

使用 QuickSwitch™ 定制四聚体试剂盒分析新抗原反应性 T 细胞



小林由香利¹⁾、孙长博¹⁾²⁾、细井亮宏¹⁾、木村真之介¹⁾、垣见和宏¹⁾

1) 东京大学医学部附属医院 免疫细胞治疗学讲座

2) 中国医科大学附属第一医院 胸外科

■ 新抗原 (neoantigen)

随着抗 PD-1/PD-L1 抗体等免疫检查点抑制剂的出现, 癌症免疫疗法受到了越来越多的关注。免疫检查点抑制剂的作用机制是肿瘤中被抑制的内源性抗肿瘤免疫应答的再激活, 其中肿瘤特异性 T 细胞起到关键作用¹⁾。经研究发现, 由免疫检查点抑制剂重新激活的肿瘤特异性 T 细胞识别的癌抗原是来源于癌细胞基因突变产生的新抗原, 这使得研究者们对肿瘤特异性 T 细胞和新抗原的研究产生了浓厚兴趣²⁾。

细胞内的蛋白质被降解成由 9~11 个氨基酸组成的多肽, 与 MHC class I 分子的抗原结合槽结合后被呈递于细胞表面³⁾。该多肽/MHC 复合物可以被 T 细胞受体 (TCR) 识别。一方面, T 细胞通过胸腺中的阴性选择诱导免疫耐受, 从而抑制自身免疫反应, 因此不会对正常细胞中表达的蛋白质产生免疫反应。另一方面, 癌细胞在癌变过程中积累了许多体细胞基因突变 (somatic mutation), 并表达正常细胞中不存在的含有氨基酸突变的蛋白质。含有这种突变的蛋白质原本是体内不存在的抗原, 因此被称为“新”抗原。由于这种新抗原不会在胸腺中诱导免疫耐受, 因此我们可以期待它会出现强烈的 T 细胞免疫应答 (高免疫原性)。所以, 含有突变氨基酸并与 MHC class I 分子结合, 可以被 T 细胞识别的多肽称为新表位 (图 1)⁴⁾。



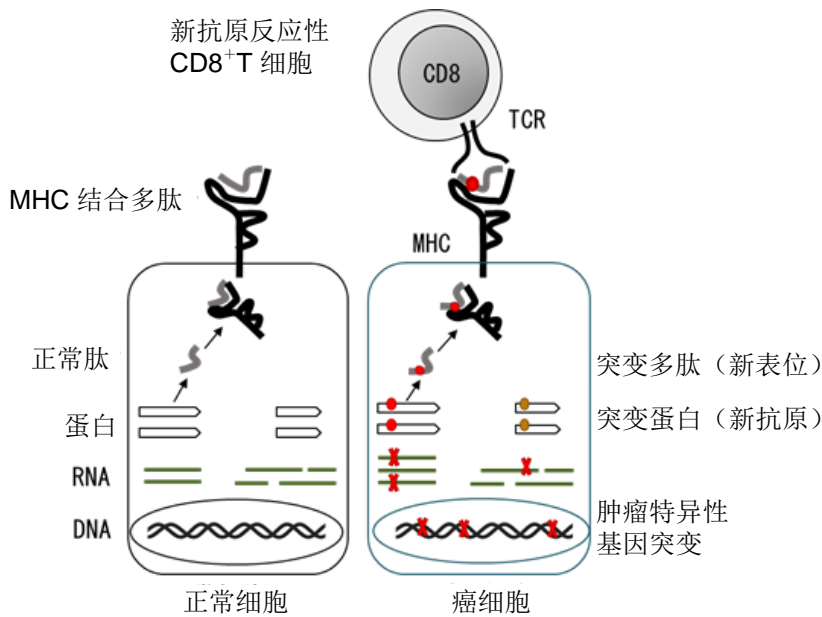


图 1. 来源于肿瘤特异性基因突变产物的新抗原

■ 使用下一代测序仪预测新抗原

在癌细胞中发现的基因突变包括直接参与癌变和细胞增殖的驱动突变以及似乎与其无关的伴随突变。对于开发分子靶向药物来说，鉴定驱动突变较为重要，但作为肿瘤免疫的靶抗原分子，不会区分驱动突变和伴随突变，只要伴有氨基酸突变，便可能是新抗原。然而，与相同的驱动突变以一定比例存在于一些患者不同，许多伴随突变是个体特有的突变，因此，迄今为止伴随突变尚未成为药物开发的对象。

