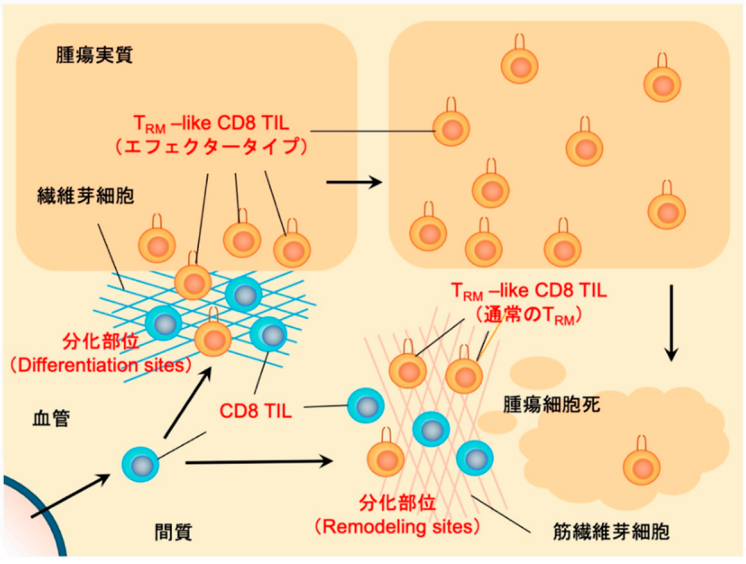
26　腫瘍内高浸潤型CD8T細胞分化機構の解明	高村　史記

【目的】粘膜上皮に定着し、感染防御に重要な役割を果たす組織滞在型メモリー（T_{RM}）と極めて類似した特徴を持つ細胞集団、T_{RM} 様腫瘍内 CD8T リンパ球（T_{RM}-like CD8 TIL）は高い抗腫瘍活性を示すと共に、免疫チェックポイント阻害（ICB）療法への反応性も高い。しかしながら、一般的ながん細胞のマウス皮下移植モデルでは T_{RM}-like CD8 TIL は誘導されないため、その分化機構は未だ不明である。本研究では、ヒト頭頸部がん組織を用いて T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位を特定し、その分化機構を解析することを目的とした。

【方法】本研究ではヒト頭頸部がん患者より採取したがん組織切片を用いて、多重免疫染色にて T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位を探索した。また、該当部位に関して空間トランスクリプトームによる T_{RM}-like CD8 TIL の性状解析を実施した。

【結果】CD103 陰性の CD8 TIL と、CD103 陽性の T_{RM}-like CD8 TIL の局在を比較したところ、間質にはこの両者とも存在したが、腫瘍実質内部に浸潤していたのは大部分が T_{RM}-like CD8 TIL であり、CD8 TIL はほとんど見られなかった。このことより、T_{RM}-like CD8 TIL が優れた腫瘍内部への浸潤能を持つこと、そして、T_{RM}-like CD8 TIL は腫瘍実質内部に浸潤する以前、即ち、間質にて T_{RM} 様の上皮細胞結合能を獲得（T_{RM}-like CD8 TIL 分化）していると考えられた。この仮説のもと、我々は、抗腫瘍免疫が活発に誘導されている部位の腫瘍と間質の境界部に CD8 TIL と T_{RM}-like CD8 TIL が共局在している領域を発見し、この部位を Differentiation site（DS）と命名した。また、がん細胞が壊死した後の修復巣にも同様の共局在が確認された。この部位は DS とは異なり、組織修復の指標でもある筋線維芽細胞が豊富に存在していたことより Remodeling side（RS）と命名した。DS 及び RS の形態学的な特徴より、DS に存在する T_{RM}-like CD8 TIL はこれから腫瘍細胞を攻撃するエフェクタータイプ、RS の T_{RM}-like CD8 TIL は死滅した腫瘍組織の修復巣に定着したメモリータイプの細胞集団であると考えられた。空間トランスクリプトームにて両者の遺伝子発現を比較したところ、DS の T_{RM}-like CD8 TIL は RS のものより強い活性化型を示した。我々は過去に感染排除後に形成される組織修復巣が T_{RM} 分化部位であることを突き止めていることより、RS の T_{RM}-like CD8 TIL は通常の T_{RM} であり、腫瘍細胞を攻撃する DS の T_{RM}-like CD8 TI とは別物である可能性が高い。従って、各々の T_{RM}-like CD8 TIL 分化機構を解析するには、腫瘍組織から分離された CD8T 細胞を一緒くたに解析するのではなく、各部位にて引き起こされるイベントを別々に解析しなくてはいけないことを意味する。今後はさらに解析を進め、各局所における T_{RM}-like CD8 TIL 誘導機構を解明し、新規免疫療法開発に繋げたい。

