

ファージディスプレイを利用した、
がん抗原特異的高親和性 T 細胞受容体の取得

愛知県がんセンター研究所
腫瘍免疫学部・部長
葛島清隆

要旨

将来の免疫療法に資する高親和性の T 細胞抗原受容体(T cell receptor, TCR)を得るために、ファージディスプレイの実験系を確立した。すなわち、HLA-A*02:01 拘束性にヒト免疫不全ウイルスの Tax 蛋白上のペプチドを認識する CTL クローン A6 の TCR を表出するファージミッドを、pUC119 ベクターをベースに合成 DNA との組換え操作により作製した。このファージミッドから産生されるファージ粒子は、リコンビナント HLA-A2/エピトープペプチドを抗原とする ELISA 法にて、Tax ペプチドを内包する HLA-A2 分子に特異的な結合を示した。

一方、ヒト細胞表面に発現した TCR 遺伝子産物を簡便に解析するツールとして、293T 細胞に CD3 分子を安定的に導入した細胞を作製し、その有用性を確認した。今後は、本研究室で保有する HLA-A*24:02 拘束性 CTL クローンから単離した TCR 等から高親和性の変異体を取得する予定である。

1. 研究の背景・目的

がん細胞を特異的に排除する細胞傷害性 T リンパ球(cytotoxic T lymphocyte, 以下 CTL と略す)を体外で増幅し、がん患者体内に経静脈的に戻す免疫細胞療法は、かつて有効性が期待されたが、投与早期に体内で CTL が死滅してしまうことが課題として残っていた。特定のがん抗原エピトープに特異的な CTL クローンから単離した T 細胞抗原受容体(T cell receptor, 以下 TCR と略す)遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて、体外で培養した患者末梢血リンパ球に導入することで、同じ抗原特異性をもった CTL 集団を大量に得ることが可能である¹⁾。このようにして作製された CTL は試験管内での分裂回数が比較的少ないため、患者に投与後も長期間残存して抗がん活性を維持できることが明らかになってきた。米国では既に、がん抗原である NY-ESO-1, Mart-1 等に特異的な CTL クローンから単離した TCR 遺伝子を用いた遺伝子免疫細胞療法を臨床応用し、末期がんが完全寛解するなど、一部の症例で劇的な効果が報告されている²⁾。

上記のような TCR 遺伝子導入 T 細胞療法において成功の鍵となるのは、標的の HLA/ペプチド複合体への親和性(結合力)が高く、かつ特異性の高い(正常細胞に結合しない)TCR を使用することである。これを最も端的に示している例が、上記の NY-ESO-1 蛋白に特異的な TCR 遺伝子導入 T 細胞療法における治療の成功である。この臨床試験では、滑膜肉腫、悪性黒色種、骨髄腫などに高い有効性と安全性が示されたが、使用された TCR は α 鎖 CDR3 の一部を改変した高親和性の変異株であった。この有益な変異はファージディスプレイ法によって発見されたものである³⁾。ファージディスプレイ法は、高親和性 TCR 単離の方法として最も効果の高い技術である⁴⁾。本研究では、本邦で未だ実施されたことのない、ヒト TCR のファージディスプレイ実験法を確立し、将来の免疫療法に資する高性能の TCR を取得する基盤を整備することを目的とした。

