

Title	Characterization of the T-cell receptor beta chain repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes
Author(s)	中西, 克実
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61520
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中西 克実
論文題名 Title	Characterization of the T-cell receptor beta chain repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes (腫瘍浸潤リンパ球のT細胞受容体ベータ鎖レパートリーの特性評価)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 腫瘍内に存在するリンパ球の一種である腫瘍浸潤性リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocyte: TIL) は、腫瘍免疫の直接的なエフェクターであり、それらの研究は今後の免疫治療の発展において大変重要であると考えられる。TIL由来の腫瘍反応性T細胞は、養子細胞移植に利用される等、T細胞受容体遺伝子やT細胞によって認識される腫瘍抗原の特定に使用されてきた。癌細胞に作用する細胞障害性T細胞を活性化させる免疫チェックポイント阻害剤の導入は、近年、癌治療に変化をもたらしている。 T細胞の活性化は、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) によって提示された細胞表面分子の認識に依存している。MHCを認識するT細胞受容体ベータ鎖 (T-cell receptor beta chain: TCRB) は、ゲノム再編成により高い多様性を持っている。TCRBのゲノム再編成では、それぞれ複数存在するvariable (V), diversity (D), and joining (J) 遺伝子セグメントから1つずつ選択され、さらに各セグメント間で挿入や欠失が起こる。この最も多様性の高い領域をCDR3 (complementarity determining region 3) 領域という。 腫瘍免疫の分野ではTCR型の特定にハイスループットな配列決定技術を利用することができるが、その高いエラー率が問題となっている。近年、high-fidelityな方法として、バーコード配列を利用したnon-overlapping integrated reads sequencing system (NOIR-SS) 法が開発された。本研究では、NOIR-SS法を用いて、大腸癌腫瘍に浸潤したTILと健常人の末梢血中リンパ球 (peripheral blood lymphocytes: PBLs) のTCRBレパートリーを比較し、TCRBのCDR3配列を特徴づけることを目的としている。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 検体には、大阪府立成人病センターで切除された凍結切片とボランティア健常人の末梢血単核球からTotalRNAを抽出し、RNAの品質をAgilent 2100 Bioanalyzerを用いて確認した。TCRBの共通配列にランダムな12塩基と塩基配列決定に必要なアダプター配列を付加したプライマーを設計し、抽出したRNAに対して逆転写反応を行なった。逆転写を行なったcDNA配列を鋳型として、PCR反応を行ない次世代シーケンサーのライブラリ作製を行なった。次世代シーケンサーIonProtonを用いて、ライブラリの配列決定を行なった。得られたリードをNOIR-SSのフローで解析し、各配列のエラーを補正した。補正した配列のCDR3領域のレパートリーを特定し、各検体間で比較した。大腸癌患者4人のTILと健常人4人のPBLの解析を行なった。 PBLとTIL間でのTCRBの各J, Vセグメントの使用頻度は、ともに同様であった。各検体のTCRB全種類数を推定した結果、PBLでは608, 664~1, 003, 098種類、TILでは90, 228~223, 757種類であった。分子集団全体において頻度0.01%以上で出現するCDR3アミノ酸配列の比率では、PBLで0.33~0.43%、TILで1.3~3.6%となり、有意な差が認められた (p=0.03)。 〔総括(Conclusion)〕 次世代シーケンサーの問題点である高いエラー率を補正し、TCRBのCDR3配列をより正確に決定することができた。また、TILにおけるCDR3の種類数がPBLにおける種類数よりも少ないことが推定された。一方で、中～高頻度で現れるCDR3の種類数はTILにおいて高い傾向にあったことから、大腸癌TILのうち特定のCDR3を持つT細胞が活性化・増殖している可能性が唆された。より多くの検体のCDR3レパートリーを詳細に測定、比較することにより、腫瘍免疫分野の今後の研究に大いに貢献できるものと期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中西 克実		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 野口 眞三郎
	副 査	大阪大学教授 土岐 祐一
	副 査	大阪大学教授 石井 圭一

論文審査の結果の要旨

本研究は、次世代シーケンサの従来の問題点である高いエラー率を低減する技術(NOIR-SS)をT細胞受容体β鎖(TCRB)中の相補性決定領域3(CDR3)の配列決定に適用したものである。大腸癌組織内の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と健康人の末梢血リンパ球(PBL)のTCRBにおけるCDR3の種類数の多様性を比較した。各サンプルのtotalRNAからCDR3の配列を決定し、その種類数と重複の頻度から全CDR3数を推定した結果、健康人PBLでは約61万～100万程度、大腸癌TILでは約9万～22万程度の種類数と推定された。TCRBを構成する各J,Vセグメントの使用頻度はそれぞれ同程度であった。今回、配列を決定したCDR3のうち0.01%以上の頻度で現れる配列はPBLで全体の0.33～0.43%、TILでは1.3～3.6%であり有意に高いことが示唆された。腫瘍内では特定のTCRBを持つT細胞が増殖、活性化しているものと考えられる。同時に大量のTCRB CDR3配列を正確に決定可能な系を構築し、今後の腫瘍免疫研究分野への応用・発展の可能性を示唆した本研究は、学位に値するものとする。