異なる性質の分化部位にて、異なるタイプの T_{RM}-like CD8 TIL が分化する



26. 腫瘍内高浸潤型 CD8T 細胞分化機構の解明

高村　史記

理化学研究所 生命医科学研究センター 免疫記憶研究チーム

Key words：CD8T 細胞，腫瘍，レジデントメモリー，分化部位

緒　言

CD8T 細胞はウイルス感染細胞やがん細胞を認識・破壊することで生体防御を司る。これらの排除後、抗原特異的 CD8T 細胞の大部分は死滅するが、一部がメモリーT 細胞へと分化し長期間体に維持され、二次感染や再発に備えている。リンパ組織や血液中を循環する通常の循環型メモリーT 細胞とは異なり、滞在型メモリーT 細胞（Tissue-resident memory T cells：T_{RM}）は病原体の侵入門戸である粘膜面に生涯留まり、再感染時に局所にて感染細胞を早期破壊することで防御免疫の最前線を担う［1］。この CD8 T_{RM} の大部分は上皮細胞間の tight-junction を司る E-cadherin に選択的に結合するインテグリン CD103 を発現することで粘膜上皮に定着する。また、臓器により T_{RM} が定着する微小環境が異なるため、各臓器特有の T_{RM} が存在し、それぞれを誘導する因子も異なる［1］。我々は長年マウスのウイルス感染モデルを用いて肺における抗原特異的 CD8T 細胞免疫応答の解析に従事し、肺における CD8 T_{RM} 分化部位を世界に先駆けて特定した［2］。その後、同部位における肺 CD8 T_{RM} 分化・維持機構の大半を解明するなど［3］、この分野を世界的に牽引してきた。

悪性腫瘍（がん）は日本人の約半数が罹患し、死亡原因の 30%以上を占めている。がん抗原特異的 CD8T 細胞はがん細胞近傍の間質に浸潤してもがん実質内に浸潤できないケースが多く、たとえがん実質内に浸潤しても過剰な抗原刺激に伴い疲弊、即ち、高発現する PD-1、Tim-3 などの免疫チェックポイント因子を介した抑制性シグナルによりその機能が制御されてしまう。免疫チェックポイント阻害（Immune checkpoint blockade：ICB）療法による疲弊 CD8T 細胞の賦活化は抗腫瘍免疫応答を増強するが、実際に機能を回復するがん組織浸潤 CD8T リンパ球（Tumor infiltrated CD8 T cells：CD8 TIL）はごく一部であり、大半の CD8 TIL は極度の疲弊を煩い回復不能である。従って、がん実質内に効率よく浸潤し、ICB 治療高反応型の CD8 TIL サブセットの分化機構解明（即ち誘導法の開発）が急務である。

近年、CD103 を発現するなど CD8 T_{RM} と極めて類似した特徴を持つ細胞集団、T_{RM} 様腫瘍内 CD8T リンパ球（T_{RM}-like CD8 TIL）の存在が様々なヒト腫瘍にて報告された［4］。T_{RM}-like CD8 TIL は高い抗腫瘍活性を示すと共に ICB への反応性も高い［5］。しかし、一般的ながん細胞のマウス皮下移植モデルでは T_{RM}-like CD8 TIL は誘導されず、その分化機構は未だ不明である。本研究では、ヒト頭頸部がん組織を用いて T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位を特定し、その分化機構を解析することを目的とした。

方法および結果

1. T_{RM}-like CD8 TIL は高率に腫瘍実質内へと浸潤する

本研究では近畿大学医学部附属病院にて採取された頭頸部がんのホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した。20 例の検体に対して切片を作製し、免疫組織化学にて CD8（赤）及び CD103（青）の二重染色を実施した。CD103 陰性の CD8 TIL と CD103 陽性の T_{RM}-like CD8 TIL の分布を比較したところ、間質にはこの両者とも存在したが、腫瘍実質内部に浸潤していたのは大部分が T_{RM}-like CD8 TIL であり、CD8 TIL はほとんど見られなかった。実際、腫瘍実質内部と間質における単一面積あたりの両者の頻度を比較したところ、腫瘍実質内部には T_{RM}-like CD8 TIL が、間質には CD8 TIL が優位に存在していた（図 1a、b）。本コホートでは腫瘍実質内部に T_{RM}-like CD8 TIL の浸潤が見

