

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03460

研究課題名(和文) 腫瘍浸潤リンパ球機能解析を含めて、腫瘍微小環境を単細胞解像度で解明する

研究課題名(英文) Single cell analysis of tumor-microenvironment based on TIL functions

研究代表者

廣橋 良彦 (HIROHASHI, Yoshihiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30516901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1阻害剤で治療された悪性黒色腫症例において、1細胞解析を行い、T細胞受容体(TCR)レパトワ解析を行った。TCRクロナイプサイズが大きいTCR配列から、TCR遺伝子導入T細胞(TCR-T細胞)を作製し悪性黒色腫反応性を検討した。主要TCRクロナイプの過半数は、腫瘍細胞株に反応を示した。この結果は、免疫療法不応性悪性黒色腫においてすら、腫瘍特異性CTLが腫瘍局所に多数浸潤していた事を示す。この結果は、PD-1/PD-L1以外の免疫チェックポイント分子が、免疫逃避に関わっていたのではないかと考察している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、悪性黒色腫症例の腫瘍浸潤リンパ球を1細胞遺伝子発現解析を行った。その結果、免疫チェックポイント阻害剤(PD-1阻害剤)不応性症例の腫瘍浸潤リンパ球であっても、腫瘍細胞を認識しうることを見出した。この結果は、PD-L1/PD-1阻害治療抵抗性症例であっても、免疫療法が効く可能性を示すと同時に、PD-L1/PD-1以外の免疫チェックポイント等の免疫抑制機構が存在する事を示唆する。この解析を進める事により、PD-1阻害療法の適応を定義出来ると同時に、新たな治療法開発への rationale となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed melanoma cases that were treated by PD-1 blockade and resulted in refractory for PD-1 blockade. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) were analyzed by single cell RNA-sequence. T cell receptor (TCR) transduced T (TCR-T) cells were generated according to the TCR sequences and tested the specificity for autologous melanoma cells. Surprisingly, most TCR-T cells recognized melanoma cells indicating TILs were functional, but PD-1 blockade did not work. These result indicate that there are other immune escape mechanisms beside PD-L1/PD-1.

研究分野：病理学

キーワード：腫瘍微小環境 細胞傷害性T細胞 腫瘍抗原 1細胞解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は様々な悪性腫瘍で承認されてはいるものの、その奏効率は 10%~40% 程度と高いとは言えない。致命的な副作用の危険性もあるため、がん微小環境を解析し局所免疫状態を深く理解する必要がある。腫瘍組織を観察すると多くの細胞傷害性 T 細胞(CTL)と思われる CD8 陽性 T 細胞が浸潤する。しかしながら、CTL 浸潤が多い症例でも免疫療法不応例が意外に多い。それらの腫瘍浸潤 CTL は抗腫瘍効果を示さないのか？ 本研究ではこの疑問の答えを探索する。単細胞解析は強力な腫瘍微小環境解析法であるものの、機能解析を不得手とする。遺伝子発現プロファイルにとどまるからである。

しかしながら、T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子配列を解析する事により、CTL 機能を推定できる。TCR 遺伝子配列が、CTL の抗原特異性を定義するからである。本研究開始において、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の 1 細胞遺伝子発現解析および、TCR 遺伝子配列に基づいた、腫瘍特異性解析を重ねる事により、免疫チェックポイント阻害剤治療例における臨床因子を読み解く腫瘍微小環境解析に繋がると仮説を立て、研究を行った。

2. 研究の目的

本研究において、免疫チェックポイント阻害剤で治療された症例における腫瘍微小環境解析を、1 細胞 RNA-sequence 解析および TCR 遺伝子配列を用いた TCR 導入 T 細胞 (TCR-T 細胞) 解析の結果を融合する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍サンプルの 1 細胞遺伝子発現解析。

免疫チェックポイント阻害剤を使った治療を受けた悪性黒色腫症例 5 例を対象とした。腫瘍サンプルから、腫瘍浸潤リンパ球を回収し、10xGenomics Chromium を用い、1 細胞遺伝子発現解析を行った。解析結果を R software を用い、統計解析を行った。