随着下一代测序仪（NGS）的出现，研究者们可以破译个体水平的基因组，从手术和活体组织检查中获得的患者组织中提取 DNA 和 RNA，并分析外显子组和转录组，在此基础上可以进行新抗原预测⁵⁾。新抗原的鉴定算法并非什么特别的方法，同样是基于分子生物学和免疫学理论，通过把鉴定驱动突变（作为分子靶向药物的靶分子）与开发癌症多肽疫苗相结合，构建新抗原/新表位的预测算法⁶⁾。在含有氨基酸突变的基因突变产物中，经预测后，与患者的 MHC 具有高亲和力的由 9~11 个氨基酸序列组成的多肽被作为新表位的候选。



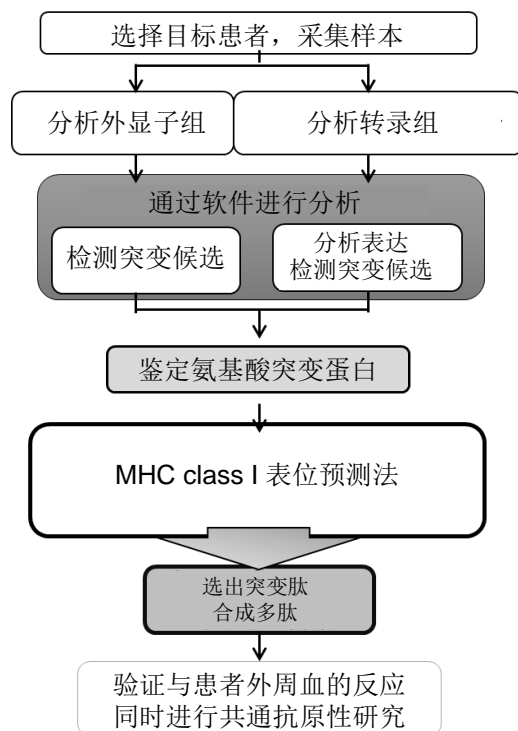


图 2. 新抗原预测算法

■ 筛选新抗原反应性 T 细胞

目前，新抗原的预测仅仅是一种预测，实际上患者体内是否存在对突变多肽有反应的淋巴细胞尚未知晓。即使存在，它对肿瘤特异性免疫反应有多大贡献也未可知。同时，如何将其与治疗联系起来，还有许多亟待解决的问题。我们以食道癌患者 NGS 数据中得到的新表位为例，介绍一例实际鉴定出了对患者外周血单核细胞（PBMC）有反应的新表位抗原肽的案例。

进行了食道癌患者的总外显子测序和总 RNA 测序后，我们发现了 209 个肿瘤特异性体细胞突变，其中有 43 个表达被确认，结合与患者具有的 HLA-A*02:06, HLA-A*11:01, HLA-B*52:01, HLA-B*54:01, HLA-C*01:02, HLA-C*12:02 的亲和力预测数据，合成了 54 个新表位多肽。将从患者处获得的 PBMC 和合成的多肽在培养板共同培养，并通过 ELISA 筛选产生的 IFN- γ (图 3)。患者 PBMC 对 NFATC2IP 基因第 283 位的丝氨酸突变为亮氨酸形成的多肽 RLPLRM[L]EPL 有反应，并产生了 IFN- γ 。这段多肽对 HLA-A*02:06 的亲和力预测值(IC50)为 163.8 nM，没有突变的 RLPLRM[S]EPL 多肽的 IC50 值为 894.2 nM。



