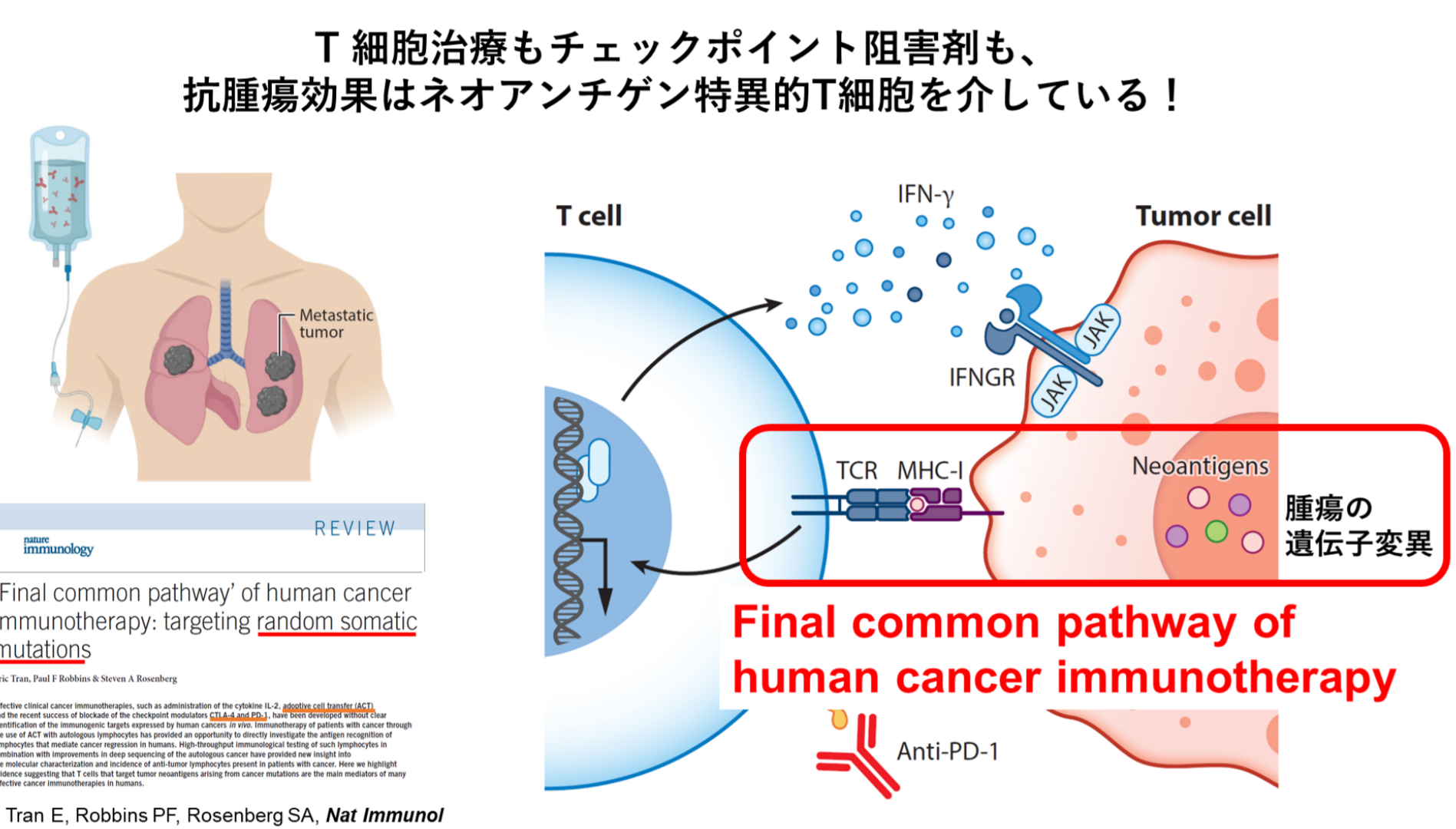




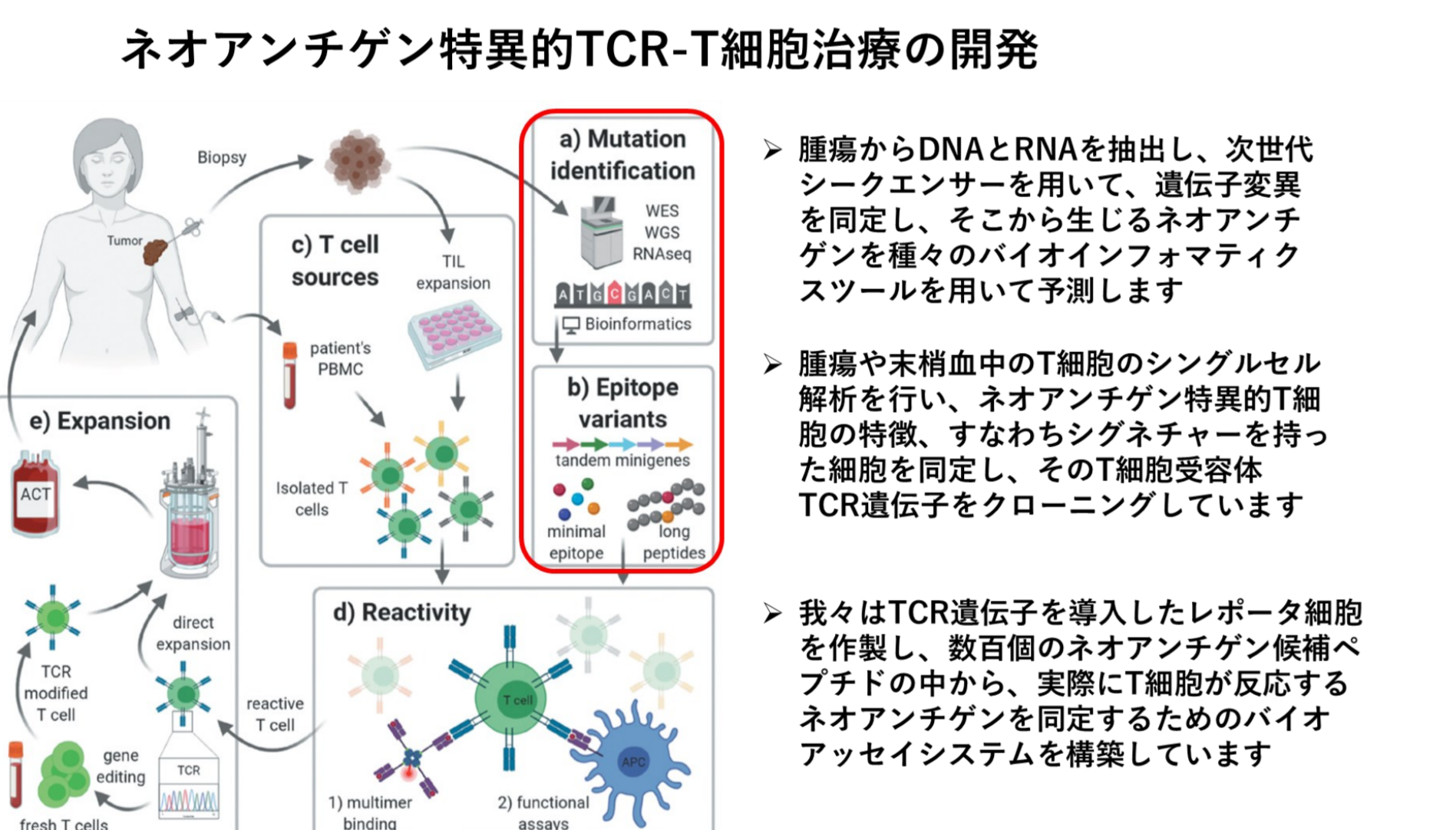
22世紀医療センター 22nd Century Medical and Research Center

