

# 研究課題名：神経膠腫におけるネオアンチゲンとがん特異的 T 細胞受容体の同定

愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫制御 TR 分野

任意研修生 岡本貴成（申請者）、ユニット長 村岡大輔、主任研究員 岡村文子、リサーチレジデント 水田亮、分野長 松下博和

京都府立医科大学大学院 医学研究科 脳神経機能再生外科学

講師 高橋義信、助教 谷山市太、助教 小川隆弘、教授 橋本直哉

## 1. 研究の背景・目的

神経膠腫に対するがん免疫療法の効果は未だ限定的である<sup>1)</sup>。本研究の目的は、神経膠腫の中で最も悪性度の高い膠芽腫（GBM）における抗原特異的ながん免疫療法を開発するために、ネオアンチゲンを同定することである。近年、メラノーマにおける腫瘍内 CD8+T 細胞のシングルセル解析で腫瘍特異性が腫瘍内 CD8+T 細胞の表現型を形成することが明らかにされた。つまり、CD8+腫瘍特異的 TIL は腫瘍内微小環境における腫瘍抗原との相互作用により、その表現型は高度疲弊細胞状態（TEX; Exhausted T cell）に著しく偏った<sup>2)</sup>。従って、TEX-TCR 遺伝子を解析・合成して TCR 遺伝子導入 T 細胞を作成し、NGS より予測されたネオアンチゲンとの免疫応答を検証することで、より正確なネオアンチゲン同定システムを確立できると考えられる。今回まずは、シングルセル RNA シーケンス（scRNA-seq）およびシングルセル TCR シーケンス（scTCR-seq）により、GBM における腫瘍抗原特異的 T 細胞の候補の特徴を明らかにし、一方で NGS に基づくネオアンチゲンの予測を行った。

