

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18403

研究課題名（和文）TCRレパトア解析を用いた膠芽腫特異抗原の探索と新規免疫療法への応用

研究課題名（英文）Search for glioblastoma-specific antigens using TCR repertoire analysis and application to novel immunotherapy

研究代表者

嵯峨 伊佐子（SAGA, Isako）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員

研究者番号：50445219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、免疫応答を励起する免疫療法として、がんペプチドワクチンの臨床研究を行った。膠芽腫腫瘍検体を対象とした次世代T細胞受容体（T Cell Receptor：TCR）レパトア解析によって、腫瘍細胞表面に発現する抗原を解析し、膠芽腫腫瘍検体でTCRの多様性が低下していることを発見した。さらに、膠芽腫浸潤T細胞のサブセット解析を加え、臨床背景との相関を評価したところ、臨床経過の良好な症例に Diversity Indexが低い傾向が示唆されること示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、外科的療法、放射線療法、化学療法、分子標的療法などの集学的治療をもってしても、平均生存期間は15カ月に満たない、非常に予後の悪い腫瘍である。免疫治療は、膠芽腫治療において期待される治療法であり、そこで得られた新たな知見は社会的にも大きなインパクトを持つ。膠芽腫検体でのTCR多様性の低下は、これまでになされた複数のがん種での報告と一致する。これは、特殊な免疫環境における脳腫瘍でも、免疫療法が有効たり得る可能性を示している。本研究で解明した膠芽腫の免疫機構の一端は、免疫治療の新たな治療ターゲットおよびバイオマーカーの開発へと繋がる成果である。

研究成果の概要（英文）：We conducted a clinical study of a cancer peptide vaccine as an immunotherapy that stimulates the immune response. We analyzed antigens expressed on the surface of glioblastoma cells using next-generation T Cell Receptor (TCR) repertoire analysis. As a result, it has become clear that TCR diversity was reduced in glioblastoma tumor specimens. Furthermore, a subset analysis of glioblastoma infiltrating T cells was added and the correlation with the clinical background was evaluated, and it was shown that the diversity index tends to be low in cases with a good 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 免疫療法 レパトア解析

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、外科的療法、放射線療法、化学療法、分子標的療法などの集学的治療の進歩にもかかわらず、平均生存期間は未だ 15 ヶ月に満たない、非常に予後の悪い腫瘍である。決定的な治療法の確立が急がれる中、第 5 の治療法として注目を集めたのが、免疫療法である。

悪性腫瘍に対する免疫療法には、悪性腫瘍が免疫系による攻撃を回避する能力を抑制する「ブレーキを外す」治療法と、悪性腫瘍に対する免疫反応を増強する「アクセルを踏む」治療法のふたつの方向性が示されている。

前者の代表として脚光を浴びたのが、免疫チェックポイント阻害剤(抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体など)である。非小細胞肺癌、腎細胞がん、ホジキンリンパ腫、頭頸部がん、胃がん、悪性胸膜中皮腫、メルケル細胞がんなど、多くのがん種で劇的治療効果が報告された。

後者の「アクセルを踏む」免疫治療において注目を集めたのが、養子免疫細胞療法のひとつであるキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)発現 T 細胞(CAR-T)療法である。急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、縦隔原発 B 細胞リンパ腫などの血液がんでは効果が認められ、固形がんに対する応用にも期待が高まりつつあった。

多くのがん種に対して免疫治療の有効性が相次いで報告される中、膠芽腫に対する臨床試験の結果は、必ずしも芳しいものばかりではなかった。進行膠芽腫に対する抗 PD-1 抗体の臨床試験では、既存治療と比較し、全生存期間に有意差を得られないとの結果が報告された(Checkmate 143 試験)。また、膠芽腫細胞で過剰発現している EGFRvIII を標的とした CAR-T 療法の臨床試験でも、腫瘍縮小効果や全生存期間の延長は示されなかった。

膠芽腫に対する免疫療法の困難さの要因として、中枢神経系という特殊な免疫環境の関与が指摘されている。膠芽腫をはじめとする頭蓋内腫瘍では、T 細胞の多くが S1P1 という分子を失い、骨髄に隔離されることで、頭蓋内は免疫不全状態になるとの報告もある。他方、有意差がつかないまでも、免疫療法によって脳内の免疫応答が引き起こされ、長期生存の症例が報告されている。

