

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16660

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを用いた悪性神経膠腫新規バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of new biomarkers for malignant glioma using next-generation sequencer

研究代表者

嵯峨 伊佐子（Saga, Isako）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：50445219

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）：悪性神経膠腫を対象とし、次世代シーケンシング法による網羅的なT細胞受容体レパトア解析を行い、増幅しているT細胞受容体を定性的、定量的に解析した。その結果、悪性神経膠腫においてT細胞受容体の多様性が低下していることが明らかとなった。また、同一症例であっても、治療の有無、初発か再発かによって、発現するT細胞受容体の種類、Clonalityに変化が生じることが分かった。さらに、臨床経過の良いものにDiversity Indexが低い傾向が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非常に予後の悪い悪性神経膠腫において、免疫療法は期待される治療法のひとつである。多くのがん種で、有効な成績が報告される中、悪性神経膠腫では必ずしも良好な結果は得られていなかった。T細胞受容体レパトア解析での多様性の低下、特定T細胞の活性化は、複数のがん種で予後との相関を示すとの報告が見られる。本研究での成果は、中枢神経系という特殊な免疫環境における悪性神経膠腫でも、他がん種同様の反応が期待できることを示している。本研究によって、悪性神経膠腫の免疫機構の一端が解明されることにより、ペプチドワクチンをはじめとした免疫療法の改良、開発の足掛かりとなる。

研究成果の概要（英文）：We have applied comprehensive T cell receptor repertoire analysis of malignant gliomas using next-generation sequencing to analyze amplifying T cell receptors qualitatively and quantitatively. As a result, it has become clear that the diversity of T cell receptors is reduced in malignant glioma. It was also found that, even in the same case, the type of T cell receptor expressed and the clonality change due to the presence or absence of treatment and recurrence. Furthermore, it was suggested that the diversity index tended to be lower for better clinical course.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：T細胞受容体 グリオーマ 脳腫瘍 腫瘍免疫 レパトア解析

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は、ヒトの中枢神経系から発生するもっとも頻度の高い腫瘍のひとつで、手術、放射線療法、化学療法などの集学的治療の進歩にもかかわらず、平均生存期間約 15 ヶ月の非常に予後の悪い腫瘍である。従来とは異なる新たな治療標的の必要性が強く求められている中、免疫療法は最も期待される治療法であった。

(1) 抗腫瘍免疫における抑制系阻害治療の出現

抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の出現は、これまでの免疫療法のあり方を大きく変えた。PD-1 受容体は、免疫の担い手である活性化 T 細胞の表面に発現し、PD-1 のリガンドである PD-L1 は、通常抗原提示細胞の表面上に発現する。この PD-1/PD-L1 シグナル伝達経路が T 細胞応答の抑制として働き、免疫チェックポイント機構を担うといわれている。一方、PD-L1 は腫瘍細胞の細胞表面上にも強く発現しており、活性化 T 細胞の PD-1 に結合し活動を抑制することが、腫瘍の免疫機構に対する抵抗性として問題となる。この免疫チェックポイントを阻害することで、T 細胞が再活性化し、著明な抗腫瘍効果をもたらすことが明らかとなった。

(2) 中枢神経系の抗腫瘍免疫における免疫反応増強治療の重要性

腫瘍の免疫抵抗性を克服する治療が見出されたことにより、悪性神経膠腫の免疫治療においては、免疫反応を増強する治療法の重要性が増した。多くのがん種において、免疫療法が有効な成績が報告されている一方、悪性神経膠腫に対する治療成績は必ずしも良好とはいえない。これは、中枢神経系という特殊な免疫環境が関与しており、従来の抗腫瘍メカニズムが作用しない所以だと考えられている。我々が取り組んできた血管内皮細胞増殖因子受容体 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor : VEGFR) をターゲットとした VEGFR1/2 ペプチドワクチン療法は、悪性神経膠腫の脳腫瘍幹細胞およびそれらを取り巻く微小環境の維持に必要な腫瘍新生血管に対する免疫療法である。これは、抗腫瘍免疫を増強させる免疫療法の代表的な方法のひとつである。さらに、従来のターゲットに加え、新たな腫瘍特異的抗原に対して抗腫瘍反応を刺激する免疫療法が開発されることの意味は大きい。