講座名 免疫細胞治療学講座 英文講座名 Department of Immunotherapeutics

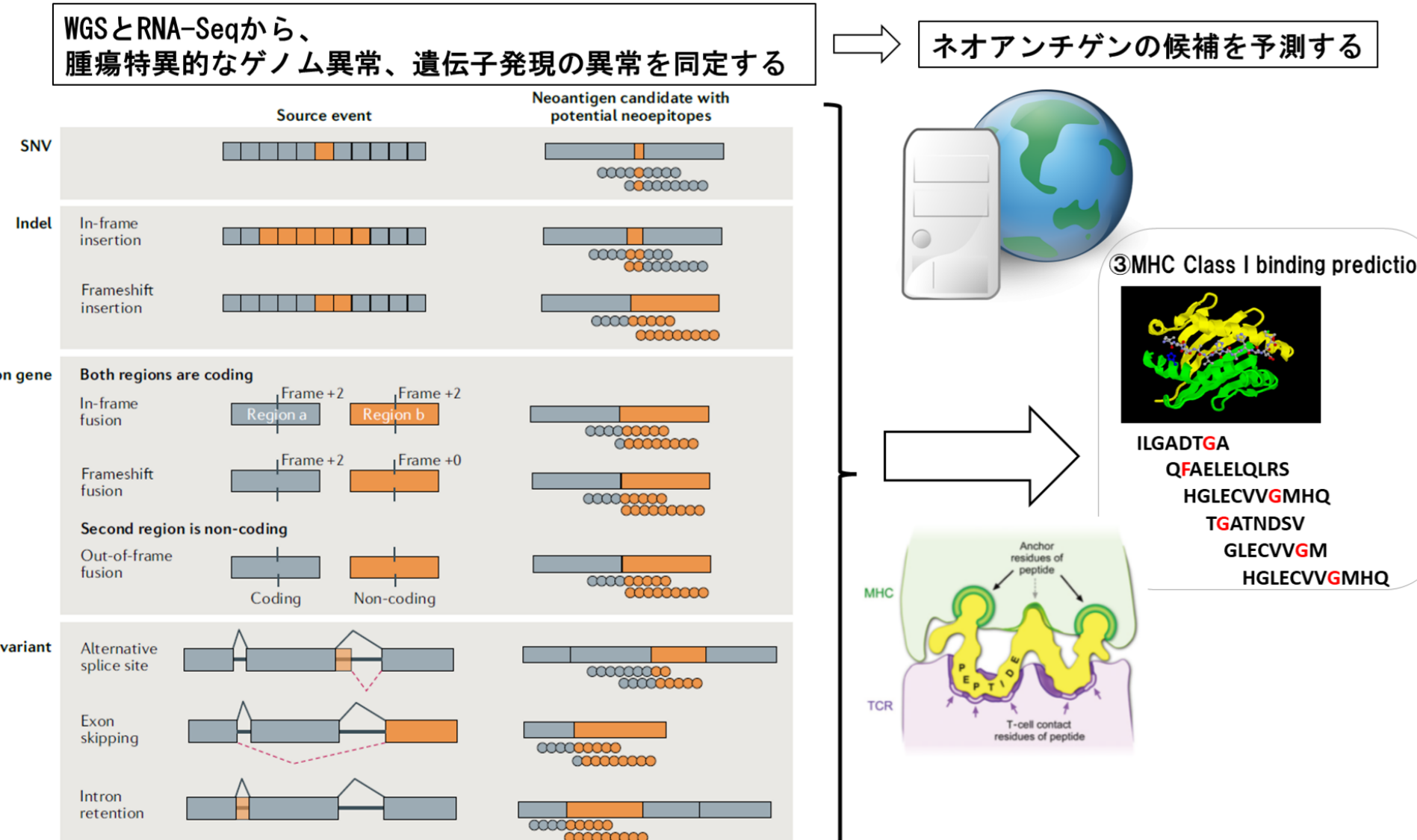
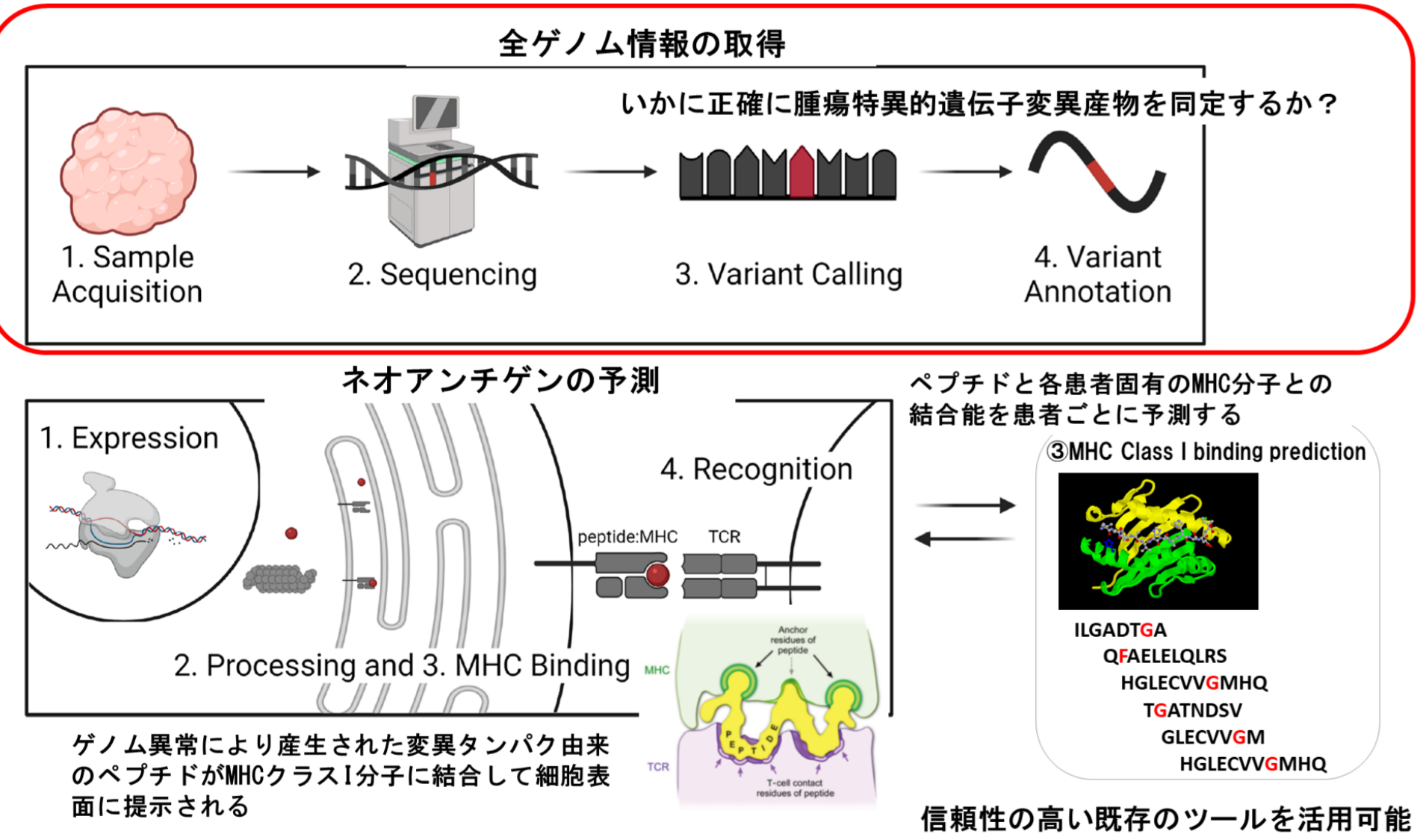
ネオアンチゲン特異的T細胞治療 演者名：小林由香利、長岡孝治、垣見和宏



