

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22980

研究課題名（和文）シングルセル解析による肉腫浸潤Tリンパ球応答の解明

研究課題名（英文）Immune response of tumor-infiltrating T lymphocytes in sarcoma using single-cell analysis

研究代表者

村田 憲治（MURATA, Kenji）

札幌医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80722454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：粘液炎症性線維芽細胞肉腫の切除片から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を分離し、シングルセル解析を行った。TILの分画はCD8陽性T細胞優位で、上位2つのT細胞受容体（TCR）が40%以上を占めていた。これらを含めたTCRクローナリティーの高いTILは、メモリーマーカーの発現が見られず、一方で疲弊マーカーや活性化マーカー、サイトカイン遺伝子の発現が高い傾向にあり、腫瘍を認識する可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部肉腫（以下、肉腫）はまれな悪性腫瘍だが、化学療法不応例の予後は不良である。肉腫に対する養子免疫療法の適応を広げ奏効率を向上させるためには、新たな肉腫特異抗原とそれに反応する抗腫瘍効果の高いT細胞受容体（TCR）の同定が必要と考えられる。我々は、粘液炎症性線維芽細胞肉腫に浸潤したリンパ球を単細胞レベルで解析し、腫瘍に反応する可能性が高い2種類のTCRを単離した。現在、その認識抗原を探索している。

研究成果の概要（英文）：We isolated tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from a myxoinflammatory fibroblastic sarcoma tissue and performed single-cell analyses of the TILs. CD8+ T cells were dominant in the TILs, and top two T-cell receptors (TCRs) were more than 40% of CD8+ T cells. CD8+ TILs of high TCR clonality did not express memory markers, but highly expressed exhaustion markers, activation makers, and cytokine genes, suggesting that these TCRs might recognize tumors.

研究分野：骨軟部肉腫、腫瘍免疫学

キーワード：骨軟部肉腫 肉腫抗原 T細胞受容体 腫瘍浸潤Tリンパ球 シングルセル解析

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫を代表とする骨軟部肉腫（以下、肉腫）はまれな悪性腫瘍だが、若年者に発症することが多く、特に化学療法不応例の予後は不良である。近年、がん精巢抗原の一つである NY-ESO-1 を標的とした、T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を導入した T 細胞 (TCR-T 細胞) を用いた養子免疫療法が滑膜肉腫で臨床効果をあげており、末期滑膜肉腫の 50%以上に部分効果を示すことが報告されている。しかし、肉腫に発現する特異抗原とそれを認識する TCR 遺伝子の報告は少なく、骨肉腫をはじめとする他の肉腫に対しての TCR-T 細胞療法は確立していない。肉腫に対する養子免疫療法の適応を広げるために、新たな肉腫特異抗原とそれに反応する抗腫瘍効果の高い TCR 遺伝子の同定が必要と考えられる。

悪性黒色腫患者に対する腫瘍浸潤 T リンパ球 (TIL) を用いた養子免疫療法 (TIL 療法) は、持続的な臨床効果をもたらすことが報告されている。一方で、肉腫に対する TIL 療法の臨床試験は行われていない。癌腫と比較して肉腫 TIL に関する研究は乏しく、肉腫に浸潤するリンパ球が少ないことや、一部の肉腫を除いて *ex vivo* で T 細胞を増殖させることが困難であることが原因としてあげられる。しかし、悪性黒色腫 TIL より単離された TCR の多くが腫瘍反応性を示すことから、肉腫 TIL 由来の TCR も肉腫抗原に対して反応性を示す可能性が高い。

## 2. 研究の目的

シングルセル解析プラットフォームを用いて肉腫 TIL の TCR レパトアと遺伝子発現を解析し、肉腫反応性 TCR を単離してその認識抗原を同定することとした。

## 3. 研究の方法

- (1) 外科手術材料の肉腫切除片からセルソーターで TIL (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) を分離し、単細胞レベルでの遺伝子発現解析と TCR 鎖のレパトア解析を行う。CD8<sup>+</sup>4-1BB<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>でクローナリティーの高い上位 3-5 ペアをサブクローニングし、健常人の末梢血 T リンパ球に遺伝子導入して TCR-T 細胞を作成する。
- (2) 腫瘍成分 (CD3<sup>+</sup>D45<sup>-</sup>) から RNA を抽出して cDNA ライブラリーを作製し、同患者の HLA class I を過剰発現させた HEK293T 細胞へ遺伝子導入して標的細胞を作成する。
- (3) TCR-T 細胞と標的細胞を共培養してフローサイトメトリーで CD137(4-1BB) を検出し、TCR が認識する抗原ペプチドの存在と HLA 拘束性を決定する。

## 4. 研究成果

### (1) 粘液炎症性線維芽細胞肉腫組織からの肉腫細胞と TIL の分離

93 歳女性の右前腕に発生した粘液炎症性線維芽細胞肉腫 (ステージ I、FNCLCC 分類 Grade1) を外科的に切除した。セルソーターを用いて TIL 成分 (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) と腫瘍成分 (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) を各々ソーティングし、TIL はシングルセル解析を行い、腫瘍成分は cDNA ライブラリーを作製するために RNA を抽出した (図 1)。

