

研究題目 高速解析を目指した1細胞からのT細胞受容体配列決定法の開発

研究組織

研究代表者：Jin Jianshi（国立研究開発法人理化学研究所）

共同研究者：岡崎拓（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

抑制性免疫補助受容体 PD-1 および CTLA-4 に対する阻害抗体、いわゆる免疫チェックポイント阻害薬の成功により、免疫を利用したがん治療法が、安全かつ効果的な治療法として大きな関心を集めている。しかし現時点では、ほとんどのがん腫において奏効率が 20～30%にとどまることから、奏効率の向上が喫緊の課題となっている。また、一部の患者において免疫関連有害事象（Immune-related adverse event, irAE）が認められることから、がん細胞に特異的な T 細胞を選択的に活性化する方法、および正常組織を攻撃する T 細胞を選択的に抑制する方法の開発が強く求められている。

がん細胞に特異的な T 細胞を選択的に活性化するためには、がん抗原およびがん抗原に特異的な T 細胞抗原受容体（T cell receptor, TCR）の配列を知ることが極めて重要である。また、免疫応答をシステムとして理解することの重要性が高まっていることから、少数の特定の T 細胞に注目するのではなく、たくさんの T 細胞について、TCR 配列を解析する必要がある。TCR は α 鎖と β 鎖から成り、両者の組み合わせにより抗原特異性が決定される。したがって、TCR α 鎖と β 鎖の配列をペアで決定することが必須であるが、従来の方法では1細胞毎に両鎖をペアで配列決定できる効率は、必ずしも高く無い。研究代表者らは、高速解析につながる基盤技術を開発するため、TCR の α 鎖と β 鎖を従来法より速やかに増幅する手法の開発を行っており、本研究ではその改良を目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

(1) 培養 T 細胞株を用いた実験系の構築

TCR α 鎖および β 鎖の増幅効率等を正確かつ安定的に評価するため、既知の TCR を発現する培養 T 細胞株を用いた。具体的には、卵白アルブミンの部分配列（pOVA₃₂₃₋₃₃₉）を I-A^d 拘束性に認識する DO11.10 T 細胞を岡崎研究室から譲り受け、安定的に培養する手技を習得した後、TCR α 鎖および β 鎖の解析に用いた。

(2) マウス初代培養 T 細胞を用いた実験系の構築

マウスの脾臓から T 細胞を採取する方法について岡崎研究室から指導を受け、安定的に T 細胞を採取できる手技を習得・確立した。また、セルソーターを用いて、プレートに1細胞ずつソートし、TCR α 鎖および β 鎖の解析に用いた。

(3) TCR α 鎖および β 鎖の解析

TCR β 鎖について、独自に開発してきた、高速で RNA から cDNA を増幅できる手法に改良を加えた。また、TCR α 鎖は TCR β 鎖に比べて増幅効率が低いため、条件検討を行った。

同定した TCR α 鎖および β 鎖を T リンパ腫細胞株に導入し、抗原刺激に対する応答性を評価した。

(4) 顕微鏡観察下の1細胞解析

抗原特異性の異なる培養 T 細胞株および抗原提示細胞を岡崎研究室から譲り受け、安定的に培養できることを確認した後、顕微鏡観察下で1細胞を分取し、T細胞受容体の配列を解析する方法の開発研究を行った。

活性化をした T 細胞を区別するため、T 細胞が活性化すると蛍光タンパク質を発現するレポーター細胞を作製した。具体的には、TCR 刺激によって活性化することが知られている

TCR 応答性配列を改良し、その下流に蛍光タンパク質の cDNA をつないだ発現プラスミドを作製した。発現プラスミドを培養 T 細胞株に導入し、抗原刺激に対する応答性を評価した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

培養 T 細胞株を導入することにより、簡便かつ安定的に TCR 解析法の効率、特異性等を評価することが可能となった。また、当初の提案から発展して実施した顕微鏡観察下での 1 細胞解析法の研究開発においてもこの培養細胞株は極めて有用であり、本分与、そして技術指導は、大変貴重であった。

研究提案時には自身の研究室で動物実験を行うことはできなかったが、動物実験ができる環境が整うことになった。そこで、岡崎研究室から初代培養 T 細胞の扱いについてアドバイスを頂き、自身の研究室でマウスの脾臓から T 細胞を採取するとともに、セルソーターのプレートソート機能を用いることで、1 細胞ごとに分取することが可能となった。

これらの細胞を用い、開発してきた新しい手法により、 β 鎖の mRNA から cDNA の増幅を試みた。従来法とは異なり、ワンステップで速やかに増幅できる手法である。複数の試薬を試し、増幅時における温度サイクルの最適化、複数のプライマーのデザイン、また、本手法独自に用いる核酸オリゴの修飾や長さなどを検討した。その結果、これまでよりも安定して増幅できる条件が見つかった。

同様の条件において、 α 鎖を増幅すると、非目的産物の増幅が多くみられた。今後は、 α 鎖の安定した増幅が課題であり、その後、 α 鎖と β 鎖の同時増幅へと進みたい。

同定した TCR の機能を評価する実験系を構築するために、これまでに報告されている TCR α 鎖および β 鎖を T リンパ腫細胞株に導入し、抗原刺激への応答性を評価した。同時に導入する免疫補助受容体、導入条件等を検討することにより、検討したほぼ全ての TCR について良好な応答性が得られる条件を得ることに成功した。

顕微鏡を用いて活性化した T 細胞を区別するためには、活性化により蛍光タンパク質を発現するレポーター細胞が極めて有用である。TCR 応答性配列に改良を加えることにより、活性化 T 細胞を明瞭に区別し得るレポーター細胞を作製することに成功した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

一般的な多細胞の解析では、細胞溶解の過程で TCR α 鎖と TCR β 鎖のペア情報は欠損してしまう。T 細胞の高精度な機能解析を行うためには、このペア情報を維持する必要がある、両方のサブユニットのシークエンスを細胞毎に同定することが望まれる。今後、TCR α 鎖との同時高速解析および顕微鏡観察下での 1 細胞解析が実現すれば、例えば、自己免疫疾患のマウスなどに特異的に発現する TCR α 鎖および β 鎖の情報を多くの細胞から 1 細胞レベルで得ることができるようになる。このように本研究から発展しうるアプローチは、疾患の原因解明や新規治療法の開発などにも貢献することが期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし

[3-2] 学会発表
なし

[3-3] 成果資料等
なし

【4】今後の課題等

上述の通り、TCR α 鎖の解析について効率および特異性を向上させることが課題である。また、T 細胞の活性化をより正確かつ簡便に評価できる方法の開発も継続して取り組んでいきたい。今後の技術開発は、本研究室を中心に行っていく予定であるが、引き続き、岡崎研究室との継続的な共同研究を予定している。

【5】謝辞

本研究をサポート頂いた岡崎研究室のメンバー、徳島大学先端酵素学研究所「酵素学研究拠点」の関係者の方々に深く感謝いたします。