

【目的】がん免疫療法の効果が証明されたが、未だ効果は不十分で、抗腫瘍免疫応答の本態解明、効果予測バイオマーカー、より効果の高い治療が望まれている。体細胞変異由来のがん抗原（ネオ抗原）は非自己として強い免疫応答を起こすことができるため、抗腫瘍免疫応答に重要で、ネオ抗原を特異的に認識して腫瘍細胞を攻撃するエフェクターT細胞が、抗PD-1抗体により活性化して抗腫瘍効果を発揮するとされている。我々は患者由来の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）をシングルセルシーケンスでT細胞受容体（TCR）も同時に解析し、同じ患者から樹立した腫瘍細胞株とエフェクターT細胞をアッセイすることで、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞を正確に同定した。網羅的遺伝子発現データからは、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞がPD-1などの従来から報告のある分子を発現していたが、より特異的な分子としてCXCL13を同定した。CXCL13は濾胞性ヘルパーT細胞（Tfh）/B細胞を誘導し腫瘍局所3次リンパ様構造（TLS）形成に重要なケモカインであり、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞自らTfh/B細胞浸潤を促しTLS形成を誘導して、様々な抗原に対するエフェクターT細胞を誘導して抗腫瘍効果を発揮している可能性が考えられた。そこで、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞と腫瘍浸潤Tfh/B細胞の関係、その抗腫瘍免疫応答での役割を解明する目的で本研究を計画した。

【方法】マウスモデルに抗PD-1抗体感受性細胞株と耐性細胞株を皮下に移植し、TILをフローサイトメトリーで解析した。さらにCD8陽性エフェクターT細胞の影響を明らかにするため、マウスモデルに感受性株を皮下移植して抗CD8抗体によりCD8陽性T細胞を除去もしくは抗CXCL13抗体でブロックし、TILをフローサイトメトリーで解析した。また、MHCクラスI（MHC-I）をCRISPR/Cas9を用いて腫瘍細胞株で発現を調整してTILを解析した。さらに、マウスにとってのネオ抗原であるOVAの発現もウイルスを用いて腫瘍細胞で調整して同様に解析した。さらに臨床検体のTILのBCRと同時に遺伝子発現を解析した。

【結果】B6マウス由来のマウス細胞株MC-38、E.G7、B16F10、LL/2をB6マウスに皮下移植し、TILを解析したところ抗PD-1抗体感受性の細胞株MC-38、E.G7ではTfhやB細胞浸潤が多く、耐性の細胞株B16F10、LL/2では少なかった。またCD8陽性T細胞でのCXCL13発現も解析したところ、PD-1陽性CD8陽性T細胞でのCXCL13発現が感受性の細胞株では高かった。これらからCD8陽性エフェクターT細胞がCXCL13を介してTfh/B細胞浸潤を促しTLS形成に関わることが示唆された。Tfh/B細胞浸潤・TLS形成におけるCD8陽性T細胞の重要性が示唆されたため、抗CD8抗体でCD8陽性T細胞を除去したところ、Tfh/B細胞浸潤は有意に減少し、また抗CXCL13抗体でも同様であった。さらにOVAを腫瘍細胞株に導入したところ、PD-1陽性CXCL13陽性CD8陽性T細胞浸潤、Tfh/B細胞浸潤も増えた。以上からTILの中でもネオ抗原特異のエフェクターT細胞がCXCL13を介してTfh/B細胞浸潤を促し抗腫瘍免疫応答に寄与していることが示唆された。臨床検体の解析ではB細胞とPlasma細胞の浸潤を確認し、今後BCRの解析を統合する予定である。

腫瘍微小環境でのネオ抗原特異のエフェクターT細胞とTfh/B細胞の関係