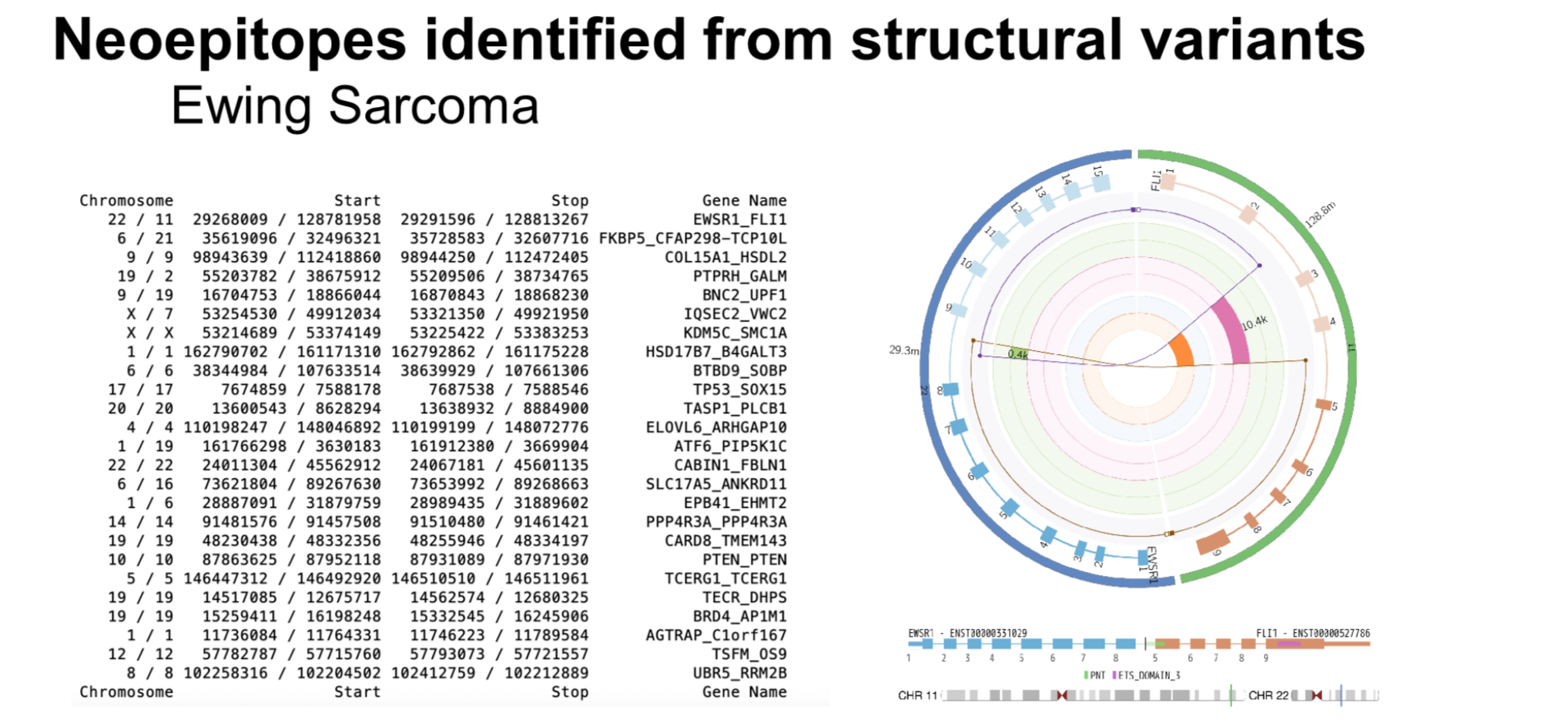
がん細胞の遺伝子変異から生じたネオアンチゲンはペプチドになってMHCクラスI分子に結合し、がん細胞の表面に提示されています。T細胞治療もチェックポイント阻害剤も、抗腫瘍効果はこのMHCとネオアンチゲンペプチドの複合体を認識するT細胞のエフェクター機能により、腫瘍の増殖を抑制しています。