(3) 次世代シーケンシング法による T 細胞受容体レパトア解析

次世代シーケンシング法を用いた解析により、組織の T 細胞受容体 (T Cell Receptor : TCR) 情報を取得し、多様性を調べることができる。濾胞性リンパ腫、卵巣がん等など、一部のがん種においては、TCR が本来もつはずの多様性が低下し、Clonality が増加、すなわち、特定の T 細胞が活性化していることが報告されている。TCR 多様性の低下は免疫機構の賦活化を意味し、予後との相関を示すとの報告も見られる。また、TCR 情報から、がんワクチンの標的となる特異的免疫エピトープのスクリーニングにつながる。子宮頸がん、肺がん、胃がん、大腸がんなどでは、腫瘍特異的抗原の発現が高いものほど免疫療法が有用であり、腫瘍再発率と相関しているという報告もみられる。腫瘍の遺伝子変異が多い症例は免疫チェックポイント阻害剤に対する治療効果が高いともいわれ、腫瘍細胞表面に特異的腫瘍抗原を多く発現しているほど、免疫反応が活発に起こるためと考えられている。

以上より、悪性神経膠腫に対する免疫治療を考えるうえで、腫瘍細胞表面にどのような抗原が発現し、どのような T 細胞が反応しているかを知ることの重要性がうかがえる。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫は、最も悪性度の高い腫瘍のひとつである。免疫抑制チェックポイント阻害の出現により、免疫療法は有望な治療法として注目されているが、特殊な免疫機構を有する中枢神経系における効果は未だに解明されていない。次世代シーケンシング法を用いた網羅的な T 細胞受容体レパトア解析によって、これまで未解明であった悪性神経膠腫の抗腫瘍免疫における活性化 T 細胞の特徴、種類を、定性的・定量的に調べ、より効果の期待できる症例の選択、治療効果判定、有効性予測の免疫バイオマーカーの開発を行うことが、本研究の目的である。脳という特殊な免疫環境下での免疫療法の可能性を広げ、症例ごとのオーダーメイド治療の実現に貢献する。

3. 研究の方法

本研究では、摘出された神経膠腫検体 (グレード 2, 3, 4) を用いて、次世代シーケンシング法に基づく TCR レパトア解析を行う。T 細胞は、細胞表面に存在する TCR によって抗原を認識し、ひとつの T 細胞は一種類の TCR によって一種類の抗原を認識する。TCR は α 鎖と β

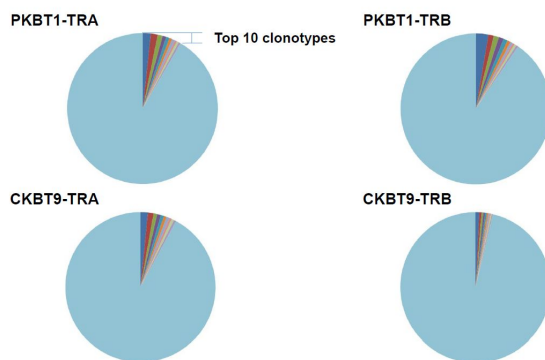
鎖の二量体で構成されるが、それぞれのゲノム配列は V、(D)、J 遺伝子がランダムに選択されることで、α 鎖と β 鎖の遺伝子配列が決定する。抗原が結合する領域は CDR3 と呼ばれ、VDJ 遺伝子が結合する際に、塩基の挿入・欠失が起こり、さらなるバリエーションの増加により、10 の 15 乗～18 乗もの多様性を実現する。このように、T 細胞は、さまざまな抗原に反応する必要性から、人の体の中で最も多様性が高いといわれている。TCR レパトア解析では、生体内でリアルタイムに変化する T 細胞の特徴・数を、網羅的・定性的・定量的かつ高精度に調べることが可能である。各グレードの腫瘍において、モノクローナルな T 細胞の増幅が見られるかを検証した。さらに、保存された脳腫瘍検体の CD4, CD8, FOXP3 発現レベルの解析を行い、さらに臨床的有効性との関連を検証した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンシング法による TCR レパトア解析

