

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16206

研究課題名（和文）T細胞性リンパ腫の免疫微小環境：シングルセル解析によるアプローチ

研究課題名（英文）Tumor microenvironment of T-cell lymphoma: approaching by single cell analysis

研究代表者

竹内 真衣 (Takeuchi, Mai)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10759666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではnCounterによる遺伝子発現解析、免疫染色、phenocyclerによるシングルセル解析を用いてT細胞性リンパ腫の一種である未分化大細胞型リンパ腫（以下ALCL）の免疫微小環境を検討した。結果、"Don't eat me" signalに関与するCD47とSIRPがALCLの免疫微小環境に重要であることが示された。ALCLの腫瘍細胞にCD47が発現しており、SIRP陽性間質細胞が周囲に多数認められた。以上より、ALCLにおいてCD47とSIRPの相互作用による免疫逃避機構が働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞性リンパ腫は化学療法の効果不十分であり、がん免疫療法などの活用が期待される。がん免疫療法の適切な利用にはがん細胞を取り巻くT細胞などの免疫微小環境の理解が重要であるが、T細胞性リンパ腫はT細胞自体が腫瘍化しているため従来の方法では免疫微小環境の解析が困難であった。本研究では遺伝子発現解析とシングルセル解析を併用することでより詳細な検討を可能にし、治療の進歩に貢献する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated tumor immune microenvironment of anaplastic large cell lymphoma (ALCL), which is a type of T-cell lymphoma, using gene expression analysis by nCounter, immunostaining, and single-cell spatial analysis by Phenocycler. The results showed that CD47 and SIRP involved in the "Don't eat me" signal were important for tumor immune microenvironment of ALCL. CD47 was expressed in ALCL tumor cells, and many SIRP-positive stromal cells were found in the surrounding area. In conclusion, it was suggested that the immune escape mechanism by the interaction between CD47 and SIRP may be working in ALCL.

研究分野：病理学

キーワード：悪性リンパ腫 未分化大細胞型リンパ腫 免疫微小環境

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は T 細胞をはじめとしたヒトの免疫細胞に攻撃を受ける。そのためがん細胞は免疫細胞の攻撃から逃れるための様々な機能を有しており、MHC クラス I 分子の消失による T 細胞からの逃避や、免疫チェックポイント分子の発現による T 細胞の不活性化などにより生存に有利な免疫微小環境を形成している。PD-1 阻害薬などのがん免疫療法はこれらの免疫微小環境に働きかけることで免疫細胞によるがん細胞の攻撃を促進する。免疫微小環境は T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、間質細胞など様々な細胞により複雑に構成されており、より詳細ながん免疫微小環境の解明が予後の改善や新規治療薬の開発につながると期待される。T 細胞性リンパ腫はリンパ球の一つである T 細胞由来の血液がんである。T 細胞性リンパ腫は通常の化学療法では効果不十分なものが多くがん免疫療法の効果が期待されるが、発症頻度が低くがん細胞そのものが T 細胞由来であることから免疫微小環境の解析が困難である。そのため、T 細胞性リンパ腫の免疫微小環境を解明し、新規治療の発展に貢献したいと考え研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では未だ不明な点が多い T 細胞性リンパ腫の免疫微小環境の解明を目的とする。T 細胞性リンパ腫の患者検体を用いて nCounter 法によるがん免疫関連の遺伝子発現解析を行う予定である。また、個々の細胞の分類、タンパク発現、位置情報の解析を行うシングルセル解析を組み合わせることで免疫微小環境を可視化し、未だ不明な点が多い T 細胞性リンパ腫における免疫微小環境の解明を行う。今回は T 細胞性リンパ腫の一種である未分化大細胞型リンパ腫に焦点を当てて検討する。

3. 研究の方法

概要

未分化大細胞型リンパ腫 (Anaplastic large cell lymphoma, 以下 ALCL) 18 例について、ホルマリン固定パラフィン検体を用いて nCounter 法による遺伝子発現解析と Phenocycler によるシングルセル単位の空間解析を施行する。最も一般的な T 細胞性リンパ腫である末梢性 T 細胞型リンパ腫、分類不能型 (peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, 以下 PTCL-NOS) 68 例を対照群に用いる。

nCounter 法による遺伝子発現解析

次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析は膨大なデータを解析できる一方で、一般的な患者検体の多くを占めるホルマリン固定パラフィン包埋検体ではゲノム DNA や RNA が断片化されているため安定した解析が困難であった。nCounter (Nanostring Technologies, WA, U.S.A) は PCR による増幅なしで遺伝子発現の定量解析が可能であり、ホルマリン固定パラフィン包埋検体由来の RNA でも再現性が高く、低発現量の遺伝子も計測できることが特徴である。本研究では T 細胞性リンパ腫のホルマリン固定パラフィン包埋検体の切片から RNA を抽出し、がん免疫関連の遺伝子パネルである Pancancer Immune Profiling Panel を用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。

