-TCR の立体構造予測

#### 4. 考察

TCRV $\beta$  の CDR3 領域のうち、エピートープとの距離も近くなる G7 を置換した場合には全てアミノ酸置換で活性・および結合力の低下を認めた。しかし、中心部から少し離れた位置でのアミノ酸置換によって、活性の上昇を認めた。一般的に機能的活性は、pMHC との結合親和性と相関することが多いが、必ずしも相関はしないこともある。そのような場合には、生理的関連性は特に機能的活性の方が高いと言われている<sup>7</sup>。今回でも、Wlid type と比較して、結合親和性がやや低下したものの、機能的活性が上昇したアミノ酸を特定できた。そのようなアミノ酸置換に注目することで、細胞傷害活性の高い最適な改変 TCR を特定できる可能性がある。今回、CDR3 $\beta$  のアミノ酸置換を行ったが、他の CDR 領域の改変や、それらの組み合わせもある。今回得られたデータを元に、システム解析分野と連携し、最適な TCR を今後予測していく予定である。また、本実験では、一過性に TCR を Jurkat 細胞に発現させた実験のため、TCR の導入効率による発現量の違いに制限がある。今後、TCR を安定発現させて Jurkat 細胞での検討が必要である。

最後に、本助成により貴重な研究機会をいただき、関係各所の方々には、ご支援とご協力いただき、この場を借りて、心から感謝を申し上げます。

5. 文献

- (1) Rapoport, Stadtmauer, Binder-Scholl et al. NY-ESO-1-Specific TCR-Engineered T Cells Mediate Sustained Antigen-Specific Antitumor Effects in Myeloma. *Nat. Med.* **2015**, *21* (8), 914–921.
- (2) Luu, Leistico, Miller et al. Predicting TCR-Epitope Binding Specificity Using Deep Metric Learning and Multimodal Learning. *Genes* **2021**, *12* (4), 572.
- (3) Sidhom, Larman, Pardoll et al. DeepTCR Is a Deep Learning Framework for Revealing Sequence Concepts within T-Cell Repertoires. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1605.
- (4) Komuro, Shinohara, Fukushima et al. Single-Cell Sequencing on CD8+ TILs Revealed the Nature of Exhausted T Cells Recognizing Neoantigen and Cancer/Testis Antigen in Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Immunother. Cancer* **2023**, *11* (8), e007180.
- (5) Jumper, Evans, Pritzel et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589.
- (6) Yin, Ribeiro-Filho, Lin et al. TCRmodel2: High-Resolution Modeling of T Cell Receptor Recognition Using Deep Learning. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (W1), W569–W576.
- (7) Vazquez-Lombardi, Jung, Schlatter et al. High-Throughput T Cell Receptor Engineering by Functional Screening Identifies Candidates with Enhanced Potency and Specificity. *Immunity* **2022**, *55* (10), 1953–1966.e10.

6. 論文発表

本研究の内容について、第 40 回日本呼吸器外科学会学術集会および第 64 回日本肺癌学会学術集会で発表した。