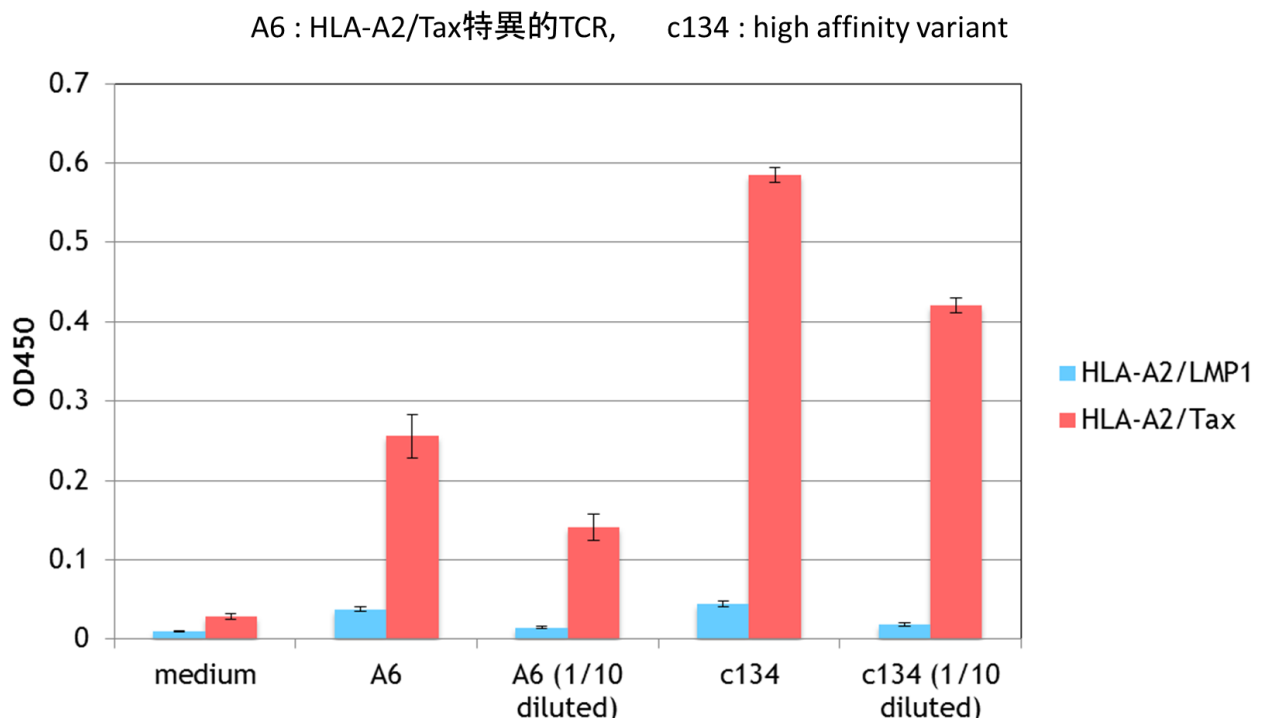
2. 方法と結果

(1)ファージディスプレイ法の確立:

ファージディスプレイ法を用いて TCR の親和性成熟を行った研究報告は極めて少なく、英国の一グループからのみである^{3,4)}。このため、我々の構築した TCR 発現ファージミッドが機能するのか、実験条件は適切か等を判断するために、内部コントロールとなり得る試料を用いた予備実

験が必要である。この目的で、このグループがファージディスプレイ法で親和性改良に成功した HLA-A*02:01 拘束性ヒト免疫不全ウイルス Tax 蛋白特異的 CTL クローン A6 の TCR を用いた実験を実施した。A6 の遺伝子配列情報を国外の研究者から入手して遺伝子合成した。野生型 A6 および文献³⁾においてファージディスプレイ法で得られた高親和性クローン c134 (TCR β 鎖 CDR3 領域のアミノ酸4個が変異)それぞれを発現するファージミッドからファージ粒子を作製し、ファージ ELISA 法を用いて我々が作製した系の検証を行った。実験の結果を図1に示す。ここでは、ストレプトアビジンがコートされたプレートに、ビオチン付加 HLA-A2/Tax (コントロール抗原として HLA-A2/EBV-LMP1 を使用) を結合させた後、作製したファージを反応させた。検出は抗 Fd ファージ・ウサギ抗体で行った。A6 および c134、それぞれの親和性に相応した抗原への特異的結合を示す結果が得られた。

図1 : TCRを表面に提示するファージをサンプルとしたELISA結果



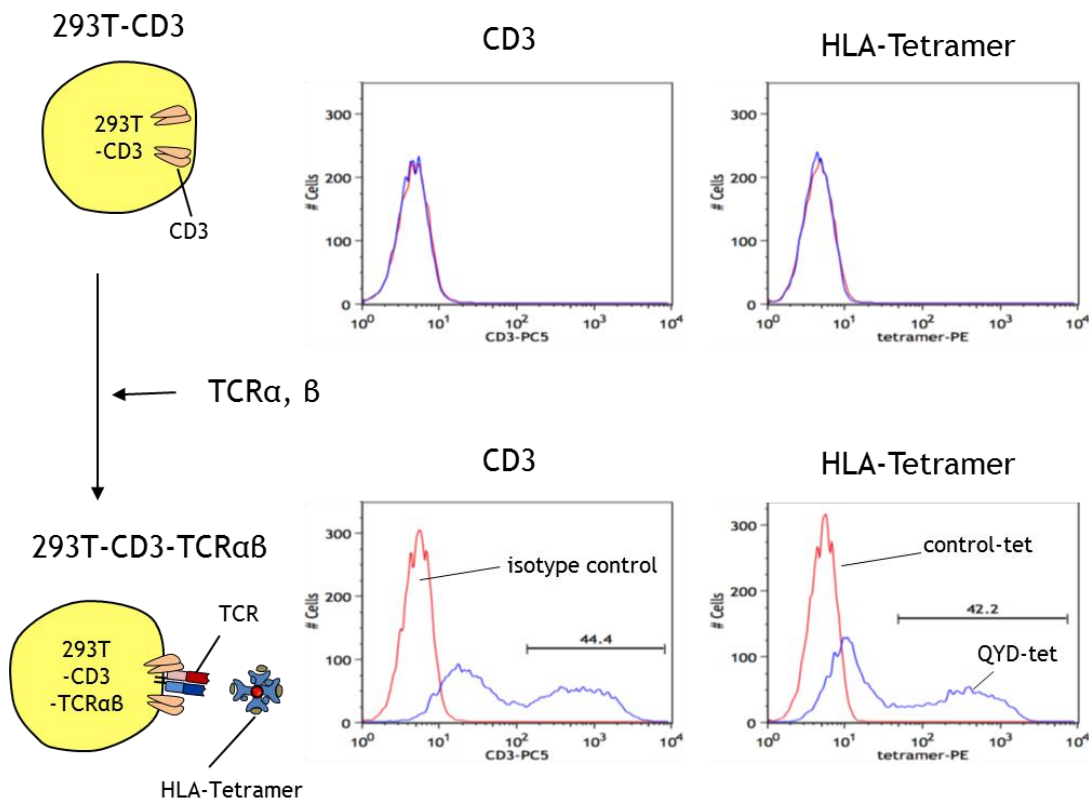
次に、野生型 A6 の TCR β 鎖 CDR3 領域の当該アミノ酸部位にオーバーラッピング PCR を用いてランダム変異を導入し、TG1 大腸菌へ電気穿孔法で PCR 産物を導入してライブラリーを