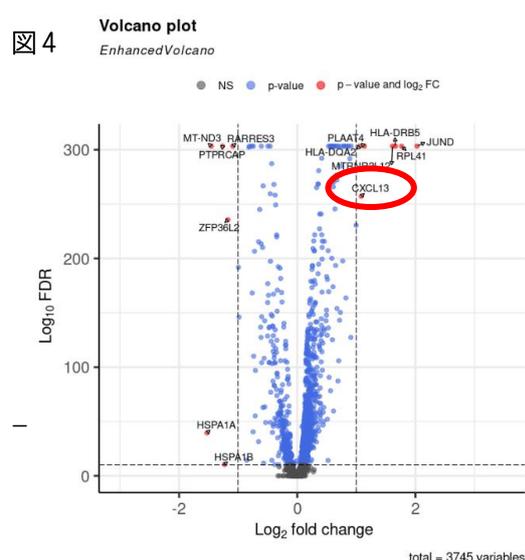
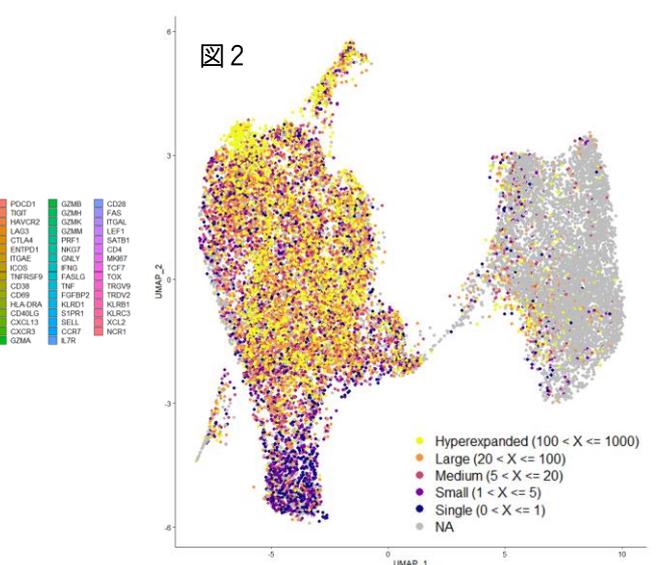
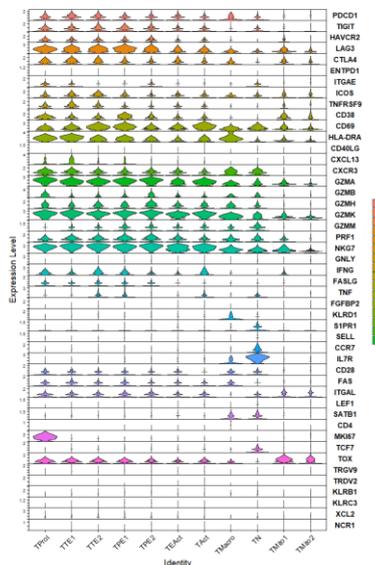
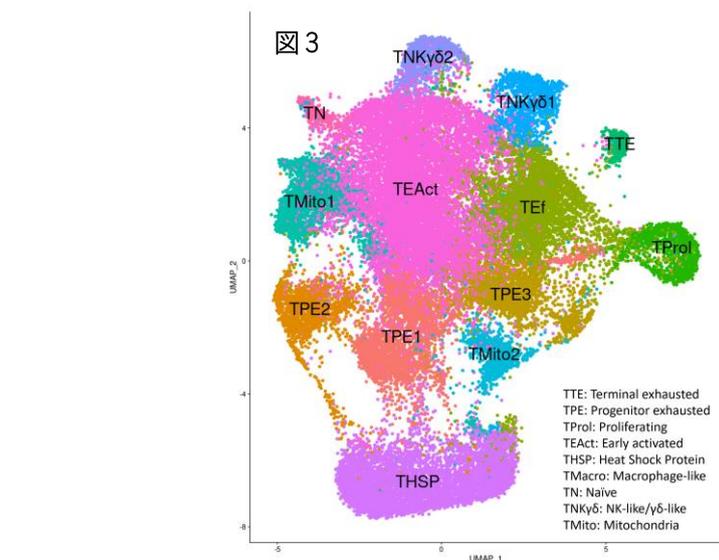
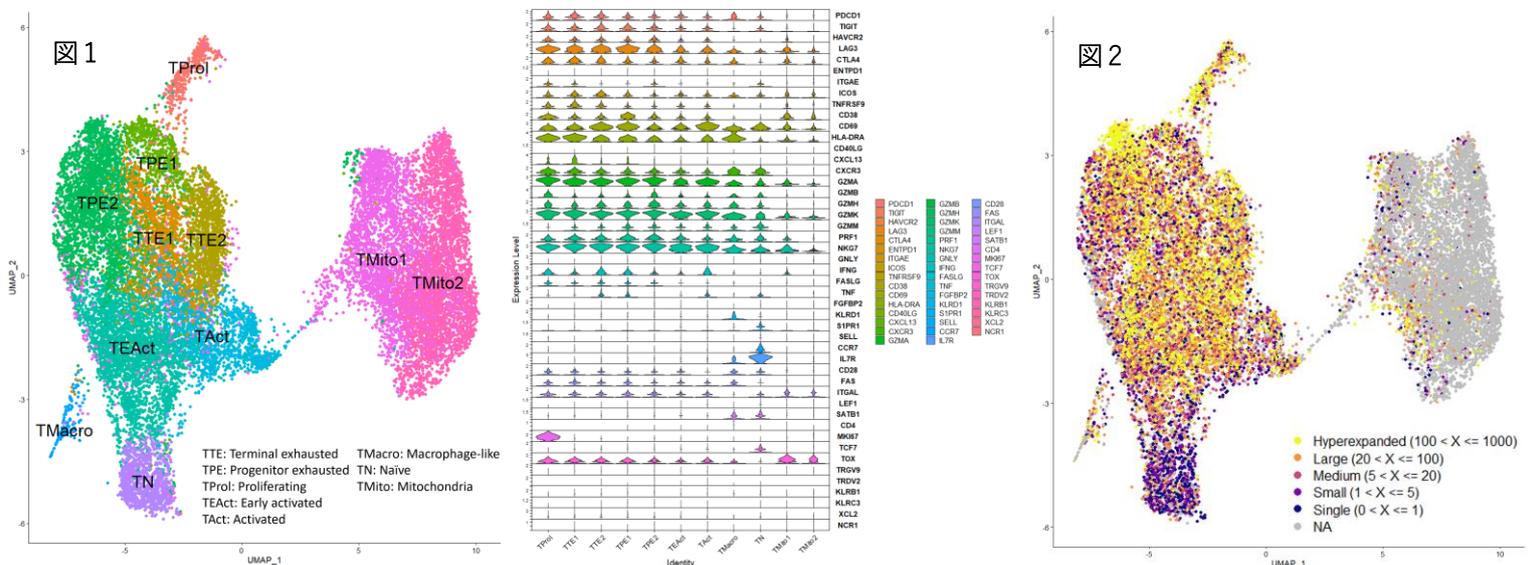
## 2. 研究の対象ならびに方法

GBM の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を評価するため、fresh tumor digest を用いてフローサイトメトリー解析を行った。TIL 中の CD8+ T 細胞について scRNA-seq および scTCR-seq を行った。Cell Ranger で作成されたデータは、R studio の Seurat にロードされた。クラスタリングのための次元削減は、uniform manifold approximation and projection（UMAP）を用いて行った。さらに、我々（ACC）のデータと公開されている GBM の TIL の scRNA-seq データで統合解析を行った。また、腫瘍検体の全エクソーム解析（WES）、正常細胞（PBMC）の全エクソーム解析、および RNA-seq によりミスセンス変異やフレームシフト変異、融合遺伝子を同定した。これらの遺伝子異常のデータから人工知能（AI）を活用して、それぞ