られる患者（Group 1）と見られない患者（Group 2）とに 2 分することができ、後者は更に間質への CD8 TIL が見られる患者（Group 2-1）と見られない患者（immune cold、Group 2-2）に分けることができた（図 1a、c）。Group 2-1 では、CD8 TIL の浸潤が見られるものの、T_{RM}-like CD8 TIL への分化が見られないため腫瘍実質内部への CD8T 細胞浸潤が見られず（図 1c）、間質における CD8T 細胞中の T_{RM}-like CD8 TIL の割合が腫瘍実質における CD8T 細胞中の T_{RM}-like CD8 TIL の割合と正の相関を示した（図 1d）。このことより、血流から腫瘍間質に浸潤した CD8 TIL は、間質内にて T_{RM}-like CD8 TIL へと分化した後に腫瘍実質内へと浸潤することが示唆された。

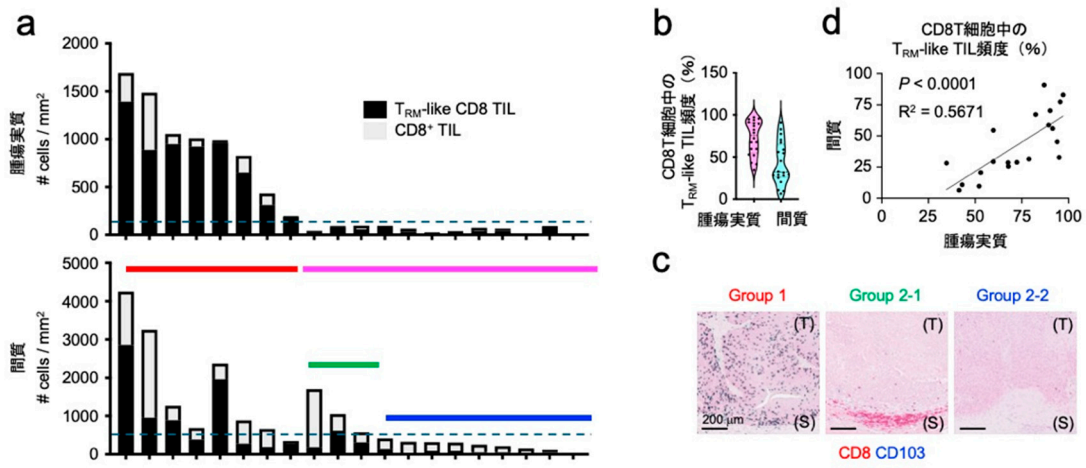


図 1. 腫瘍実質および間質における T_{RM}-like CD8 TIL の分布

a）頭頸部がん検体における腫瘍実質内及び間質における CD8 TIL もしくは T_{RM}-like CD8 TIL の頻度。

b）各部位における全 CD8T 細胞中の T_{RM}-like CD8 TIL の割合。

c）各グループの代表的な染色像。

d）間質と腫瘍実質における T_{RM}-like CD8 TIL 頻度の相関関係。$P<0.0001$（単回帰分析）。

2. T_{RM}-like CD8 TIL は TLS ではなく特定の分化部位にて分化する

間質にて T_{RM}-like CD8 TIL が分化した後に腫瘍実質へと浸潤するのであれば、抗腫瘍免疫が活発に誘導されている部位では腫瘍実質の辺縁に T_{RM}-like CD8 TIL が盛んに浸潤している像が観察されると予想される。そこで、そのような部位を探索したところ、いくつかの検体にて該当部位が見られ、その周囲の間質に T_{RM}-like CD8 TIL と CD8 TIL が共局在している領域があることがわかった。この部位が T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位であると考えられるため、我々はこの部位を Differentiation site（DS）と命名した（図 2a）。また類似の T_{RM}-like CD8 TIL と CD8 TIL 共局在領域が、壊死したがん細胞の周囲にも存在することがわかった。この領域はがん細胞が死んだ後に形成された修復巣と考えられるため、この領域を Remodeling site（RS）と命名した（図 2b）。一方、いくつかの検体にて腫瘍組織近辺に B 細胞濾胞を CD4T 細胞が取り巻くようなリンパ節様の構造（Tertiary lymphoid structure : TLS）が形成されることが散見されたが、それらの領域内には T_{RM}-like CD8 TIL はほとんど見られなかった（図 2c）。このことより、T_{RM}-like CD8 TIL は TLS では分化せず、DS や RS などの特定の部位にて分化することが示唆された。しかも、その様な分化部位は複数種存在することも示された。

