

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16620

研究課題名(和文)新規包括的1細胞解析による腫瘍浸潤T細胞クローン応答の俯瞰図の解明

研究課題名(英文) Investigation of the immune response of the tumor-infiltrating T cells by novel scTCR-seq methods

研究代表者

七野 成之 (Shichino, Shigeyuki)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：70822435

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)：BD Rhapsodyをベースとした独自の正確性の高いscTCR-seq解析手法の確立に成功した。本手法により抗CD4抗体を投与したB16マウス皮下移植腫瘍モデルを解析したところ、遺伝子発現に基づき8つの主要浸潤T細胞subsetが同定された。scTCR-seq情報と所属リンパ節TCR-seq情報のoverlap解析により同定されたoligoclonal/polyclonal T細胞画分のうち、前期疲弊T細胞・後期疲弊T細胞の割合は前者が10%:90%、後者が30%:70%であった。加えて、後者は前者よりも前期疲弊T細胞の表現型に關与する遺伝子を有意に多く発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腫瘍浸潤T細胞のうち、Oligoclonal画分ではなく、Polyclonal画分に分化・増殖ポテンシャルを持つ前期疲弊T細胞が維持されていることが見出された。近年、抗PD-1抗体を投与された皮膚基底細胞癌症例において、後期疲弊T細胞からなる腫瘍浸潤T細胞クローンが治療前後で入れ替わっていることが報告されている。本研究やこれらの報告を鑑みると、当該Polyclonal画分に属するT細胞クローンが、より反応性が高いOligoclonal画分のT細胞クローンを置換し、新たな腫瘍反応性クローンとして機能し、チェックポイント阻害剤はそれを増強しているという可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in establishing a unique and highly accurate scTCR-seq analysis method based on BD Rhapsody. When a B16 mouse subcutaneous tumor model administered with anti-CD4 antibody was analyzed by this method, eight major infiltrating T cell subsets were identified based on gene expression. Of the oligoclonal / polyclonal T cell fractions identified by overlapping analysis of scTCR-seq information and regional lymph node TCR-seq information, the proportion of early-exhausted T cells and late-exhausted T cells was 10%: 90% for the former and the latter. Was 30%: 70%. In addition, the latter expressed significantly more genes involved in the phenotype of early-exhausted T cells than the former.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞応答 TCRレパトワ解析 single-cell TCR-seq single-cell RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

遺伝子再構成による TCR の多様性創造と、抗原提示細胞に提示された抗原と TCR の親和性に基づく T 細胞の clonal expansion は、獲得免疫応答のドグマの一つである。しかしながら、多様な T 細胞クローンを細胞機能と結びつける方法は、現状個々の TCR の組を遺伝子導入して機能を評価し、認識抗原を同定するなど極めて限られている。そのため、上記ドグマの基盤、すなわち生体内での同一クローン中での機能的多様性の有無、クローンサイズや抗原受容体配列と細胞機能との関連性、炎症病態進展に伴い誘導されるクローン特異的な機能的 signature の有無、相互作用する T 細胞サブセットのクローンとその機能的 signature の有無といった物事の理解は現状全く進んでいなかった。そこで本研究では、数千-数万の T 細胞が持つ抗原受容体と、数千の遺伝子発現情報を同時解析する新たな手法の開発を通じ、がん免疫において多様な抗原特異的 T 細胞の応答を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

代表者らは、担がんマウスモデルにおける TCRレパトア解析を通じて、がん免疫療法の治療効果に寄与する TCRレパトアの特徴を明らかにすることを目指してきた。同一個体の腫瘍と所属リンパ節の両方に存在する T 細胞クローンのレパトア（腫瘍-所属リンパ節間重複レパトア、図1）には、腫瘍反応性 T 細胞クローンが濃縮されると考えられる。代表者らは、免疫チェックポイント阻害剤を投与された担がんマウスでは、腫瘍-所属リンパ節間重複レパトアが増大すること、および、この増大は限られたクローンの増殖ではなく、重複レパトアに含まれる多様なクローンの増殖 (clonal spreading) によることを明らかとした。しかし、このような腫瘍-所属リンパ節間重複レパトアの clonal spreading に寄与するクローンが、腫瘍内でどのような免疫学的表現型を示すのかは不明であった。

