

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名：(日本語) ペプチド特異的 T 細胞の迅速かつ高感度検出法「T-ISAAC 法」の開発
(英語) Development of a rapid and high sensitive system, T-ISAAC, to detect peptide-specific T cells

研究開発担当者

所属 役職 氏名：(日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 教授 村口 篤
(英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research (Medicine), Professor, Atsushi Muraguchi

実施期間：平成28年9月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究

開発課題名：(日本語) ペプチド特異的 T 細胞の迅速かつ高感度検出法「T-ISAAC 法」の開発
(英語) Development of a rapid and high sensitive system, T-ISAAC, to detect peptide-specific T cells

研究開発分担者

所属 役職 氏名：(日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部 教授 村口 篤
(英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research (Medicine), Professor, Atsushi Muraguchi

分担研究

開発課題名：(日本語) T-ISAAC 法による抗原特異的 T 細胞の検出と特異性の確認
(英語) Detection of antigen-specific T cells and verification of their specificity using T-ISAAC

研究開発分担者

所属 役職 氏名：(日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 助教 小澤龍彦
(英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research (Medicine), Assistant Professor, Tatsuhiko Ozawa

分担研究

開発課題名： (日本語) 単一 T 細胞からの TCR 遺伝子の増幅と TCR の発現

(英語) Amplification of TCR genes from single T cells and expression of TCR genes

研究開発分担者

所属 役職 氏名：(日本語) 国立大学法人富山大学大学院医学薬学研究部(医学) 助教 浜名 洋

(英語) National University Corporation, University of Toyama, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research (Medicine), Assistant Professor, Hiroshi Hamana

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

新しいがん免疫療法として、ペプチドワクチン治療が注目されている。ペプチドワクチン治療では、ワクチン接種前に当該ペプチドの反応性を確認するためのELISPOT等の応答試験が必須である。しかし、この試験は、リンパ球全体で培養するために雑音(ノイズ)が高いこと、また、反応したTCRが真にペプチド特異的かどうかを判断できない、という問題点がある。本研究では、これらの問題点を解決し、かつ迅速、適切にTCR遺伝子治療を可能とする画期的なT-ISAAC法の開発を行う。

T-ISAAC法の開発には、我々が見出した斬新なT細胞の活性化メカニズムを利用する。これまでの免疫学の常識では、T細胞活性化にはT細胞以外の抗原提示細胞の存在が必要(trans-activation)とされてきた。我々は、1個のリンパ球を1ウェルに捕捉できる「リンパ球チップ」を世界に先駆けて開発し、このチップを用いて、特定の1個のT細胞に特定のペプチドを添加するとT細胞は自己のTCRと自己のペプチド/MHCが相互作用し、自分自身を活性化(cis-activation)現象を見出した。一方、我々は、10日間で1個のT細胞からTCR遺伝子を効率良く単離し、その機能を解析できる画期的な技術(hTEC10)をすでに開発している。

本研究では、cis-activationという新規のT細胞活性化機序を利用して、自己MHCに提示されるペプチドに応答するTCRを確実に選別し、極めて短期間にTCRの機能を解析できる斬新的な方法:T-ISAACを開発することを目的とする。本方法の開発により、ペプチドのみで特異的TCRの取得が可能になり、検出系がクリアカットになる。加えて、特異的TCRの取得が格段に効率的になり、がん特異的なTCRシーズがより効率良く、かつ網羅的に得られる。また、本方法によりペプチドワクチン療法の治療応答性を検証する新規診断法も確立され、オーダーメイド医療による適切かつ合理的な医療行為を行うことが可能となり、人類の健康増進に大きく寄与すると期待される。さらに、本検出系はがん研究に欠かせないヒトのクラスI MHCだけでなく、クラスII MHC、特に予後不良因子との報告があるがん浸潤制御性T細胞などへの応用も期待され、今日まで解明されていない様々な疾患の病態・病因の解明に大きく寄与すると思われる。

平成28年度は、TCR遺伝子の効率的な増幅条件の検討を行い、単一T細胞からTCR α /TCR β の両者が増幅できる効率を、これまでの60%でから90%以上にすることに成功した。次

