

氏名 したおかきよみ 下岡 清美

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 254 号

学位授与年月日 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目 腫瘍浸潤 T リンパ球の単一細胞レパートリー解析による
キラー活性を有する腫瘍抗原特異的 TCR の同定

論文審査委員

(主査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	西田 尚樹
(副査)	教授	清水 忠道
(副査)	教授	齋藤 滋
(指導教員)	教授	北島 勲

論文内容の要旨

【目的】

がん患者の腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) の単一 T 細胞のレパートリー解析により、TIL 中にクローナルな T 細胞集団を見出している。しかしながら、これらの T 細胞の T 細胞受容体 (T cell Receptor, TCR) が、がん特異的であるかどうかは検証されていない。本研究は、メラノーマのマウスモデルを用いて、TIL、リンパ節、脾臓の T リンパ球のレパートリー解析を行い、TIL でクローナルに増殖している TCR を用いて *in vitro* および *in vivo* の抗腫瘍効果を検証することを目的とした。

【方法並びに成績】

富山大学医学部免疫学講座が開発した「単一 T 細胞から TCR 遺伝子を迅速に取得する技術」を応用し、B16F10 メラノーマ細胞を移植したマウスの TIL、リンパ節、脾臓の T 細胞の TCR レパートリーを解析した。さらに、取得した TIL 由来の TCR を発現させた脾臓 T 細胞を用いて、腫瘍細胞に対する反応性や、*in vitro* でのがん細胞傷害活性、および *in vivo* での抗腫瘍効果を検証し、以下の実験結果を得た。

① B16F10 メラノーマ担癌マウスにおける、TIL、所属リンパ節 (RLN)、脾臓の T 細胞の TCR β レパートリーの解析：マウスメラノーマ担癌マウスの CD8⁺CD137⁺ の TIL 中には、同一の TCR を持つクローナルな細胞集団が多数観察されたが、担癌マウスの RLN や脾臓において CD137⁺ または CD137⁻ の T 細胞では、クローナルな集団はほとんど観察されなかった。TIL 中では、約 6 割の T 細胞がクローナルな増殖を示す T 細胞集団に属していた。これらの結果は、腫瘍内で腫瘍特異的 T 細胞が腫瘍細胞に応答してクローナルに増殖した可能性を示唆している。

② TIL 由来 TCR 遺伝子を導入した T 細胞の B16F10 細胞反応性 (IFN- γ 分泌)：クローナルな増殖を示す T 細胞の TCR について、その腫瘍反応性を評価するために、6 匹のマウスから合わせて 13 種類の TCR を選択し、TCR α 鎖及び β 鎖を含む発現ベクターを作製し、マウス脾臓 T 細胞に発現させた。B16F10 細胞と TCR 発現 T (TCR-T) 細胞を共培養し、IFN- γ の分泌を ELISA で測定した。その結果、13 種類のうち 9 種類の TCR が B16F10 細胞に対し反応した。これらの結果より、TIL 由来のクローナルな増殖を示す T 細胞には、B16F10 細胞に対して反応性を示すものが存在することが示された。

③ TIL 由来 TCR 遺伝子導入 T 細胞の B16F10 細胞に対する *in vitro* での細胞傷害活性：13 種類の TIL 由来 TCR-T 細胞を用いて、ルシフェラーゼを発現させた B16F10 (B16F10-Luc) 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。細胞傷害活性は、細胞の生存率をルシフェラーゼ活性で測定することで評価した。TIL 由来 TCR-T 細胞のうち B16F10 細胞に反応し、IFN- γ 分泌が誘導された 9 種類は、B16F10-Luc 細胞に対して細胞傷害活性を示した。一方で、IFN- γ 分泌が認められなかった TCR-T 細胞は、B16F10-Luc 細胞に対して細胞傷害性を示さなかった。

④ TIL 由来 TCR-T 細胞の *in vivo* における抗腫瘍効果：TIL 由来 TCR-T 細胞で B16F10 細胞

に反応し、IFN- γ 分泌および細胞傷害性を強く誘導した、TCR4-3および6-1を用いて、TIL由来TCR-T細胞の*in vivo*における抗腫瘍効果を評価した。B16F10-Luc細胞をC57BL/6マウスの静脈内(i.v.)に投与し、翌日に4-3、6-1、及びコントロールTCRを発現したTCR-T細胞をi.v.投与した。その後、3日後に発光測定イメージングシステム(IVIS)を用いて肺の転移巣を分析した。コントロール群では、多数のB16F10_Luc細胞の肺転移が観察された。それに対し、4-3あるいは6-1のTCR-T細胞を投与した場合、肺転移は強く阻害された。これらのデータにより、TIL由来TCR-T細胞が、*in vivo*でも抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

