

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16380

研究課題名（和文）肺癌に対するがんワクチン開発に向けた、がん抗原に関する基盤データの取得

研究課題名（英文）Acquisition of basic data on cancer antigens for the development of vaccine therapies for lung cancer.

研究代表者

小室 裕康 (Komuro, Hiroyasu)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40839122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では肺癌検体3例から新鮮分離がん細胞を採取し、そこからCD8+T細胞を分離しSingle cell解析を用いてT細胞のRNA発現とT細胞受容体(TCR)遺伝子を解析した。一方で同3例の腫瘍細胞からDNA・RNAを抽出し、AIを用いてがん抗原を予測した。双方の情報を合わせることで、腫瘍特異的なT細胞集団とがん抗原を同定した。

ENTPD1 (CD39), PDCD1 (PD1), HAVCR2 (TIM3)といった疲弊化マーカーを発現したT細胞集団のTCR 49種が検証され、9種ががん抗原との反応を示し、腫瘍特異的な反応を示す集団であると推定された。がん抗原は7種で反応が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌に対する個別化がんワクチン開発の際に、腫瘍反応性CD8+T細胞が認識するがん抗原に優先順位をつけることができれば、より効果的なワクチン療法を提案できる可能性がある。がん抗原の候補として遺伝子変異由来のネオ抗原とがん・精巢抗原 (KK-LC-1) を含めて検討しており、TCRとがん抗原のペアで反応性を検証できたことで、抗原ごとの反応性の違いを検証することができた。これはがん抗原の順位づけの一助となる可能性があり、将来の肺癌に対するがんワクチンを開発する上で重要な情報となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, freshly isolated cancer cells were collected from three lung cancer specimens, from which CD8+T cells were isolated and analyzed for T cell RNA expression and T cell receptor (TCR) genes using single cell analysis. On the other hand, DNA and RNA were extracted from the tumor cells of the same three cases, and cancer antigens were predicted using AI. By combining both information, tumor-specific T cell populations, and cancer antigens were identified. 49 TCRs in the T cell cluster expressing exhaustion markers such as ENTPD1 (CD39), PDCD1 (PD1), and HAVCR2 (TIM3) were validated, and 9 TCRs were found to react with cancer antigens, suggesting that it was a tumor-specific cluster. Seven cancer antigens were confirmed to be reactive.

研究分野：腫瘍免疫学、呼吸器外科学

キーワード：がん・精巢抗原 エキソームシーケンス RNAシーケンス TIL RT-PCR法 Single Cell解析 発現差解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内に存在する様々な T 細胞の中で、腫瘍に特異的に反応する T 細胞のマーカーは明らかにされていなかったが、CD103⁺CD39⁺CD8⁺T 細胞が腫瘍内に浸潤する腫瘍反応性の T 細胞として認識され始めた。頭頸部癌において CD103⁺CD39⁺CD8⁺T 細胞が腫瘍内に多く存在するほど、予後が良好であることが示されている (Duhon et al, Nat. Commun, 2018)。しかし、肺癌ではこのような解析はされていなかった。

これまでヒトで同定されたがん抗原は、遺伝子変異由来のネオ抗原、ウイルス抗原、がん・精巣抗原等の腫瘍特異性の高い抗原と、分化抗原、過剰発現抗原などの腫瘍特異性の低い抗原に分類される。肺癌においては、免疫チェックポイント阻害剤の奏効率が遺伝子変異の多寡と相関するという報告から、遺伝子変異由来のネオ抗原が免疫系の標的となっている可能性が高い。一方で、EGFR 変異陽性でネオ抗原が少ない肺癌においても、がん・精巣 (CT) 抗原の発現とそれに対する液性免疫応答が強い症例では免疫チェックポイント阻害剤の奏効率が高いことが示されている (Ohue et al, J Thorac Oncol, 2019)。従って、腫瘍浸潤リンパ球中の腫瘍反応性の T 細胞が認識するがん抗原はどのような抗原か、例えばネオ抗原とがん・精巣抗原が混在しているのか等ははまだ明らかではない。

2. 研究の目的

手術で切除された肺癌検体から、新鮮分離がん細胞の解析、TIL の培養、がん細胞株の樹立等を行い、腫瘍反応性 T 細胞が認識するがん抗原を患者個々のレベルで検討し、将来の肺癌に対する個別化がんワクチン開発に向けた基盤となるデータを取得することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

