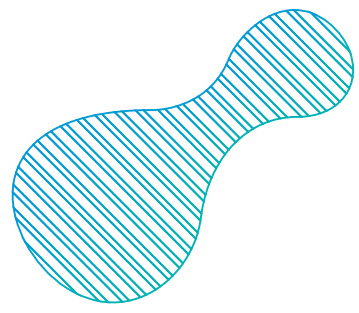


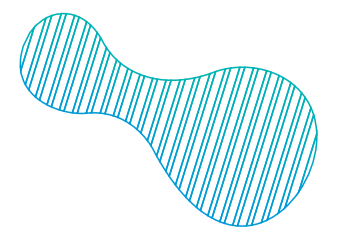


腫瘤基質中COL6A3-E6與腫瘤清除



標靶新抗原的過繼性T細胞治療是一種具有前景的新治療技術，其在部分血液腫瘤中已取得了較好的療效，但對於實體瘤，由於免疫微環境的複雜作用，以及缺乏共同的抗原表現，一定程度上限制了該技術的療效。2022年8月，來自賓夕法尼亞大學和Immatics Biotechnologies的研究人員在Science Translational Medicine上發表的題為“Quantitative immunopeptidomics reveals a tumor stroma-specific target for T cell therapy”的文章，鑑定了一個共同的泛癌膠原VI型 α -3 (COL6A3)表位，該表位存在於腫瘤基質上，是選擇式剪接的結果。他們建構了親和力增強的T細胞受體T (TCR-T)細胞，並對小鼠進行治療，結果顯示表現靶向pHLA的腫瘤的消除，而對正常細胞沒有毒性。

pHLA複合物在腫瘤上高度表現，而在健康組織上幾乎不表現，在進行TCR-T方式進行治療時，能夠準確識別pHLA，引導T細胞對腫瘤而非健康組織進行特異性殺傷，是對以TCR為基礎的細胞治療安全性和有效性的關鍵要求。作者使用了群體規模免疫肽組學(Immunopeptidomics)、定量質譜，在約1500個腫瘤和正常的組織樣本中鑑定了COL6A3基因內的HLA-A*02:01限制性泛癌表位。作者用HLA-A*02特異性抗體進行免疫沉澱後，分析了來自HLA-A*02陽性的739個腫瘤和673個正常組織樣品中的HLA-A*02-presented peptides，確認了來自COL6A3外顯子6 (COL6A3-E6) 的胜肽 (COL6A3-FLNV) 在約28%的腫瘤樣本中有表現，而在正常組織中，僅約有1%的樣本有表現 (圖1)。