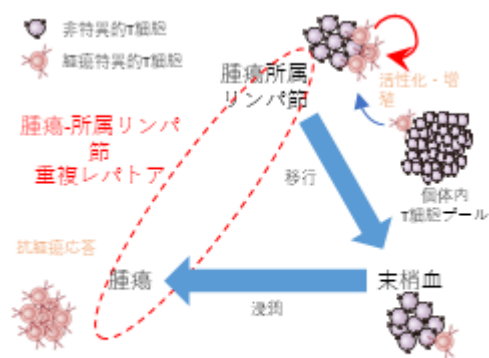


図1. 腫瘍反応性T細胞の生体内動態

腫瘍中に浸潤している数千種の T 細胞クローンの表現型を網羅的に解析するためには、それぞれのクローンに属する各 T 細胞の遺伝子発現情報を 1 細胞レベルで取得し、その結果をクローンレベルで統合する必要がある (single cell transcriptome / TCRseq: SCT/scTCRseq)。そのためには、腫瘍浸潤 T 細胞の TCR 配列情報と遺伝子発現情報とを 1 細胞レベルで取得することが求められる。BD Rhapsody System を用いた Mouse VDJ CDR3 Library Preparation Protocol は、1 回あたり最大 20,000 細胞から、TCR 配列情報と免疫応答に関与する約 400 遺伝子の発現プロファイルを、1 細胞レベルで同時に取得することを可能にする。代表者らは、上記プロトコルを用い、免疫チェックポイント治療を施した担がんモデルマウスの腫瘍-所属リンパ節間重複クローンの表現型を網羅的に解析することを目的に、以下の実験を行った。

3. 研究の方法

抗 CD4 抗体治療を施した B16F10 メラノーマ担がんマウスの腫瘍から腫瘍浸潤白血球を回収し、セルソーターを用いて CD8+ T 細胞を精製した。その後、BD Rhapsody System を用い、BD 社の Mouse VDJ CDR3 Library Preparation Protocol に準じてシングルセル解析用のライブラリを作成した。

次世代シーケンサーを用いたシーケンスの効率を向上させるため、上記プロトコルに対して以下のような改善を行った。

- Pronex beads を用いて PCR 増幅産物を精製することで、最終ライブラリ中の TCR 遺伝子産物の純度を高めることに成功した。これにより、少ないリード数で効率的に TCR 配列をシーケンスすることが可能となった。
- TCR 配列の増幅に用いるプライマーの設計箇所を調節することで、TCR 配列の同定に必要なシーケンスリード長を 100bp 程度短縮することに成功した。これにより、より低コストで single cell TCRseq 解析を行うことが可能となった。

これらに加えて、上記プロトコルで得られた TCR 配列情報が、同じ細胞の遺伝子発現情報と正しく対応しているのか検証することも試みた。そのために、B16F10 メラノーマ担がんマウス由来の腫瘍浸潤 T 細胞 (B16 TIL) に、既知の TCR 配列を導入したトランスジェニックマウス (Pmel-1 mouse) に由来する T 細胞 (Pmel-1 T cell) を spike-in した。B16 TIL と Pmel-1 T cell は異なる Hash tag で標識することにより区別できるため、B16 TIL のうち Pmel-1 TCR を持つ細胞の割合を算出することで、TCR 配列情報の

対応が誤っている (ミスペアリング) 細胞の割合を評価した。

上記のように腫瘍浸潤 T 細胞に対して SCT/scTCRseq 解析を行うのと同時に、同一マウスの腫瘍所属リンパ節から CD8⁺ CD44^{high} 活性化 T 細胞を精製し、その TCR レパトアを解析した (Bulk TCRseq)。この結果をもとに、scTCRseq で検出された腫瘍浸潤 T 細胞クローンから、腫瘍-所属リンパ節間重複クローンを同定した (図2)。これら重複クローンのうち、腫瘍内で頻度が上位 10 位以内であるものを重複レパトアの oligoclonal 画分に属するクローン、頻度が 11 位以下であるものを重複レパトアの polyclonal 画分に属するクローンと定義した。oligoclonal 画分に属するクローンと polyclonal 画分に属するクローンの表現型を比較することを通じて、clonal spreading に寄与するクローンの腫瘍内での表現型を明らかにすることを試みた。

