

## 癌特異的 T 細胞の位置および遺伝子発現を統合解析する基盤の開発

研究代表者：小山 正平 国立がん研究センター 研究所 部門長  
共同研究者：熊谷 尚悟 国立がん研究センター 研究所 研究員  
坪井 正博 国立がん研究センター 東病院 呼吸器外科 科長  
設楽 紘平 国立がん研究センター 東病院 消化器内科 科長



### 1. 研究の背景と達成目標

**背景：**現在の日本社会において 4 人に 1 人ががんで死亡することが示されている。がんに備えたより良い社会システムの樹立には、がんの早期発見を目指した技術革新や、新たな治療薬の開発などの先進的なアプローチに加え、個々の患者に合わせた既存のがん治療の最適化が極要である。本邦では、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が新たながらん治療の選択肢として加わり、多様ながんに対して適応拡大され、一部の症例では長期奏功も得られるようになったが、奏功率は全体の 20% 程度に留まり、奏功例の絞り込みに有用な高精度なバイオマーカーの樹立が喫緊の課題である。近年のシングルセル解析技術の進展により、1 細胞シークエンス (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) を用いた腫瘍微小環境の包括的解析が世界的に加速しており、バイオマーカーの探索にも活用されつつある (Bagaev A et al., *Cancer Cell*, 2021)。これにより、腫瘍に浸潤する多様な細胞集団の同定や分類に加え、細胞の分化経路や活性化状態の動的変化を解析することが可能となってきた。一方で、各細胞、特に癌特異的 T 細胞が腫瘍組織内でどのような空間的配置を取り、どのように相互作用しているかといった“細胞間の空間的関係”を可視化・評価する技術は、依然として発展途上にある。

**目標：**本研究では、腫瘍に浸潤する T 細胞をはじめとする免疫細胞について、1 細胞シークエンスに加え、多重免疫染色、T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析、空間トランск립トーム解析、ならびに腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) の機能解析を実施する。これら複数の解析手法から得られるデータを統合的に解析することで、癌特異的 T 細胞が腫瘍内のどこに、どのような活性化状態で分布・局在しているのかを可視化・定量化する新たな解析基盤を構築する。

### 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

#### 【開発項目 1】 多重免疫染色・空間的遺伝子発現解析の統合的解析基盤の樹立

Akoya 社の Fusion および Leica 社の Cell DIVE システム、ならびに画像解析ソフトウェア HALO を用いた統合的解析基盤により、最大 32 種類の免疫関連マーカーによる多重免疫染色に加え、空間的トランスク립トーム情報を同時に取得することが可能となった。

#### 【開発項目 2】 癌特異性 T 細胞のもつ TCR のがん組織内での局在を同定

凍結切片を用いた VISIUM との基盤を活用した *in situ* TCR-seq により TCR を同定。クローナル増殖している TCR の空間的局在を可視化し、癌特異的 TCR の機能的評価も同時に解析可能となった。

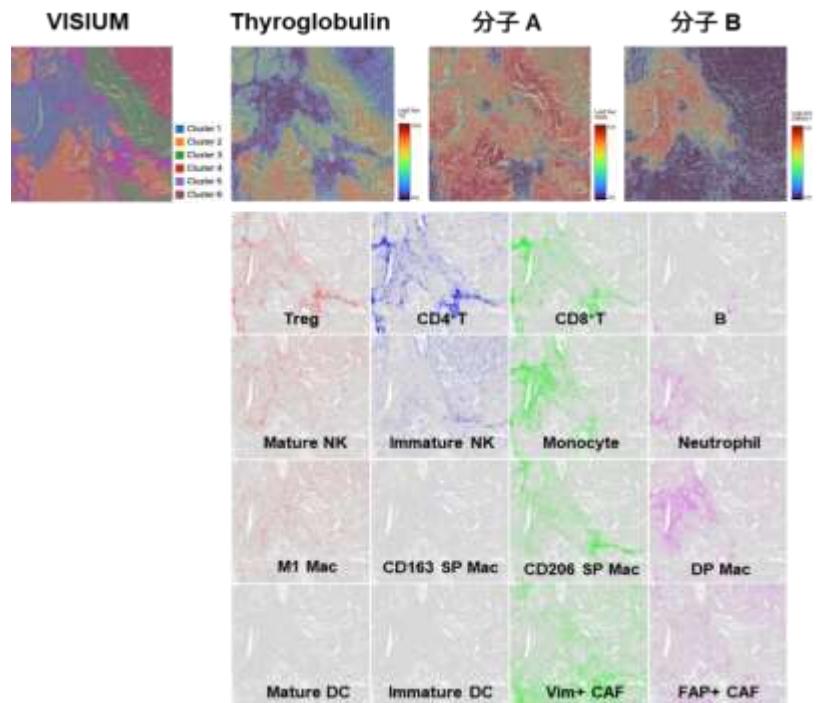
#### 【開発項目 3】 臨床検体の前向きな収集

解析基盤作成および最適化に必要な検体として、胃がん・肺がん・甲状腺がん・腎がんなどを中心に、125 検体の生検もしくは外科切除検体を集積した。一部は ICI が投与され、治療効果を含めた臨床情報が紐づいている。

