

氏名 やまぐち さとし
山口 智史

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 359 号

学位授与年月日 令和 3 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

Comprehensive analysis of TCR function using a novel system
reveals the multiple unconventional tumor-reactive T cells in
breast cancer-infiltrating lymphocytes
(T細胞受容体の網羅的機能解析法の開発と乳癌腫瘍浸潤
リンパ球中の非典型的T細胞の発見)

論文審査委員

(主査)	教授	清水 忠道
(副査)	教授	笹原 正清
(副査)	教授	森永 芳智
(副査)	教授	齋藤 淳一
(指導教員)	教授	戸邊 一之

論 文 要 旨

論 文 題 目

**Comprehensive analysis of TCR function using a novel system
reveals the multiple unconventional tumor-reactive T cells in
breast cancer-infiltrating lymphocytes**

T細胞受容体の網羅的機能解析法の開発と
乳癌腫瘍浸潤リンパ球中の非典型的T細胞の発見

氏 名 山口 智史

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

〔目的〕

T cell receptor (TCR)-T cell therapy is drawing attention as a promising next-generation immunological cancer therapy. To achieve a significant therapeutic effect in TCR-T cell therapy, highly functional tumor-specific TCRs are prerequisite. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a potent source for obtaining tumor-reactive TCRs. Although comprehensive methods to analyze the TCR repertoire in TILs have been reported, tumor-reactivity of TCRs in TILs has not been comprehensively analyzed. The function of only five to ten TCR clones from fifty to thousands of obtained TCRs have been conventionally analyzed to obtain tumor-reactive TCRs. This is because examination of dual TCR α - or β -expression in a single T cell and their functional combination, preparation of TCR-expression vectors and their assessment of DNA sequences is extremely complicated and laborious. The aim of this study is to develop the method for comprehensive analysis of the tumor-reactivity of TCRs derived from TILs.

〔方法〕

We developed a novel, efficient, and comprehensive evaluation system for TCR-function and designated it c-FIT (comprehensive functional investigation of TCRs). In the c-FIT system, we prepare retroviral TCR-expression vectors without cloning and sequencing. In detail, we insert cDNAs of TCR β and α into retrovirus vector using homologous recombination and connect TCR β , TCR α fragments, and the blasticidin S-resistant gene (Bsr) with a nucleotide sequence encoding self-cleaving 2A peptides. We named the vector TCR-2A-Bsr. The resultant plasmids contained not only functional TCR-expression vectors but also unfunctional ones. We transfect the mixture of functional and unfunctional TCR-expression vectors into a BW5147.3 reporter T cell line, which exhibits strong sensitivity to stimuli from antigen presenting tumor cells. We then culture the transfectants in the presence of blasticidin S to enrich the transfectants with functional TCR-expression vectors, in which TCR β and TCR α fragments are connected to Bsr in frame. We then

coculture TCR-transduced BW5147.3 reporter cells with target cells and assess the reactivity of TCRs to the target cells by analyzing IL-2-secretion with ELISA. When analyzing the cytotoxicity-inducibility of TCRs, we transfect TCR-expression vector into peripheral blood T cells and coculture them with target cells expressing luciferase, whose activity corresponds to live cell number.


〔成績〕

To assess the c-FIT system using clinical samples, we single cell-sorted PD-1⁺ CD137⁺ CD8⁺ TILs of two breast cancer patients, analyzed the TCR repertoire and amplified the clones of TCR β and TCR α cDNA. We then prepared the bulk TCR-2A-Bsr vector for each TIL clone, retrovirally transferred the vectors into BW5147.3 reporter cells expressing human CD8 $\alpha\beta$ and cultured them in the presence of blasticidin S. As target cells, we used breast cancer cell lines (MCF7) in which the patient's HLA molecules were exogenously expressed. We analyzed 70 TCRs obtained from CD8⁺ TILs of two breast cancer patients and found 23 TCRs that reacted to a breast tumor cell line. Surprisingly, two TCRs were patient's HLA class I-restricted and conventional TCRs, while the remaining 21 TCRs were non-HLA-restricted unconventional TCRs. Representative two obtained TCRs responded and killed MCF7 cells when expressed on human peripheral blood T cells.

〔総括〕

We established a novel method, c-FIT, that is suitable for comprehensive assays for the function of TCRs. c-FIT does not require cloning and verification of TCR-expression vectors or the troublesome dual expression of TCR α or β in a single T cell. Furthermore, the c-FIT protocol uses BW5147.3 reporter cells, the most sensitive reporter mouse T cell line, for the functional assay. c-FIT system enables us to analyze up to 90 TCRs for their reactivity to tumor cells by a single assay within a month. c-FIT can be applied for monitoring multiple conventional and unconventional antigen-specific killer T cells in TILs, leading to the development of new designs for more effective T-cell-based immunotherapies.