我々が以前より注力してきた、脳腫瘍に対するがんペプチドワクチンの臨床研究でも、同様の壁の存在を感じてきた。がんペプチドワクチンは、「アクセルを踏む」免疫療法のひとつである。我々は、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高発現する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、悪性神経膠腫細胞に発現する複数のがん抗原ペプチドを用いたカクテルワクチン療法、化学療法によって免疫応答が抑制される以前の初発悪性神経膠腫、進行性神経線維腫症 2 型、再発・進行性の難治性脳腫瘍(血管周皮腫、血管芽腫、WHO grade II or III の髄膜腫、脊索腫、上衣腫)などの経験を経て、知見を集積してきた。

これらの研究を通して得た知見より、症例による免疫療法に対する感受性に違いがあることがわかってきた。腫瘍の遺伝子変異が多い症例は免疫療法に対する治療効果が高いことが知られており、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る。

そこで着目したのが、腫瘍細胞表面に発現する抗原と浸潤する T 細胞の解析である。T 細胞は、細胞表面に存在する T 細胞受容体(T Cell Receptor: 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に対応する。TCR は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の二量体で構成され、ゲノム上では多数の V (variable)、D (diversity)、J (joining)および C (constant) の遺伝子断片がランダムに選ばれて結合するが、抗原が結合する領域は CDR3 と呼ばれ、VDJ 間で遺伝子再構成が起こる過程で、V-D 間および D-J 間に塩基の挿入・欠失が起こり(N 領域)、遺伝子の多様性が高まる。TCR は、人の体の中で最も多様性が高く、その数は 10 の 15 乗 ~ 18 乗にのぼるといわれている。卵巣がん、濾胞性リンパ腫、肝細胞がんなどいくつかのがん種の TCR レパトア解析において、TCR の多様性が低下し、特定の T 細胞が活性化していることが報告されている。一方、膠芽腫を対象とした報告はほとんどなく、免疫療法の治療効果判定、新たな治療標的の探索のため、重要な知見を得られる可能性があると考えた。

膠芽腫に対する免疫療法では、ほかのがん種以上に、中枢神経系という免疫寛容な環境、免疫療法に有効な患者群の判別・治療効果判定のためのバイオマーカーの存在、治療の相乗効果のための免疫併用療法の重要性を痛感してきたことが、本研究を考案した大きな動機である。

## 2. 研究の目的

集学的治療法をもってしても未だ決定的な治療法のない膠芽腫において、免疫療法は最も期待される治療法のひとつである。中枢神経系という免疫寛容な環境ゆえに、より強力な治療の相乗効果を得るための免疫併用療法は、膠芽腫の免疫療法を考えるうえで不可欠である。特殊な免疫機構を有する中枢神経系において、免疫療法の治療効果判定および予後予測因子としてのバイオマーカーの開発、免疫併用療法の重要性がより注目されている。次世代 TCR レパトア解析によって、膠芽腫の抗腫瘍免疫における T 細胞の特徴・種類を解明し、新たな治療標的の探索を可能とする。さらに、新規免疫療法の応用へとつなげることが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 浸潤 T 細胞のサブタイプ解析

当施設で治療された手術症例(30例)より得た神経膠腫切片における、腫瘍浸潤性リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes : TIL) を、HE 染色、免疫染色 (CD3, CD4, CD8, CD45RO, FOXP3) で評価する。CD4+, CD8+, CD4+CD25+ 制御性 T 細胞の割合と PFS (progression-free survival), OS (Overall Survival) などの臨床学的背景との相関を、単変量・多変量解析にて比較する。

| Pathological diagnosis                        | Grade | N         | Primary N | Recurrent N | Untreated N | Treated N |
|---|-------|-----------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| Astrocytoma                                   | 2     | 1         | 1         | 0           | 1           | 0         |
| Oligodendroglioma                             | 2     | 3         | 3         | 0           | 2           | 1         |
| Oligoastrocytoma                              | 2     | 4         | 2         | 2           | 3           | 1         |
| Anaplastic oligodendroglioma                  | 3     | 5         | 2         | 3           | 3           | 2         |
| Anaplastic oligoastrocytoma                   | 3     | 2         | 2         | 0           | 2           | 0         |
| Glioma, probably high grade                   | 4     | 1         | 0         | 1           | 0           | 1         |
| Glioblastoma                                  | 4     | 11        | 7         | 4           | 5           | 6         |
| Glioblastoma with oligodendroglioma component | 4     | 3         | 2         | 1           | 0           | 3         |
| <b>Total</b>                                  |       | <b>30</b> | <b>19</b> | <b>11</b>   | <b>16</b>   | <b>14</b> |