肺癌検体中の腫瘍浸潤性 T 細胞のうち、腫瘍特異的な T 細胞集団の特徴を同定するために、Single cell RNA sequence を使用した (図 1)。外科的に切除された 3 例の肺癌検体から、Cell sorter を使用し CD3⁺CD8⁺T 細胞を Cell sorting し、CD8⁺T 細胞に着目して scRNA-seq および scTCR-seq を行った。Cell Ranger によって作成された RNA 発現データを Seurat (R package) で解析した。Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) により次元削減し、RNA 発現プロファイルによってクラスタリングを行い、T 細胞を分類した。各クラスターにドミナントな TCR 遺伝子を人工合成し、Jurkat 細胞に導入して予測抗原ペプチドに対する反応性を検討した。抗原ペプチドは、それぞれの症例の DNA および RNA シーケンスデータから人工知能によって予測されたネオ抗原ペプチドと癌/精巣抗原である KK-LC-1 由来ペプチドを用いた。

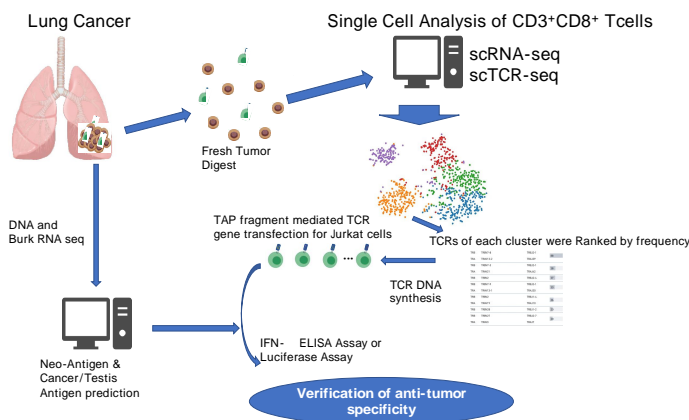


図 1: 研究方法概要

4. 研究成果

合計 6,998 個の CD8⁺T 細胞を解析し、遺伝子発現プロファイルに従って 10 のクラスターに分割した (図 2)。ENTPD1 (CD39) の発現および PDCD1 (PD-1) や HAVCR2 (Tim-3) などの疲弊化マーカー遺伝子の発現を特徴とする Tex (exhausted T cell) クラスターと、TCF7 や CCR7 といった未分化マーカー遺伝子の発現を特徴とする Tm (memory T cell) クラスターに属する細胞が大部分を占めていた。合計 1,597 種類の TCR クロノタイプのうち、180 種類のクロノタイプが Tex クラスターに含まれ、

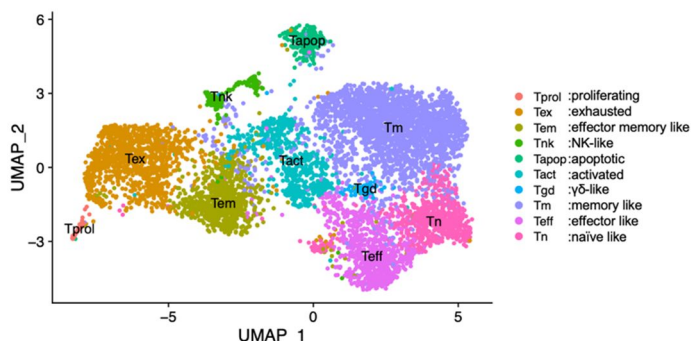


図 2: 6,998 細胞の UMAP

clonalityが高かった。

1例(Pt.1)では各クラスターでドミナントなTCRについて予測抗原との反応性を検討し、Texクラスターにドミナントに存在する19種類のTCRのうち4種類(21%)で抗原ペプチドとの反応性を認めた。一方、その他のクラスターにドミナントな合計52種類のTCRからは反応を認めなかった(図3A)。そこで、残り2例(Pt.2, Pt.3)ではTexクラスターに着目し、それぞれ発現頻度上位15番目までのTCR(合計30種類のTCR クロノタイプ)について検証を行い、5種類(16.7%)のTCRがネオ抗原とKK-LC-1に特異的な反応を示した(図3B,C)。