当施設において治療された神経膠腫 30 例の腫瘍検体を対象とし、次世代シーケンシング法による網羅的な T 細胞受容体 (T Cell Receptor : TCR) レパトア解析を行った。グレード 4 (膠芽腫) 15 例、グレード 3 (退形成性星細胞腫、退形成性乏突起膠腫、退形成性乏突起星細胞腫) 7 例とし、コントロールとしてグレード 2 (星細胞腫、乏突起膠腫、乏突起星細胞腫) 8 例をおいた。RNA 抽出、cDNA 合成・遺伝子増幅から解析アルゴリズムに基づき遺伝子配列を決定し、V-J 遺伝子情報、CDR3 配列、V-J 遺伝子および CDR3 配列の各組み合わせのリード数などの情報から、多様性指数のデータ解析を行った。

TCR sequencing using brain tissue - Clonal diversity



腫瘍で増幅する T 細胞プロファイルの比較

増幅している TCR を定性的、定量的に解析し、アルゴリズムに基づいて Clonality, Diversity Index を算出したところ、悪性神経膠腫において TCR の多様性が低下していることが明らかとなった。

臨床経過との相関性の解析

再発、予後、化学療法治療歴などの臨床経過との関連を検討するため、4 検体の追加検査を行った。同一症例であっても、治療の有無、再発によって、発現する TCR の種類、Clonality に変化が生じることが分かった。また、臨床経過の良いものに Diversity Index が低い傾向が示唆された。

(2) 腫瘍組織の T 細胞のサブタイプ解析

腫瘍組織への腫瘍浸潤性リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes : TIL) の浸潤が高いほど、予後良好であるとの報告があるが、T 細胞のサブタイプによって異なり、腫瘍内の CD8+ T 細胞が多いと良好、制御性 T 細胞が多いと予後不良といわれている。腫瘍検体の免疫染色 (CD4, CD8, FOXP3) では、上記より得られた Diversity Index との明らかな関連性は認められなかった。CD4+, CD8+, CD4+CD25+制御性 T 細胞の割合が、臨床経過と相関しているかに関しては、さらなる検討が要される。

TCR レパトア解析での TCR 多様性の低下、特定 T 細胞の活性化は、複数のがん種で予後との相関を示すとの報告が見られる。本研究での結果は、特殊な免疫環境における脳腫瘍でも、他がん種同様の反応が期待できることを示している。本研究によって、悪性神経膠腫の免疫機構の一端が解明されることにより、ペプチドワクチンをはじめとした免疫療法の改良、開発の足掛かりとなった。

【参考文献】

1. Jang M, et al: Characterization of T cell repertoire of blood, tumor, and ascites in ovarian cancer patients using next generation sequencing. *Oncoimmunology*. 2015;4(11): e1030561.
2. Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka S, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, Saya H. et al: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells: *Neoplasia*.

2011;13(9):784-91.

3. Saga I, et al: Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model. Neuro Oncol. 2014 ;16(8):1048-56.

4. Ueda R, Ohkusu-Tsukada K, Fusaki N, Soeda A, Kawase T, Kawakami Y, Toda M: Identification of HLA-A2-and A24-restricted T-cell epitopes derived from SOX6 expressed in glioma stem cells for immunotherapy. Int J Cancer 2010;126(4):919-29.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

なし

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。