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号	氏 名	山口 智史
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	清水 忠道	
	(副査) 教授	笹原 正清	
	(副査) 教授	森永 芳智	
(副査) 教授	齋藤 淳一		
指導 (紹介) 教員	教授	戸邊 一之	
(論文題目) Comprehensive analysis of TCR function using a novel system reveals the multiple unconventional tumor-reactive T cells in breast cancer-infiltrating lymphocytes (T細胞受容体の網羅的機能解析法の開発と乳癌腫瘍浸潤リンパ球中の非典型的T細胞の発見)			(判定) 合格
(論文審査の要旨) 【目的】 T細胞受容体 (T cell receptor; TCR) -T細胞療法は、次世代の癌免疫療法として注目されている。TCR-T細胞療法を行う上で、高機能な腫瘍抗原特異的なTCRの同定が重要である。腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TIL) のTCRレパトアの中から、腫瘍反応性TCRが得られることが報告されている。TILのTCRレパトアについて、次世代シーケンサを用いた解析や単一細胞解析により大量のTCRレパトア (100~数万種類) の情報が得られる。しかし、同定したTCRの機能を網羅的に解析する方法は報告されておらず、同定したTCRの一部 (10種類程度) の機能しか解析されていなかった。本研究では、高機能な腫瘍反応性TCRを同定するために、90種類のTCRの腫瘍反応性を網羅的に解析できる方法を開発し、開発した方法を臨床材料に応用しその有用性を実証することを目的とした。			
【方法】 従来は、TCR発現ベクターをクローニングし、それを末梢血T細胞に遺伝子導入し、TCRの機能を解析していた。そのために以下の解析が必要であった。① 1個のT細胞で2種類のTCR α 鎖、あるいは β 鎖が発現していることがあるため、全てのTCR α 鎖、 β 鎖のクローニング。② クローニングされた α 鎖、 β 鎖の全ての組み合わせのTCR発現ベクターの作製。また通常のT細胞株に、腫瘍反応性TCRを発現させても、感度が低く反応しない。そのため、③ 作製したTCRの腫瘍細胞に対する反応性解析するために、作製したTCR発現ベクターを末梢血T細胞へ遺伝子導入し、反応性を解析する必要があった。これらの工程が複雑で、時間と労力を要した。			
《網羅的なTCR機能評価法、c-FIT (comprehensive functional investigation of TCRs) 法の樹立》 c-FIT法における改善点は以下のとおりである。① 増幅したTCR α 鎖および β 鎖のcDNAのクローニングを行わず、増幅したcDNA混合物を相同組換え法を用いて発現ベクターに組み込むようにした。② TCR α 鎖、 β 鎖およびブラストサイジンS耐性遺伝子 (Bsr)を、自己切断型2Aペプチドをコードする塩基配列で接続した。③ 高反応性のT細胞株BW-hCD8 α β ⁺ 細胞			

hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞を作製した。④BW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞に作製したTCR発現ベクターの混合物を遺伝子導入し、ブラストサイジンS存在下で培養した。⑤ TCR発現BW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞を標的腫瘍細胞と共培養し、IL-2分泌を指標に腫瘍反応性TCRを同定した。

《c-FIT法を用いた乳癌患者TILに発現したTCRの網羅的解析》

2名の乳癌患者のTILよりCD137⁺ PD-1⁺ CD8⁺ T細胞を90個ずつ単一細胞ソートし、単一T細胞よりTCR α 鎖および β 鎖を増幅した。増幅したTCR $\alpha\beta$ の腫瘍反応性をc-FIT法を用いて解析した。患者乳癌細胞株が樹立できなかつたため、標的細胞として患者のHLA分子を発現させた既存の乳癌細胞株、MCF7を用いた。同定した腫瘍反応性TCRについては、末梢血T細胞に遺伝子導入し、IFN- γ 産生および細胞傷害活性を検証した。

【成績】

《c-FIT法の検証》① 既存のTCRの α 鎖および β 鎖を遺伝子増幅し、c-FIT法に従い、BW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞に遺伝子導入し、ブラストサイジンS存在下で培養した。その結果、TCRを発現した細胞が濃縮されることが示された。② 単一細胞ソートした90個の末梢血T細胞よりTCR α 鎖および β 鎖を遺伝子増幅し、c-FIT法に従い、24個のTCRをBW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞に遺伝子導入し、ブラストサイジンS存在下で培養した。その結果、22個のTCR発現 BW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞を作製することができた。以上より、c-FIT法を用いて、迅速・簡便に大量のTCRの発現T細胞株が作製できることがわかった。

《c-FIT法を用いた乳癌TIL TCRの解析》

次に臨床検体へc-FIT法を適用するために、2名の乳癌患者の114個のTILに由来するTCRの腫瘍反応性を解析した。BW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞の細胞表面に発現し機能解析できたTCRのクローン数は70で、114種類のTCRのうち61%であった。TCRを発現させたBW-hCD8 $\alpha\beta$ ⁺細胞と患者HLAを発現させたMCF7細胞を共培養し、23個の腫瘍反応性TCRを同定した。そのうち2個は患者HLAを発現させたMCF7に反応する典型的TCR、残りの21個は患者HLAを発現させていないMCF7にも反応する非典型的TCRであった。同定したTCRより典型的TCRと非典型的TCRを各1個選択し末梢血T細胞を用いて解析したところ、それぞれHLA依存的、非依存的にMCF7細胞に反応し、IFN- γ の分泌および腫瘍細胞傷害活性が観察された。

【総括】

山口智史氏は、大量のTCRの機能を網羅的に評価するc-FIT法を樹立した。c-FIT法を用いることで、1人の研究者が90個のTCRの機能を約1か月（約0.01か月/1TCR）で解析することが可能になった。従来は10個程度のTCRの機能を解析するのに2か月程度かかっていた（約0.2か月/1TCR）ため、約20倍効率化できた。c-FIT法を乳癌患者のTCRの機能解析に応用し、70個のTCRを解析し23個の腫瘍反応性TCRを同定することができた。驚いたことに、このうち、21個はHLAに非依存的に機能するTCRであった。

以上、TCR機能について新規c-FIT法を開発し、網羅的にTCRを解析できるようにした点で新規性がある。またc-FIT法は、腫瘍免疫のみならず自己免疫疾患や妊娠免疫に関与するTCRの機能解析にも応用可能であり、幅広く免疫学的機序の解明に貢献しうることから医学における学術的重要性も高い。また、今回取得されたHLA非依存的腫瘍反応性TCRについては、今後、HLA非依存的なTCR-T細胞療法の開発につながり、がんの免疫学的治療法の選択肢を広げることができると考えられる。そのため、臨床的発展性が期待される。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。