⑤他のがん細胞株に対する反応性：TIL由来TCR-T細胞がC57BL/6マウス由来のB16F10細胞以外のがん細胞株および正常細胞に対して反応性を示すか評価した。TCR-T細胞を、メラノーマ(B16F0)、リンパ腫(EL4)、結腸癌由来細胞(MC38)、および正常マウス線維芽細胞(MEF)と共培養し、IFN- γ 分泌により反応性を評価した。4-3、6-1のTCR-T細胞は、B16F0細胞のみならず、EL4細胞にも反応しIFN- γ を分泌した。しかし、MC38細胞、MEF細胞には反応しなかった。B16F0細胞に反応する9種類のTCRのうち4-3、6-1を除く7種類は、B16F0細胞に反応するものもあったが、EL4、MC38、MEF細胞には反応しなかった。この結果、取得したTCRは、メラノーマ抗原あるいはメラノーマ、リンパ腫共通抗原を認識するTCRであることが示唆された。

⑥TIL由来TCRのC57BL/6マウス内在性白血病ウイルス由来ペプチドに対する反応性：TIL由来TCRがマウスMHC分子のH-2K^b分子に提示されたペプチドを認識することが予備実験にて示唆されていた。そこで、B16F10細胞で発現が確認されており、そのペプチドがH-2K^b分子に提示されることがわかっている、内因性マウス白血病ウイルス由来のMuLV p15E抗原とチロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP2) 由来ペプチドに反応するか評価した。TRP2p/H-2K^bテトラマーはいずれのTIL由来TCRにも結合しなかったが、p15Ep/H-2K^bテトラマーは、9種類のTCRのうち4-3、6-1を除く、7種類のTCRに結合した。p15Eペプチドをパルスした抗原提示細胞と7種類のTCR-T細胞を共培養することで、IFN- γ の産生が確認された。p15Eは強力な免疫原性を示し、B16F10細胞で高発現し、正常組織ではほとんど検出できないレベルでしか発現していないため、がん抗原としてTILを活性化したと考えられる。

【総括】

B16F10 メラノーマ細胞を移植した6匹のマウスのTILより、クローナルな増殖を示すT細胞の13種類のTCRを選択し、機能解析を行った。その結果、9種類がB16F10細胞に対する細胞傷害活性を示し、7種類は、p15E抗原を認識し、2種類はがん関連抗原を認識した。*in vivo*での評価でも、B16F10メラノーマの肺転移を抑制することが観察された。結論として、TILの単一T細胞解析は、MHCハプロタイプおよび抗原に関わらず、がん特異的なT細胞を同定し、腫瘍増殖に対して阻害効果を発揮する腫瘍特異的TCRを取得することが可能である。単一T細胞解析を用いて、がん患者の個別医療が加速することが期待される。

学位論文審査の要旨

【研究背景と目的】

近年、がん細胞免疫療法として注目されている TCR-T 細胞療法には、個々の患者のがんに特異的な TCR 遺伝子が必要となる。その有望な遺伝子源としてがん浸潤リンパ球 (TIL) が注目されている。TIL 中には、がんの特異的 T リンパ球が存在することが報告され、これまで多くのがん抗原が TIL の T 細胞を用いて同定されてきた。さらに、抑制分子である PD-1、あるいは、活性化マーカーである CD137 (4-1BB) 陽性の TIL は、がん・精巣抗原やネオ抗原に反応し、抗腫瘍効果を示すことも報告されている。したがって、TIL は、TCR-T 細胞療法に用いるがん特異的 TCR 遺伝子を取得するための有望な臨床材料と考えられる。本研究は、メラノーマのマウスモデルを用いて、がん浸潤リンパ球 (TIL)、リンパ節、脾臓の T リンパ球のレパトリー解析を行い、TIL でクローナルに増殖している TCR を用いて *in vitro* および *in vivo* の抗腫瘍効果を検証することを目的とする。

