

氏 名 すけがわ けんた  
祐川 健太

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 289 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学 専攻

学 位 論 文 題 目 大腸がん及び乳がんの腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の PD-1<sup>+</sup>および  
PD-L1<sup>+</sup>T リンパ球集団の T 細胞受容体 (TCR) レパトアの解析  
(Analysis of T cell receptor repertoire of PD-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>-</sup>  
population in tumor infiltrating lymphocytes of colorectal  
cancer and breast cancer)

論文審査委員

(主査)	教 授	林 龍二
(副査)	教 授	井村 穰二
(副査)	教 授	山本 善裕
(副査)	教 授	安田 一朗
(指導教員)	教 授	藤井 努

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

次世代のがん免疫治療として、腫瘍特異的T細胞あるいは腫瘍特異的T細胞受容体導入T細胞を用いた養子T細胞療法が期待されている。養子T細胞療法においては、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）が腫瘍特異的T細胞の主要な供給源であるが、その表現型に対する機能の解析は十分ではない。

本研究では、大腸がん、乳がん、および同時多発がんのCD8<sup>+</sup> TILをPD-1<sup>+</sup>とPD-1<sup>-</sup>のポピュレーションに分け、そのT細胞受容体（TCR）のレパトアを単一細胞レベルで解析し、PD-1の発現とTILのTCRレパトアとの関連を明らかにする。さらに、TILから取得したTCR遺伝子の中から腫瘍特異的TCR遺伝子を同定し、TCRの腫瘍反応性との関連を明らかにすることを目的とする。

### 〔方法並びに成績〕

大腸がん患者21名、乳がん患者10名の腫瘍よりCD8<sup>+</sup> TILをPD-1<sup>+</sup>とPD-1<sup>-</sup>のポピュレーションを調整し、そのTCRβのレパトアを単一細胞レベルで解析した。その結果、大腸がんおよび乳がんにおいては、同じTCRβを発現したT細胞の増殖、すなわち、クローナルに増殖しているポピュレーションが、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILの40～60%を占めていた。一方、PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILでは、クローナルな増殖を示すポピュレーションは、乳がんではその14%に過ぎず、健常人の末梢血リンパ球におけるクローナルな増殖を示すポピュレーションの頻度と有意な差はなかった。それに対して、大腸がんのPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILでは、約40%のポピュレーションがクローナルな増殖を示していた。

次に、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILとPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILにおけるTCRレパトアが重なっているか否かを大腸がんにおいて調べた。その結果、大腸がんでは、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILとPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILのTCRレパトアはほとんど重なっていなかった。また、原発巣と転移巣におけるCD8<sup>+</sup> TILのTCRレパトア解析を行ったところ、同じTCRを発現したCD8<sup>+</sup> TILが原発巣と転移巣の両方でクローナルに増殖していることが観察された。さらに、腫瘍の原発巣でPD-1<sup>+</sup>のCD8<sup>+</sup> TILクローンは転移巣においてもPD-1<sup>+</sup>であり、原発巣でPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILクローンは転移巣においてもPD-1<sup>-</sup>であることが明らかになった。

また、大腸がんと肝がんを併発した1症例についてもTILのTCRレパトアを解析した。その結果、異なる組織由来の腫瘍であるにもかかわらず、同じTCRを発現したCD8<sup>+</sup> TILが両方の腫瘍でクローナルに増殖しており、大腸がんではPD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILクローンは肝がんにおいてもPD-1<sup>+</sup>であり、大腸がんではPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILクローンは肝がんにおいてもPD-1<sup>-</sup>であることが明らかになった。

### 〔総括〕

本研究の結果は、1) 腫瘍内微小環境の違い（大腸がん和乳がんでの違い）によって、PD-1<sup>-</sup>のポピュレーションの中にもクローナルな増殖を示すものが出現すること、2) 腫瘍の原発巣においてクローナルな増殖を示すPD-1<sup>+</sup>のCD8<sup>+</sup> TILは、転移巣あるいは異なる組織由来の腫瘍においてもPD-1<sup>+</sup>になり、PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TILは転移巣あるいは異なる組織由来の腫瘍においてもPD-1<sup>-</sup>になることを示している。このことから、腫瘍の微小環境および腫瘍に浸潤したナイーブCD8<sup>+</sup> TILクローンのTCRの機能により免疫チェックポイント分子PD-1の発現が制御される可能性が示唆された。その制御機構の解明が、今後のがんの免疫学的治療、免疫チェックポイント阻害療法の適用において重要な情報をもたらすことが期待される。