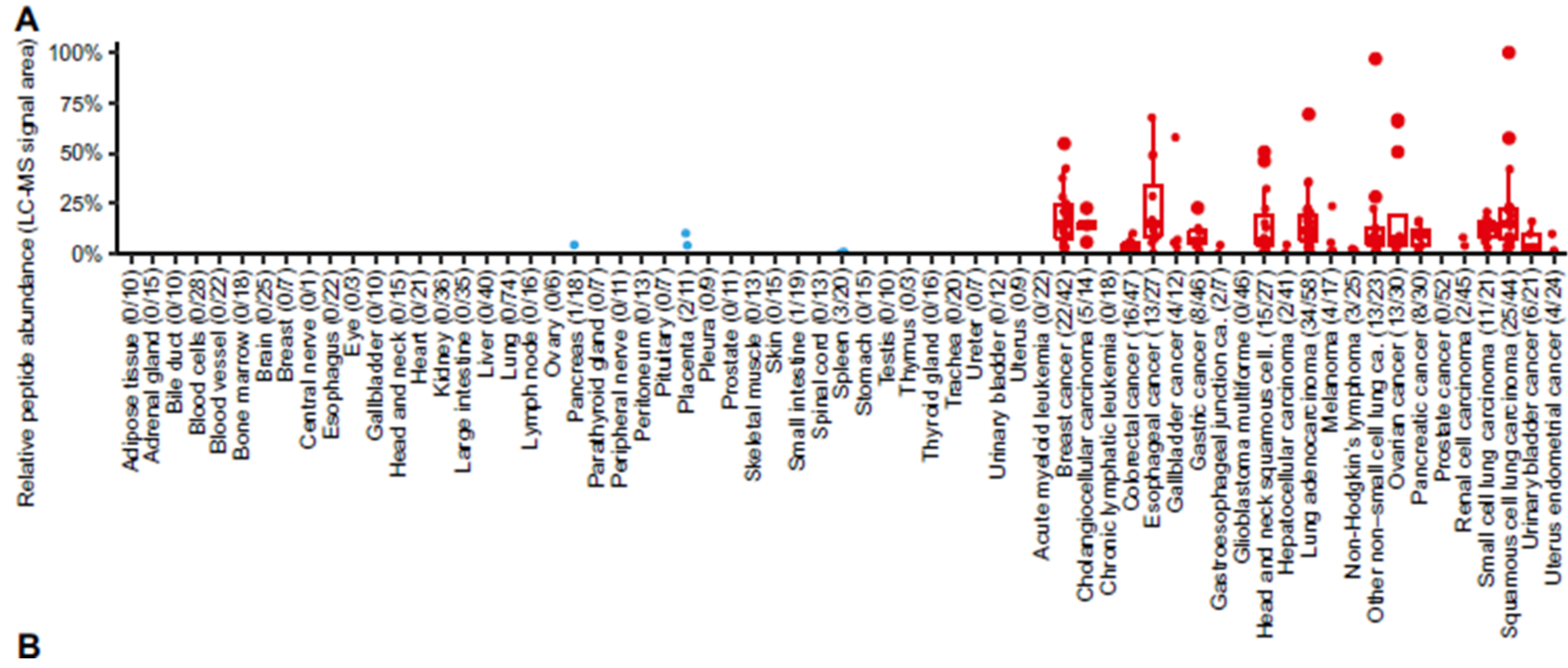


圖 1 腫瘤(紅色)和正常樣本(藍色)中分離HLA結合的COL6A3-FLNV胜肽的相對豐度。

作者結合TCGA數據庫，結合本篇研究數據，用以估計COL6A3-FLNV在幾種腫瘤類型中的目標患病率。數據表明COL6A3-E6在腫瘤中高度表現，這導致了普遍的泛癌表位的出現。隨後，作者利用RNAscope的方式，使用COL6A3-E6、panCK(泛細胞角蛋白)、ACTA2(平滑肌肌動蛋白 α 2)等探針，對患者的腫瘤組織連續切片進行RNA原位檢測，以瞭解COL6A3-E6在腫瘤組織中表現的空間位置。連續切片上的顯色結果染色顯示COL6A3-E6表達與ACTA2表現明顯共定位(圖2)。ACTA2陽性區域代表腫瘤基質區域。

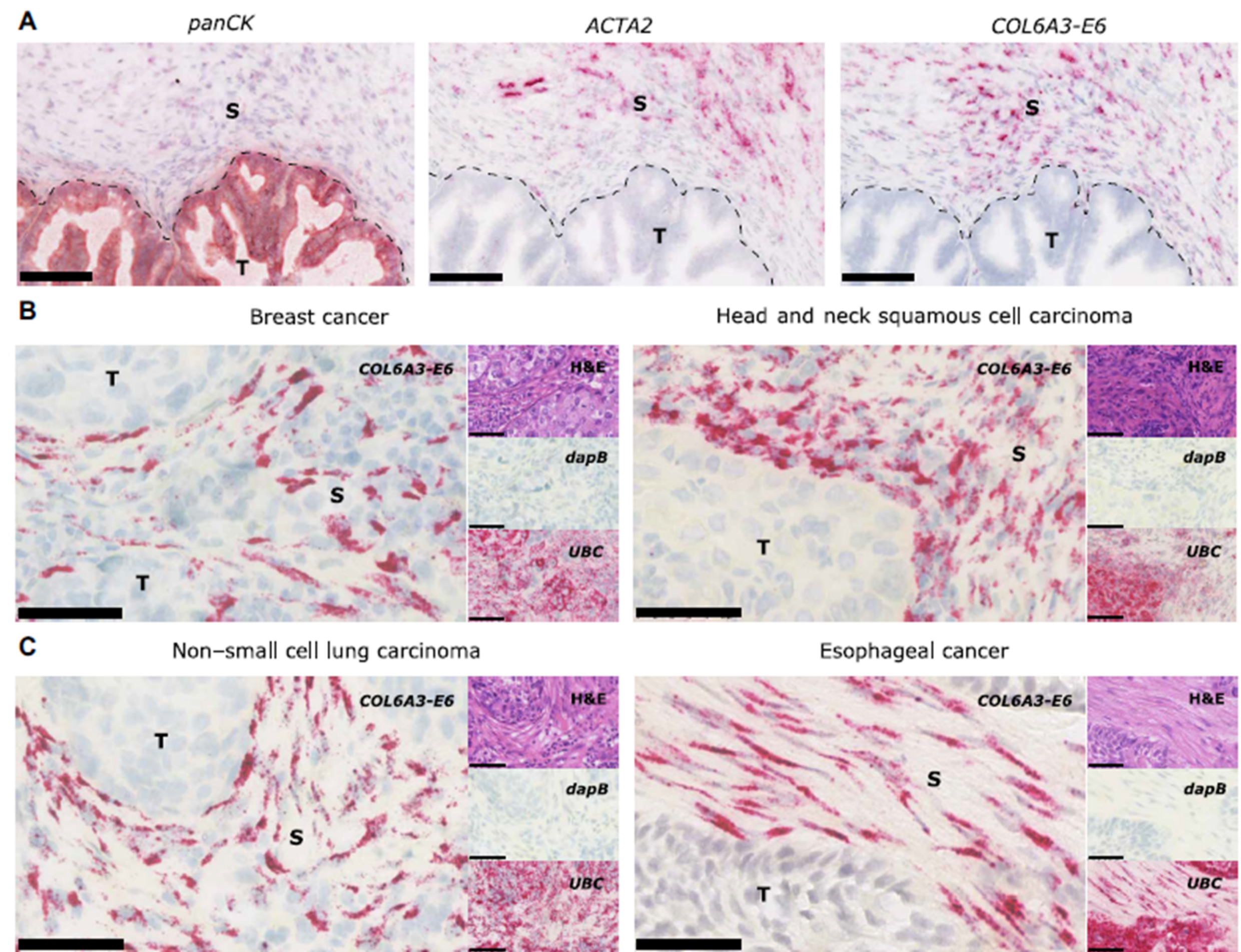
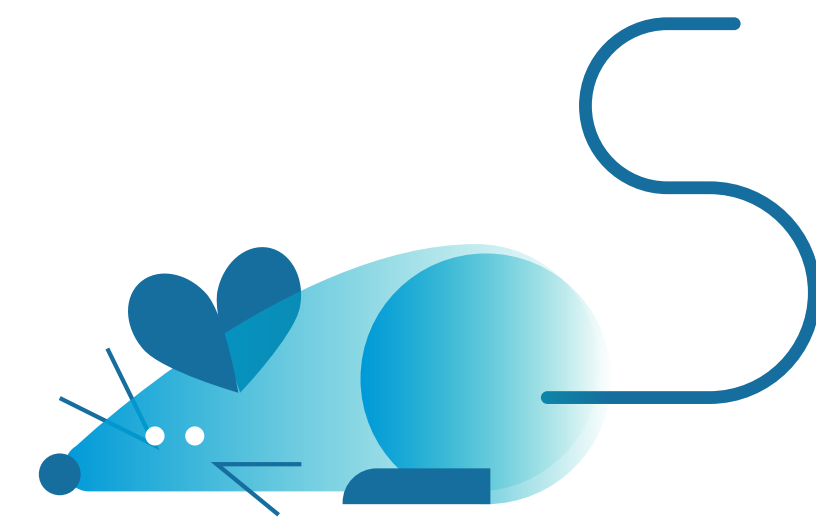


