

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22573

研究課題名（和文）新規単一細胞解析技術を用いたがん免疫微小環境の解明

研究課題名（英文）Elucidation of tumor immune microenvironment using novel single-cell technology

研究代表者

片岡 圭亮（Kataoka, Keisuke）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90631383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、様々ながん免疫を標的とする薬剤が開発されているが、それらの標的となる細胞集団や分子学的特徴は十分に明らかではない。最近、我々は10XGenomics技術を応用して、多数の表面マーカー解析と網羅的トランスクリプトーム解析・レパトア解析を単一細胞レベルで同時に実現できる技術を開発した（CITE-seq）。本研究では、この新規単一細胞解析技術を用いて、マウス腫瘍モデルにおける免疫チェックポイント分子やその阻害剤が、がん免疫微小環境に与える影響を網羅的に解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、申請者が開発した革新的な単一細胞解析技術をがん免疫分野に初めて応用する試みである。今後、臨床検体におけるがん免疫微小環境や、それらの相互作用の解析など様々な研究への応用が可能であり、がん免疫研究の進展に大いに貢献できることが期待される。さらに、本研究性からに基づいて、がん免疫を標的とする薬剤の最適な組み合わせが検討されたり、バイオマーカー開発が進んだりすることが期待され、今後のがん免疫を標的とした治療戦略の改善に資すると予想される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, several agents targeting immune checkpoint molecules have been developed. However, the effect of such immune checkpoints and their inhibitors on tumor microenvironment remains unclear. Recently, we have developed a novel single-cell technology, which enables us to investigate transcriptome, many surface markers, and T-cell and B-cell receptor repertoires at the same single cell. Here, using this novel single-cell technology, we have investigated the role of immune checkpoint molecules and the effect of their inhibitors in mouse tumor models.

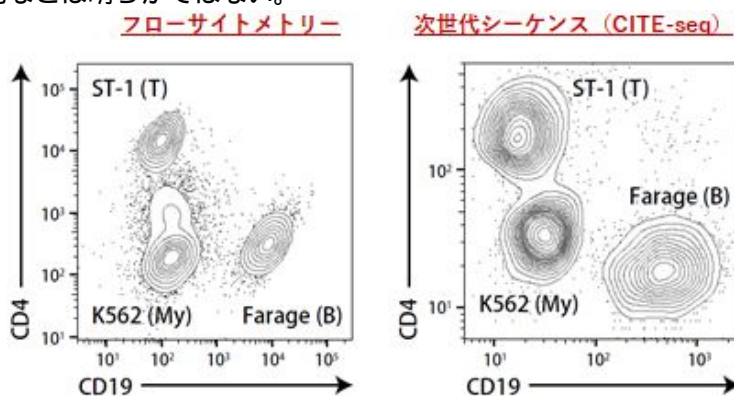
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん免疫 シングルセル解析

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法の登場により、がん免疫療法が脚光を浴びているが、その奏効率は未だ十分ではなく、がん免疫を標的とした治療戦略の改善が望まれている (SL Topalian, Cancer Cell, 2015)。最近では、これらの抗体以外に、抗 LAG-3 抗体、抗 4-1BB アゴニスト抗体など様々な腫瘍免疫を標的とする薬剤が開発されている。これらの薬剤の標的となる細胞集団はそれぞれ異なると考えられるが、これまでにほとんど理解が得られていない。これらの免疫療法の活性において、遺伝子変異により生じたネオアンチゲンや高発現しているオンコアンチゲンが重要であることが知られているが、このような抗原を特異的に認識する T 細胞の表面マーカーや遺伝子発現プロファイルなどの特徴、免疫チェックポイント阻害薬投与時の変化などは明らかではない。

がん免疫微小環境の解析方法として、マスマイトメトリー (CyTOF) による表面マーカー解析や、10X Genomics 技術を用いた単一細胞トランスクリプトーム解析が導入されつつある。これらの方法には一長一短があるため、両者を同時に解析することが最適であるが、それを実現するのは困難であった。最近、CITE-seq と呼ばれる、オリゴヌクレオチドを結合させた抗体を用いることで、表面マーカーの検出を次世代シーケンスで定量可能なリードアウトで代替することを可能とする技術が開発された (M Stoeckius, Nat Method, 2017)。我々は既に本技術を導入し、10X Genomics 技術を応用して、多数の表面マーカー解析と網羅的トランスクリプトーム解析・レパトア解析を単一細胞レベルで同時に実現できる技術とその解析パイプラインを開発している (未発表)。