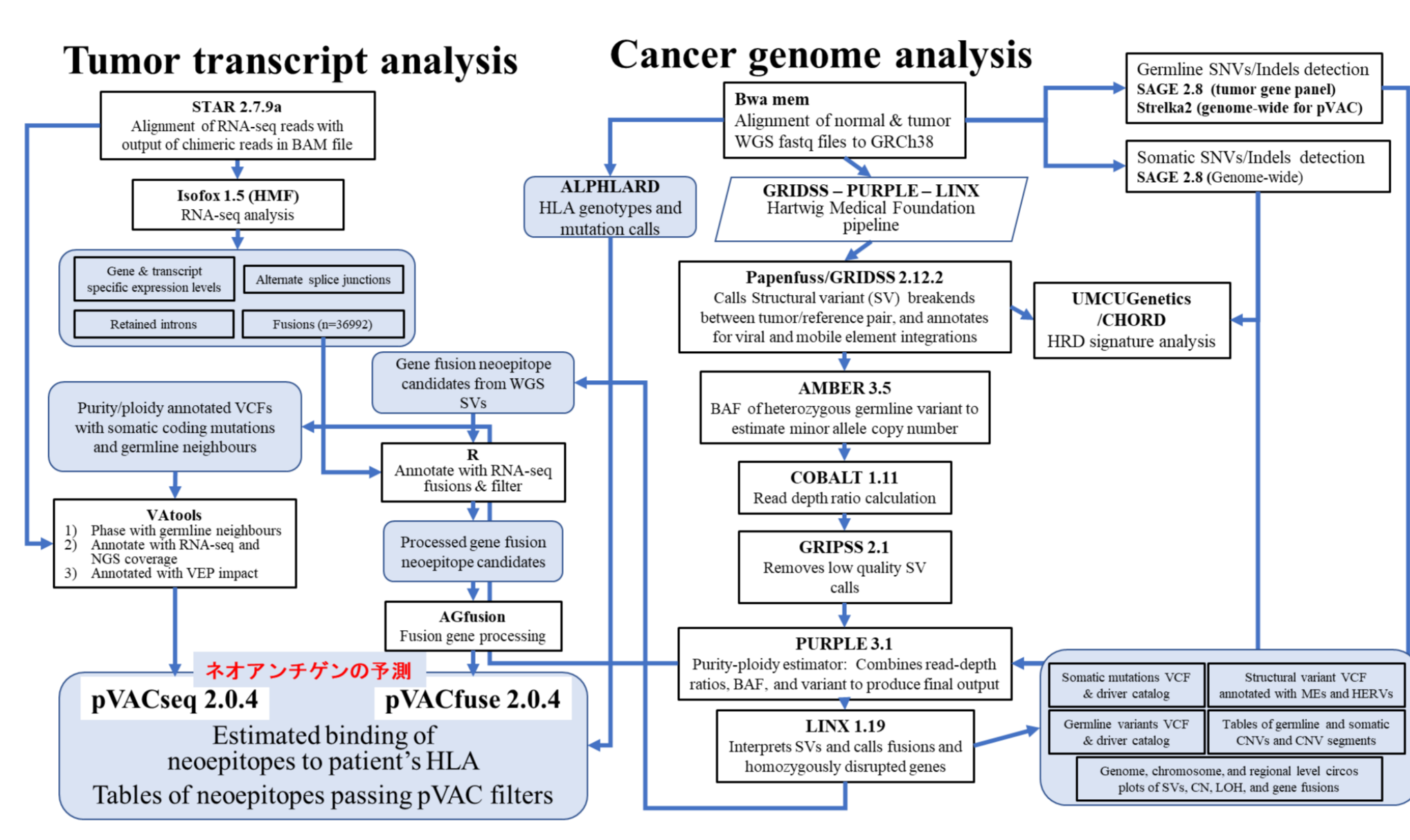
手術で切除された腫瘍からDNAとRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子変異を同定し、そこから生じるネオアンチゲンを種々のバイオインフォマティクスツールを用いて予測する。腫瘍や末梢血中のT細胞のシングルセル解析を行い、ネオアンチゲン特異的T細胞の特徴を持った細胞を同定し、そのT細胞受容体 TCR遺伝子をクローニングする。TCR遺伝子を導入したレポーター細胞を作成し、数百個のネオアンチゲン候補ペプチドの中から、実際にT細胞が反応するネオアンチゲンを同定するためのバイオアッセイシステムを構築しています。



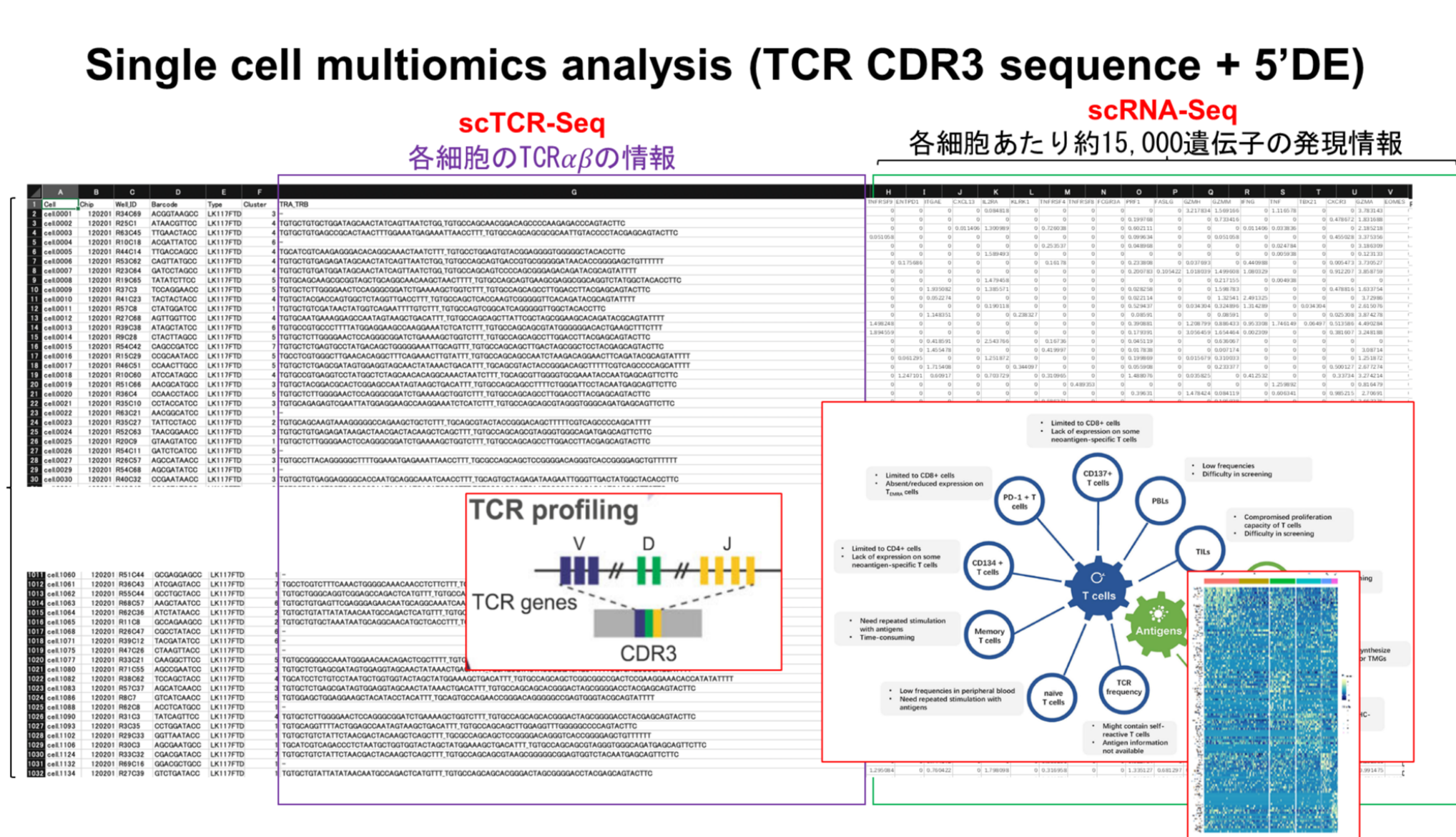
ネオアンチゲンはSNVと呼ばれる1塩基の変異によって生じた変異アミノ酸を含んだタンパク以外に、indelと呼ばれる塩基配列の挿入や欠失によって生じたフレームシフト、融合遺伝子によって生じたジャンクションやフレームシフト、スプライスの異常によって生じた新たなアミノ酸配列等からもネオアンチゲンができます。正常細胞には存在しない、がん細胞に存在する様々な形の変異アミノ酸を含んだペプチドがネオアンチゲンになる可能性を持っています。



