

## 学位論文題名

# Establishment of a stable T lymphoma cell line transduced with HLA-A\*24:02-restricted WT1-specific TCR genes and its application to antigen-specific immunomonitoring

(HLA-A\*24:02拘束性WT1特異的TCR遺伝子導入安定発現細胞株の樹立とその免疫モニタリングにおける有用性)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Wilms 腫瘍因子 (WT1) は成長因子などの発現を制御する転写因子で、白血病や種々の固形がんで高発現しており、その発症と進行に関与することが知られている。WT1 を標的としたがん免疫療法は臨床効果が高いことが NIH より報告され、世界的にも注目を集めている。国内においては、日本人で頻度の高い HLA-A\*24:02 (A24) の研究が盛んであるが、A24 拘束性 WT1 天然型エピートープペプチドは、HLA 分子との結合力が非常に弱いことから、HLA 分子との結合力を高め、かつ WT1 特異的な抗腫瘍免疫応答をより強く誘導できる WT1 改変型ペプチドが作出された。WT1 ペプチドを用いたがんワクチンの臨床試験は国内外で数年前から始まっており、体内でワクチンにより活性化され増殖した WT1 特異的な CTL をモニタリングする方法の標準化が課題になっている。モニタリング方法の一つとして IFN- $\gamma$  ELISPOT assay がよく利用されているが、IFN- $\gamma$  は T 細胞に限らず NK 細胞、NKT 細胞などからも産生されるため、必ずしも特異性が高い評価系とはいえない。そこで WT1 特異的 CTL を検出する方法として、HLA-tetramer が注目されている。HLA-tetramer は、人工的に作製した HLA 分子と  $\beta$ 2m 分子、及び特異的なエピートープペプチドを buffer 中で folding させることで 3 者複合体 (monomer) を形成させ、これを 4 量体 (tetramer) 化して CTL の検出感度を高めた試薬である。HLA-tetramer は CTL 細胞膜表面上の TCR の抗原認識機構を模した試薬であり、TCR と直接結合することで、特異的 CTL をフローサイトメトリー (FCM) にて高感度に検出することが可能である。しかし、生体内に存在するがん特異的 CTL の数は非常に少なく、高頻度の場合でも  $10^7$  個の PBMC に 1~2 個程度といわれている。更に HLA-tetramer はその高い特異性のため、反応性を正確に判断するにはクローナルな特異的 TCR を安定的に発現する均質な細胞株が必要であり、このような細胞株が樹立できれば、がん免疫療法における免疫モニタリングの標準化において重要なツールとしても期待できる。そこで本研究では、A24 WT1 特異的 TCR を新規にクローニングし、HLA-tetramer と反応する TCR を安定的に発現する細胞株の樹立を目指した。

【方法と結果】 HLA genotyping 済 A24 保持 donor 由来 PBMC より、A24 WT1 改変型ペプチドを用いて MLPC 法にて A24 WT1 特異的 CTL を誘導した。誘導された CTL line のうち、A24 WT1 改変型および天然型 tetramer の両方に反応する 37F8 CTL line を選択した。autoMACS を用いて tetramer 陽性細胞を単離し、mRNA を抽出して cDNA を合成した。TCR  $\alpha$  鎖は、網羅的に作製した primer を用いて PCR を行った結果、3 種類の

PCR産物が得られた。それらのDNA配列を確認し、最終的に2種類のTCR $\alpha$ 鎖を同定した。TCR $\beta$ 鎖に関しては、市販のレパトア解析キットを用いてFCMにて解析を行った結果、V $\beta$ 5.1を有する事が判明した。そこでTCR V $\beta$ 5.1に対するprimerを設計し、PCRおよびシークエンスにてTCR $\beta$ 鎖の全長配列を同定した。得られた2種類の $\alpha$ 鎖と1種類の $\beta$ 鎖遺伝子をそれぞれ発現ベクターに組み込み、TCR欠損Tリンフォーマ細胞株に遺伝子導入した。次に細胞膜表面上のTCRの発現を確認し、A24 WT1 tetramerを用いて正しいTCR $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の組合せを確定した。さらに薬剤耐性によるクローニングを行い、TCR遺伝子安定発現細胞株(SK37)を樹立した。SK37は、A24 WT1 改変型および天然型 tetramerのいずれにも反応した。さらに本TCRによる細胞傷害活性をクロムリリースアッセイにて確認した。その結果、A24陽性LCL (lymphoblastoid cell lines) にWT1変異型ペプチドをパルスした場合に、非常に強い細胞傷害活性が検出され、WT1天然型ペプチドをパルスしたLCLに対しては、弱い細胞傷害活性が検出された。ペプチドをパルスしない場合およびA24陰性LCLに対しては、細胞傷害活性はほとんど見られなかった。

【考察】 TCRの特異性は、抗原ペプチド特異的な細胞傷害活性やIFN- $\gamma$ 産生などで間接的に評価されてきたが、HLA-tetramerが開発されたことで、TCRの特異性を直接的に評価することが可能となった。本研究において樹立された細胞株SK37は、A24 WT1 改変型および天然型 tetramerのいずれにも反応することから、両者の陽性コントロール細胞として使用できることが証明された。このSK37を用いることで、HLA-tetramerの反応性における品質検定が可能となり、がんワクチン治療の際のHLA-tetramer assayにおける実施者や施設間差の問題を解消し、より精度の高い免疫モニタリングが可能になると考えられる。また、本研究において同定されたTCRの細胞傷害活性は、WT1天然型ペプチドとWT1改変型ペプチドを比較した場合に約4倍の差があった。これは、WT1天然型ペプチドは改変型のペプチドと比較して明らかにHLAとの結合力が弱いことが原因と考えられた。ここで、WT1天然型ペプチドパルスA24陽性LCLに対しても細胞傷害活性が確認されたことから、生体内の生理的条件下においても細胞傷害活性が保持されていることが示唆された。今後、本TCRについては、ヒトリンパ球に遺伝子導入して各種がん細胞などに対する細胞傷害活性の確認を行い、その有用性を拡大して証明する予定である。