(2) T 細胞受容体 (TCR) 解析

1 細胞解析にて取得した TCR 遺伝子配列から、クローンサイズが大きい TCR を、上位 10 クローン程度を解析した。TCR 遺伝子配列情報から、TCR 遺伝子を合成し、健常者末梢血単核球 (PBMC) から採取した T 細胞に TCR 遺伝子導入を行い、TCR 導入 T 細胞 (TCR-T 細胞) を作製した。TCR-T 細胞の特異性を検討するため、自己悪性黒色腫細胞に対する反応性を IFN ELISPOT および、フローサイトメーターを用いた CD107a 発現にて検討した。

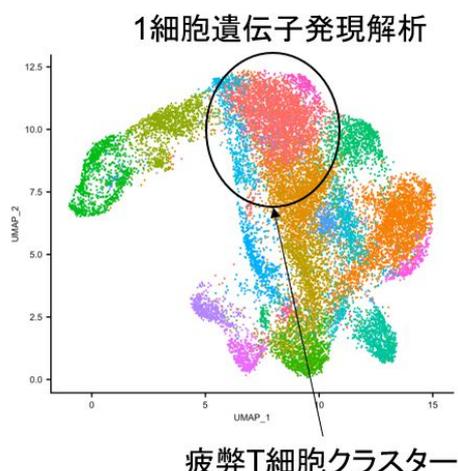
(3) 腫瘍組織解析

1 細胞遺伝子発現解析を行った症例で、腫瘍サンプルを用い、免疫組織化学染色にて腫瘍微小環境解析を行った。

4. 研究成果

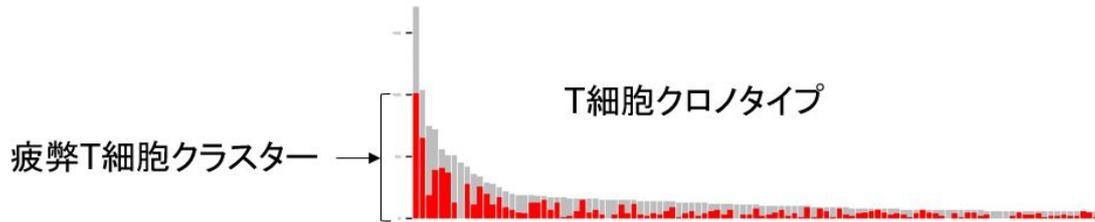
(1) ヒト腫瘍検体の 1 細胞遺伝子発現解析

PD-1 阻害剤で治療された悪性黒色腫症例 5 例の腫瘍サンプルから、腫瘍浸潤リンパ球を採取し、1 細胞遺伝子発現解析を行った。1 細胞遺伝子発現の UMAP を図に示す (右図)。このように、腫瘍浸潤リンパ球解析から、様々なクラスターを検出した。悪性黒色腫の 1 細胞遺伝子発現を解析した論文 (Oliveira G, et al., Nature 2021) の 1 細胞遺伝子発現データを参照に、疲弊 T 細胞クラスターを定義した。その結果、我々の解析においても、悪性黒色腫 TIL において、疲弊 T 細胞クラスターを検出した。この疲弊 T 細胞クラスターは腫瘍特異的であると報告されており、疲弊 T 細胞クラスターを解析する事とした。



(2) T細胞受容体(TCR)解析

1細胞 TCR 遺伝子解析から、さまざまな TCR クロノタイプを検出した。1細胞遺伝子発現解析結果を参照し、TCR クロノタイプおよび、疲弊T細胞クラスター（赤で表示）を下図に示す