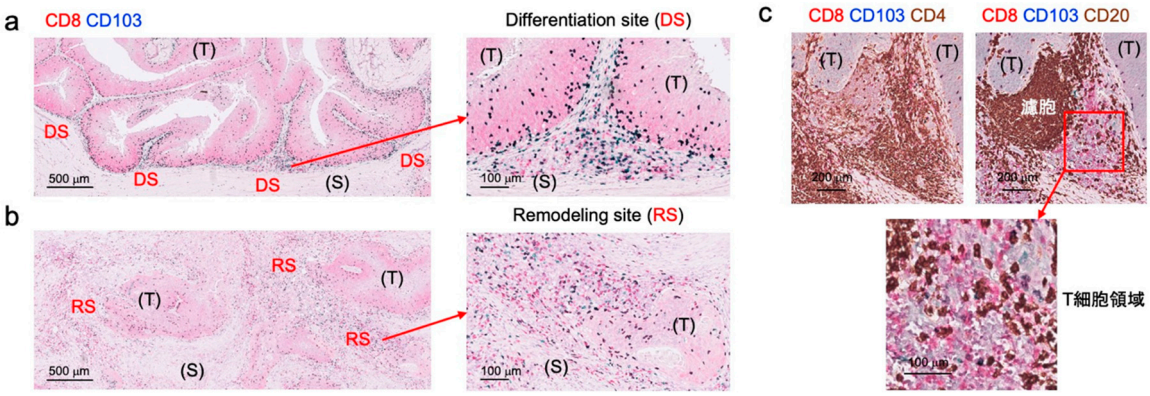


図 2. T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位

a) 抗腫瘍免疫が活発な箇所におけるT_{RM}-like CD8 TIL分化部位。

b) 腫瘍細胞が壊死した後の修復巣に形成されたT_{RM}-like CD8 TIL分化部位。

c) TLS における T_{RM}-like CD8 TIL の分布。

3. T_{RM}-like CD8 TIL 分化部位 DS、RS は異なる特徴を持つ

免疫組織化学の三重染色により DS、RS を構成する成分を調べたところ、両者ともに、循環中の CD8T 細胞の入り口となる血管（CD31 陽性細胞）が存在することがわかった（図 3a）。また、両組織には Fibroblast activation protein（FAP）陽性の線維芽細胞が多数存在していることもわかった（図 3b）。しかしながら、RS に存在する線維芽細胞は平滑筋アクチン（α smooth muscle actin：αSMA）陽性であったが、DS に存在する線維芽細胞はαSMA 陰性であった（図 3c）。αSMA 陽性線維芽細胞は筋線維芽細胞として知られており、組織修復に重要な役割を果たしていることより、筋線維芽細胞が修復組織である RS のみに存在するという結果は非常に理にかなっている。

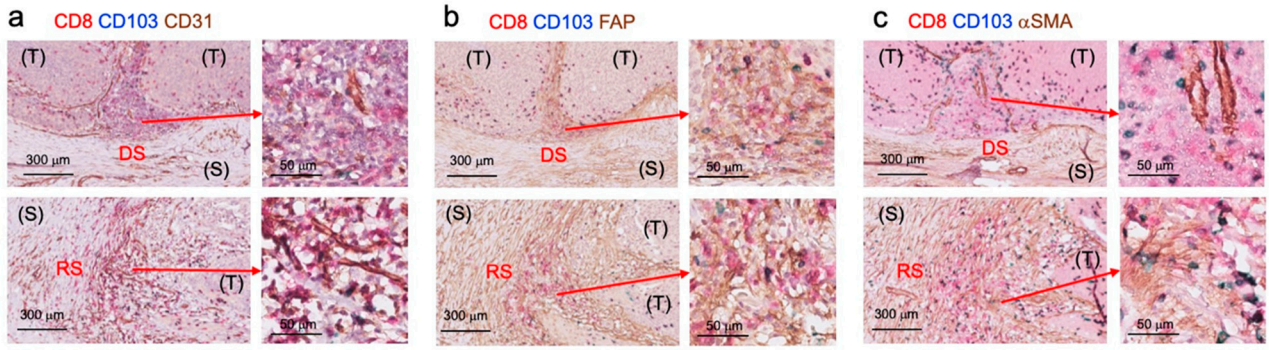


図 3. DS、RS の構成成分の違い

a) 各分化部位におけるCD8、CD103、CD31の三重染色像。

b) 各分化部位におけるCD8、CD103、FAPの三重染色像。

c) 各分化部位におけるCD8、CD103、αSMAの三重染色像。

4. DS、RS にて分化する T_{RM}-like CD8 TIL は異なる性質を持つ

同じ T_{RM}-like CD8 TIL 分化部位でも DS と RS ではその性質が異なることが示されたため、それぞれの領域にて分化する T_{RM}-like CD8 TIL の性質も異なることが示唆される。そこで Nanostring 社の空間トランスクリプトーム GeoMx を用いて、DS、RS、更には腫瘍実質内に浸潤した T_{RM}-like CD8 TIL にて発現する mRNA 量を比較した。想定通り、腫瘍の T_{RM}-like CD8 TIL は疲弊型の遺伝子発現パターン（疲弊遺伝子が高く、活性化初期発現遺伝子が低い）を示した（図 4）。DS の T_{RM}-like CD8 TIL は活性化初期発現遺伝子も高発現していることより、疲弊段階の浅い細胞