作製した。このライブラリーを用いて得られたファージ集団から、ビオチン化 HLA-A2/Tax ペプチド複合体とstreptavidin磁気ビーズを用いたパニング法で、高親和性クローンを濃縮・回収し、その変異部位を DNA シーケンス解析したところ、高親和性クローンの c134 に類似したアミノ酸配列パターンが多く認められた。すなわち、高親和性 TCR を取得するための一連の実験系が作動していることが確認された。

(2) CD3 発現 293T 細胞を用いた TCR 解析:

TCR が細胞表面に発現するには、4個の CD3 サブユニットが必要である。このため、単離した TCR 遺伝子の発現を検証・解析する際には、通常、ヒト末梢血 Tリンパ球にレトロウイルス等で導入することが多い。今後多数の変異 TCR クローンを解析する必要が予測されるので、簡易な方法を開発した。すなわち遺伝子導入が容易な 293T 細胞に CD3 の4個のサブユニットを導入した 293T-CD3 細胞を作製した。pcDNA ベクターに組込んだ HLA-A*24:02 拘束性ヒト CMV 特異的 TCR α 鎖と β 鎖を遺伝子導入すると、細胞表面に CD3 および HLA-A24/CMV テトラマーで染色される TCR 複合体が表出した(図2)。

図2: CD3を導入した293T細胞上でのTCRの発現



3. 倫理的配慮

(1)本研究計画は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示、平成 25 年 2 月 8 日に全部改正、同年 4 月 1 日施行)、および、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 27 年 4 月 1 日施行)に基づいて必要な書類を作成し、愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において承認を受けた上で実施した。

(2)ファージディスプレイおよびリコンビナント蛋白作製に必要な組換え DNA 実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)に基づき、愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会において承認を受けた。

4. 考察と結論

HLA-A*02:01 拘束性にヒト免疫不全ウイルスの Tax 蛋白上のペプチドを認識する CTL クローン A6 の TCR を表出するファージミッドを用いて、ファージディスプレイの実験系を確立した。将来の免疫療法に資する高親和性の T 細胞抗原受容体(T cell receptor, TCR)を得るために、今後は、本研究室が保有する3個の TCR を用いた本実験に進む予定である。これらはいずれも HLA-A*24:02 拘束性 CTL クローンから得られたもので、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)pp65 蛋白⁵⁾、がん抗原 Ep-CAM⁶⁾、hTERT⁷⁾の順に野生株の TCR 親和性が高い。野生型 TCR の親和性が高いほど、変異クローンが取り易くなると考えられるため、この順でファージディスプレイを実施する予定である。

また、ヒト細胞表面に発現した TCR 遺伝子産物を簡便に解析するツールとして、293T 細胞に CD3 分子を安定的に導入した細胞を作製し、その有用性を確認した。目的の変異 TCR が取得された際には、それらの遺伝子をこの細胞に導入した後、段階希釈した HLA-テトラマーで染色することで、親和性の増強および特異性について解析できると考えられる。

5. 文献

- 1) Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood*, 121(24):4894-901, 2013.
- 2) Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. NY-ES O-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med*, 21(8):914-21, 2015.
- 3) Li Y, Moysey R, Molloy PE, Vuidepot AL, Mahon T, Baston E, Dunn S, Liddy N, Jacob J, Jakobsen BK, Boulter JM. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nat Biotechnol*, 23(3):349-54, 2005.
- 4) Dunn SM, Rizkallah PJ, Baston E, Mahon T, Cameron B, Moysey R, Gao F, Sami M, Boulter J, Li Y, Jakobsen BK. Directed evolution of human T cell receptor CDR2 residues by phage display dramatically enhances affinity for cognate peptide-MHC without increasing apparent cross-reactivity. *Protein Sci*, 15(4):710-21, 2006.
- 5) Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, Tsurumi T. Efficient identification of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood*, 8:1872-1881, 2001
- 6) Tajima K, Demachi A, Ito Y, Nishida K, Akatsuka Y, Tsujimura K, Kuw

- ano H, Mitsudomi T, Takahashi T, Kuzushima K. Identification of an epitope from the epithelial cell adhesion molecule eliciting HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses. *Tissue Antigens*, 64:650-659, 2004.
- 7) Tajima K, Ito Y, Demachi A, Nishida K, Akatsuka Y, Tsujimura K, Hida T, Morishima Y, Kuwano H, Mitsudomi T, Takahashi T, Kuzushima K. Interferon-gamma differentially regulates susceptibility of lung cancer cells to telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer*, 110:403-412, 2004.