

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19285

研究課題名（和文）見るだけでがんを攻撃するキラーT細胞を判別する顕微鏡・セルソーターの開発

研究課題名（英文）Development of a microscope/cell sorter to identify killer T cells that attack cancer simply by observing them

研究代表者

垣見 和宏（Kakimi, Kazuhiro）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：80273358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：「見るだけでがんを攻撃するキラーT細胞を判別する顕微鏡・セルソーターを開発すること」をテーマに機能や分化が異なるT細胞の識別法を検討した。動的ゴーストイメージング（GMI: Ghost Motion Imaging）法は、計測された細胞画像情報を、画像に再構成せずにデータのままで活用し、機械学習によりその細胞特性を捉えて高速判別する手法である。GMI技術を用いて、抗原刺激を受けて様々な機能を獲得し変化するT細胞の分化を、従来の細胞表面マーカーに対する蛍光抗体による識別ではなく、イメージ情報によってのみ識別する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAR-T細胞治療に加えて、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）治療がFDAの承認を受けた。これらのT細胞治療は、体外で培養増殖させたがん特異的T細胞を用いる治療であるため、T細胞の機能と増殖をバランスよく保持した細胞を安全に効率よく培養する必要がある。そのためには、閉鎖系の自動培養装置の開発が求められており、培養中のT細胞の状態、機能を把握する必要がある。我々の研究成果は、蛍光抗体などを用いることなく、細胞を観察しその画像情報のみでT細胞の分化度や機能を識別できることから、閉鎖培養装置に組み込み、T細胞のモニタリングを可能にし、CAR-TやTIL治療に最適な培養細胞の調製に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：We utilized GMI (Ghost Motion Imaging) technology to develop a novel cell analyzing and sorting system capable of identifying killer T cells that attack cancer simply by observing them. The GMI method utilizes measured cell image data directly without reconstructing images, enabling rapid identification of cell characteristics through machine learning. Using GMI technology, we established a method to differentiate T cells with different functions and differentiation states, which acquire various functions upon antigen stimulation, solely based on image information rather than conventional identification via fluorescent antibodies targeting cell surface markers.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：GMI CTL キラーT細胞 AI 機械学習 T細胞活性化

1. 研究開始当初の背景

がん免疫治療の根幹は、がん細胞を特異的に認識し傷害する腫瘍（抗原）特異的 T 細胞（キラー T 細胞）による抗腫瘍免疫応答である。現在のがん免疫治療の中心である免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍内の免疫抑制性の環境下で機能を喪失（免疫疲弊）した腫瘍特異的 T 細胞の再活性化により抗腫瘍効果を得る治療である。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤による治療効果が限定的である理由の一つは、腫瘍内では質・量ともに腫瘍特異的 T 細胞が不十分であることである。わずかに存在する腫瘍特異的 T 細胞も、免疫チェックポイント阻害剤単独では、再活性化させ増殖させることが不十分であることが多い。そこで、研究代表者の垣見は、この腫瘍特異的 T 細胞（CTL）を同定し、分離培養して増殖させて直接患者に投与する CTL 治療や、腫瘍特異的 T 細胞の TCR の遺伝子をクローニングして、新たに増殖能を持った T リンパ球に遺伝子導入して腫瘍特異的 T 細胞を作製して治療に用いる TCR-T 細胞治療の研究開発を進めている。

腫瘍特異的 T 細胞は、腫瘍に存在する遺伝子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を認識することが知られているが、ネオアンチゲンの多くは、パッセンジャー変異と呼ばれる個々の患者に固有の遺伝子変異産物であるため、ネオアンチゲンを同定することは容易ではなく、未知であることが多い。ネオアンチゲンが同定できない大多数の患者においては、MHC テトラマーを用いた腫瘍特異的 T 細胞を同定、検出することが困難である。がん免疫治療開発に従事する垣見にとっては、腫瘍特異的 T 細胞の同定と分離を可能にする新たな技術革新の導入が必要であった。