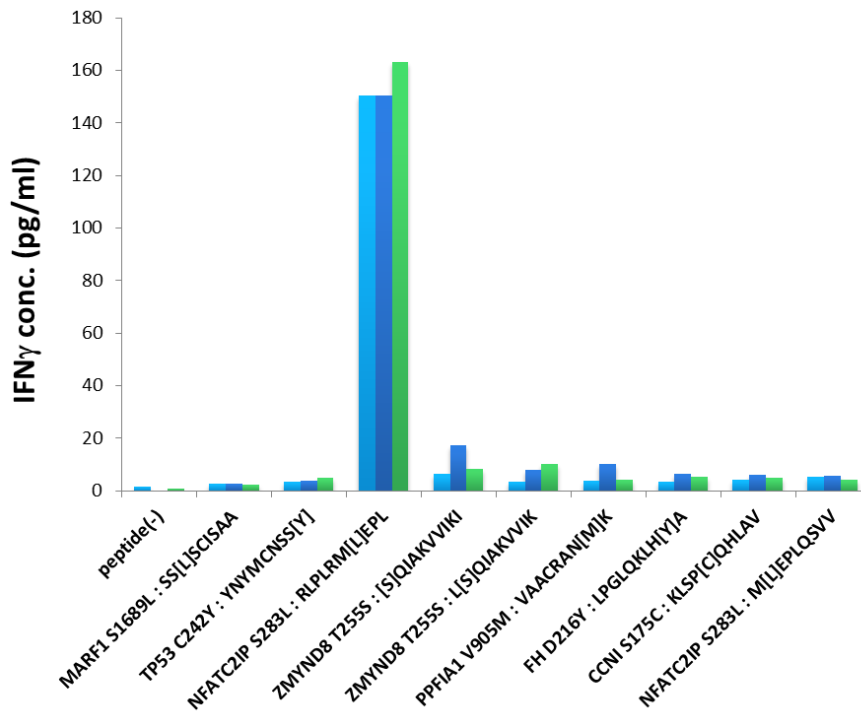


图 3. 使用新表位肽板进行筛选，通过 ELISA 测定产生的 IFN- γ

■ 通过 QuickSwitch™ 定制四聚体检测新抗原反应性 T 细胞

为了验证患者外周血中是否存在新抗原反应性 T 细胞，将患者的 PBMC 与新表位多肽负载后的患者树突状细胞（DC）共同培养 24 天，在新抗原反应性 T 细胞的选择性增殖后尝试进行四聚体染色。使用 QuickSwitch™ 定制四聚体试剂盒（MBL）和合成的多肽，在实验室中进行多肽置换反应，制备了新表位多肽四聚体和用于对照的野生型四聚体。突变型多肽和对照野生型多肽的多肽置换效率分别为 98.6% 和 96.7%（图 4）。