【結論】 本研究において、A24 WT1 特異的 CTL line から新規 A24 WT1 特異的 TCR のクローニングに成功するとともに、本 TCR 遺伝子導入安定発現細胞株である SK37 を樹立した。SK37 は A24 WT1 天然型および改変型 tetramer の両方と反応することから、これらの tetramer に関して、反応性による厳密な品質検定が可能になった。SK37 は、今後、がん免疫治療における免疫モニタリングの標準化において重要なツールとなることが期待されている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 清 野 研 一 郎  
副 査 教 授 西 村 孝 司

学位論文題名

## Establishment of a stable T lymphoma cell line transduced with HLA-A\*24:02-restricted WT1-specific TCR genes and its application to antigen-specific immunomonitoring

(HLA-A\*24:02拘束性WT1特異的TCR遺伝子導入安定発現細胞株の樹立とそ  
の免疫モニタリングにおける有用性)

本研究において、申請者は、HLA-tetramer 試薬を用いた精度の高い免疫モニタリングに必要な陽性コントロールに使用できる細胞の樹立に成功した。申請者は、まず、HLA-A\*24:02 (A24) 拘束性 WT1 特異的 CTL を健常人末梢血から誘導した。得られた CTL line のうち、A24 WT1 改変型および天然型 tetramer の両方に反応し、陽性率が高く、十分な細胞数が得られた 37F8 CTL line に関して A24 WT1 tetramer によりソーティングを行い、mRNA を抽出して cDNA を合成した。TCR  $\alpha$  鎖について、網羅的に作製した primer を用いて PCR およびシーケンスを行った結果、最終的に 2 種類の遺伝子配列を得た。TCR  $\beta$  鎖に関しては、レパトア解析キットを用いて解析を行った結果、V $\beta$ 5.1 を有する事が判明したため、TCR V $\beta$ 5.1 に対する primer を設計し、PCR およびシーケンスを行い、全長配列を同定した。得られた TCR 遺伝子を組み合わせて発現ベクターに組み込み、T lymphoma 細胞株に遺伝子導入して A24 WT1 tetramer に反応する TCR  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の組合せを確定した。更に薬剤耐性によるスクリーニングを行い、TCR 遺伝子安定発現細胞株 SK37 を樹立した。SK37 は、A24 WT1 改変型および天然型 tetramer の両方に反応し、実際に各 tetramer 試薬の反応性を評価することが可能であった。また、本 TCR による細胞傷害活性を確認し、その結果、A24 拘束性 WT1 特異的な細胞傷害活性が確認された。以上より、本研究で得られた TCR について、機能的である事が明らかとなった。SK37 は、今後がん免疫治療における免疫モニタリングの標準化において重要なツールとなる細胞であることが示された。

学位論文発表後、副査である清野研一郎教授からフローサイトメーターを用いた V $\beta$  の解析方法について質問があったが、適切な回答がなされた。また、TCR を遺伝子導入した T lymphoma 細胞株における内在性 TCR の発現に関する質問があり、内在性 TCR が欠損した細胞株であることが説明された。更に、この TCR を用いて、将来 TCR 遺伝子導入細胞による治療を行う場合の工程に関して質問があり、タカラバイオで開発された内在性 TCR をノックダウン可能なベクターを利用してレトロウイルスにより遺伝子導入するこ

とが現在確立されている方法の中では最も現実的であるという返答がなされた。

また、主査の上出利光教授より、これまでに分かっている免疫モニタリングの結果と実際の臨床効果について、相関は見られるのかとの質問がなされたが、申請者は自己の実験結果やこれまでの知見を基に適切に回答を成し得た。又 tetramer 陽性細胞が認められる症例でも臨床効果がみられない場合などに関して、これをどのように臨床へ feed back していくのが良いのかについて熟考することが必要であり、免疫モニタリングに関して今後の更なる発展が期待される旨のコメントがなされた。

引き続き、副査である西村孝司教授から、現在免疫制御分野で実施されている臨床試験で得られた知見に基づく免疫応答と臨床効果との関係性についての説明が求められた。現在得られている抗体価の測定に関するデータについて、特に Th1 型の免疫応答が誘導された患者において予後の相関性が見られる傾向があるデータを得ている事、CTL だけでなく、ヘルパーT 細胞の機能にも着目した免疫モニタリングを実施するとともに、臨床効果、予後との相関を検証することが望まれると考えているとの返答がなされた。

この論文は、A24 WT1 特異的 TCR 遺伝子配列の同定を行っただけでなく、この TCR を細胞膜表面上に再構築し、これまで世界に存在しなかったがん抗原 WT1 特異的 TCR を機能的かつ安定的に発現する細胞株 SK37 を樹立した点で高く評価され、今後、SK37 が日本及び世界で行われている、がん免疫療法における免疫モニタリングの標準化に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの研究活動における研鑽なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。