#### (2) 次世代シーケンシング法による TCR レパトア解析

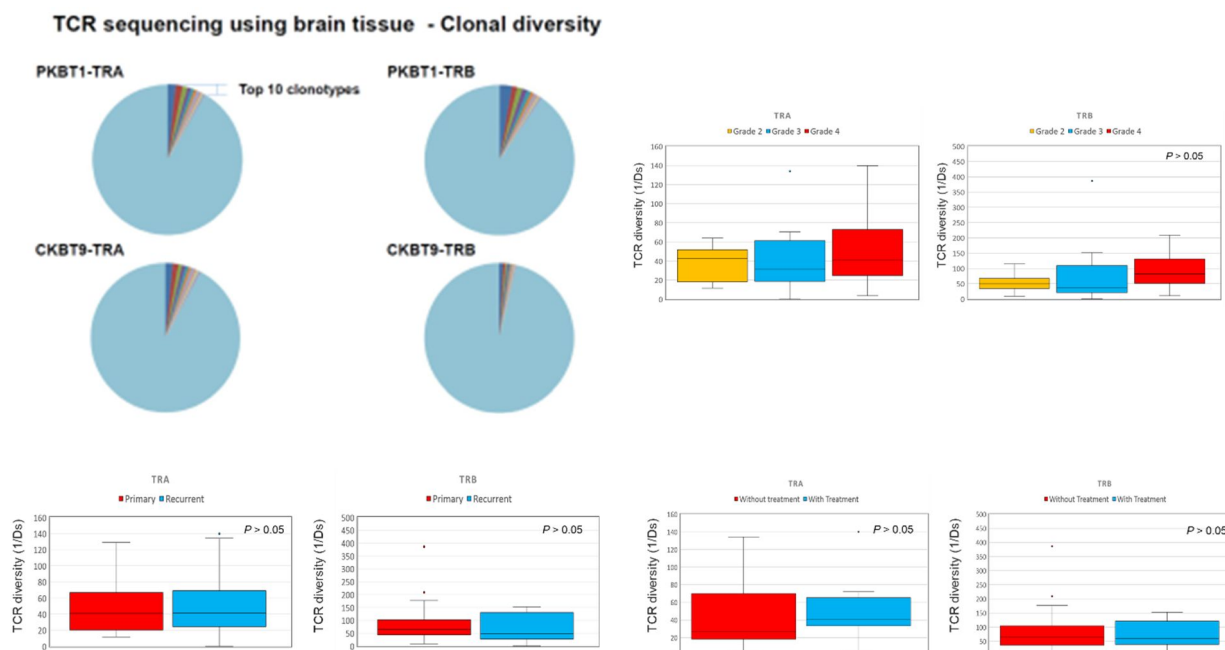
次世代 TCR レパトア解析では、RNA 抽出、cDNA 合成・遺伝子増幅から解析アルゴリズムに基づき遺伝子配列を決定する。V-J 遺伝子情報、CDR3 配列、V-J 遺伝子、CDR3 配列の各組み合わせのリード数などの情報から、多様性指数のデータ解析を行う。神経膠腫細胞を対象とした TCR レパトア解析の結果を検証、治療標的となる膠芽腫抗原特異的 T 細胞の探索を行う。

### 4. 研究成果

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、グレード 2 (星細胞腫、乏突起膠腫、乏突起星細胞腫) 8 例の解析を行った。さらに、再発、予後、化学放射線療法治療歴などの臨床経過との関連を検討するため、うち摘出時期の異なる同一症例 4 検体を個別に検証した。

次世代シーケンシング法による TCR レパトア解析にて、増幅している TCR を定性・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、グレード間での有意差は得られなかったものの、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。膠芽腫においては、Primary, Secondary での差は認められなかった。また、化学療法あるいは放射線療法の有無では、発現する TCR の種類に変化が生じていた。一方、同一症例の初発と再発後と比較すると、再発後の方がより Clonality が高い傾向にあった。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。

悪性度の高い膠芽腫腫瘍検体で TCR の多様性がより低下し、臨床経過の良好な症例に Diversity Index が低い傾向が示唆される結果は、複数のがん種での報告と一致している。特殊な免疫環境における脳腫瘍でも、免疫療法が有効たり得る可能性を示している。本研究で解明した膠芽腫の免疫機構の一端は、免疫療法の新たな治療ターゲットおよびバイオマーカーの開発へと繋がる成果といえる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|