

肺癌悪性胸水の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞マーカーの同定と免疫療法への応用

申請者：愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御 TR 分野 リサーチレジデント 杉田裕介

共同研究者：愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫制御 TR 分野 分野長 松下 博和

ユニット長 村岡 大輔

1. 研究の背景・目的

肺癌患者の中で、悪性胸水 (Malignant pleural effusion, MPE) 貯留を示す進行性肺癌患者の生存期間中央値は3~12か月と極めて予後不良である (Ryu, J. S. et al. J. Clin. Oncol. 2014)。近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) を始めとするがん免疫療法が注目されており、肺癌は ICI に感受性を示すがんの一つであるが、効果が認められるのは一部の患者に過ぎない。そこで、新たな治療法の開発が必要である。胸水、腹水等からリンパ球を採取し、*in vitro* で増幅して患者に戻す細胞移入治療が様々ながんで行われてきたが、これらの治療で用いられるリンパ球は、非特異的に増幅されたものであり、抗原特異的な T 細胞にフォーカスしたものではない (Rosenberg et al, Nat Rev Cancer 2008)。本研究の目的は、MPE 中の CD8⁺ T 細胞に焦点を当て、自己がん細胞に対する特異的免疫応答を解析することで、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞のマーカーを明らかにすることである。将来的には、その患者の CD8⁺ T 細胞集団から、抗原特異的マーカーを使って、抗原特異的 T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) を単離し、TCR 遺伝子導入 T 細胞 (TCR-T) 治療に結びつけられるようにする。

2. 研究の対象並びに方法

愛知県がんセンター及び関連施設で胸水の採取を行った肺癌患者の中で、その胸水細胞からがん細胞株を樹立できた3症例を対象とした(施設研究倫理審査番号: 2018-2-20)。

がん細胞株から DNA, RNA を採取し、全エクソームシーケンスと RNA シーケンスの結果から、変異由来の抗原を予測した。肺癌の腫瘍浸潤リンパ球の検討 (Komuro et al, J Immunother Cancer 2023) と同様、胸水リンパ球のうち CD8 陽性 T 細胞をソートして、シングルセル解析 (CD8T scRNA/TCR-seq) を行った。予測した抗原エピトープペプチドを自己の B 細胞由来抗原提示細胞 (B-APC) にロードして、シングルセル解析の結果から予測された腫瘍特異的 TCR 遺伝子を導入した Jurkat 細胞を刺激し、NFAT レポーターアッセイで抗原特異的応答を評価した。

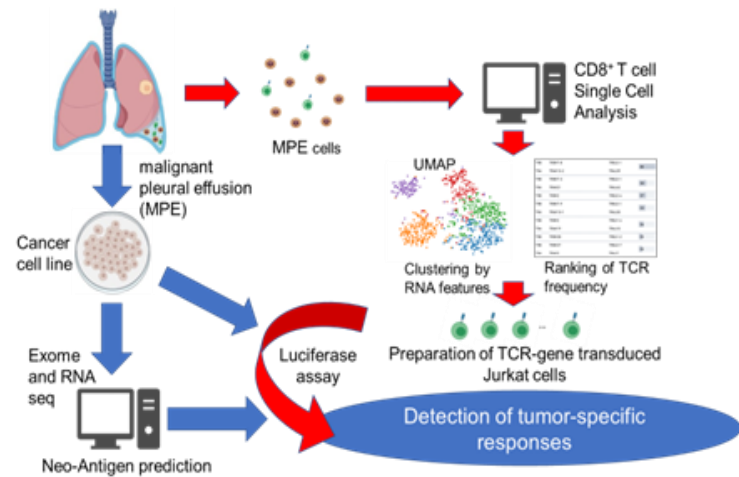


図 1. 研究の流れ

3. 研究結果

胸水貯留肺癌 3 症例で検討し

た (図 1)。2,681 個の CD8T 細胞を解析し、遺伝子発現解析により 8 つのクラスターに分類した。PDCD1 (PD-1) や HAVCR2 (Tim-3) などの疲弊マーカーの発現が特徴の Tex cluster (C5-PDCD1) を同定した (図 2)。また、TCR 解析で、672 個の TCR クロノタイプのうち 286 個のクロノタイプが Tex cluster に含まれていることがわかった。NFAT ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、MPE Pt. 1 (KOM002) では ex1, ex7, ex12, ex17 でペプチド MP36 (mutant DOP1B) に反応を認め、ex321 ではペプチドは不明だが、Patient1 (KOM002) の自己細胞株に反応を認めた。MPE Pt. 2 (LK006)、MPE Pt. 3 (LK208) では抗原特異的応答認めなかった。