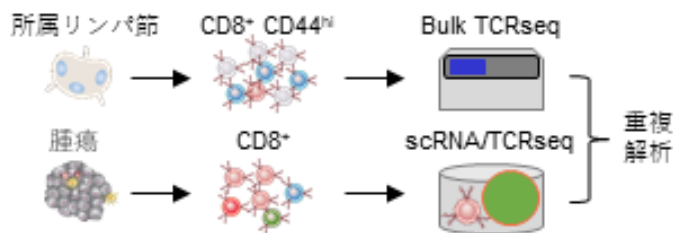


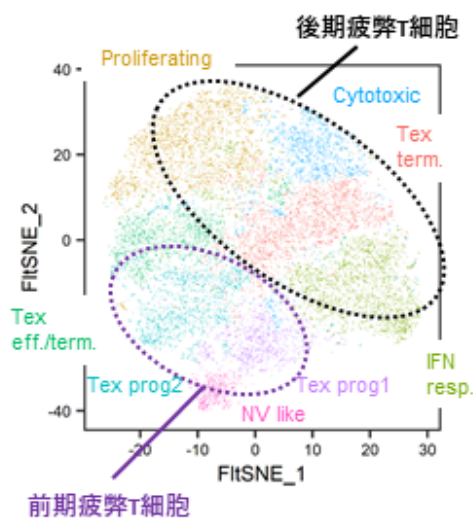
図2 bulk TCR-seq/scTCR-seq による重複クローンの同定

4. 研究成果

上記手法を用いて SCT/scTCRseq を行い、11,831 細胞の腫瘍浸潤 T 細胞の TCR 配列情報と遺伝子発現情報を解析した。TCR は a 鎖と b 鎖のペアからなり、一般に scTCRseq の性能は a 鎖と b 鎖のペアで配列を得られた細胞の割合 (ペアリング効率) によって評価される。本研究では、解析した細胞の 85.7%にあたる 10,135 細胞で a 鎖と b 鎖のペアの情報を検出できており、このペアリング効率は先行研究よりも高いものであった。加えて、B16 TIL のうち Pmel-1 TCR とミスペアリングしていた細胞の割合は 0.1%以下であり、上記プロトコルの高い正確性を確認することができた。

腫瘍反応性の CD8⁺ T 細胞は、免疫抑制性の腫瘍微小環境の中で疲弊 (exhausted) し、反応性と長期的生存能と徐々に失っていく。近年の先行研究により、これら疲弊 T 細胞の中には、分裂能と腫瘍内での持続能を持つ前期疲弊 T 細胞 (Progenitor exhausted T cell) と、腫瘍反応性は高いものの腫瘍内で長期生存することができない後期疲弊 T 細胞 (Terminally exhausted T cell) が存在していることが明らかになっている。加えて、免疫チェックポイント阻害剤が治療効果を発揮するには前期疲弊 T 細胞が必要であることが示されている。

図3. 遺伝子発現情報に基づく B16 TIL の分類



SCT/scTCR 解析を行った 11,831 細胞を遺伝子発現プロファイルに基づいてクラスタリングしたところ、これら B16 TIL を 8 つのクラスターに分類することができた。その中には、腫瘍反応性が低いと考えられるナイーブ様 T 細胞クラスターに加え、前述の前期疲弊 T 細胞クラスター、後期疲弊 T 細胞クラスターが含まれていた (図 3)。

次に、前述 (3. 研究の方法) のようにして同定された oligoclonal / polyclonal 画分に属するクローンにおける、ナイーブ様 T 細胞、前期疲弊 T 細胞、後期疲弊 T 細胞の割合を計算した (次項図4)。その結果、Oligoclonal 画分の約 90%、Polyclonal 画分の約 70%は後期疲弊 T 細胞によって構成されており、これら腫瘍-所属リンパ節間重複クローンが腫瘍反応性を持つことが示唆された。加えて、Polyclonal 画分に占める前期疲弊 T 細胞の割合は約 30%と、Oligoclonal 画分中の前期疲弊 T 細胞の割合よりも高かった。加えて、Polyclonal 画分は前期疲弊 T 細胞の表現型に関与する遺伝子 (Tcf7, Xcl1, Il7r など) を Oligoclonal 画分よりも有意に多く発現していた。

以上の結果は、腫瘍-所属リンパ節間重複レパトアの Oligoclonal 画分の大部分が腫瘍反応性の高い後期疲弊 T 細胞から構成されている一方、Polyclonal 画分には分化・増殖ポテンシャルを持つ前期疲弊 T 細胞が維持されていることを示すものである。近年、抗 PD-1 抗体を投与された皮膚基底細胞癌症例において、後期疲弊 T 細胞からなる腫瘍浸潤 T 細胞クローンが治療前後で入れ替わっていることが報告されている。この報告と当研究の結果を考えると、等研究で見出された腫瘍-所属リンパ節間重複レパトアの Polyclonal 画分に属するクローンが、より反応性が高い Oligoclonal 画分のクローンを置

換し、新たな腫瘍反応性クローンとして機能することが示唆される。加えて、チェックポイント阻害剤は、疲弊が進行したクローンの”バックアップ要員”となる多様な腫瘍反応性クローンを動員すること (clonal spreading) を通じて、強力かつ持続的な抗腫瘍効果をもたらしている、という可能性が考えられる。