図：フローサイトメトリーと次世代シーケンスによる表面マーカー解析の比較

### 2. 研究の目的

本研究においては、この新規に開発した単一細胞解析技術を用いて、マウス腫瘍モデルにおいて免疫チェックポイント分子やその阻害剤が免疫微小環境に与える影響の網羅的な解析を試みる。さらに、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体、抗 LAG-3 抗体などの様々な種類の腫瘍免疫を標的とする薬剤やその併用を試すことにより、それぞれの薬剤の及ぼす効果の類似点や相違点を明らかにし、最適な組み合わせを同定することを目指す。さらに、ネオアンチゲン由来ペプチドと MHC 分子の複合体の多量体にオリゴヌクレオチドを結合させて、CITE-seq により検出することにより、ネオアンチゲン特異的 T 細胞を単一細胞レベルで解析することを目指す。これらを通して、がん免疫微小環境を細胞・分子レベルで詳細に解明し、免疫チェックポイント阻害療法の改善の糸口を見出すことを目標とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス腫瘍モデルにおける免疫チェックポイント分子やその阻害剤の効果評価系の構築

まず、がん免疫のマウス腫瘍モデルの頻繁に用いられている MC38、CT26、A20 などの細胞株を同系マウスに皮下移植し、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体、抗 LAG-3 抗体、抗 4-1BB アゴニスト抗体、あるいはその組み合わせを投与して、コントロール抗体と比較した。腫瘍径、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の割合などの評価を行い、実験条件を決定した。

#### (2) 新規単一細胞解析技術を用いたマウス腫瘍モデルにおける免疫チェックポイント阻害剤

## の効果の検証

腫瘍組織から浸潤した免疫担当細胞を分離し、骨髄系、T細胞系、B細胞系などに特徴的な表面マーカーを認識する30~40種類のオリゴヌクレオチドを結合させた抗体で染色した後、10X Genomicsの単一細胞トランスクリプトーム解析およびB細胞やT細胞に対する単一細胞レパトア解析によりライブラリ作成を行い、次世代シーケンサーにより解読した(CITE-seq)。得られたデータはCell Ranger アルゴリズムによりマッピング、遺伝子発現カウント、B・T細胞受容体カウントを行った後に、遺伝子発現、表面マーカー、および、レパトア解析を実施した(既に本解析パイプラインも作成済み)。特に、免疫チェックポイント阻害剤により変化する細胞集団を同定し、同一の単一細胞で遺伝子発現や表面マーカー、B・T細胞受容体多様性を評価することで、分子レベルでの特徴を明らかにすることを旨とした。

### (3) ネオアンチゲン・MHC複合体マルチマーを用いた腫瘍特異的T細胞の単一細胞解析

MC38細胞株ではReps1やAdpgk、Dpagt1遺伝子変異がネオアンチゲンとして機能すること(M Yadav, 2014, Nature)、CT26細胞株ではgp70抗原がオンコアンチゲンとして作用すること(JE Slansky, 2000, Immunity)が報告されている。本研究では、これらの抗原を含むペプチドとMHCの複合体マルチマーを作成し、上記の実験系において腫瘍抗原特異的なT細胞を検出可能か確認した。さらに、このペプチド・MHCマルチマーにDNAバーコードとして機能するオリゴヌクレオチドを結合させたdCODEデキストラマー(Immudex)を作成した。そのデキストラマーの性能評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マウス腫瘍モデルにおける免疫チェックポイント分子やその阻害剤の効果評価系の構築

マウス腫瘍モデルにおける免疫チェックポイント阻害剤の効果評価系の構築を行った。まず、がん免疫のマウス腫瘍モデルの頻りに用いられているMC38、CT26、A20などの細胞株を同系マウスに皮下移植し、抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体、抗LAG-3抗体、抗4-1BBアゴニスト抗体、あるいは、その組み合わせを投与して、コントロール抗体と比較した。腫瘍径、CD4およびCD8陽性T細胞の割合などの評価を行い、最適な実験条件を決定することが出来た。

### (2) 新規単一細胞解析技術を用いたマウス腫瘍モデルにおける免疫チェックポイント阻害剤の効果の検証

マウス腫瘍モデルにおける各免疫チェックポイントを標的とした場合の微小環境の変化をCITE-seqで解析することに焦点を当てた。まず、MC38、CT26、A20などの細胞株にPD-L1を始めとする複数の免疫チェックポイントが発現していることを確認した。さらに、各免疫チェックポイントを標的とした場合に微小環境の変化をフローサイトメトリーや病理学的検索、およびCITE-seqで評価した結果、CD8 T細胞の割合や表現型の変化が確認されただけでなく、それ以外の様々な免疫微小環境に存在する細胞や分子の変化を起こしていることが見出された。さらに、同じ細胞株を用いて一部の免疫チェックポイントを遺伝学的に高発現させた場合に、各免疫チェックポイントを標的とした場合と逆の変化が観察された。現在、この一部の変化の生物学的意義を検証中である。これらの結果は、CITE-seqなどによるシングルセル解析ががん微小環境の強力な解析ツールであることを示唆している。

### (3) ネオアンチゲン・MHC複合体マルチマーを用いた腫瘍特異的T細胞の単一細胞解析

ネオアンチゲン・MHC複合体マルチマーを用いた腫瘍特異的T細胞の単一細胞解析を行った。抗原を含むペプチドとMHCの複合体マルチマーを作成し、上記の実験系において腫瘍抗原特異的なT細胞を検出可能か検討したが、このような細胞は少数であり、シングルセル解析では検出困難なことが判明した。

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 (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
---------	---------