に、機能評価の迅速化目的として、工程にTAP (Transcriptionally active PCR)法を応用し、従来7日を要した複雑な機能評価を4日間に短縮することができた。さらに、HLA-A24及びA02でのモデル実験でEBウイルス抗原のペプチド/MHCに特異的なT細胞をT-ISAAC法にて検出し、その細胞を回収してTCR遺伝子を得て、特異性の確認することができた。これらの結果は、T-ISAACを応用して、ペプチドワクチン治療のみならず、近い将来、TCRがん治療への新しい道が開けることを示唆する。

Peptide-vaccine therapy draws the limelight as a new cancer immunotherapy. For this therapy, however, to confirm the reactivity to the peptide, assays such as ELISPOT is indispensable before the initiation of therapy, that is believed to have high noise (non-specific response) because whole peripheral blood lymphocytes of the individuals are incubated with peptide in the culture. The assay also has a major problem in which whether T cells detected in ELISPOT really response to the peptide in a specific manner. To solve these serious problems, we try to develop a novel T cell immunospot array assay on a chip, T-ISAAC, that enables rapid and efficient detection of peptide-specific T cells, cloning the TCR genes, and determining their function.

For developing T-ISAAC, we utilize a novel T lymphocyte activation system, cis-activation system. It has been a central dogma in immunology that T cell activation occurs as a result of TCR on T cells react to MCH/peptide on separate antigen presenting cells (trans-activation system). We have developed “lymphocyte chip” in which we can trap a single lymphocyte in a chip. Using the lymphocyte chip, we found that single T cell reacted to the peptide on the self MHC when the peptide was added to the chip (cis-activation). We also developed an efficient cloning system for single T cell retrieved from the chip, and analyze TCR gene and their function within 10 days (hTEC10).

In this study, we apply the new finding of cis-activation and develop T-ISAAC in which we are able to efficiently detect peptide specific T cells, rapidly analyze their TCR, and verify the function of TCR. This system reduces the noise of ELISPOT and be useful for assessment for reactivity of peptide specific T cells of the cancer patients before and after peptide-vaccine therapy. It also enables us to analyze not only class-I restricted T cells but also class-II restricted T cells, that is thought to be contained in tumor-infiltrating T cells. The T-ISAAC system also be useful for efficient cloning of peptide-specific TCR to promote order-maid TCR gene therapy as well as dissolving the mechanism of various T cell-mediated diseases whose onset of the diseases were unrevealed, thus contributing the wellness of human beings.

Here, we established an efficient amplification system of TCR genes from single T cells retrieved from lymphocyte chip. We increased the amplification rate of both TCR α and TCR β from single T cells retrieved from the chip from 60% to over 90%. We also developed a more rapid screen system for TCR function using TAP (transcriptionally active PCR) method. Conventional method needed 7 days for determining the TCR function, but applying TAP method to hTEC10 system, we succeeded

in determining the TCR function within only 4 days. Furthermore, using HLA-A24 and HLA-02 model system we had established, we were able to detect EB virus peptide specific T cell clones with T-ISAAC system, analyzed the TCR gene from the single cells retrieved from the lymphocyte chip, and verified that the TCR specifically reacted to the target cells. These data suggest that we are able to apply the T-ISAAC for not only detection of peptide-specific T cells for peptide-vaccine therapy but also TCR-gene cancer therapy in the near future.

Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 6 件)

1. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2017, 129(21): 2908-2916
2. Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Tamai T, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Muraguchi A, Kaneko S. Association between high-avidity T-cell receptors, induced by α -fetoprotein-derived peptides, and anti-tumor effects in patients with hepatocellular carcinoma. 2017, 152(6): 1395-1406.
3. Hamana H, Shitaoka K, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. A novel, rapid and efficient method of cloning functional antigen-specific T-cell receptors from single human and mouse T-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 474(4): 709-14.
4. Piao X, Ozawa T, Hamana H, Shitaoka K, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. *Oncoimmunology*. 2016, 5(5): e1131380.
5. Kawasaki Y, Sakimura A, Park CM, Tomaru R, Tanaka T, Ozawa T, Zhou Y, Narita K, Kishi H, Muraguchi A, Sakurai H. Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. *Sci Rep*. 2016, 6: 31502.
6. Ohnaga T, Shimada Y, Takata K, Obata T, Okumura T, Nagata T, Kishi H, Muraguchi A, Tsukada K. Capture of esophageal and breast cancer cells with polymeric microfluidic devices for CTC isolation. *Mol Clin Oncol*. 2016, 4(4): 599-602.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. *Cis*-interaction of TCRs and antigen/MHC class I complexes on CD8⁺ T cells causes their activation. ポスター, Kishi H, Jin A, Hamana H, Shitaoka K, Tajiri K, Kobayashi E, Kusano S, Yokoyama S, Ozawa T, Nagai T, Obata T, Hatakeyama S, Horii M, Hu Y, Zhang F, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology, 2016/8/21-26; Melbourne, 国外.

