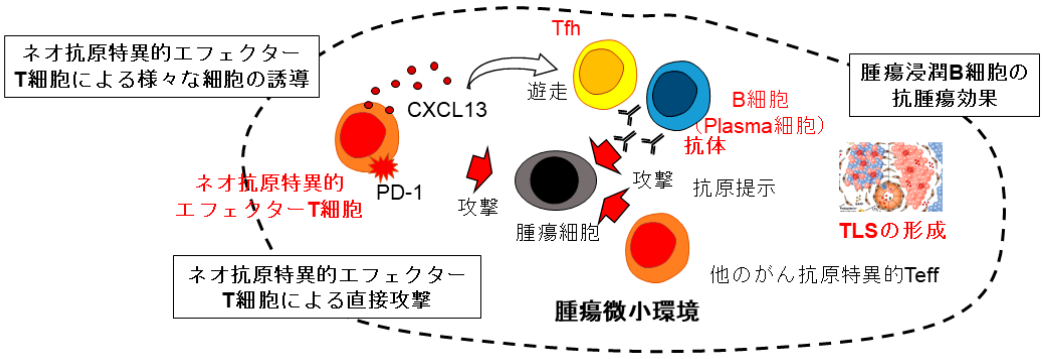
155　腫瘍浸潤B細胞の本態解明とその治療応用	冨樫　庸介

【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クエンスで 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、ネオ抗原特異的エフェクター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、ネオ抗原特異的エフェクター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、ネオ抗原特異的エフェクター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、ネオ抗原特異的エフェクター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 の発現もウィ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的エフェクター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的エフェクターT 細胞と Tfh／B 細胞の関係



155. 腫瘍浸潤 B 細胞の本態解明とその治療応用

冨樫　庸介

*千葉県がんセンター 研究所

Key words：腫瘍免疫，ネオ抗原，濾胞性ヘルパーT 細胞，B 細胞

緒　言

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［1，2］。体細胞変異由来のがん抗原（ネオ抗原）は非自己として扱われ、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ある［3］。従って、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［3］。我々はシングルセルシークエンスで T 細胞受容体（TCR）も同時に解析することで、T 細胞クローンごとに表現型を明らかにした［4，5］。この方法で患者由来の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を解析し、同じ患者から樹立した腫瘍細胞株とエフェクターT 細胞をアッセイし、ネオ抗原特異的エフェクターT 細胞を正確に同定することに成功した。その網羅的遺伝子発現データを解析したところ、ネオ抗原特異的エフェクター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［4］。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、ネオ抗原特異的エフェクターT 細胞が自ら Tfh／B 細胞浸潤・TLS 形成を誘導し、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、ネオ抗原特異的エフェクター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行った。

まずマウスモデル TIL を解析したところ抗 PD-1 抗体に感受性の細胞株では Tfh や B 細胞浸潤が多く、耐性の細胞株では少なかった。また CD8 陽性エフェクター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。そこで、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的エフェクター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 細胞や 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。

方　法

1. マウスモデルでの検証

B6 マウスベースで抗 PD-1 抗体感受性細胞株 MC-38、E.G7 と耐性細胞株 B16F10、LL/2 を皮下に移植し、TIL をフローサイトメトリーで解析した。特に PD-1 発現や CXCL13 発現、Tfh／B 細胞浸潤について重点的に解析した。

2. 除去抗体やブロッキング抗体での検証

CD8 陽性 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 細胞を除去し、TIL を Tfh／B 細胞浸潤に関してフローサイトメトリーで解析した。さらに抗 CXCL13 抗体でもブロッキングし TIL を解析した。

3. 抗原性の検証

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 の PD-1 発現や CXCL13 発

*現在の所属：岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 腫瘍微小環境学分野

現、Tfh／B 細胞浸潤を解析した。さらに、マウスにとってのネオ抗原である OVA の発現もウィルスを用いて腫瘍細胞で調整して同様に解析した。OVA の中でも MHC-I に提示される配列と MHC-Ⅱに提示される配列があるため各々の PD-1 発現や CXCL13 発現、Tfh／B 細胞浸潤への影響を解析した。

4. 臨床検体の解析

患者由来の TIL を遺伝子発現と BCR を同時にシングルセルシークエンスし評価することで「腫瘍特異的 B 細胞」の解析を行った。

結　果

1. 抗 PD-1 抗体感受性マウス腫瘍には Tfh／B 細胞浸潤が多かった

B6 マウスベースで抗 PD-1 抗体感受性細胞株 MC-38、E.G7 と耐性細胞株 B16F10、LL/2 を皮下に移植し、TIL をフローサイトメトリーで解析したところ、感受性株では PD-1 陽性 CXCL13 陽性 CD8 陽性 T 細胞が有意に多く浸潤していた（図 1A）。それに伴い Tfh／B 細胞浸潤も多かった（図 1B）。