MPE Pt. 1 由来の 5 つの異なるクロノタイプから同定されたすべての TCR クローン (n=29) を UMAP に投影した (図 3A)。これらの TCR のそれぞれについて、腫瘍特異的 T 細胞の遺伝子発現を解析した (図 3B)。PDCD1、HAVCR2、TNFRSF9、ITGAE、CXCL13 の遺伝子は、他の T 細胞よりも腫瘍特異的 T 細胞で

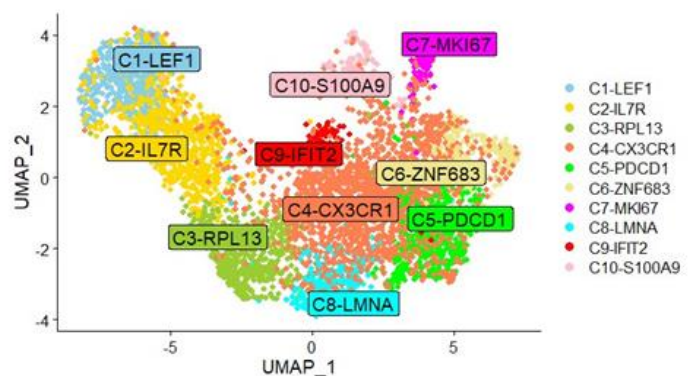


図 2. MPE 3 症例の UMAP

高発現していた(図 3C)。興味深いことに、以前の研究で肺癌患者の腫瘍特異的マーカーとして特定された *ENTPD1*(CD39) の発現は腫瘍特異的 T 細胞と他の T 細胞で発現差がなく、*ENTPD1* が腫瘍特異的 MPE T 細胞のマーカーにならない可能性があることを示唆している。