### 3. 研究成果

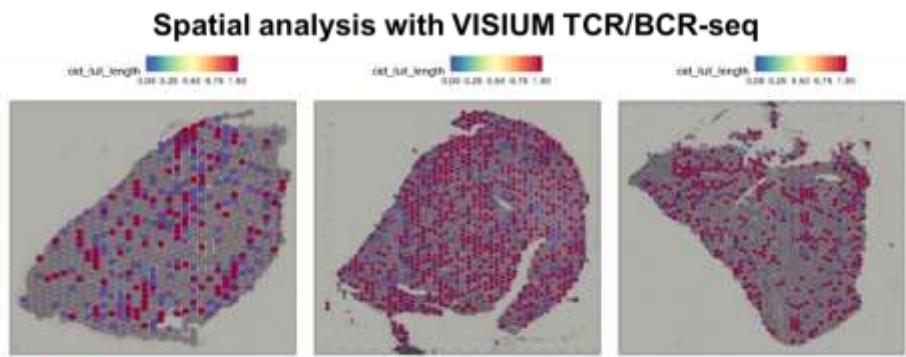
#### 【開発項目 1 の成果】

微小な腫瘍組織検体からより多くの情報を得るため、最大 32 種類の免疫関連マーカーによる多重免疫染色に加え、空間的トランスクリプトーム情報を同時に取得することが可能となった。例として、甲状腺がんのホルマリン固定ブロックから FFPE 切片を作成。1 枚を空間トランスクリプトーム解析 (VISIUM) に使用し、それと接する 1 枚を Leica 社 Cell DIVE によって多重免疫染色を実施し (32 免疫関連マーカー)、画像ソフト HALO を用いて解析することが可能となった (右図)。



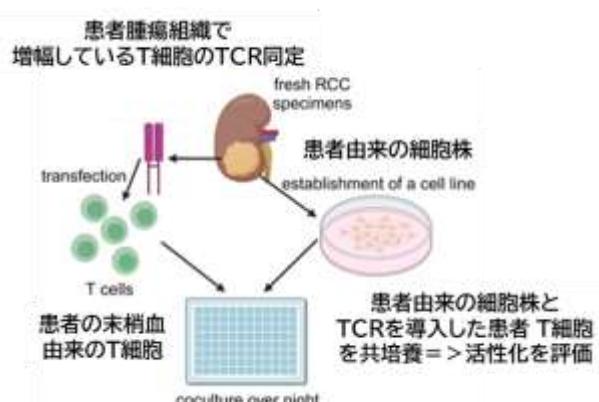
#### 【開発項目 2 の成果】

凍結切片を用いた VISIUM とその基盤を活用した *in situ* TCR-seq により TCR を同定。クローナル増殖している TCR の空間的局在を可視化し、癌特異的 TCR の機能的評価も同時に解析可能となった。例として、非小細胞肺がんの外科切除検体の一部を凍結保存し、凍結切片を用いて空間的トランスクリプトーム解析 VISIUM を実施。さらに同一 spot の RNA を用いて、*in situ* TCR-seq を実施した。以下、クローナルに増殖している TCR が含まれる spot を色付けて示す (右上図)。



Dot scTCR-seq で enrichment を確認した TCR クローンを含むVISIUM spot

さらに、腎臓がんを用いてシングルセル TCR-seq を行い、クローナルに増幅している TCR を同定。その TCR を同一患者由来の末梢血 T 細胞に導入し、TCR-T 細胞を作成した。その TCR-T 細胞を同じ患者の腫瘍組織から樹立した primary 細胞株と共に培養することで、癌特異的 T 細胞を同定することに成功した (右下図)。



### 【開発項目 3 の成果】

胃がん、肺がん、頭頸部がん、乳がんを中心に、合計 125 例の生検または外科的切除検体を収集した。一部の症例では、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の単独投与、あるいは ICI と化学療法や分子標的治療薬との併用療法が実施されており、治療効果を含む詳細な臨床情報と対応付けられている。今後は、この解析基盤から得られるデータを活用し、病理学的に治療奏効が認められた症例（主に術前に ICI を含む治療を受けた腫瘍組織）において、腫瘍局所で増殖している T 細胞クローンが、tissue residency を有して腫瘍組織内に局在しているのか、三次リンパ濾胞のようなリンパ組織様構造内に集積しているのか、あるいは末梢血やリンパ節内に分布しているのかについて、さらなる検討を進める予定である。

### 4. 今後の展開

本研究計画においては、空間トランскriプトーム解析、in situ TCR シークエンス、および多重免疫染色を同時に実施可能な統合的解析基盤の構築に成功した。本解析基盤の大きな特徴として、癌特異的 CD8 陽性 T 細胞の腫瘍組織内の局在をスライド上で可視化・評価できる点が挙げられ、これまで困難であった特定の TCR を有する T 細胞の空間的位置情報の取得が可能となった。