【方法と結果】

- ① B16F10メラノーマ担癌マウスにおける、TIL、所属リンパ節 (RLN)、脾臓の T 細胞の TCR β レパトリーの解析：マウスメラノーマ担癌マウスの CD8⁺CD137⁺ の TIL 中には、同一の TCR を持つクローナルな細胞集団が多数観察されたが、担癌マウスの RLN や脾臓において CD137⁺ または CD137⁻ の T 細胞では、クローナルな集団はほとんど観察されなかった。TIL 中では、約 6 割の T 細胞がクローナルな増殖を示す T 細胞集団に属していた。これらの結果は、腫瘍内で腫瘍特異的 T 細胞が腫瘍細胞に応答してクローナルに増殖した可能性を示唆する。
- ② TIL 由来 TCR 遺伝子を導入した T 細胞の B16F10 細胞反応性 (IFN- γ 分泌)：クローナルな増殖を示す T 細胞の TCR について、その腫瘍反応性を評価するために、6 匹のマウスから合わせて 13 種類の TCR を選択し、TCR α 鎖及び β 鎖を含む発現ベクターを作製し、マウス脾臓 T 細胞に発現させた。B16F10 細胞と TCR 発現 T (TCR-T) 細胞を共培養し、IFN- γ の分泌を ELISA で測定した。その結果、13 種類のうち 9 種類の TCR が B16F10 細胞に対し反応した。これらの結果より、TIL 由来のクローナルな増殖を示す T 細胞には、B16F10 細胞に対して反応性を示すものが存在することが示された。
- ③ TIL 由来 TCR 遺伝子導入 T 細胞の B16F10 細胞に対する *in vitro* での細胞傷害活性：13 種類の TIL 由来 TCR-T 細胞を用いて、ルシフェラーゼを発現させた B16F10 (B16F10-Luc) 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。細胞傷害活性は、細胞の生存率をルシフェラーゼ活性で測定することで評価した。TIL 由来 TCR-T 細胞のうち B16F10 細胞に反応し、IFN- γ 分泌が誘導された 9 種類は、B16F10-Luc 細胞に対して細胞傷害活性を示した。一方で、IFN- γ 分泌が認められなかった TCR-T 細胞は、B16F10-Luc 細胞に対して細胞傷害性を示さなかった。
- ④ TIL 由来 TCR-T 細胞の *in vivo* における抗腫瘍効果：TIL 由来 TCR-T 細胞で B16F10 細胞に反応し、IFN- γ 分泌および細胞傷害性を強く誘導した、TCR4-3 および 6-1 を用いて、TIL 由来 TCR-T 細胞の *in vivo* における抗腫瘍効果を評価した。B16F10-Luc 細胞を C57BL/6 マウスの静脈内 (i.v.) に投与し、翌日に 4-3、6-1、及びコントロール TCR を発現した TCR-T 細胞を i.v. 投与した。その後、3 日後に発光測定イメージングシステム (IVIS) を用いて肺の転移巣を分析した。コントロール群では、多数の B16F10-Luc 細胞の肺転移が観察された。それに対し、4-3 あるいは 6-1 の TCR-T 細胞を投与した場合、肺転移は強く阻害された。これらのデータにより、TIL 由

来TCR-T細胞が、*in vivo*でも抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

⑤他のがん細胞株に対する反応性：TIL由来TCR-T細胞がC57BL/6マウス由来のB16F10細胞以外のがん細胞株および正常細胞に対して反応性を示すか評価した。TCR-T細胞を、メラノーマ (B16F0)、リンパ腫 (EL4)、結腸癌由来細胞 (MC38)、および正常マウス線維芽細胞 (MEF) と共培養し、IFN- γ 分泌により反応性を評価した。4-3、6-1のTCR-T細胞は、B16F0細胞のみならず、EL4細胞にも反応しIFN- γ を分泌した。しかし、MC38細胞、MEF細胞には反応しなかった。B16F10細胞に反応する9種類のTCRのうち4-3、6-1を除く7種類は、B16F0細胞に反応するものもあったが、EL4、MC38、MEF細胞には反応しなかった。この結果、取得したTCRは、メラノーマ抗原あるいはメラノーマ、リンパ腫共通抗原を認識するTCRであることが示唆された。

⑥TIL由来TCRのC57BL/6マウス内在性白血病ウイルス由来ペプチドに対する反応性：TIL由来TCRがマウスMHC分子のH-2K^b分子に提示されたペプチドを認識することが予備実験にて示唆されていたため、B16F10細胞で発現が確認されており、そのペプチドがH-2K^b分子に提示されることがわかっている、内因性マウス白血病ウイルス由来のMuLV p15E抗原とチロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP2) 由来ペプチドに反応するか評価した。TRP2p/H-2K^bテトラマーはいずれのTIL由来TCRにも結合しなかったが、p15Ep/H-2K^bテトラマーは、9種類のTCRのうち4-3、6-1を除く、7種類のTCRに結合した。p15Eペプチドをパルスした抗原提示細胞と7種類のTCR-T細胞を共培養することで、IFN- γ の産生が確認された。p15Eは強力な免疫原性を示し、B16F10細胞で高発現し、正常組織ではほとんど検出できないレベルでしか発現していないため、がん抗原としてTILを活性化したと考えられる。

【総括】下岡 清美君は、B16F10メラノーマ細胞を移植した6匹のマウスのTILよりクローナルな増殖を示すT細胞から13種類のTCRを選択し、TCRの機能評価を行った。その結果、*in vitro*の評価系で、9種類がB16F10細胞に対する細胞傷害活性を示し、その中の7種類はp15E抗原を、2種類はがん関連抗原を認識することを示した。*in vivo*での評価系でも、2種類がB16F10メラノーマの肺転移を強く抑制することを示し、結論として、TILの単一T細胞解析により、MHCハプロタイプおよび抗原に拘束されないで、腫瘍増殖に対して阻害効果を発揮する腫瘍特異的TCRを取得することが可能であることを立証した。本研究により、単一T細胞解析によるがんの個別医療が大きく加速することが期待される。研究は綿密に計画され再現性ある実験が行なわれ、新規性にも優れ、学術的にも高い水準で、また、臨床的にも極めて重要な知見を得ているもので、本審査委員会は本研究が博士（医学）に充分値すると判断した。