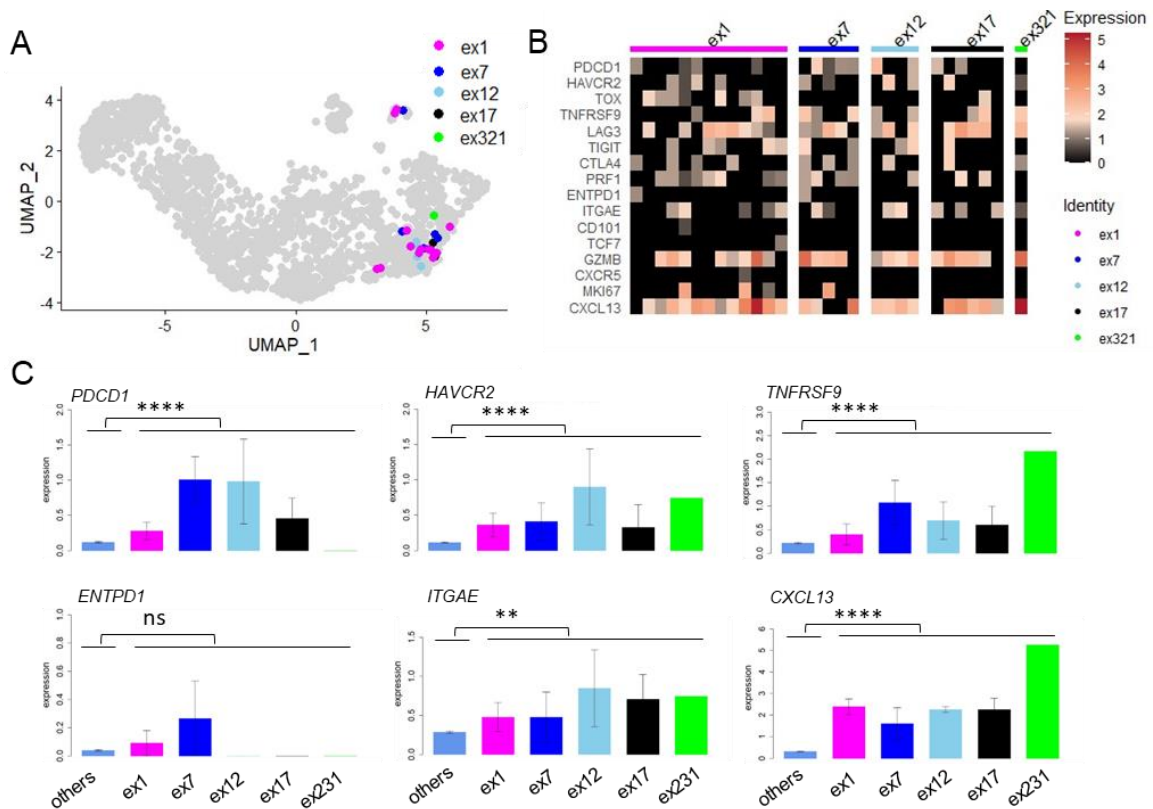


図 3. MPE 由来の腫瘍特異的 CD8+ T 細胞の遺伝子発現解析

A. 5つの腫瘍抗原特異的 TCR (ex1, ex7, ex12, ex17, および ex321) を有するすべての TCR クローン (n = 29) を UMAP に投影した。 **B.** 各腫瘍特異的 T 細胞クローンにおける疲弊関連遺伝子の発現。 **C.** 腫瘍特異的 T 細胞と他の T 細胞との比較。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns、統計的に有意ではない。

次に、MPE Pt. 1、MPE Pt. 2、MPE Pt. 3を含む69人の患者の腫瘍特異的T細胞をフローサイトメトリーで定量し、臨床転帰との関連を調べた。CD8+ T細胞サブセット内のPD-1+4-1BB+細胞およびCXCL13+細胞の頻度は、それぞれ0%から27.8%および0.034%から4.76%の範囲であった(図4AおよびB)。予想通り、MPE Pt. 1の陽性細胞の頻度は、MPE Pt. 2またはMPE Pt. 3よりも高かった。