2. A rapid and efficient single-cell manipulation method using microwell array chip (ISAAC) technology for screening antigen-specific cytokines-secreting T-cells. ポスター, Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Lyu F, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology, 2016/8/21-26; Melbourne, 国外.
3. A rapid and easy system for screening of antigen-specific TCRs. ポスター, Hamana H, Kishi H, Shitaoka K, Piao X, Ozawa T, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology, 2016/8/21-26; Melbourne, 国外.
4. Identification of tumor-specific T cell receptors of primary tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from B16F10 melanoma-bearing mice at single cell levels. ポスター, Shitaoka K, Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology, 2016/8/21-26; Melbourne, 国外.
5. Establishment of West Nile virus-neutralizing human monoclonal antibodies derived from the individuals vaccinated with inactivated Japanese encephalitis virus by ISAAC technology. ポスター, Masaki H., Ozawa T., Takasaki T., Aoyama I., Yumisashi T., Konishi E., Kishi H., and Muraguchi A. 2016 International Congress of Immunology, 2016/8/21-26; Melbourne, 国外.
6. B16F10 メラノーマ浸潤リンパ球の単一細胞解析による, がん特異的 T 細胞の同定および TCR 遺伝子治療の試み. ポスター, 下岡清美, 浜名 洋, 呂 福蓮, 小澤龍彦, 早川芳弘, 岸 裕幸, 村口 篤. 第 20 回日本がん免疫学会総会 ; 2016/7/27-29 ; 大阪, 国内.
7. Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip. 口頭, Ozawa T, Kishi H., and Muraguchi A. 第 68 回日本生物工学会大会国際シンポジウム ; 2016/9/28-30 ; 富山, 国内. (招待講演)
8. 腫瘍浸潤リンパ球の単一細胞解析による腫瘍特異的 TCR の同定および治療への応用 (担癌マウスモデル). ポスター, 岸 裕幸, 村口 篤. 第 75 回日本癌学会学術総会 ; 2016/10/ 6-8 ; 横浜, 国内.
9. ISAAC 法を用いた抗原特異的 T 細胞検出法の開発. ポスター, 小澤龍彦, 岸 裕幸, 浜名 洋, 田尻和人, 呂 福蓮, 村口 篤. 第 39 回日本分子生物学会年会 ; 2016 /11/30- 12/2 ; 横浜, 国内.
10. TCR repertoire of CD4+CD25+CD137+Foxp3+ tumor infiltrating lymphocytes in mice. 口頭, Kishi H, Hamana H, Shitaoka K, Lyu F, Ozawa T, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 宜野湾, 国内.
11. Single-T-cell manipulation method using microwell array chip (T-ISAAC) allows rapid and efficient cloning of antigen-specific TCRs. ポスター, Ozawa T, Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 宜野湾, 国内.
12. A rapid and easy system for cDNAs cloning of antigen specific TCRs from single human and mouse T-cells within 4 days. ポスター, Hamana H, Kishi H, Shitaoka K, Ozawa T, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 宜野湾, 国内.
13. T cell receptor obtained from tumor-infiltrating lymphocytes without using tumor-specific antigens exhibits cytotoxicity to tumors in vitro and in vivo. ポスター, Shitaoka K, Kishi H, Hamana H, Hayakawa Y, Ozawa T, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 宜野湾, 国内.

14. TCR repertoire analysis of OVA-specific T-cells infiltrating into OVA-expressing-melanoma during tumor progression. ポスター, Lyu F, Shitaoka K, Hamana H, Hayakawa Y, Kishi H, Muraguchi A. 第 45 回日本免疫学会学術集会 ; 2016/12/5-7 ; 宜野湾, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
公開対象なし