Phenocycler によるシングルセル解析

遺伝子発現解析は網羅的な解析が可能である一方で、がん全体の遺伝子発現を平均して数値化するため、個々の細胞の発現の差や位置情報までは分からない。特に T 細胞性リンパ腫はがん細胞自体が T 細胞由来であるため、がん免疫関連の遺伝子発現が正常 T 細胞由来かがん細胞由来か区別することが難しい。そのため、nCounter による遺伝子解析のみでは T 細胞性リンパ腫の免疫微小環境を十分に捉えきれないと予測される。そのため、本研究では細胞単位で網羅的空間解析を行うシングルセル解析を組み合わせる。

計画当初は研究協力施設の Hyperion imaging system (FLUIDIGM 社) を用いて解析を進める予定であったが、条件設定に難渋したこと、自施設に同系統の設備である Phenocycler (旧: Codex) (AKOYA Bioscience, CA, U.S.A) が導入されたことから Phenocycler での解析に変更した。Phenocycler は多重蛍光染色を利用した画像解析システムであり、シングルセル単位の空間解析が可能である。nCounter で抽出された特徴的な遺伝子群のコードするタンパクについて、発現する細胞の種類、周囲の細胞との位置関係、各細胞間の相互作用を可視化することができる。

4. 研究成果

nCounter による遺伝子発現解析

18 例の ALCL について Pancancer Immune Profiling Panel を用いた遺伝子発現データを取得し、過去に nCounter 解析が行われた PTCL-NOS 68 例の遺伝子発現と比較した。その結果、ALCL では PTCL-NOS よりも有意に CD47 ($p < 0.0001$), HAVCR2 ($p < 0.0001$), CD163 ($p < 0.0001$) の発現が高値であった (図 1)。

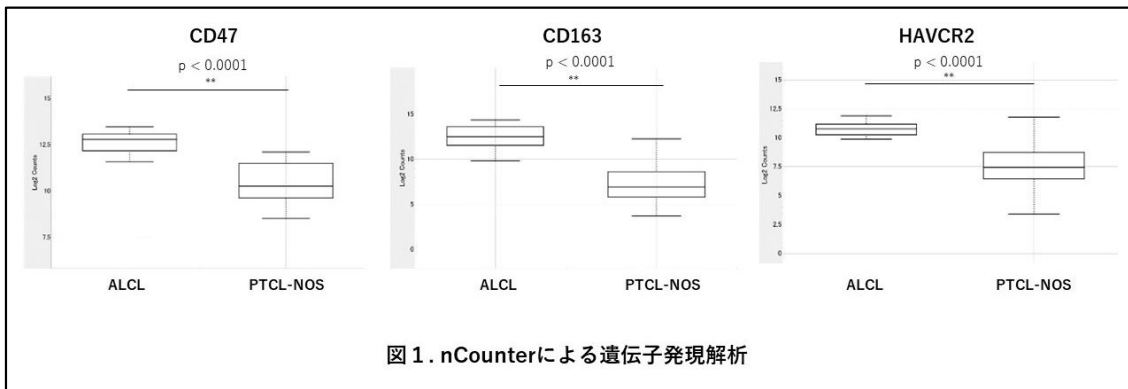


図 1. nCounterによる遺伝子発現解析

免疫染色によるタンパク発現の検討

nCounter で発現上昇がみられた遺伝子について、タンパク発現がみられるかどうか免疫染色で確認した(図 2)。結果、CD47 は腫瘍細胞に発現がみられ、ALCL は PTCL-NOS と比較して有意に CD47 の高発現がみられた ($p < 0.0001$)。CD47 と結合する SIRP についても免疫染色で検討したが、SIRP は間質細胞に陽性であり、ALCL は SIRP 陽性細胞数が有意に高値であった ($p < 0.0001$)。CD163 は間質のマクローファージに陽性であり、ALCL は PTCL-NOS と比較して有意に CD163 陽性細胞の数が多かった ($p < 0.0001$)。また、HAVCR2 については腫瘍細胞と間質細胞の双方に発現がみられた。ALCL は PTCL-NOS と比較して有意に腫瘍細胞の HAVCR2 発現率が高く、間質の HAVCR2 陽性細胞数も多く認められた ($p < 0.0001$)。