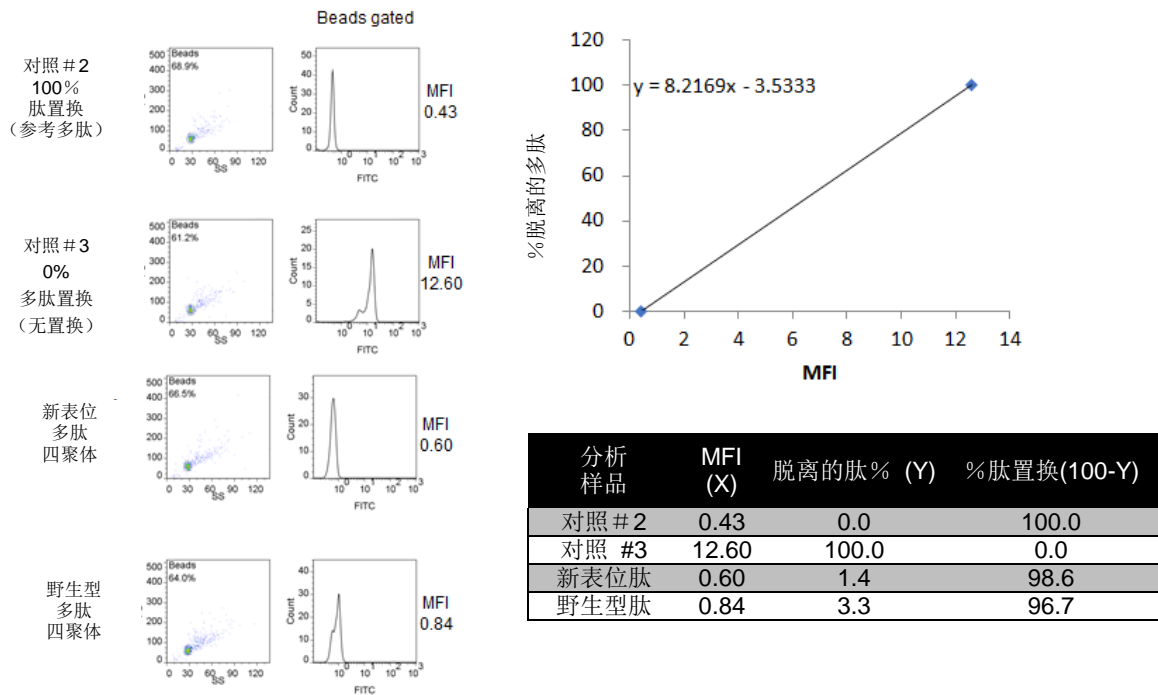


图 4. 通过 QuickSwitch™ 定制四聚体试剂盒确认新表位特异性四聚体的制备和置换效率

使用这些四聚体，对培养后的患者 PBMC 进行 CD8、CD3、Fixable Viability Dye eFluor™ 780、四聚体染色时，发现 CD3 阳性细胞中 0.8% 的细胞显示出四聚体阳性，这证明了患者外周血中存在与新抗原反应的 T 细胞（图 5）。



