

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：臨床腫瘍特異的な $\gamma$   $\delta$  T 細胞の同定技術に基づく革新的がん診断・治療法の基盤開発
2. 研究開発代表者：加藤洋人（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
3. 研究開発の成果

本研究開発の目的は、びまん性胃癌組織および同一人の正常部胃粘膜に浸潤する $\gamma$   $\delta$  T 細胞が発現する $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体遺伝子配列を次世代シーケンサによって網羅的に解読し、がん組織に特徴的に浸潤する $\gamma$   $\delta$  T 細胞の抗原受容体構造を探索することであった。以下2点の研究開発成果が得られた。

① $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体遺伝子配列の次世代シーケンス・プロトコールが開発された。すなわち、(1)凍結バンキングされた臨床胃癌試料からの RNA 抽出プロトコールの樹立、(2)V(D)J ゲノム再構成によって形成された $\gamma$   $\delta$  受容体可変領域レパートリの multiplex PCR 増幅法の開発、(3)multiplex PCR 産物の精製法に関するプロトコールの樹立、(4) $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体 multiplex PCR 産物の次世代シーケンス・プロトコールの樹立等、シーケンス解析の各段階における実験プロトコールをさまざまな条件検討に基づいて研究開発した。その結果、凍結保存されたびまん性胃癌症例のがん部および非がん部から抽出された RNA を鋳型として、臨床腫瘍症例における $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体の可変領域レパートリ情報を次世代シーケンサによって網羅的に取得することが可能になった。また、次世代シーケンスによって得られた $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体の可変領域塩基配列情報をアミノ酸配列へ変換するアルゴリズムの樹立、およびV(D)J ゲノム再構成の定義付け法に関するアルゴリズムの樹立等、バイオインフォマティクスの解析法の研究開発も併せて行った。

②上記で確立された実験・解析法に基づいて、びまん性胃癌 30 症例のがん部および非がん部に浸潤する $\gamma$   $\delta$  T 細胞の抗原受容体遺伝子配列を次世代シーケンス解析によって網羅的に取得した。各検体において約数十万リード以上の抗原受容体遺伝子配列情報が得られた。次世代シーケンス解析の妥当性を検討するために、取得された $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体配列のうち代表的な複数の例について従来のシーケンス法による検証シーケンスを行ったところ、次世代シーケンス情報の正確性が実証された。取得したシーケンス情報を基盤として、非がん部胃粘膜に比較して胃癌組織において特徴的に存在する $\gamma$   $\delta$  受容体配列を包括的に探索したところ、がん特異的な浸潤を呈する複数の $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体構造を同定することができた。

この研究開発計画によって、臨床がん試料を用いた $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体の網羅的解析法が開発された。また、実際に次世代シーケンス解析によって取得されたびまん性胃癌試料の $\gamma$   $\delta$  T 細胞抗原受容体配列情報は、腫瘍免疫システムの本態解明あるいは腫瘍免疫療法開発における基盤的データベースになることが期待される。

4. その他  
特記事項なし