クロノタイプサイズが大きく、疲弊T細胞クラスターの率が高いTCR クローンに関し、腫瘍細胞特異的である可能性が高いとし、さらに解析を続けた。

クロノタイプサイズ上位10種類程度から作製したTCR 遺伝子を用い、TCR-T細胞を作製した。今回解析した5症例中2症例において、自己悪性黒色腫細胞株樹立に成功しており、自己悪性黒色腫細胞株に対するTCR-T細胞の反応性を検討した。その結果、驚くべき事に、クロノタイプサイズが大きいクローンは、腫瘍特異的であった。今回解析に使った2症例はいずれも、PD-1阻害剤で治療された症例であり、2例中1例は治療感受性、もう1例は治療抵抗性であった。しかしながら、TCR-Tを用いたT細胞機能アッセイでは、いずれの症例においても、腫瘍特異的TCRを検出した。すなわち、この結果から、腫瘍浸潤リンパ球の腫瘍特異性は、PD-1阻害剤の治療感受性を定義出来るものではない可能性が示された。PD-1阻害剤不応例は、PD-L1/PD-1以外の免疫チェックポイント分子が関わる可能性も今後検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyata H, Hirohashi Y, Yamada S, Yanagawa J, Murai A, Hashimoto S, Tokita S, Hori K, Abe T, Kubo T, Tsukahara T, Kanaseki T, Shinohara N, Torigoe T.	4. 巻 71
2. 論文標題 GRIK2 is a target for bladder cancer stem-like cell-targeting immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 795-806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-03025-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuki M, Hirohashi Y, Nakatsugawa M, Murai A, Kubo T, Hashimoto S, Tokita S, Murata K, Kanaseki T, Tsukahara T, Nishida S, Tanaka T, Kitamura H, Masumori N, Torigoe T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Tumor-infiltrating CD8 + T cells recognize a heterogeneously expressed functional neoantigen in clear cell renal cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 905-918
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-03048-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubo T, Hirohashi Y, Keira Y, Akimoto M, Ikeda T, Kikuchi N, Iwaki H, Kikuchi T, Obata M, Morita R, Kasai K, Segawa K, Tsukahara T, Kanaseki T, Murata K, Kikuchi Y, Shinkawa T, Hasegawa T, Torigoe T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Identification of characteristic subepithelial surface granulomatosis in immune-related adverse event-associated enterocolitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1320-1325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14773.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kubo T, Hirohashi Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Murata K, Morita R, Torigoe T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Epithelioid granulomatous lesions express abundant programmed death ligand-1 (PD-L1): a discussion of adverse events in anti-PD-1 antibody-based cancer immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Vaccin Immunother	6. 最初と最後の頁 1940-1942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21645515.2020.1870364.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuki M, Inoue R, Murai A, Kubo T, Hashimoto S, Murata K, Kanaseki T, Tsukahara T, Nishida S, Tanaka T, Kitamura H, Masumori N, Hirohashi Y, Torigoe T.	4. 巻 552
2. 論文標題 Neuregulin-1- 1 and -secretase play a critical role in sphere-formation and cell survival of urothelial carcinoma cancer stem-like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 128-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada S, Miyata H, Isono M, Hori K, Yanagawa J, Murai A, Minowa T, Mizue Y, Sasaki K, Murata K, Tokita S, Nakatsugawa M, Iwabuchi S, Hashimoto S, Kubo T, Kanaseki T, Tsukahara T, Abe T, Shinohara N, Hirohashi Y, Torigoe T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cisplatin resistance driver claspin is a target for immunotherapy in urothelial carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-023-03388-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki K, Hirohashi Y, Murata K, Minowa T, Nakatsugawa M, Murai A, Mizue Y, Kubo T, Kanaseki T, Tsukahara T, Iwabuchi S, Hashimoto S, Uhara H, Ishida-Yamamoto A, Torigoe T.	4. 巻 43
2. 論文標題 SOX10 Inhibits T Cell Recognition by Inducing Expression of the Immune Checkpoint Molecule PD-L1 in A375 Melanoma Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 1477-1484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16296.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minowa T, Hirohashi Y, Murata K, Sasaki K, Handa T, Nakatsugawa M, Mizue Y, Murai A, Kubo T, Kanaseki T, Tsukahara T, Iwabuchi S, Hashimoto S, Ishida-Yamamoto A, Uhara H, Torigoe T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Fusion with type 2 macrophages induces melanoma cell heterogeneity that potentiates immunological escape from cytotoxic T lymphocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Pathol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6083.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣橋 良彦
2. 発表標題 免疫応答をコントロールするがんの多様性
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣橋 良彦
2. 発表標題 腫瘍浸潤リンパ球の機能とその認識する抗原
3. 学会等名 和歌山悪性腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣橋 良彦
2. 発表標題 癌免疫療法と腫瘍をとりまく免疫微小環境
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------