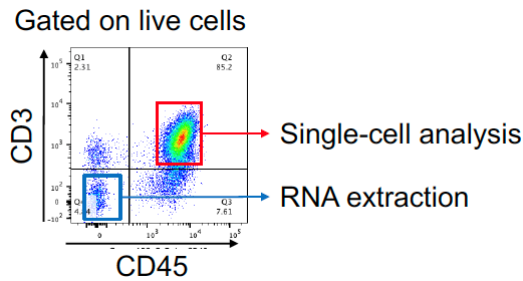


図 1.フローサイトメトリー解析

(2) TIL の単細胞解析

TIL の分画は CD8 陽性 T 細胞優位で、TCR レパトア解析では CD4 陽性 T 細胞 (386 細胞、307 クロノタイプ) は CD8 陽性 T 細胞 (3904 細胞、441 クロノタイプ) よりもポリクローナルであった。CD8 陽性 T 細胞においては上位 2 つの TCR が 40%以上を占めており、クローナリティが極めて高い TIL であることが分かった (図 2)。

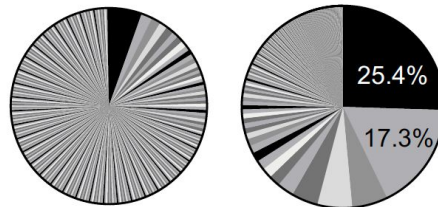


図 2.TCR レパトア解析 (左 : CD4 陽性 T 細胞、右 : CD8 陽性 T 細胞)

CD8 陽性 T 細胞の遺伝子発現パターンをみると、上位 2 つを含めたクローナリティーの高い TCR は、メモリーマーカーの発現が見られず、一方で疲弊マーカーや活性化マーカー、そしてサイトカイン遺伝子の発現が高い傾向にあった (図 3)。これらの TCR は腫瘍を認識する可能性が高いと考えられる。

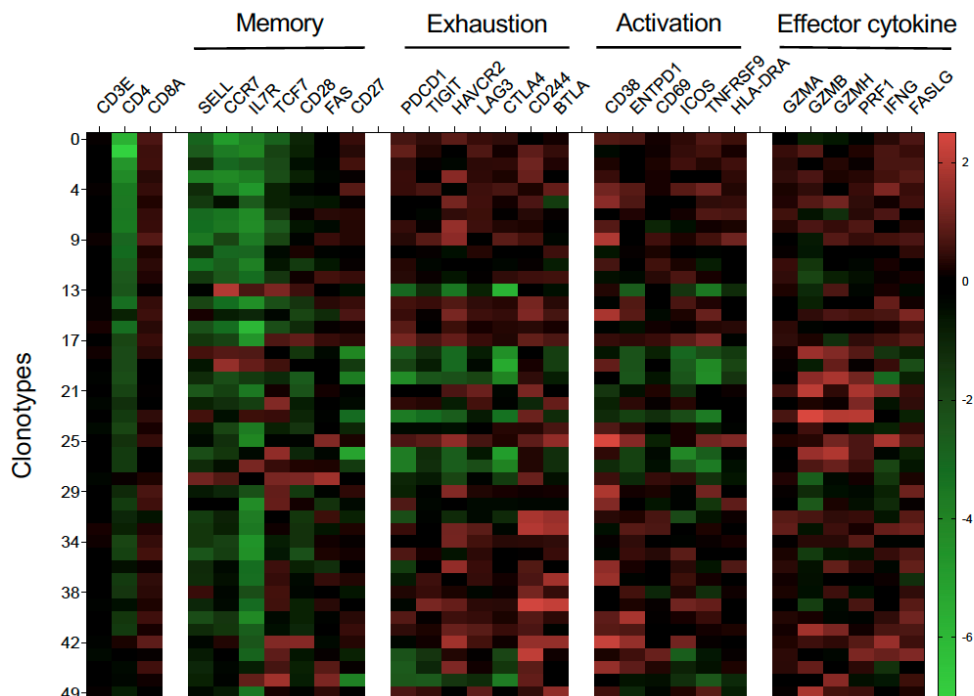


図 3.CD8 陽性 T 細胞の免疫プロファイリング

### (3) TCR-T 細胞の作成

腫瘍への反応を示す可能性が高くクローナリティーが極めて高いクロナタイプ0と1の鎖、鎖そして CD271 ( NGFR ) を自己切断ペプチド P2A でつないだ TCR コンストラクトを作成し、レトロウイルスベクターへサブクローニングした。健常人から採取した末梢血単核球細胞へ遺伝子導入して TCR-T 細胞を作成し、CD271 抗体で TCR の導入を確認したところ、15-30%程度の導入効率が得られた ( 図 4 )

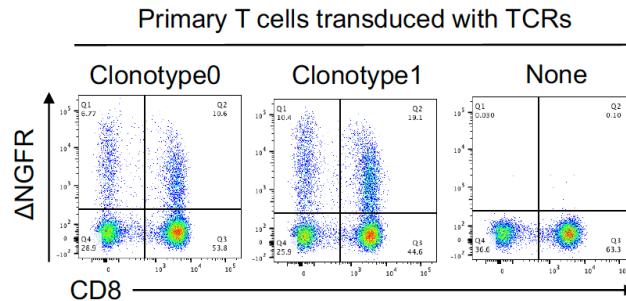


図 4. TCR-T 細胞の作成

### (4) 肉腫 cDNA ライブラリー導入標的細胞の作成

腫瘍成分から抽出した RNA から cDNA ライブラリーを作製し、患者の HLA class I ( 6 種類 ) を各々過剰発現した HEK293T 細胞に導入して肉腫由来ペプチドを HLA 上に提示した標的細胞を作成した。現在、作成した TCR-T 細胞と標的細胞を用いて抗原スクリーニングを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田憲治, 塚原智英, 江森誠人, 鳥越俊彦
2. 発表標題 単細胞解析による軟部肉腫浸潤Tリンパ球応答の解明
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------