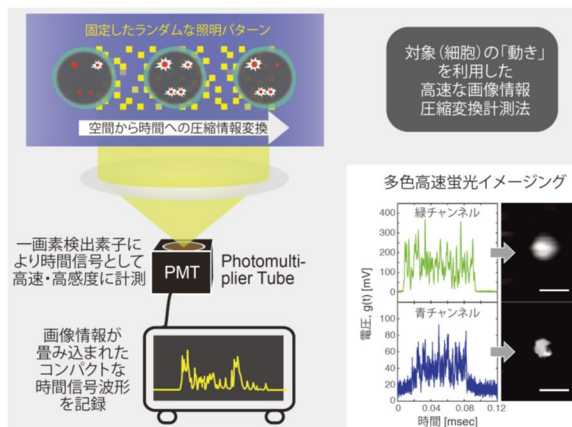
シンクサイトの研究者らは、高速に細胞の構造情報を取得するイメージング技術と、その情報をリアルタイムで処理するデータ処理技術に先端マイクロ流体細胞分取技術を融合させた GC 技術（Science, 2018 Jun 15;360: 1246-1251）の開発に成功し、その技術を再生・細胞医薬領域に加え、創薬や体外診断の領域へ展開することを目指していた。

腫瘍特異的 T 細胞（キラー T 細胞）を用いたがん免疫治療法の開発に取り組む研究代表者は、フローサイトメーターで取り扱うパラメーター数は通常は数 10 個に過ぎないが、特徴量の表現に限られる画像を見ずにデータをそのまま評価する GC 技術を活用すれば、より多くの特徴量を用いた評価が可能になり、画像イメージから形態だけでなく細胞の機能を把握することが可能になるのではないかと考えた。従来のフローサイトメーターの情報に、イメージング情報を活用することで、機能や分化の手移動が異なる T 細胞を識別し、延いてはがん抗原・ネオアンチゲンを認識する T 細胞を判別可能にするシステム構築が可能になるのではないかと期待された。すなわち、顕微鏡を見る（イメージング情報を取得する）だけで、T 細胞の機能を評価し、腫瘍特異的 T 細胞（キラー T 細胞）を判別する画期的なシステムの構築を目的として本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「見るだけでがんを攻撃するキラー T 細胞を判別する顕微鏡・セルソーターを開発すること」である。

研究協力者が開発した Ghost Cytometry (GC) 技術 (Kawamura Y, et al. Science. 2018 15;360: 1246-1251) は、動的ゴーストイメージング (GMI: Ghost Motion Imaging) 法によって計測された細胞画像情報を、**画像に再構成せずにデータのまま活用し、機械学習によりその細胞特性を捉えて高速判別する**新手法である。私たち人の知識や識別能力が追いついていないため、画像への再構成のステップでは、せっかく取得した膨大な情報を圧縮してしまうことになる。それならイメージ情報をそのまま使おうというコンセプトのもとに、この GC 技術と流体技術を組み合わせることによって、毎秒数千細胞のスピードで細胞を判別し分離する世界最速の AI 駆動型イメージングセルソーターが実現されている (THINKCYTE 社: <https://thinkcyte.com/>)。



3. 研究の方法

(1) 従来の FACS 解析データを教師とする機械学習を用いた腫瘍浸潤 T 細胞の解析

AI には、詳細で正確な学習データセットと検証のためのデータセットが必要である。まず、がん細胞表面に提示されたがん抗原を認識し、正常細胞には反応せず、がん細胞に対してのみ反応する腫瘍特異的 T 細胞として、マウスメラノーマ細胞 B16F10 特異的 CTL (pme1-1 TCR トランスジェニック T 細胞) と胃がん細胞株 YTN16 特異的 CTL (mCdt1 特異的 CTL 細胞株) の 2 種類のがん細胞株に対する CTL を用いた。これらの CTL に対して、それぞれのがん抗原を発現する細胞とがん抗原を発現しないがん細胞を準備して、CTL と 16 時間共培養した。がん抗原を発現するがん細胞と共培養した CTL は、がん抗原を認識して直ちに活性化し、がん細胞を攻撃する。活性化した CTL は細胞表面に CD69 及び CD137(4-1BB) を発現する。一方、がん抗原を発現しないがん細胞と共培養した CTL は、活性化も増殖も認めず、がん細胞に対する細胞傷害活性も観察されない。