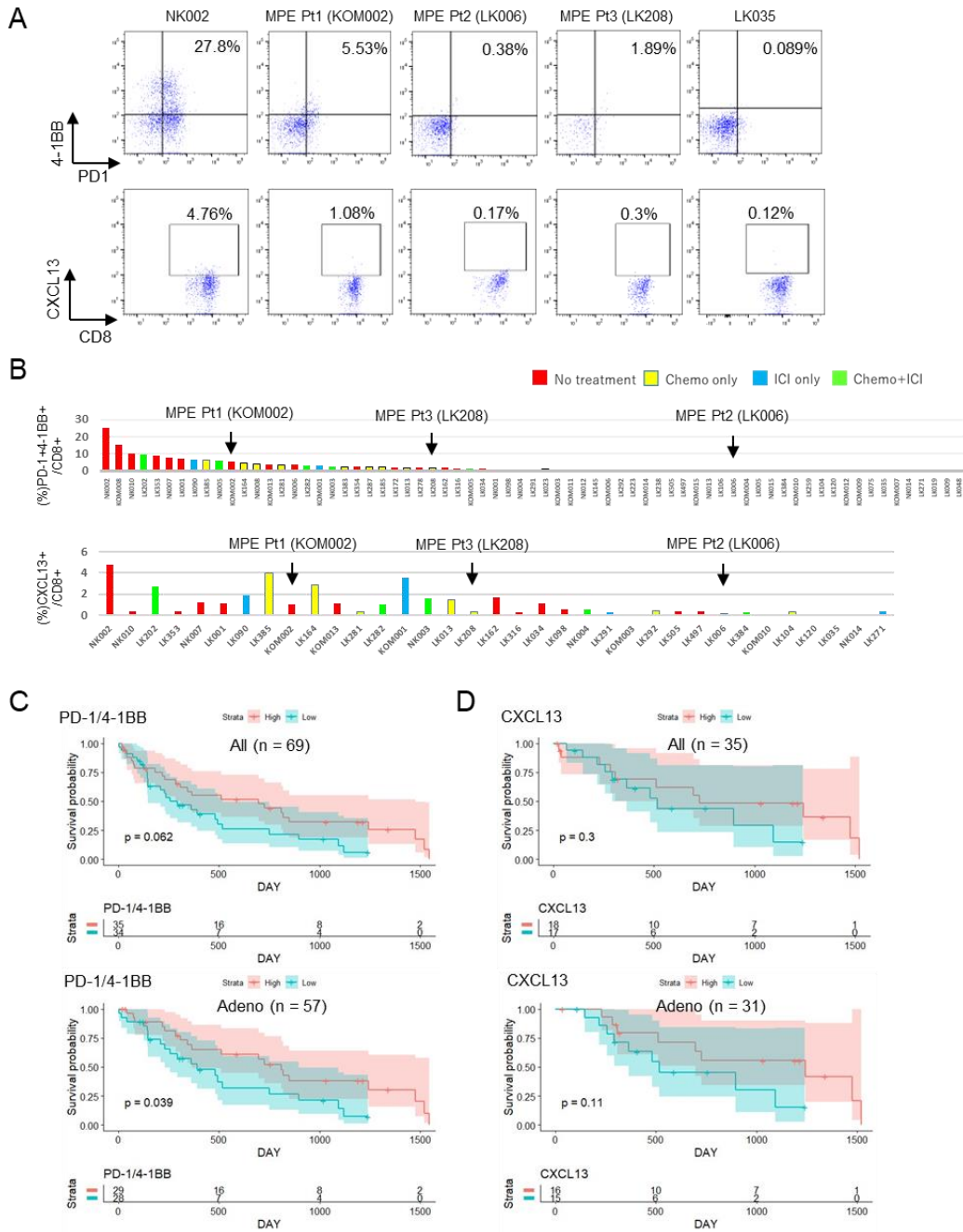


図4. MPEにおける腫瘍特異的CD8+ T細胞分画と患者の予後との関連

A. 69人および35人の患者でフローサイトメトリーによって分析されたCD8+ T細胞によるPD-1/4-1BBおよびCXCL13の発現。 **B.** 全患者のフローサイトメトリー解析結果。 **C** と **D.** すべての患者および腺癌患者のサブグループにおけるPD-1/4-1BB(**C**)またはCXCL13(**D**)の発現の中央値によって2つのグループに層別化された患者のKaplan-Meier生存曲線。

最後に、MPEにおける腫瘍特異的T細胞の頻度が予後に影響を与えるかどうかを調べた。

患者 (n=69) をマーカー発現の中央値で2つのグループに分けた。PD-1/4-1BBの発現が高い患者は、発現が低い患者 (P=0.062) よりも予後が良好である傾向があった(図4C上)。腺がん患者のみを対象としたサブグループ解析 (n=57) では、関連性が強くなり、統計的有意性 (P=0.039) を認めた(図4C下)。TILが高い傾向にある他のマーカーの組み合わせ (TIM3/4-1BBまたはCD39/CD103) を用いた同様の解析では、コホート全体または腺がん患者57例において、高発現群と低発現群の間に差は認められなかった。これらのデータは、表面PD-1/4-1BBを発現する腫瘍特異的MPE T細胞の存在が進行肺がんの予後良好と関連している可能性があることを示唆している。

4. 考察

今回の検討では MPE 症例 3 例中 1 例で抗原及び抗原特異的 T 細胞を同定できた。PD-1/4-1BB を共発現する CD8T 細胞集団に抗原特異的 T 細胞が多く含まれており、また PD-1/4-1BB を共発現する CD8T 細胞の頻度が高い患者は、低い患者に比べて予後が良好であったことから、PD-1/4-1BB 共発現は予後に関連する腫瘍抗原特異的マーカーである可能性がある。今後、症例を増やし、PD-1/4-1BB が胸水中の抗原特異的 T 細胞のマーカーとして有用であるか検証する予定である。

5. 文献

1. Ryu JS, Ryu HJ, Lee SN, Memon A, Lee SK, Nam HS, Kim HJ, Lee KH, Cho JH, Hwang SS. Prognostic impact of minimal pleural effusion in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2014; 32(9):960-7.
2. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 ;8(4):299-308.
3. 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*. 2023;11(8):e007180.

6. 学会、論文発表

1. 第40回日本呼吸器外科学会学術総会（2023/7/13） 肺癌悪性胸水における腫瘍特異的 CD8+T 細胞とネオアンチゲンの同定 杉田 裕介、松下 博和、福島 恭啓、松井 琢哉、小室 裕康、篠原 周一、橋本 佳奈、高橋 祐介、岡村 文子、村岡 大輔、山下 慶子、黒田 浩章、堀尾 芳嗣、大久保 憲一
2. 第27回日本がん免疫学会総会（2023/7/20） 肺癌悪性胸水患者の抗原特異的免疫応答の検討 杉田 裕介、松下 博和、福島 恭啓、松井 琢哉、小室 裕康、篠原 周一、橋本 佳奈、高橋 祐介、岡村 文子、村岡 大輔、岸 裕幸、田中 雄希、尾上 広祐、小野口 和英、山下 慶子、黒田 浩章、堀尾 芳嗣、大久保 憲一
3. 第64回日本肺癌学会（2023/11/4） 肺癌悪性胸水における腫瘍特異的 CD8+T 細胞とネオアンチゲンの同定 杉田 裕介、松下 博和、福島 恭啓、松井 琢哉、小室 裕康、篠原 周一、橋本 佳奈、高橋 祐介、岡村 文子、村岡 大輔、岸 裕幸、田中 雄希、尾上 広祐、小野口 和英、山下 慶子、黒田 浩章、堀尾 芳嗣、大久保 憲一

本研究成果を *Oncoimmunology* 誌に投稿した。現在リバイス中である。