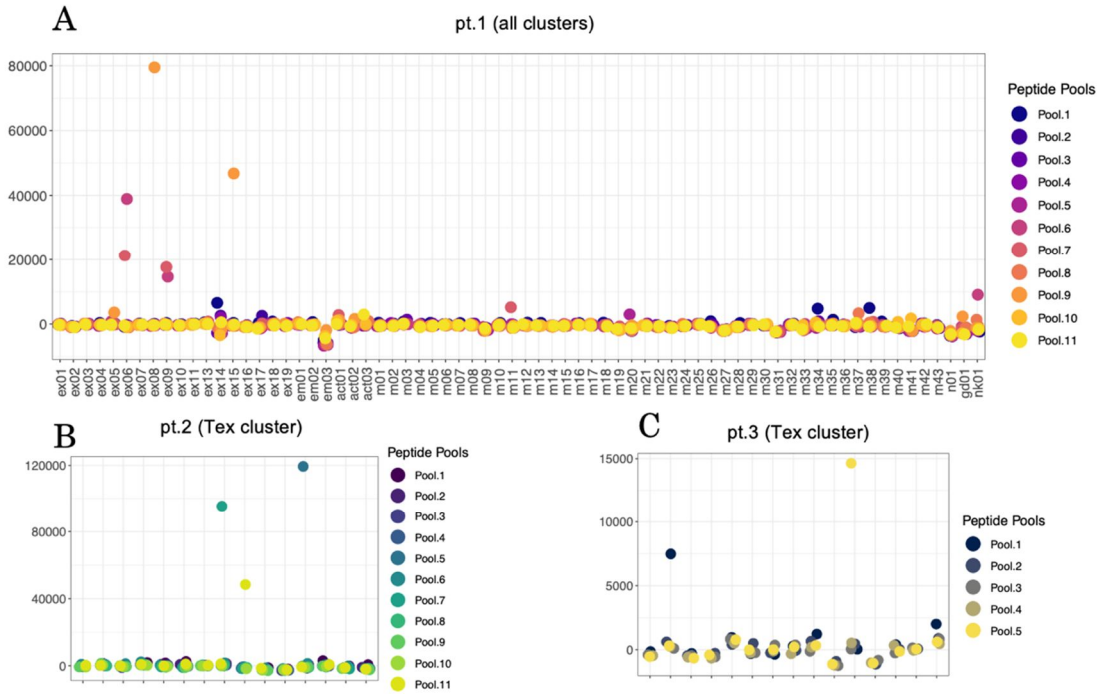


図3: TCRの反応性

がん抗原の候補として遺伝子変異由来のネオ抗原とがん・精巣抗原(KK-LC-1)を含めて検討しており、ネオ抗原で反応性がやや高い傾向が示された(図4)。TCRとがん抗原のペアで反応性を検証できたことで、抗原ごとの反応性の違いを検証することができた。これはがん抗原の順位づけの一助となる可能性があり、将来の肺癌に対するがんワクチンを開発する上で重要な情報となる。

非小細胞肺癌において、Texクラスターは腫瘍抗原を認識する腫瘍特異的なT細胞集団である可能性がある。CD8⁺T細胞 scRNA/TCR-seqによるTex-TCRの検出は、肺癌患者の腫瘍抗原を同定する有用なアプローチと考えられた。

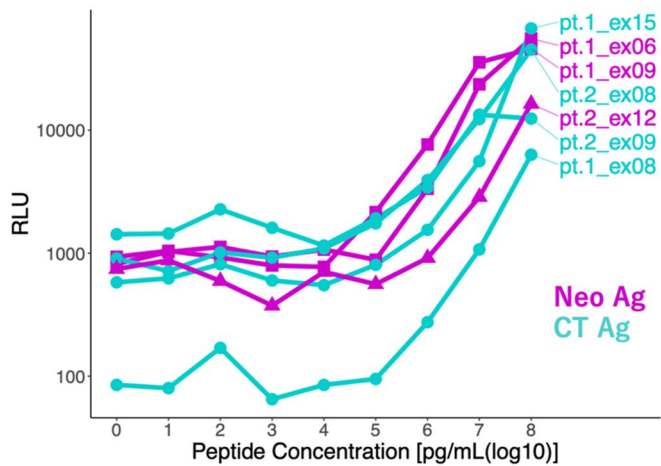


図4: ネオ抗原(Neo Ag)と癌精巣抗原(CT Ag)の反応性の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小室 裕康
2. 発表標題 HLA-B15肺癌患者におけるKK-LC-1に対する新規TCRの検討
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小室 裕康
2. 発表標題 Single Cell解析を活用した非小細胞性肺癌におけるネオ抗原および癌・精巢抗原特異的なCD8+T細胞集団の同定
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小室 裕康
2. 発表標題 肺癌におけるネオ抗原および癌・精巢抗原特異的なCD8+T細胞集団と腫瘍抗原同定のためのSingle Cell解析を活用したアプローチ
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小室 裕康
2. 発表標題 非小細胞性肺癌におけるネオ抗原および癌・精巢抗原特異的なCD8+T細胞集団と腫瘍抗原同定のためのSingle Cell解析を活用したアプローチ
3. 学会等名 第19回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小室 裕康
2. 発表標題 HLA-B1501 肺癌患者における KK-LC-1 に対するTCR 鎖の解析
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小室 裕康, 松下 博和, 中島 裕理, 横瀬 智之, 吉田 正行, 藤井 誠志, 小俣 渡, 関根 茂樹, 高野 忠夫, 羽賀 敏博, 長尾 俊孝, 中村 直哉, 山本 浩平, 加留部 謙之輔, 黒瀬 顕, 坂口 涼子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 120
3. 書名 病理と臨床 2022年6月号 (40巻6号)	

1. 著者名 北野 滋久	4. 発行年 2022年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 162
3. 書名 必修! 腫瘍免疫学	

〔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