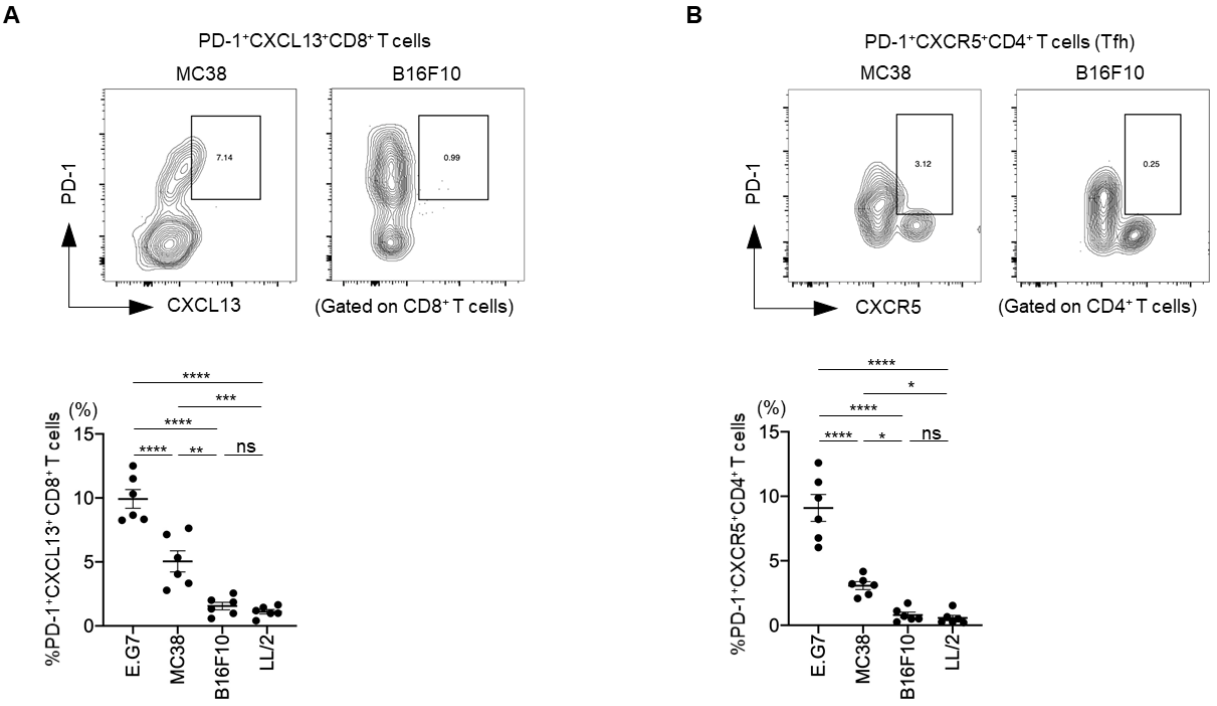


図 1. マウスモデルでの PD-1 陽性 CXCL13 陽性 CD8 陽性 T 細胞と Tfh／B 細胞浸潤

A)　腫瘍細胞株ごとの PD-1 陽性 CXCL13 陽性 CD8 陽性 T 細胞浸潤。

B)　腫瘍細胞株ごとの Tfh／B 細胞浸潤。

One-way ANOVA test、** P＜0.01、*** P＜0.001、**** P＜0.0001、ns : not significant。

2. CD8 陽性 T 細胞由来の CXCL13 が Tfh／B 細胞浸潤に重要であった

マウスモデルで抗 CD8 抗体により CD8 陽性 T 細胞を除去し、感受性株を皮下移植して TIL を Tfh／B 細胞浸潤を解析したところ、Tfh／B 細胞浸潤は有意に減少していた（図 2A）。さらに抗 CXCL13 抗体でもブロッキングし TIL を解析したところ、同様に減少していた（図 2B）。