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

## 〔目的〕

次世代のがん免疫治療として、腫瘍特異的T細胞あるいは腫瘍特異的T細胞受容体導入T細胞を用いた養子T細胞療法が期待されている。養子T細胞においては、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）が腫瘍特異的T細胞の主要な供給源であるが、その表現型に対する機能の解析は十分ではない。本研究では、大腸がん、乳がん、および同時多発がんのCD8<sup>+</sup>TILをPD-1<sup>+</sup>とPD-1<sup>-</sup>のポピュレーションに分け、そのT細胞受容体（TCR）のレパトアを単一細胞レベルで解析し、PD-1の発現とTILのTCRレパトアとの関連を明らかにする。さらに、TILから取得したTCR遺伝子の中から腫瘍特異的TCR遺伝子を同定し、TCRの腫瘍反応性との関連を明らかにすることを目的とする。

## 〔方法ならびに成績〕

大腸がん患者21名、乳がん患者10名の腫瘍よりCD8<sup>+</sup>TILをPD-1<sup>+</sup>とPD-1<sup>-</sup>のポピュレーションを調整し、そのTCR  $\beta$  のレパトアを単一細胞レベルで解析した。その結果、大腸がんおよび乳癌においては、同じTCR  $\beta$  を発現したT細胞の増殖、すなわち、クローナルに増殖しているポピュレーションが、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TILの40～60%を占めていた。一方、PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TILでは、クローナルな増殖を示すポピュレーションは、乳癌ではその14%に過ぎず、健常人の末梢血リンパ球におけるクローナルな増殖を示すポピュレーションの頻度と有意差はなかった。それに対して、大腸がんのPD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TILでは、約40%のポピュレーションがクローナルな増殖を示していた。

次に、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL と PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TIL における TCR レパトアが重なっているか否かを大腸がんにおいて調べた。その結果、大腸がんでは、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL と PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TIL の TCR レパトアはほとんど重なっていなかった。また、原発巣と転移巣における CD8<sup>+</sup>TIL の TCR レパトア解析を行ったところ、同じ TCR を発現した CD8<sup>+</sup>TIL が原発巣と転移巣の両方でクローナルに増殖していることが観察された。さらに、腫瘍の原発巣で PD-1<sup>+</sup>の CD8<sup>+</sup>TIL クローンは転移巣においても PD-1<sup>+</sup>であり、原発巣で PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TIL クローンは転移巣においても PD-1<sup>-</sup>であることが明らかになった。

また、大腸がんと肝がんを併発した1症例についても TIL の TCR レパトアを解析した。その結果、異なる組織由来の腫瘍であるにもかかわらず、同じ TCR を発現した CD8<sup>+</sup>TIL が両方の腫瘍でクローナルに増殖しており、大腸がんでは PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL クローンは肝がんにおいても PD-1<sup>+</sup>であり、大腸がんでは PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TIL クローンは肝がんにおいても PD-1<sup>-</sup>であることが明らかになった。

〔総括〕

本研究の結果は、1) 腫瘍内微小環境の違い(大腸がんと乳がんでの違い)によって、PD-1<sup>+</sup>のポピュレーションの中にもクローナルな増殖を示すものが出現すること、2) 腫瘍の原発巣においてクローナルな増殖を示す PD-1<sup>+</sup>の CD8<sup>+</sup>TIL は、転移巣あるいは異なる組織由来の腫瘍においても PD-1<sup>+</sup>になり、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL は転移巣あるいは異なる組織由来の腫瘍においても PD-1<sup>+</sup>になることを示している。このことから、腫瘍の微小環境および腫瘍に浸潤したナイーブ CD8<sup>+</sup>TIL クローンの TCR の機能により免疫チェックポイント分子 PD-1 の発現が制御される可能性が示唆された。その制御機構の解明が、今後のがんの免疫学的治療、免疫チェックポイント阻害療法の適用において重要な情報をもたらすことが期待される。

以上のことから大腸がん腫瘍内微小環境において、クローナル増殖を示す PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL が存在すること、腫瘍の原発巣、転移巣に集積する TIL が同一クローンであること、を初めて明らかにした点は新規性があり、このことは TCR の機能により PD-1 の発現が制御されることを示唆するという理由により医学における学術的重要性も高く、これらの情報が免疫チェックポイントを利用したがん免疫療法を改善し得る可能性があることより臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。