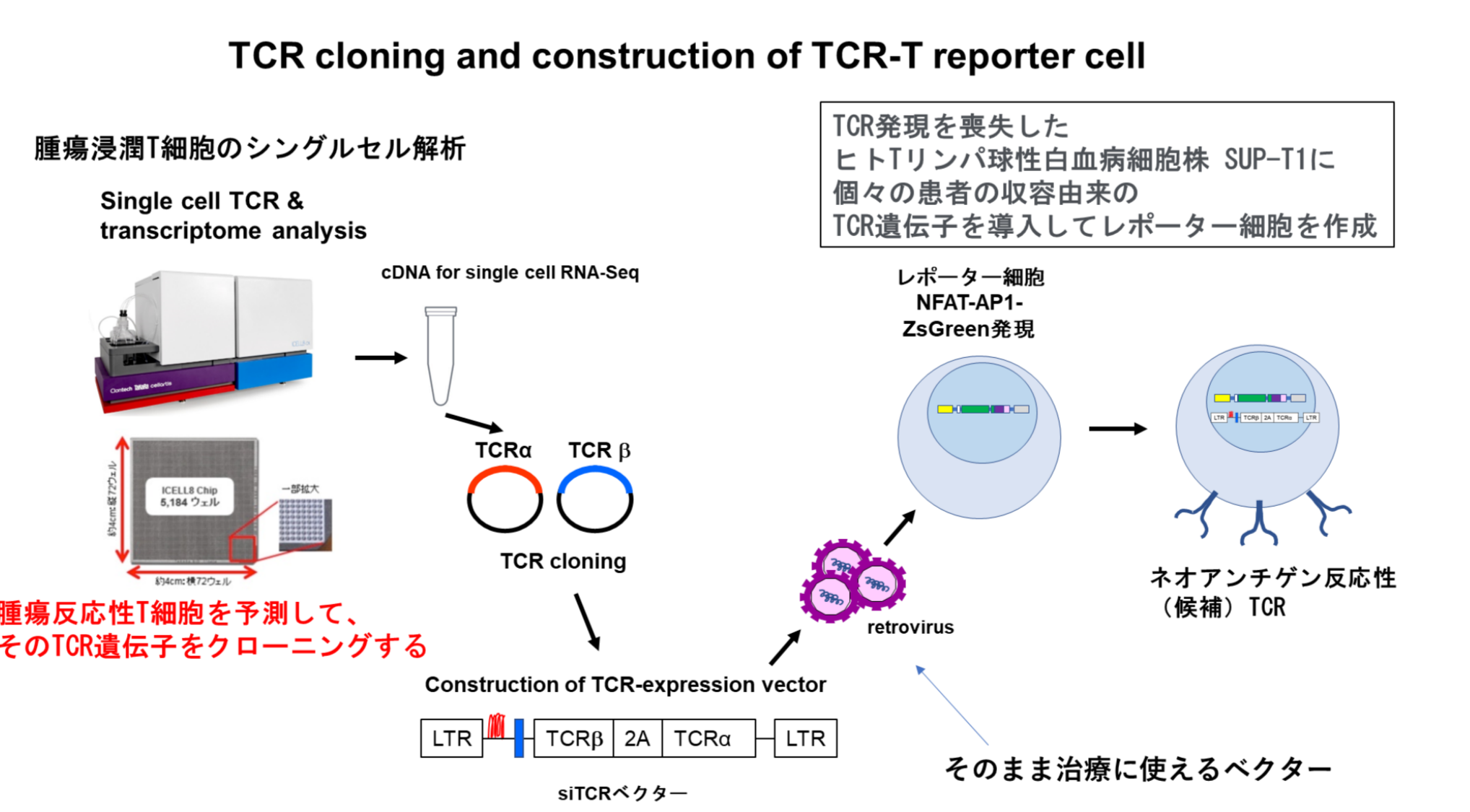
あるユーイング腫瘍に認められた融合遺伝子のリストです。このような融合遺伝子のジャンクション部分がネオアンチゲンの候補になります。