CTL の活性化、および抗原認識・刺激の有無は、蛍光色素を標識した抗 CD69 抗体あるいは抗 CD137 抗体を用いて、フローサイトメーターで CD69、CD137 の発現を検出し判定した。同時に GMI データを取得し、教師あり学習に用いた。

フローサイトメーターで取得した CD69 発現と CD137 発現の有無による抗原刺激有無の判定をもとに、GMI データを教師データとして、サポートベクターマシーン (SVM) を用いてがん細胞との共培養あり (抗原認識・刺激有) の CTL と共培養なし (抗原認識・刺激なし) の CTL の 2 群を識別した。

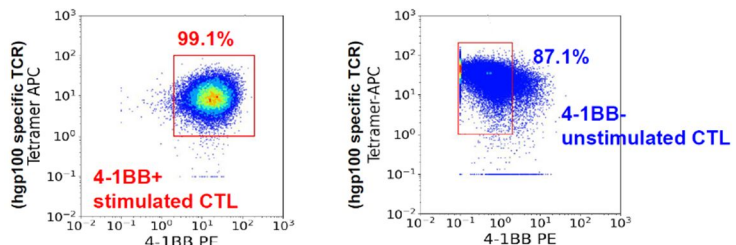
(2) 教師なし学習 (UMAP) による活性化 T 細胞の分類

フローサイトメーターの情報を使わず、がん細胞と共培養した活性化 CTL と CTL GMI データのみで教師なし学習 (UMAP) による分類を行い、未知のサンプルに対する判別能力を検討した。

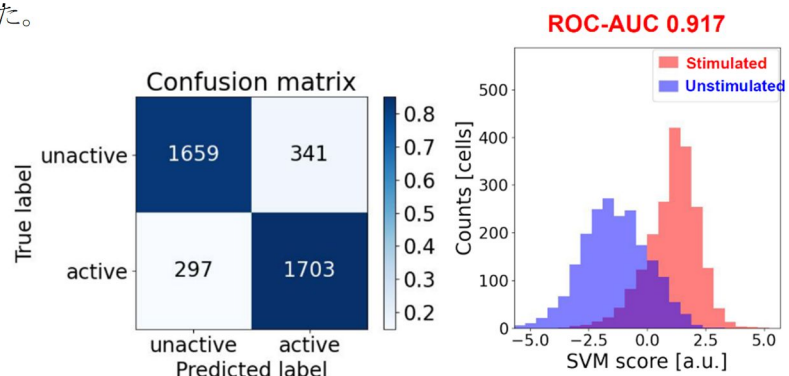
4. 研究成果

(1) 共培養有り無しのパme1-1 細胞の識別

がん抗原陽性細胞と共培養した pme1-1 細胞の 99.1% が CD137(4-1BB) を発現した。一方、がん抗原陰性細胞と共培養した pme1-1 細胞も、IL-2 存在下の培養でわずかに CD137(4-1BB) を発現していたが、87.1% の細胞は CD137(4-1BB) 陰性であった。がん抗原の認識有り、無し 2 群から、それぞれ 2000 個の細胞から取得したデータを教師データとして SVM で予測アルゴリズムを構築し、教師データに用いなかった 2000 個の細胞を評価した。



SVM での予測結果と、実際のがん抗原陽性有無の細胞との共培養の事実の一致をみると、感度 = 0.871、特異度 = 0.8535、ROC-AUC = 0.93 だがん抗原陽性細胞との共培養で活性化した T 細胞とがん抗原陰性細胞との共培養で活性化されていない T