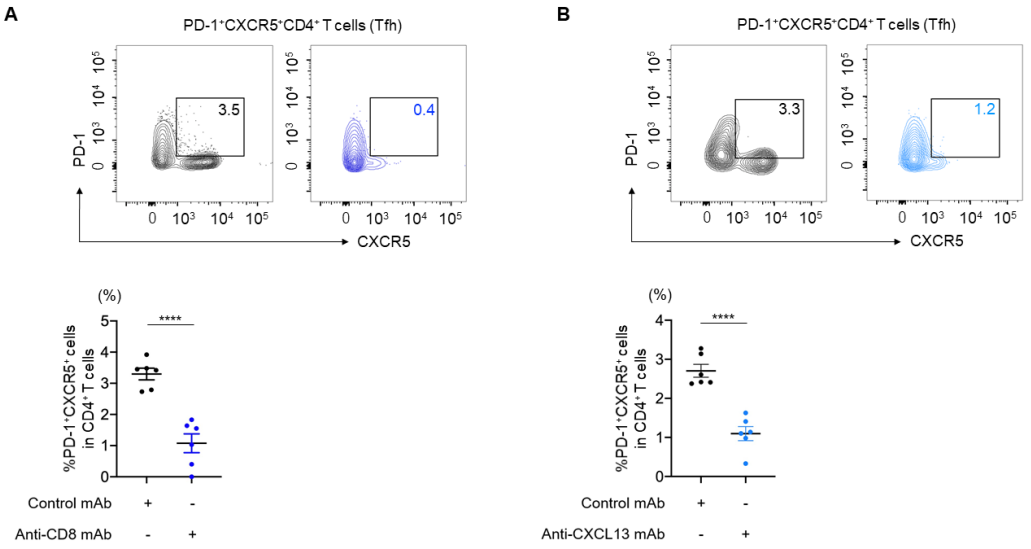


図 2. CD8 陽性 T 細胞除去や CXCL13 ブロック時の Tfh／B 細胞浸潤

A) CD8 陽性 T 細胞除去時の Tfh／B 細胞浸潤。

B) CXCL13 ブロック時の Tfh／B 細胞浸潤。

One-way ANOVA test：**** P < 0.0001。

3. MHC-I に提示される抗原が Tfh／B 細胞浸潤に重要であった

腫瘍細胞株の MHC -I を CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトして TIL の PD-1 発現や CXCL13 発現、Tfh／B 細胞浸潤を解析したところ、有意に減少していた（図 3A）。さらに、マウスにとってのネオ抗原である OVA を腫瘍細胞で発現させ、解析したところ、PD-1 発現や CXCL13 発現、Tfh／B 細胞浸潤は有意に増加していた（図 3B）。OVA の中でも MHC-I に提示される配列と MHC-Ⅱに提示される配列があるため各々を発現させて PD-1 発現や CXCL13 発現、Tfh／B 細胞浸潤を解析したところ、MHC-I に提示される OVA は Tfh／B 細胞浸潤を促したが、MHC-Ⅱに提示される OVA では変化がなかった（図 3B）。

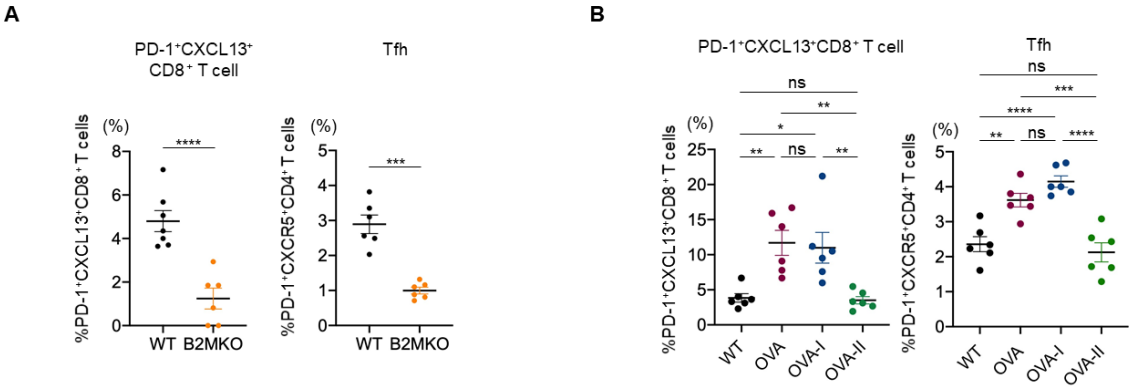


図 3. MHC-I 欠損やネオ抗原導入時の PD-1 陽性 CXCL13 陽性 CD8 陽性 T 細胞や Tfh／B 細胞浸潤

A) MHC-I 欠損時の PD-1 陽性 CXCL13 陽性 CD8 陽性 T 細胞や Tfh／B 細胞浸潤。

B) ネオ抗原導入時の PD-1 陽性 CXCL13 陽性 CD8 陽性 T 細胞や Tfh／B 細胞浸潤。全長 OVA（OVA）と MHC-I に提示される OVA（OVA-I）、MHC-Ⅱに提示される OVA（OVA-Ⅱ）をそれぞれ導入した。