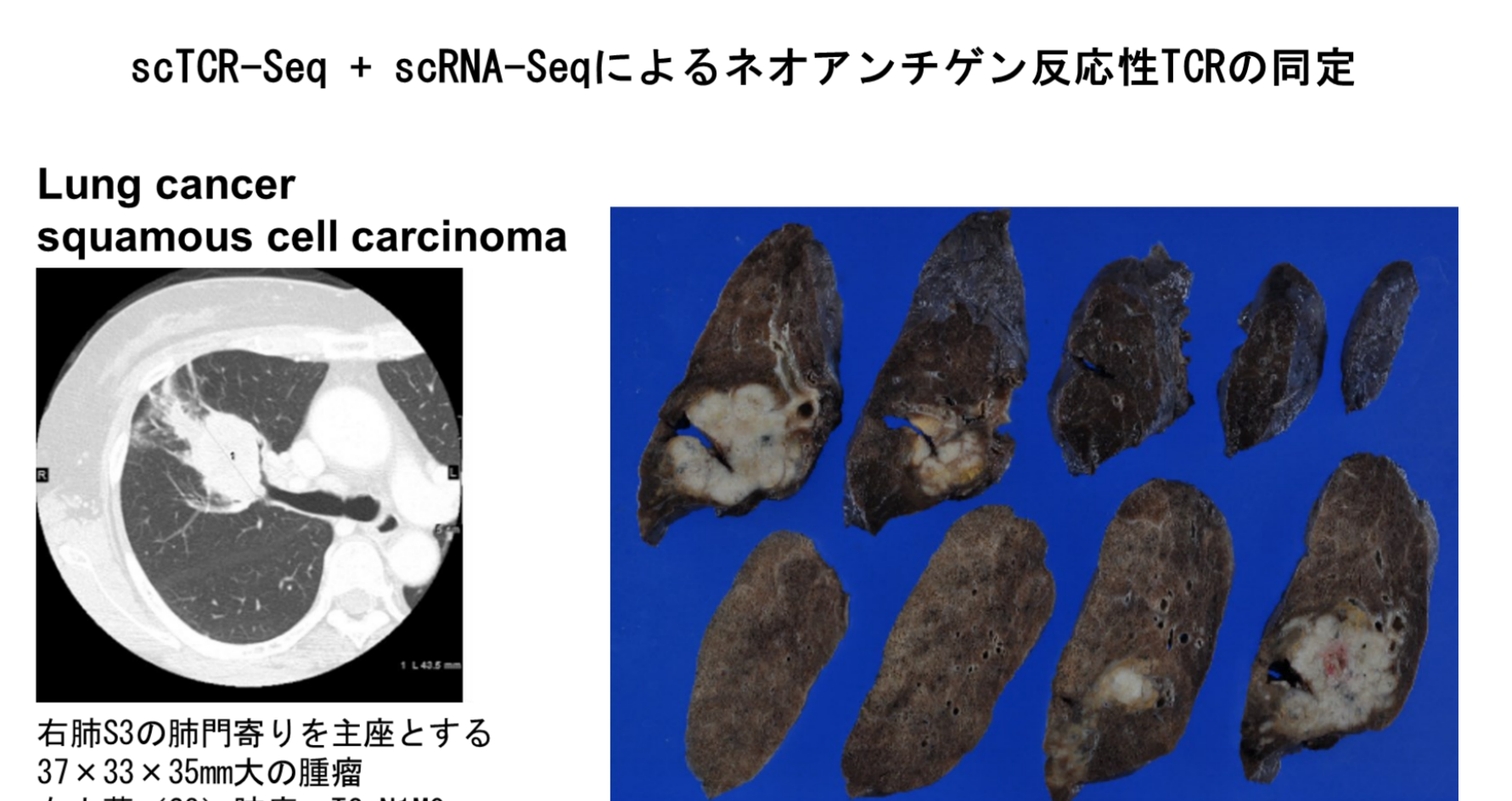
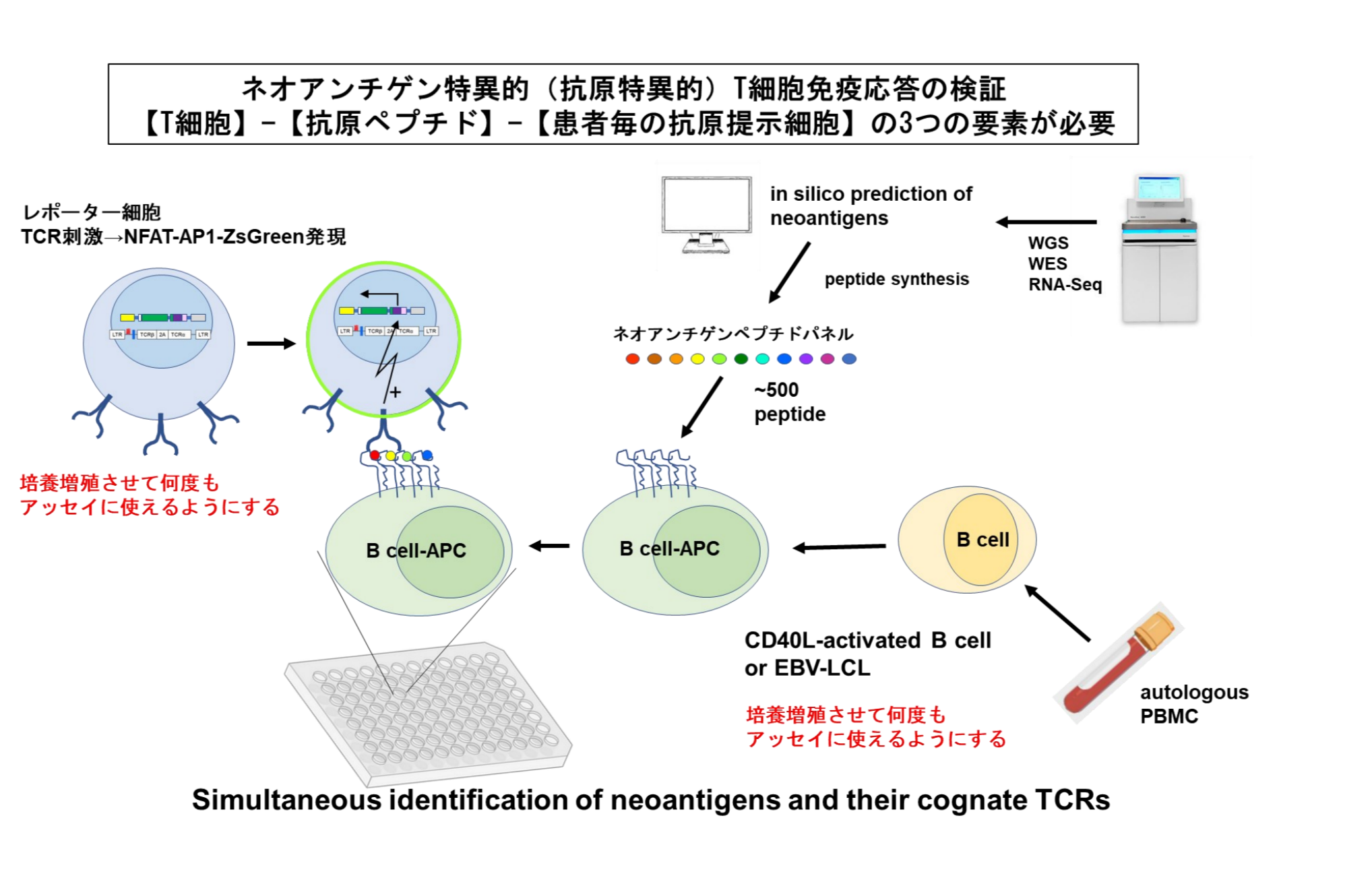
我々は様々なバイオインフォマティクスツールを駆使して、全ゲノム解析データやトランスクリプトームデータから、ネオアンチゲンを予測するパイプラインを構築し、スーパーコンピュータSHIROGANEを活用して、一人ひとりの患者のネオアンチゲンを予測しています。



