

# 論 文 内 容 要 旨

Highly functional T-cell receptor repertoires are  
abundant in stem memory T cells and  
highly shared among individuals

(高機能 T 細胞受容体は幹細胞様メモリー T 細胞分  
画に豊富に存在し個人間で高頻度に共有されている)

Scientific Reports, 7(1):3663, 2017.

主指導教員：一戸 辰夫 教授

(原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野)

副指導教員：稲葉 俊哉 教授

(原爆放射線医科学研究所 がん分子病態研究分野)

副指導教員：小林 正夫 教授

(医歯薬保健学研究科 小児科学)

美山 貴彦

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

【背景】近年、新たに同定された stem-cell memory (SCM) T 細胞は、高い自己複製能と多分化能を有していることから、免疫記憶の根幹を形成する T 細胞群であると考えられているが、その中に包含される T 細胞クローンの特徴は明らかにされていない。このように多様なクローンから構成される特定の T 細胞分画を包括的に理解するために T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子配列の next-generation sequencing (NGS) 技術を用いた半定量解析が開発されているが、NGS では個々の T 細胞が有する TCR $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の遺伝子配列をペアとして同定できないため、TCR の機能検証に応用できないという弱点がある。一方、シングルセルソーティング技術を用いた TCR 解析は、網羅性の点では NGS に劣るものの、単一細胞レベルでの  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖ペア遺伝子配列を取得することができるため、TCR の抗原特異性および機能検証が可能という優れた利点がある。

そこで、今回我々は、NGS と単一細胞 TCR 解析を組み合わせることにより、サイトメガロウイルス (CMV) pp65 抗原特異的 TCR の網羅的同定と、それらを発現する T 細胞レパトワの階層性を検証した。さらに、異なる個人間で共有される TCR (shared TCR) は感染免疫応答において機能的に優位なクローンを形成することが報告されていることから、SCM を含む T 細胞亜分画でそれらの頻度を解析し、それらの shared TCR がどの分画で維持されているのかを検討した。

【方法】5 人の健常者 (CMV 既感染者 : 4 人、未感染者 : 1 人) から末梢血を採取し、全 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞サブセット (Naïve T cells, SCM T cells, central memory [CM] T cells, effector memory [EM] T cells, terminal effector [EFF] T cells) における TCR の complementarity determining region (CDR3) の遺伝子配列を NGS で網羅的に同定し、リード集計を行った。また HLA-A\*02 陽性の CMV 既感染者から CD8 陽性 T 細胞を分離し、CMVpp65 抗原由来の HLA-A\*02 拘束性 NLVPMVATV (NLV) ペプチドによる抗原刺激で感作増幅した NLV 特異的 T 細胞をテトラマーで検出、セルソーターを用いて分取し同様の解析を行った。TCR レパトワの多様性を Simpson's diversity index を用いて評価し、また異なる 2 人以上で共通に見出される CDR3 配列を有する TCR を shared TCR としてその頻度を算出した。次に NLV 特異的 T 細胞を、96 穴プレートの各ウェルに 1 細胞ずつ分取し、TCR $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の CDR3 遺伝子配列の同定を行った。得られた各 TCR $\alpha\beta$  遺伝子を、CMV 未感染者の末梢血 T 細胞および TCR 欠損 T 細胞株に導入し、NLV ペプチド刺激によるサイトカイン産生能と NLV テトラマーとの結合力を検証した。

【結果】CMV 既感染者の末梢血に存在する NLV 特異的 T 細胞のレパトワは、極めて多様性が低下しており、1~2 種類のドミナントなクローンとそれ以外のサブドミナントなクローンで構成されていた。また、これらの TCR を導入した PHA 芽球は、NLV ペプチド特異的なインターフェロン $\gamma$  産生能を獲得し、特にドミナントクローンの TCR はサブドミナントクローンよりも NLV テトラマーに対して強い結合力をもちことが確認された。ペプチド刺激で感作増幅させた細胞で各 TCR の存在頻度を NGS で解析したところ、TCR の結合力の強さとそれら TCR を有する T 細胞クローンの存在頻度には正の相関性を認めた。各 T 細胞サブセットにおける shared

TCR の頻度は非常にわずかであったが、いずれのサブセットにおいても定量的に上位を構成するクローンほど共有性が高い TCR を有しており、特に SCM サブセットにおいては顕著な傾向を認めた。また、NLV 特異的 shared TCR は CMV 既感染だけでなく未感染者の末梢血にも確認でき、NLV 特異的 T 細胞は共有性の高い shared TCR が上位クローンを占めていた。

【考察】今回我々は、CMV 既感染者における NLV 特異的 T 細胞レパトワは、NLV ペプチドと結合力がより強く、また個人間での共有性がより高い TCR を有するクローンがドミナンスを獲得していることを明らかにした。T 細胞の分化過程において、共有性の高い TCR を有するクローンの顕著な増幅は SCM の段階で確認でき、これらの結果はウイルス免疫応答において SCM に存在する shared TCR が、免疫記憶の主体となる機能的に優位なクローンの維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。