れの患者の HLA に結合するネオアンチゲンを予測した（日本電気株式会社（NEC）との共同研究）。

### 3. 研究結果

GBM 20 例中 2 例（10%）が豊富な TIL を示した。この 2 例から、合計約 2 万個の CD8+ T 細胞を解析した。UMAP に基づくクラスタリングにより、疲弊マーカーを発現するクラスタが優勢であることが明らかになり（図 1）、TEX クラスタを中心に高い TCR クローナリティがみられた（図 2）。2 つの公開データセットと ACC のデータを統合して解析したところ（図 3）、TEX クラスタ内では、近年抗原特異的マーカーとしてしばしば報告されている<sup>3)</sup> CXCL13 の発現が ACC データで有意に高いことが示された（図 4）。続いて、腫瘍の RNA-seq, WES データから、NEC の人工知能による抗原予測アルゴリズムに基づいて、ネオアンチゲン候補が予測された。OK-BT007 で計 34 個（ミスセンス変異由来が 18 個、フレームシフト変異由来が 2 個、そして融合遺伝子由来が 14 個）、OK-BT019 で計 27 個（ミスセンス変異由来が 23 個、欠失変異由来が 1 個、そして融合遺伝子由来が 3 個）のネオアンチゲン候補が同定された。



#### 4. 考察

神経膠腫におけるがん免疫療法は未だ有効な結果が得られていないのが現状である。今回、フローサイトメトリーで TIL を解析したところ、GBM では T 細胞の浸潤が非常に少なく、10%の症例においてのみ豊富な TIL が確認された。この極めて immune cold な微小環境が、免疫チェックポイント阻害剤等の免疫療法が奏功しない理由の一つと考えられる。一方で、TIL が豊富な症例では、他の癌腫と同様に疲弊型 T 細胞が浸潤し、CXCL13 を高発現する抗原特異的 T 細胞の候補を検出することができた。当研究室では肺癌に浸潤する TEX から、肺癌のネオアンチゲンを同定しており<sup>4)</sup>、同様の手法を用いて、これらの T 細胞が認識するネオアンチゲンを同定したいと考えている。すなわち、上記の TCR 遺伝子導入 Jurkat 細胞とネオアンチゲン候補となる腫瘍抗原ペプチドとの反応性について、ルシフェラーゼアッセイを用いて検証する。この研究でがん抗原特異的 T 細胞を同定することができれば、一部の神経膠腫では抗原特異的な免疫療法の道が開ける可能性がある。

#### 5. 文献

- 1) Medikonda R, Dunn G, Rahman M, Fecci P, Lim M: A review of glioblastoma immunotherapy. *J Neurooncol.* 151 (1): 41-53, 2021
- 2) Oliveira G, Stromhaug K, Klaeger S, Kula T, Frederick DT, Le PM, Forman J, Huang T, Li S, Zhang W, Xu Q, Cieri N, Clauser KR, Shukla SA, Neuberg D, Justesen S, MacBeath G, Carr SA, Fritsch EF, Hacohen N, Sade-Feldman M, Livak KJ, Boland GM, Ott PA, Keskin DB, Wu CJ: Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8+ T cells in melanoma. *Nature.* 596 (7870): 119-125, 2021
- 3) Hanada KI, Zhao C, Gil-Hoyos R, Gartner JJ, Chow-Parmer C, Lowery FJ, Krishna S, Prickett TD, Kivitz S, Parkhurst MR, Wong N, Rae Z, Kelly MC, Goff SL, Robbins PF, Rosenberg SA, Yang JC: A phenotypic signature that identifies neoantigen-reactive T cells in fresh human lung cancers. *Cancer Cell.* 40 (5): 479-493, 2022
- 4) Komuro H, Shinohara S, Fukushima Y, Demachi-Okamura A, Muraoka D, Masago K, Matsui T, Sugita Y, Takahashi Y, Nishida R, Takashima C, Ohki T, Shigematsu Y, Watanabe F, Adachi K, Fukuyama T, Hamana H, Kishi H, Miura D, Tanaka Y, Onoue K, Onoguchi K, Yamashita Y, Stratford R, Clancy T, Yamaguchi R, Kuroda H, Doi K, Iwata H, Matsushita H: Single-cell sequencing on CD8+ TILs revealed the nature of exhausted T cells recognizing neoantigen and cancer/testis antigen in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer.* 11 (8): e007180, 2023

6. 発表

令和5年12月17日 ステーションコンファレンス東京  
第19回がんワクチン療法研究会学術集会