ネオアンチゲン特異的T細胞の同定のために、腫瘍浸潤T細胞のシングルセル解析(同一細胞scRNA-SeqとscTCR-Seq解析)を実施する。このように、一行につき一つの細胞のTCR遺伝子配列情報と、1細胞のトランスクリプトームデータがついになって取得できる。ICELL8を用いて、1チップで約1000個の細胞を処理できることから、約1000行の表が得られた。この症例では、388種類のTCRβペア情報をしゅくし、この388種類のTCRから、がん抗原特異的だと予想されるものを選び、レトロウイルスベクターにクローニングした。



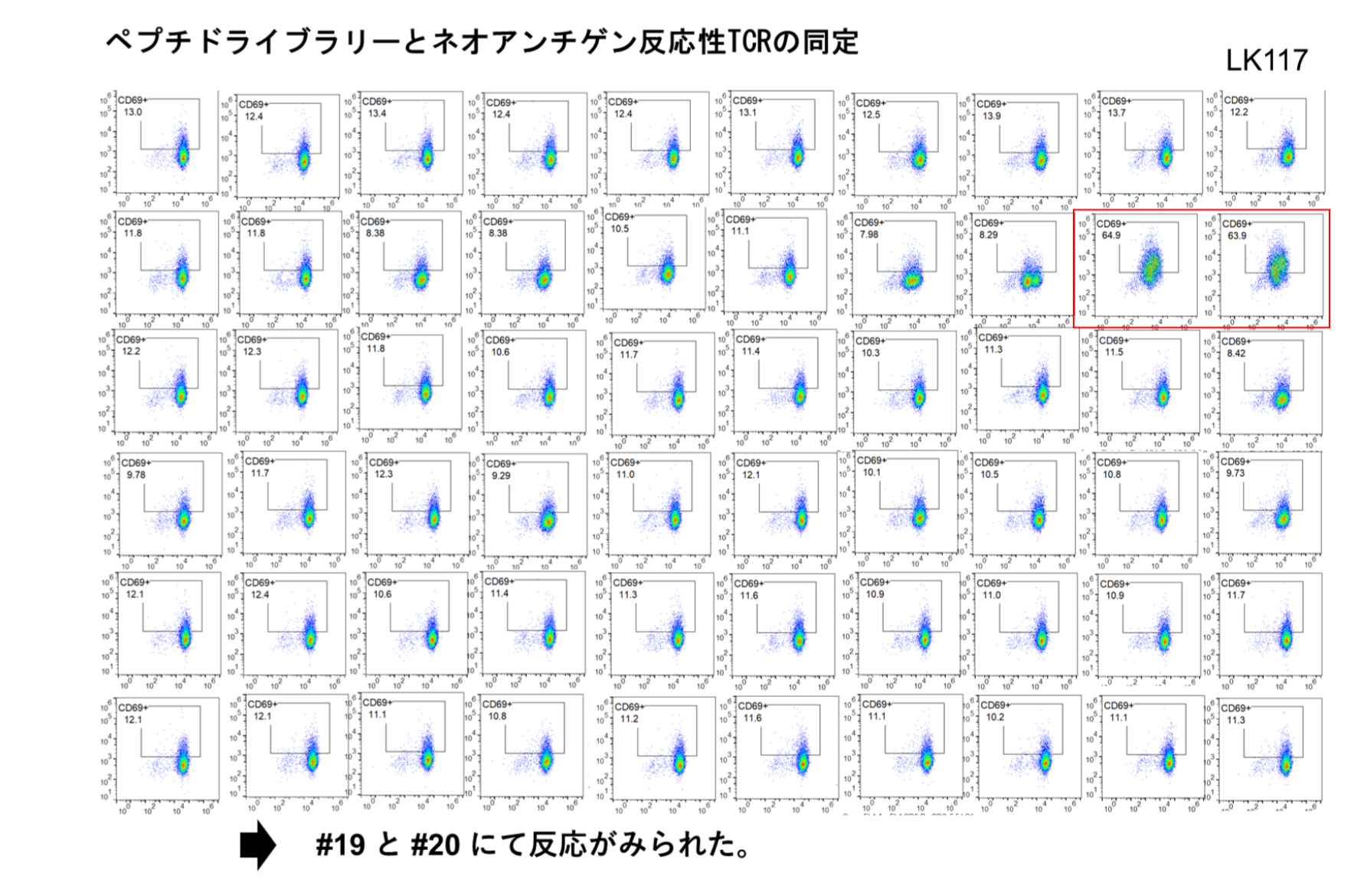
同一細胞でscRNA-SeqとscTCR-Seqを実施すると、先ずscRNA-Seqデータをもとにネオアンチゲンに反応した特徴(Exhaustion)を持った細胞が同定できる。同時に同じ細胞のTCR遺伝子配列情報とscTCR-Seqで取得できることから、この情報をもとに直ちにTCR発現ベクターが作成可能になる。TCR発現を喪失したヒトリンパ球性白血病細胞株SUP-T1に個々の患者の腫瘍由来のTCR遺伝子を導入してレポーター細胞を作成する。TCRがネオアンチゲンを特異的に認識すると、蛍光色素ZsGreenが発現する仕組みを活用し、数百個のペプチドを効率よくスクリーニング可能である。