圖 2 COL6A3-E6在腫瘤組織切片中的空間定位，panCK作為腫瘤區域定位標誌，ACTA2作為腫瘤基質區域標誌。

隨後，作者篩選出了高親和力的COL6A3特異性TCR，能夠使T細胞對pHLA能夠特異並靈敏的識別，並在小鼠體內進行實驗。實驗結果表明，表現親和力增強的COL6A3特異性TCR的T細胞在體內能夠特異性地控制腫瘤。



確定腫瘤選擇性靶點是開發特異性免疫療法的關鍵。這篇文章中，作者通過定量LC-MS/MS，使用群體規模免疫肽組學，對腫瘤和正常組織上差異表現肽進行無偏見的搜索。在COL6A3的選擇性剪接外顯子中鑑定了HLA-A2限制性腫瘤間質表位COL6A3-FLNV，該表位在腫瘤間質上以高拷貝數呈現，並在不同腫瘤類型的許多患者都可以觀察到這個情形。作為TME的關鍵組成部分，腫瘤基質已被證明在腫瘤發生、發展和轉移中起著重要作用，其破壞可導致腫瘤消除。文章中利用RNAscope證實了COL6A3-FLNV特異性在腫瘤基質中表現，為TCR-T針對基質對腫瘤實現殺傷提供了一個良好的標靶。

RNAscope技術是由Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope技術屬新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。

該方法的具體優勢如下：

1 應用廣泛

使用RNAscope技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。

2 特異性強

RNAscope獨特的雙Z (ZZ) 探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要2~4週時間即可完成。

3 靈敏度高

RNAscope方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z (ZZ) 探針即可完成雜交和訊號的檢測。

4 單分子檢測和單細胞定量

使用RNAscope技術雜交接上三對及以上雙Z探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司建議的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA的表現量。

5 相容降解的RNA

由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。



6 檢測結果穩定一致性

RNAscope技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冷凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼附細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平臺上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。

7 多通道多目標同時檢測

由於RNAscope技術可以同時進行多通道探針雜交以及訊號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個目標；而在螢光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上目標RNA。

在RNAscope技術的基礎上，ACD公司旗下的Basescope技術可以檢測RNA層面的外顯子跳躍，點突變，環狀RNA等；miRNAscope可以原位對小分子RNA，包括miRNA, siRNA, ASO進行追蹤定位；而近年來推出的RNAscope HiPlex技術則可以在一張石蠟切片上同時檢測最多12個RNA目標的分佈定位，成為神經科學，腫瘤微環境研究以及單細胞定序後驗證等領域的常用檢測方法。