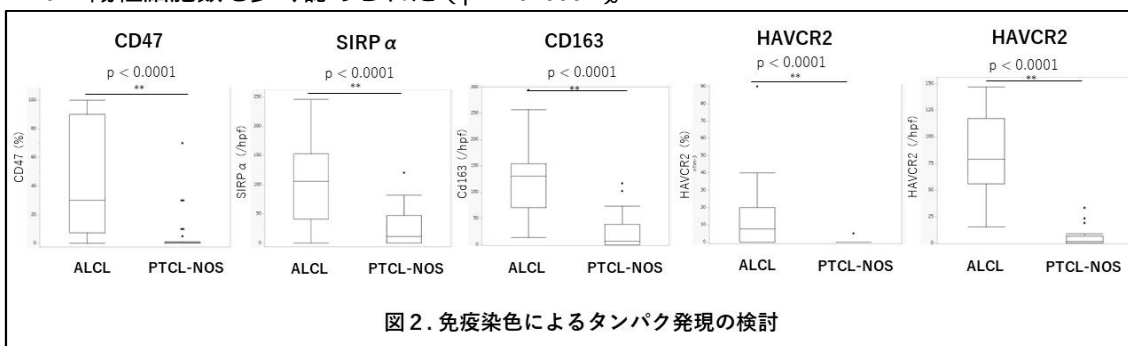


図 2. 免疫染色によるタンパク発現の検討

Phenocycler によるシングルセル解析

Phenocycler によるシングルセル解析を行うにあたり、CD47, SIRP, CD163, HAVCR2 を含むがん免疫に関連するタンパク約 40 種類のパネル作成を計画した。解析用の専用バーコードを抗体にコンジュゲートし、条件設定を行った。初期は条件設定に難渋したが、本報告書作成時点で約 80%の抗体について条件設定が終了し、ALCL のマーカーである CD30, CD47, SIRP の 3 種で予備実験を行った。解析ソフトである Qu-path と Cytomap による細胞間距離の解析を行ったところ、CD30, CD47, SIRP の 3 つのマーカーは陽性細胞間の距離が他の細胞間と比較して有意に近く、ALCL において腫瘍細胞の CD47 と間質細胞の SIRP の相互作用が重要であることが示唆された。今後残り 20%の抗体の条件設定を進め、リンパ腫のがん免疫パネルによる詳細な解析を行う予定である。

まとめ

nCounter による遺伝子解析と免疫染色、Phenocycler でのシングルセル解析の結果、ALCL において腫瘍細胞が発現する CD47 と間質細胞が発現する SIRP の相互作用が重要であることが示された。CD47 と SIRP は "Don't eat me" signal を構成し、CD47 を発現するがん細胞が SIRP を発現するマクローファージから逃れるがんの免疫逃避機構の一つである。本研究で ALCL の CD47 と SIRP の重要性が明らかになり、ALCL の治療戦略において有用な知見となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Mai Takeuchi, Hiroaki Miyoshi Kazutaka Nakashima, et al	4. 巻 99
2. 論文標題 Comprehensive immunohistochemical analysis of immune checkpoint molecules in adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1093-1098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-020-03967-x	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 Ryo Kazama, Hiroaki Miyoshi, Mai Takeuchi, et al	4. 巻 111
2. 論文標題 Combination of CD47 and signal-regulatory protein- constituting the "don't eat me signal" is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2608-2619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14437	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 Eriko Yanagida, Hiroaki Miyoshi, Mai Takeuchi, et al	4. 巻 38
2. 論文標題 Clinicopathological analysis of immunohistochemical expression of CD47 and SIRP in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 680-688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hon.2768	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 Kyohei Yamada, Hiroaki Miyoshi, Noriaki Yoshida, Joji Shimono, Kensaku Sato, Kazutaka Nakashima, Mai Takeuchi	4. 巻 34
2. 論文標題 Human T-cell lymphotropic virus HBZ and tax mRNA expression are associated with specific clinicopathological features in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 314-326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41379-020-00654-0	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内真衣
2. 発表標題 成人T細胞白血病・リンパ腫における免疫チェックポイント分子の網羅的検索
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------