従来、TCR 配列の解析は主にシングルセル RNA-seq により 1 細胞レベルで実施されてきたが、それらの T 細胞が腫瘍内のどこに存在し、どのような免疫細胞と相互作用しているかを明らかにすることは困難であった。今回構築した解析基盤により、癌抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞が腫瘍組織内でどのように局在し、抑制性免疫細胞などとの相互作用を通じて機能制限を受けているのかを、空間的・機能的な観点から総合的に解析することが可能となった。この技術的成果を米国の製薬企業に説明したところ、高い評価を受け、現在、mRNA ワクチンを用いた臨床試験において、治療前後の腫瘍組織を対象としたシングルセル RNA-seq および in situ TCR-seq の統合解析を実施する附随研究が進行中である。

課題として、現在の解析基盤は 10x Genomics 社の VISIUM プラットフォームを活用しており、解析可能なスポットごとのサイズが比較的大きいという技術的な制約が残っている。今後は、それぞれのスポットに含まれる遺伝子変異や、そこから予測される変異由来の非自己抗原との関連性を明らかにすることで、どのような抗原に対して T 細胞が活性化されやすいのかをより詳細に評価可能な解析基盤へと発展させる。

### 5. 発表実績

#### 【論文】

1. Tsuge A, Watanabe S, Kawazoe A, Togashi Y, Itahashi K, Masuda M, Sai A, Takei S, Muraoka H, Ohkubo S, Sugiyama D, Yan Y, Fukuoka S, Doi T, Shitara K, **Koyama S (corresponding)**, Nishikawa H. The HSP90 Inhibitor Pimtespib Targets Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol Res.* 2025 Feb 3;13(2):273-285.
2. Habu T, Kumagai S, Bando H, Fujisawa T, Mishima S, Kotani D, Nakamura M, Hojo H, Sakashita S, Kinoshita T, Yano T, Mitsunaga S, Nishikawa H, **Koyama S (corresponding)**, Kojima T. Definitive chemoradiotherapy induces T-cell-inflamed tumor microenvironment in unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol.* 2024 Sep;59(9):798-811.
3. Hirai T, Naito Y, **Koyama S (corresponding)**, Nakanishi Y, Masuhiro K, Izumi M, Kuge T, Naito M, Mizuno Y, Yamaguchi Y, Kang S, Yaga M, Futami Y, Nojima S, Nishide M, Morita T, Kato Y, Tsuda T, Takemoto N,

Kinugasa-Katayama Y, Aoshi T, Villa JK, Yamashita K, Enokida T, Hoshi Y, Matsuura K, Tahara M, Takamatsu H, Takeda Y, Inohara H, Kumanogoh A. Sema6D forward signaling impairs T cell activation and proliferation in head and neck cancer. *JCI Insight*. 2024 Feb 8;9(3):e166349.

4. Naito Y, Koyama S (corresponding), Masuhiro K, Hirai T, Uenami T, Inoue T, Osa A, Machiyama H, Watanabe G, Sax N, Villa J, Kinugasa-Katayama Y, Nojima S, Yaga M, Hosono Y, Okuzaki D, Satoh S, Tsuda T, Nakanishi Y, Suga Y, Morita T, Fukushima K, Nishide M, Shiroyama T, Miyake K, Iwahori K, Hirata H, Nagatomo I, Yano Y, Tamiya M, Kumagai T, Takemoto N, Inohara H, Yamasaki S, Yamashita K, Aoshi T, Akbay EA, Hosen N, Shintani Y, Takamatsu H, Mori M, Takeda Y, Kumanogoh A. Tumor-derived semaphorin 4A improves PD-1-blocking antibody efficacy by enhancing CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity and proliferation. *Sci Adv*. 2023 May 19;9(20):eade0718.

#### 【学会発表】

1. 小山正平：免疫療法の感受性に関わる肺がん免疫微小環境の特徴. 第 63 回日本肺癌学会学術集会, シンポジウム, 福岡, 2022/12/3
2. 小山正平: 腫瘍微小環境における制御性 T 細胞の役割. 第 82 回日本癌学会学術総会, シンポジウム, 横浜, 2023/9/23
3. 内藤祐二朗、小山正平、益弘健太朗、平井崇士、井上貴子、町山裕知、田宮基裕、山下和男、森雅秀、武田吉人、熊ノ郷淳：腫瘍由来のセマフォリン 4A は CD8 陽性 T 細胞の細胞障害活性と増殖能を高め、抗 PD-1 抗体の治療効果を強化する. 第 82 回日本癌学会学術総会, Japanese Oral Sessions, 横浜, 2023/9/21
4. 小山正平：がん治療を席巻する免疫療法：現状と未来. 第 83 回日本癌学会学術総会, コアシンポジウム, 福岡, 2024/9/21

#### 【特許】

該当なし

#### 【その他】

該当なし