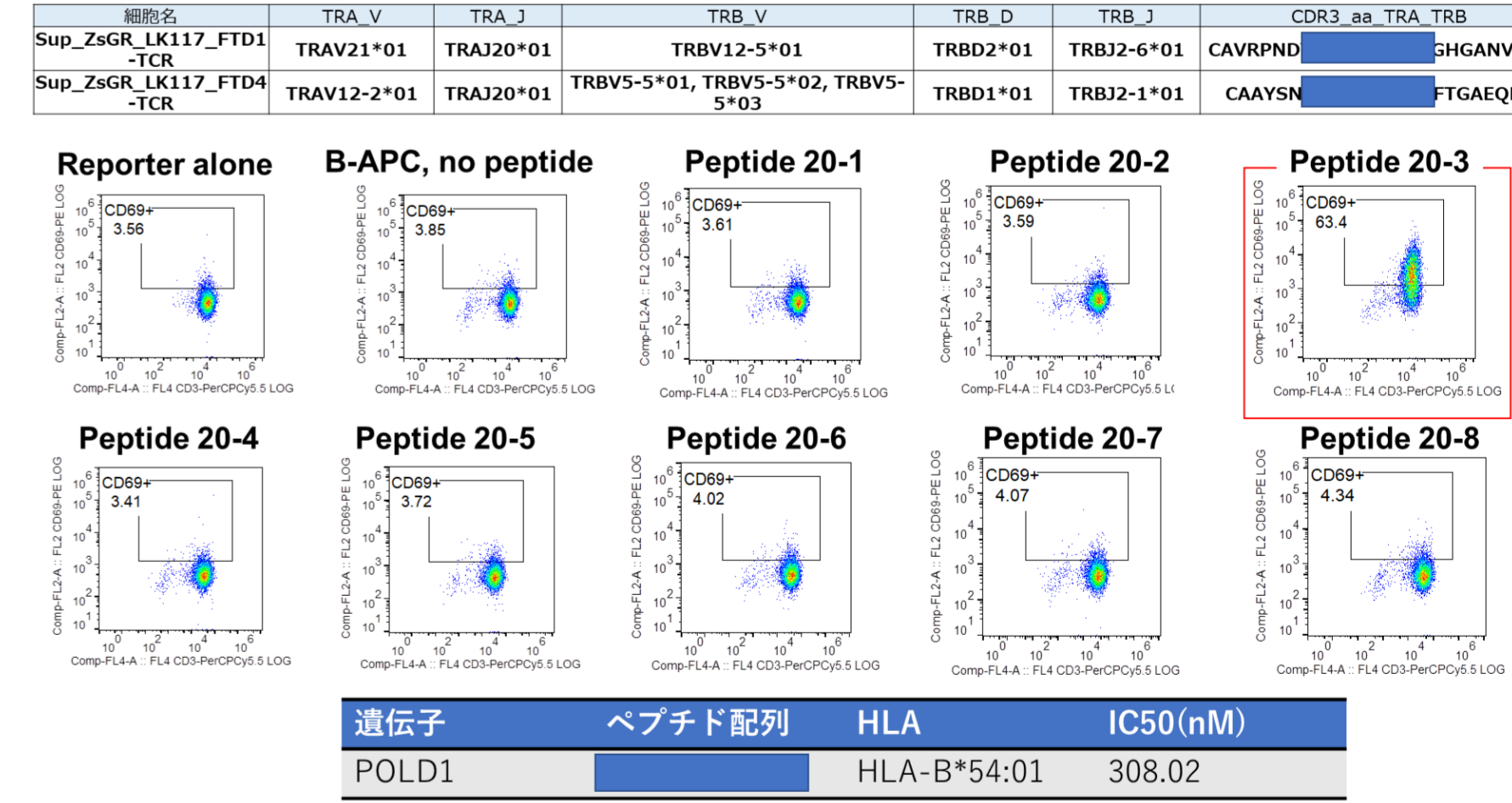
ペプチドライブラリーとネオアンチゲン反応性TCRの同定

Mutation	Peptide	HLA	IC50 (nM)
ERGIC1 p.Ile225Met	RMPAIVFWR	HLA-A*31:01	15.21
CT_CN0T9	KTRPFVYLR	HLA-A*31:01	15.61
CT_ATAD2	RVFPHAEFR	HLA-A*31:01	16.51
CT_KIAA0100	KLGLFLVHR	HLA-A*31:01	16.7
CT_KIAA0100	RMMGFPPGR	HLA-A*31:01	18.01
CT_KIAA0100	RLLKVICQR	HLA-A*31:01	19.15
CT_KIAA0100	RLVSNTPMR	HLA-A*31:01	19.29
CT_ATAD2	RTRALLSLR	HLA-A*31:01	21.03
CT_KIAA0100	QLTQHFHR	HLA-A*31:01	21.05
CT_KIAA0100	SLVHQSIR	HLA-A*31:01	21.25
ZBTB25 p.Asn47Tyr	VLAAFSYFK	HLA-A*31:01	233.51
ZCHHAV1 p.Ala470Thr	RTTDDAFRR	HLA-A*31:01	284.13
IGF1R p.Asp555Tyr	SWMMVDVYL	HLA-C*14:02	454.42
THAP4 p.Cys349Phe	LIDLHSHYF	HLA-C*14:02	472.65
HOXA3 p.Val151Leu	KPSLLNSPL	HLA-C*01:02	473.86
RABGAP1L p.Glu575fs	DSAQVLLLC	HLA-B*51:01	484.03
WDR75 p.Ser749Phe	VLPAAFLCC	HLA-A*24:02	495.28

各症例500個程度のネオアンチゲン候補ペプチドを効率よく評価するため、ペプチドをプールしてアッセイを実施した。MHCに対してアフィニティが高いペプチドと低いペプチドが共存すると、アフィニティの高いペプチドだけが結合し、アフィニティが低いペプチドはMHCに結合できず、反応性の確認から漏れてしまう。そこで、HLAに結合するペプチドが競合しないように、結合能力が同程度のものを選択し、一つのHLAに偏らず、いろんなHLAに結合するペプチドをうまく分散してパネルを作製している。



プールペプチドに対するTCR-Tレポーター細胞の反応をフローサイトメーターで検証した。ネオアンチゲンに反応したレポーター細胞はZsGreenの発現を認める。反応を認めたプールペプチドは、ひとつづつのペプチドに分けてアッセイし、ネオアンチゲンペプチドを決定する。



グループ20のうち、ペプチド20-3に対して2種類のTCR-Tレポーター細胞が反応した。ペプチド20-3はPOLD1変異によって生じた変異アミノ酸を含んだネオアンチゲンであり、このネオアンチゲンに反応する2種類のT細胞由来のTCR遺伝子が同定された。このように、患者の腫瘍内、ネオアンチゲンに反応する細胞は単一ではなく、異なるTCRを持った複数のT細胞がネオアンチゲンに反応していることが明らかになった。今後、より多くの症例経験を積み重ね臨床応用をめざしたい。