WT：野生型、One-way ANOVA test：* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001、**** P < 0.0001、ns：not significant。

4. 臨床検体ではB細胞・Plasma細胞が多く腫瘍微小環境に浸潤していた

患者由来のTILを遺伝子発現とBCRを同時にシングルセルシークエンスし、TILにB細胞やPlasma細胞が多いことを明らかにした。今後BCR配列を統合して解析する予定である。

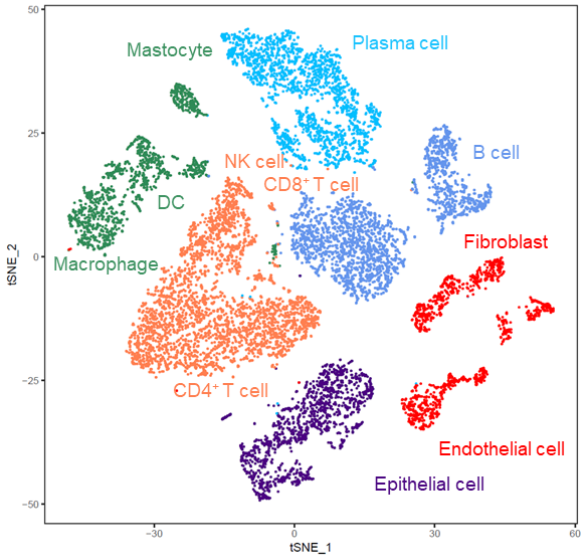


図4. 臨床検体由来TILのシングルセルシークエンス

考　察

本研究ではヒトTILのシングルセルシークエンスデータ並びにマウスモデルから腫瘍を特異的に攻撃するPD-1陽性CD8陽性T細胞がCXCL13を発現し、Tfh／B細胞の浸潤・TLS形成を促していることが示唆された。特にネオ抗原であるOVAを導入しCD8陽性T細胞が活性化することで、このTfh／B細胞の浸潤がさらに促された。一方でMHC-Ⅱに提示されるOVAではこの現象は観察されず、さらにCD8陽性T細胞を除去することやCXCL13をブロックすることでもTfh／B細胞浸潤は完全にキャンセルされた。したがって、ネオ抗原を認識してがん細胞を直接認識して攻撃しているCD8陽性T細胞がCXCL13を産生することでTfh／B細胞の浸潤を促して共にがん細胞を攻撃していることが示唆された。さらに患者検体のTILをシングルセルシークエンスすることでB細胞やPlasma細胞が多く浸潤していることを明らかにした。現在BCRのデータを統合し、腫瘍特異的B細胞を明らかにする予定である。

共同研究者・謝辞

本研究に参画いただいた大学院生の川島秀介先生、Zhou Wenhao先生並びに遂行にあたってサポートいただいた上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1） Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthy S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med, 2012. 366(26): p. 2455-65. DOI: 10.1056/NEJMoa1200694

2) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med, 2012. 366(26): p. 2443-54. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690

3) Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science, 2015. 348(6230): p. 124-8. DOI: 10.1126/science.aaa1348

4) Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, Kawazu M, Ueno T, Irie T, Tanji E, Morinaga T, Honobe A, Ohnuma T, Yoshino M, Iwata T, Kawase K, Sasaki K, Hanazawa T, Kochin V, Kawamura T, Matsue H, Hino M, Mano H, Suzuki Y, Nishikawa H, Togashi Y. PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes. Cell Rep, 2022. 38(5): p. 110331. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110331

5) Kashima Y, Togashi Y, Fukuoka S, Kamada T, Irie T, Suzuki A, Nakamura Y, Shitara K, Minamide T, Yoshida T, Taoka N, Kawase T, Wada T, Inaki K, Chihara M, Ebisuno Y, Tsukamoto S, Fujii R, Ohashi A, Suzuki Y, Tsuchihara K, Nishikawa H, Doi T. Potentiality of multiple modalities for single-cell analyses to evaluate the tumor microenvironment in clinical specimens. Sci Rep, 2021. 11(1): p. 341. DOI: 10.1038/s41598-020-79385-w