

Title	Single cell-based T cell receptor gene analysis reveals existence of expanded WT1(Wilms' tumor gene) product-specific T cell clones in leukemia patients but not healthy volunteers
Author(s)	原田, ゆきえ
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47353
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 はら だ ゆ き え
原 田 ゆ き え

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 9 3 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Single cell-based T cell receptor gene analysis reveals existence of expanded WT1 (Wilms' tumor gene) product-specific T cell clones in leukemia patients but not healthy volunteers
(T 細胞レセプター遺伝子解析により明らかになった白血病患者末梢血中の癌抗原 Wilms' tumor 遺伝子産物特異的 T 細胞クローンの増殖)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 川瀬 一郎

(副査)
教 授 青笹 克之 教 授 野口眞三郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

現在我々は、癌抗原である WT1 (Wilms' tumor gene) 産物を標的とした WT1 ペプチド癌ワクチン療法を実施しており、有効な治療効果を示している。同時に患者体内における WT1 特異的 T 細胞の解析を行っている。本研究では Flow cytometry (FACS) を用いた WT1 特異的 CD8 T 細胞に対する tetramer 法と表面抗原解析に加え、T-cell receptor (TCR)- β 鎖に対する single-cell RT-PCR 法を確立することで、どのような WT1 特異的 CD8 T 細胞クローンが癌患者体内に存在しているのか、single cell かつ遺伝子レベルでの評価を行うことを目的とした。

〔 方法ならびに成績 〕

WT1 ペプチドワクチン投与前の HLA-A*2402 白血病患者 (AML) 1 例と MDS 患者 1 例、対照として HLA-A*2402 健常人 2 例 (計 4 例) について、末梢血中の WT1 特異的 CD8 T 細胞を CD3、CD8 抗体、WT1-tetramer で染色し、その頻度および表面抗原、TCR レパトア解析を single cell レベルで行った。まず、WT1 特異的 CD8 T 細胞の頻度と T 細胞分化ステージを CD45RA、CCR7 の発現レベルによって FACS で評価した。その結果、癌患者と健常人、それぞれの WT1 特異的 CD8 T 細胞の頻度はいずれも CD8⁺ 細胞中 0.1% 以下と非常に低く、両者間に明らかな差も見られなかった。一方、細胞表面抗原 CD45RA、CCR7 の発現レベルにより、健常人 2 例では約 80% が naïve type (CD45RA⁺, CCR7⁺) であったのに対し、患者ではそのほとんどが memory phenotype (CD45RA⁻, CCR7^{+/+})、あるいは terminal differentiated effector phenotype (CD45RA⁺, CCR7⁻) と、より分化した stage であることが示唆された。次に、TCR β 鎖 specific primer (24V β specific forward primers と 2C β specific reverse primers) を設計し、TCR β 鎖に対する single-cell RT-PCR 法を確立した。その PCR 成功率 (single cell からの TCR β 遺伝子を増幅、解析できる率) は 80.1% と十分に高かった。これを受け、各患者と健常人の凍結解凍末梢血サンプルから WT1 特異的 CD8 T 細胞を染色後、single-cell sorting し、single-cell RT-PCR 法で直接個々の細胞の TCR β 遺伝子を増幅、シーケンスし、それぞれ 50 細胞の TCR repertoire の解析を行った。その結果、健常人では WT1 特異的 T 細胞の特定 clone

の増殖はなく、患者でのみ特定 clone が高頻度に増殖していることが明らかになった。さらに、TCR-V β 5 と V β 6 gene family が健常人と患者に共通して選択的に使用されていることも明らかになった。このように、癌患者では WT1 に対する特異的 T 細胞の免疫応答の結果、特定の T 細胞 clone の増殖が起こっていることが遺伝子レベルの実験で証明できた。

[総 括]

効率の高い TCR β 鎖に対する single-cell RT-PCR 法を確立することで、非常に頻度の低い末梢血中の WT1 特異的 T 細胞の character を総合的に評価可能とした。今後、このシステムにより WT1 ワクチン投与前後での WT1 特異的 clone の増殖と患者の臨床効果の相関について有意義な評価が可能である。これは、担癌患者における癌抗原に対する免疫応答のより深い理解や、よりすぐれた癌免疫療法の開発に役立つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

WT1 (Wilms' tumor gene) 遺伝子産物は癌抗原である。本研究では癌患者体内の WT1 抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (WT1-CTL) の *ex vivo* 解析を single-cell かつ遺伝子レベルで包括的に行った。FACS での WT1-CTL に対する tetramer 法による頻度と表面抗原解析に加え、T cell receptor に対する single-cell RT-PCR 法を確立することにより、白血病患者と健常人 (HLA-A*2402)、それぞれの末梢血中の WT1-CTL clone の多様性を single cell かつ遺伝子レベルで比較評価した。その結果、末梢血中において癌患者の WT1-CTL の頻度は非常に少なく (CD8T 細胞中 0.1%以下) 健常人と明らかな差は無いが、その活性化状態において健常人の WT1-CTL は naïve であるのに対し、癌患者の WT1-CTL は活性化状態 (memory/effector phase) にあることが明らかとなった。さらに、特定の WT1-CTL クローンの増殖が、癌患者でのみ高頻度に行っていることも遺伝子レベルで明らかとなった。以上の結果から、癌患者では WT1 特異的な細胞性免疫が健常人に比べ、より誘導されていることが証明された。このような包括的な single-cell レベルでの癌抗原特異的 CTL の *ex vivo* 解析は腫瘍に対する免疫応答の機序解明、さらによりすぐれた癌免疫療法の開発に役立つと考えられた。

本研究の結果は、癌患者の腫瘍関連抗原に対する免疫応答の解明に貢献するものであり、学位授与に値すると思われる。