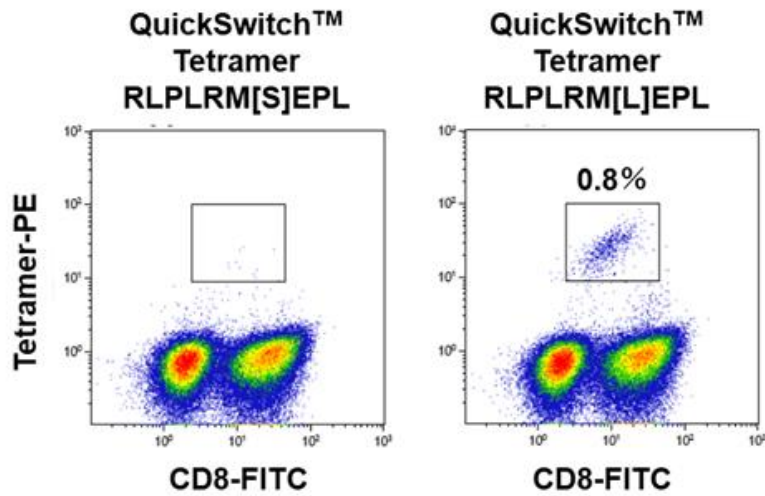


图 5. 检测癌症患者外周血中新抗原反应性 T 细胞

■ 新抗原反应性 T 细胞的克隆性验证

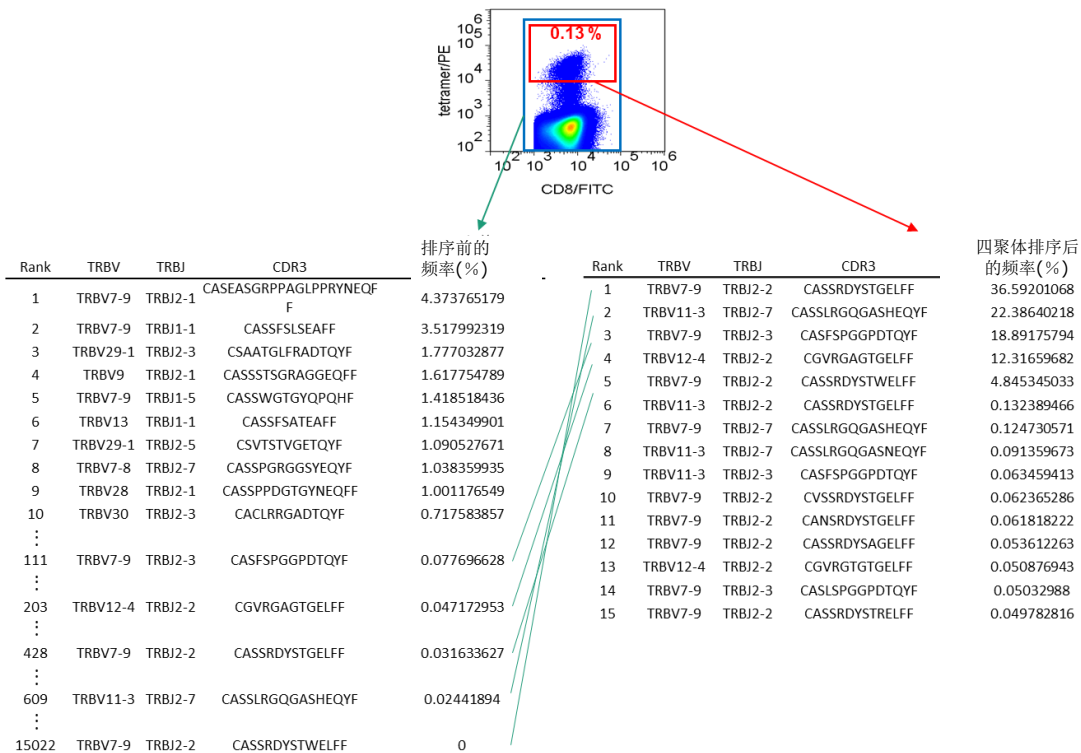


图 6. 通过四聚体排序进行新抗原特异性 T 细胞的富集

在 HLA-A*02 阳性食道癌患者中，与 DHX57 基因第 1049 位精氨酸突变为半胱氨酸 (SIF[C]CLDPA) 的新表位反应的 T 细胞是从 HLA 型相同的 (HLA-A*02)



健康人供体的 PBMC 中培养出来的。因为健康人中新抗原反应性 T 细胞的频率非常低，所以进行两次多肽刺激使其扩增后，用四聚体进行了检测。在检测中，使用了通过抗原肽置换法制备新表位多肽的 QuickSwitch™ 定制四聚体。培养细胞中 0.13% 的 CD8 阳性 T 细胞显示出四聚体阳性。为了评估新抗原反应性 T 细胞是否为单克隆，使用细胞分选仪分离了四聚体阳性细胞。在 RNA 提取后制备 cDNA，扩增 TCR 基因，并使用 NGS 分析了 CDR3 区基因序列。对 TCRβ 链的 CDR3 进行测序进而得知，从该供体中获得的新抗原反应性 T 细胞并非单一的，它们是由少数克隆（寡克隆）构成的（图 6）。即使使用 NGS 对 TCR 基因进行分析，外周血中的新抗原反应性 T 细胞也是处于较低的检测灵敏度，在多肽刺激培养后，每个克隆的频率也低于 0.1%。通过有效使用四聚体染色方法，可以简单地富集和分析这种稀少的新抗原反应性 T 细胞（图 7）。