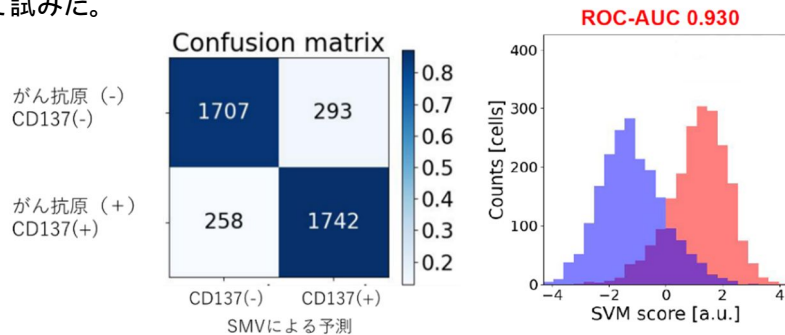


細胞を識別できた。T 細胞は、16 時間の培養中に、がん抗原なしの細胞との共培養でも 12.9% の細胞が CD137(4-1BB) を発現していたことを考えると、非常に優れた分類精度が得られたと考えられた。

(2) CD137(4-1BB) 陽性細胞と陰性細胞の教師あり学習

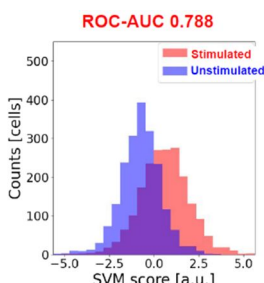
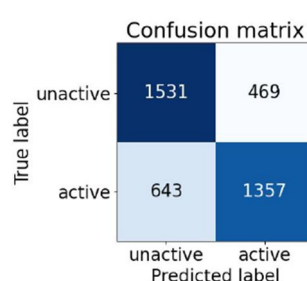
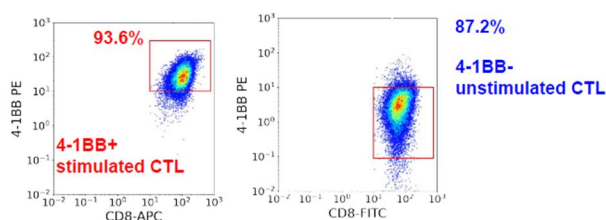
がん抗原陽性細胞との培養でも CD137(4-1BB)陰性 CTL が存在し、がん抗原陰性細胞との培養でも CD137(4-1BB)陽性 CTL が出現することから、より厳密な解析を試みるため、がん抗原陽性細胞と共培養した CD137(4-1BB)陽性 CTL と、がん抗原陰性細胞と培養した CD137(4-1BB)陰性 CTL の 2 群の分類を SVM を用いて試みた。

予め実際に抗原刺激を受けて活性化した細胞とそうでない細胞を CD137(4-1BB)を用いて厳密に分類したのちに取り得たデータを用いて教師学習すると、感度 = 0.871、特異度 = 0.8535、AUC = 0.930 と、より識別能が向上した。



(3) 共培養有り無しの mCdt1 特異的 CTL 細胞株の識別

胃癌細胞株 YTN16 に対する mCdt1 特異的 CTL 細胞株を用いた場合、mCdt1 ペプチドパルスした抗原陽性細胞と共培養した 99.1% の細胞が CD137(4-1BB)を発現した。一方、がん抗原陰性細胞と共培養した CTL も、IL-2 存在下の培養でわずかに CD137(4-1BB)を発現するため、87.2% の細胞が CD137(4-1BB)陰性であった。すべての細胞が同じ TCR を持つ TCR トランスジェニック細胞である pmel-1 と異なり、mCdt1 特異的 CTL は、様々な TCR からなるポリクローナルな細胞集団であるが、CD137(4-1BB)の発現で評価する T 細胞の活性化は pmel-1 細胞と同程度であった。