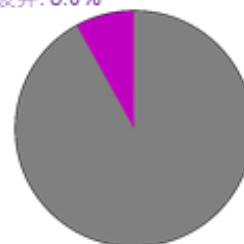
図4. 重複レパトアのOligoclonal/Polyclonal画分中の前期/後期疲弊T細胞の割合

Oligoclonal 画分



ナイーブ様: 0.1%

前期疲弊: 8.0%

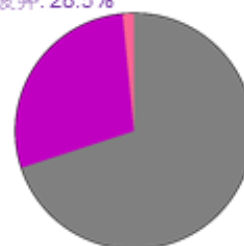


Polyclonal 画分



ナイーブ様: 1.5%

前期疲弊: 28.5%



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 Chen Chang-Yu, Ueha Satoshi, Ishiwata Yoshio, Yokochi Shoji, Yang De, Oppenheim Joost J., Ogiwara Haru, Shichino Shigeyuki, Deshimaru Shungo, Shand Francis H. W., Shibayama Shiro, Matsushima Kouji	4. 巻 7
2. 論文標題 Combined treatment with HMGN1 and anti-CD4 depleting antibody reverses T cell exhaustion and exerts robust anti-tumor effects in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 21-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40425-019-0503-6	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 Shitara K, Ueha S, Shichino S, Aoki H, Ogiwara H, Nakatsura T, Suzuki T, Shimomura M, Yoshikawa T, Shoda K, Kitano S, Yamashita M, Nakayama T, Sato A, Kuroda S, Wakabayashi M, Nomura S, Yokochi S, Ito S, Matsushima K, Doi T	4. 巻 7
2. 論文標題 First-in-human phase 1 study of IT1208, a defucosylated humanized anti-CD4 depleting antibody, in patients with advanced solid tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 195-195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40425-019-0677-y	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 Hiroyasu Aoki, Satoshi Ueha, Yoshiaki Nakamura, Shigeyuki Shichino, Hiromichi Nakajima, Manami Shimomura, Akihiro Sato, Tetsuya Nakatsura, Takayuki Yoshino, Kouji Matsushima	4. 巻 1
2. 論文標題 Greater extent of blood-tumor TCR repertoire overlap is associated with favorable clinical responses to PD-1 blockade.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14975	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 Hiroyasu Aoki, Satoshi Ueha, Shigeyuki Shichino, Haru Ogiwara, Kohei Shitara, Manami Shimomura, Toshihiro Suzuki, Tetsuya Nakatsura, Makiko Yamashita, Shigehisa Kitano, Sakiko Kuroda, Masashi Wakabayashi, Makoto Kurachi, Satoru Ito, Toshihiko Doi, Kouji Matsushima	4. 巻 1
2. 論文標題 Transient Depletion of CD4+ Cells Induces Remodeling of the TCR Repertoire in Gastrointestinal Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer immunology research	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-20-0989	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shitara K, Ueha S, Shichino S, Aoki H, Ogiwara H, Nakatsura T, Suzuki T, Shimomura M, Yoshikawa T, Shoda K, Kitano S, Yamashita M, Nakayama T, Sato A, Kuroda S, Wakabayashi M, Nomura S, Yokochi S, Ito S, Matsushima K, Doi T
2. 発表標題 Anti CD4 Monoclonal Antibody Immunotherapy Exerts an Antitumor Effect by Replacing the T Cell Receptor Repertoire in Patients with Gastrointestinal Cancer.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木寛泰, 上羽悟史, 七野成之, 荻原春, 設樂紘平, 中面哲也, 鈴木利宙, 下村真菜美, 北野滋久, 山下万貴子, 伊藤哲, 土井俊彦, 松島綱治
2. 発表標題 6. 担がん患者における抗CD4抗体投与後のTCRレパトア変動の解析
3. 学会等名 第5回骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木寛泰, 上羽悟史, 七野成之, 荻原春, 設樂紘平, 中面哲也, 鈴木利宙, 下村真菜美, 北野滋久, 山下万貴子, 伊藤哲, 土井俊彦, 松島綱治
2. 発表標題 担がん患者における抗CD4抗体投与後のTCRレパトア変動
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木寛泰, 上羽悟史, 中村能章, 七野成之, 中島裕理, 下村真菜美, 中面哲也, 吉野孝之, 松島綱治
2. 発表標題 "末梢血-腫瘍間で重複するTCRレパトアは、消化器癌患者に対するPD-1阻害療法の 有効性を予測しうる"
3. 学会等名 第24回日本がん学会学術総会
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
---------	---------