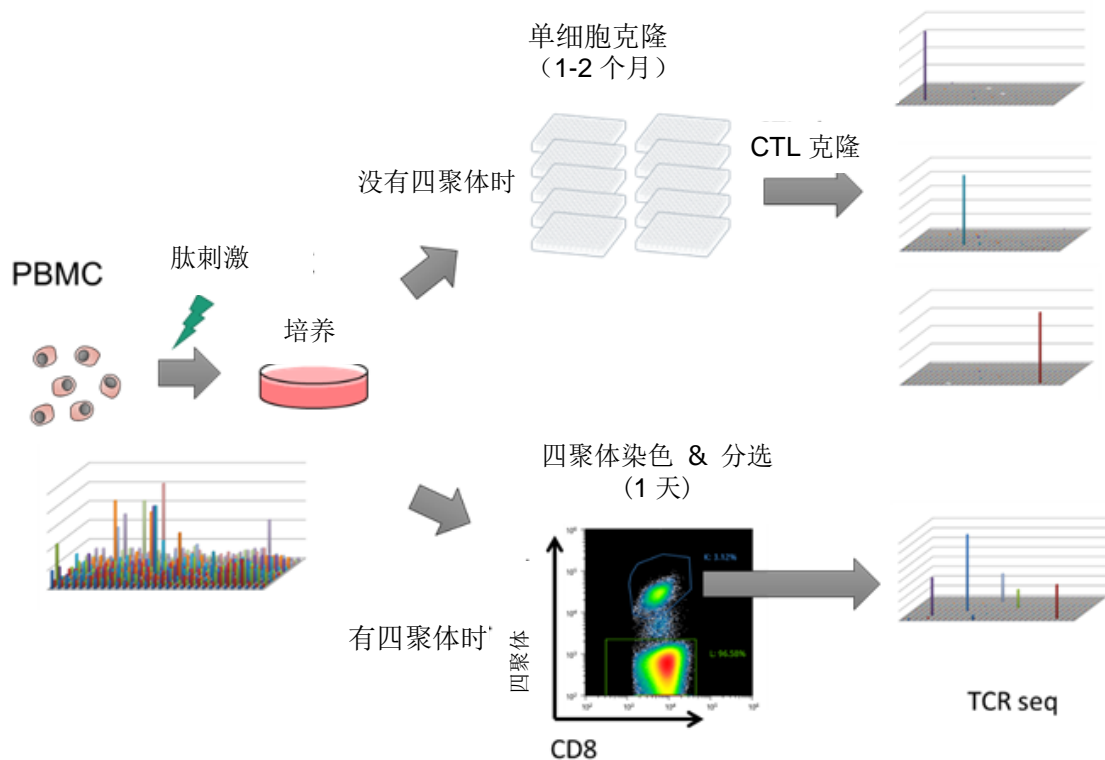


图 7.有效利用四聚体对新抗原反应性 T 细胞进行鉴定和 TCR 分析



■ QuickSwitch™ 定制四聚体的有效性

新抗原研究中的难题在于肿瘤中存在多种基因突变，基因突变因患者不同有所差异，以及并非所有的突变基因产物都是新抗原，而且通过患者的 HLA 呈递的多肽是不同的，因此每位患者可以有多种特有的新表位抗原肽作为候补，而研究者们需要对其进行逐一验证。

使用多肽/MHC 复合物的四聚体结构检测抗原特异性 T 细胞的技术是一种创新的技术，可直接检测抗原特异性 T 细胞。但想要正确并稳定地将多肽、MHC class I 分子和 $\beta 2$ 微球蛋白这 3 种分子结合在一起并不容易。虽然一些病毒和已知癌抗原的表位的商品化四聚体在市面上也有销售，但是对于个体化患者的新抗原，使用其制备未知表位抗原肽的四聚体较为困难。我们使用已知多肽制备的四聚体试剂盒，可以轻松制备所需的四聚体。

在 QuickSwitch™ 定制四聚体中，为了稳定多肽/MHC 复合物的结构，我们预先加载了可被置换的多肽以保持四聚体切合的立体结构。当加入目的新表位抗原肽并添加多肽置换因子后，已加载多肽和目的多肽之间发生竞争置换反应，可以制备出加载有新表位抗原肽的四聚体。这个方法可以同时制备多个新表位抗原肽的四聚体，并且能够构建用于高通量新抗原反应性 T 细胞的检测系统。今后，QuickSwitch™ 定制四聚体有望被作为新抗原研究中不可或缺的工具广泛应用。

■ 参考文献

1. Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD. Emerging Concepts for Immune Checkpoint Blockade-Based Combination Therapies. *Cancer cell*. 2018;33(4):581-98.
2. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (New York, NY)*. 2015;348(6230):69-74.
3. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology*. 2013;31:443-73.
4. Tureci O, Vormehr M, Diken M, Kreiter S, Huber C, Sahin U. Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(8):1885-96.
5. Hackl H, Charoentong P, Finotello F, Trajanoski Z. Computational genomics tools for dissecting tumour-immune cell interactions. *Nature reviews Genetics*. 2016;17(8):441-58.
6. Karasaki T, Nagayama K, Kawashima M, Hiyama N, Murayama T, Kuwano H, et al. Identification of Individual Cancer-Specific Somatic Mutations for Neoantigen-Based Immunotherapy of Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015.