しかしながら、抗原刺激に対する TCR シグナル強度が異なるこのにより、活性化による形態の変化の差が不均一であるため、共培養有り無しだけでは GMI にオーバーラップが認められ、2000 個の細胞から取得したデータを教師データとして SVM で予測アルゴリズムを構築し、教師データに用い

なかった 2000 個の細胞を評したところ ROC-AUC=0.788 と良好な分類精度が得られたが、均一な細胞集団である pmel-1 の分類には及ばなかった。

(4) モデルの学習に使用するモダリティの組合せと分類精度の関係

抗原刺激による T 細胞の活性化を蛍光標識抗体を用いずに分類するために用いるモダリティを比較した。通常のフローサイトメーターで取得される FSC と BSC を用いて分類した場合の ROC-AUC を青矢印で示し、GMI を合わせて最も優れた分類を可能にした組み合わせを赤矢印で示した。Pmel-1 と mCdt1-CTL いずれの場合も、FSC+BSC のみでモデルの学習を行った場合より、GMI 波形を組み合わせることで分類精度が向上した。Pmel-1 CTL を用いた場合に比べて、mCdt1-specific CTL line を使った場合の分類は困難であり、FSC+BSC だけでは分類精度が最も低かったが、GMI を併用することで、かなり識別能が改善した。GMI という新たなモダリティで取得される多数のパラメーターが、細胞の機能や分化の判別に貢献できることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sun Changbo, Nagaoka Koji, Kobayashi Yukari, Maejima Kazuhiro, Nakagawa Hidewaki, Nakajima Jun, Kakimi Kazuhiro	4. 巻 152
2. 論文標題 Immunotherapies targeting neoantigens are effective in PD-1 blockade resistant tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1463 ~ 1475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Teshima Taro, Kobayashi Yukari, Kawai Taketo, Kushihara Yoshihiro, Nagaoka Koji, Miyakawa Jimpei, Akiyama Yoshiyuki, Yamada Yuta, Sato Yusuke, Yamada Daisuke, Tanaka Nobuyuki, Tsunoda Tatsuhiko, Kume Haruki, Kakimi Kazuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Principal component analysis of early immune cell dynamics during pembrolizumab treatment of advanced urothelial carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Beck Richard J., Sloot Sander, Matsushita Hirokazu, Kakimi Kazuhiro, Beltman Joost B.	4. 巻 26
2. 論文標題 Mathematical modeling identifies LAG3 and HAVCR2 as biomarkers of T?cell exhaustion in melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106666 ~ 106666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林由香利, 長岡孝治, 佐藤靖祥, 船内雄生, 久保花織, 西江敏和, 岡本幸子, 高橋俊二, 垣見和宏
2. 発表標題 軟部肉腫におけるネオアンチゲン特異的TCRの探索.
3. 学会等名 第20回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長岡孝治, 小林由香利, 加藤洋人, 齊藤知子, 戸塚義和, 竹田和由, 石川俊平, 垣見和宏
2. 発表標題 scRNA-Seq, TCR-Seqデータを用いたネオアンチゲン特異的TCRの同定と、ネオアンチゲン特異的CD8+T細胞に含まれる2種類の疲弊T細胞の解析
3. 学会等名 第20回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河西碩紀, 長岡孝治, 垣見和宏, 角田達彦
2. 発表標題 養子免疫細胞療法におけるがん微小環境のエージェントベースモデルによるシミュレーション解析
3. 学会等名 第20回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長岡孝治, 小林由香利, 加藤洋人, 齊藤知子, 戸塚義和, 竹田和由, 石川俊平, 垣見和宏
2. 発表標題 scRNA-Seq, scTCR-Seqデータを用いたネオアンチゲン特異的TCRの同定とそれらを持つ2種類の疲弊T細胞の解析
3. 学会等名 第27回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	長岡 孝治 (nagaoka Koji) (80649799)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小林 由香利 (Kobayashi Yukari) (40866919)	東京大学・医学部附属病院・特任助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関