集団であることがわかった（図 4）。一方、RS の T_{RM}-like CD8 TIL は活性化されてはいるものの、疲弊遺伝子発現が低く、抑えられていることが判明した（図 4）。

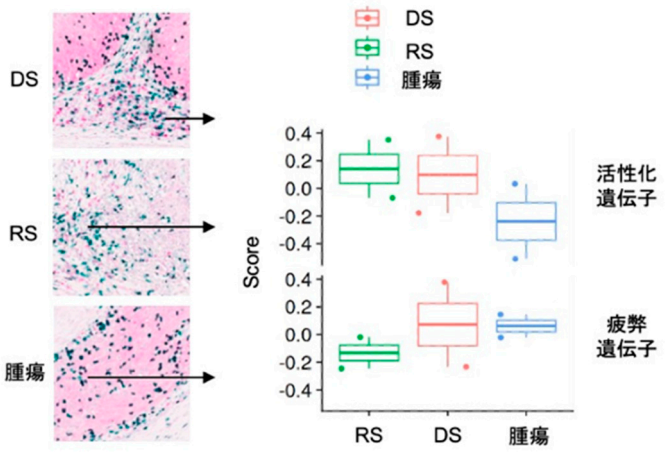


図 4. DS、RS、腫瘍の T_{RM}-like CD8 TIL における遺伝子発現の違い
Nanostring 社の空間トランスクリプトーム GeoMx を用いた各部位における T_{RM}-like CD8 TIL の遺伝子発現解析。

考　察

近年のシングルセル解析により、T_{RM}-like CD8 TIL は多様な性質を持つ細胞集団であり、それらは単に分化段階の違いを反映していると考えられていた［6］。しかしながら、本研究の結果より T_{RM}-like CD8 TIL にはこれからがん細胞を攻撃するエフェクタータイプと、がん細胞が排除された後に形成された修復巣にて分化するメモリータイプが存在することが明らかとなった。この後者は、感染後に誘導される通常の T_{RM} と同様の細胞種であると考えられる。従って、DS、RS で分化する T_{RM}-like CD8 TIL は全く異なる環境にて誘導された、異なる細胞集団である。このことは、各々の分化機構を解析するには、腫瘍組織から分離された CD8T 細胞を一緒くたに解析するのではなく、各部位にて引き起こされるイベントを別々に解析しなくてはいけないことを意味する。今後はさらに解析を進め、各局所における T_{RM}-like CD8 TIL 誘導機構を解明し、新規免疫療法開発に繋げたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、近畿大学医学部内科学教室主要内科学部門の米坂仁雄、金村宙昌、原谷浩司、中川和彦、水戸済生会病院の大谷明夫、大阪大学免疫学フロンティア研究センター定量免疫学ユニットの Diego Diez、理化学研究所生命医科学研究センター免疫記憶研究チームの北畑孝祐である。

文　献

1） Takamura S. Niches for the Long-Term Maintenance of Tissue-Resident Memory T Cells. Front Immunol. 2018 May 31;9:1214. PMID: 29904388 DOI: 10.3389/fimmu.2018.01214.

2） Takamura S, Yagi H, Hakata Y, Motozono C, McMaster SR, Masumoto T, Fujisawa M, Chikaishi T, Komeda J, Itoh J, Umemura M, Kyusai A, Tomura M, Nakayama T, Woodland DL, Kohlmeier JE, Miyazawa. Specific niches for lung-resident memory CD8+ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. J Exp Med. 2016 Dec 12;213(13):3057-3073. PMID: 27815325 DOI: 10.1084/jem.20160938.

3) Takamura S, Kato S, Motozono C, Shimaoka T, Ueha S, Matsuo K, Miyauchi K, Masumoto T, Katsushima A, Nakayama T, Tomura M, Matsushima K, Kubo M, Miyazawa M. Interstitial-resident memory CD8+ T cells sustain frontline epithelial memory in the lung. J Exp Med. 2019 Dec 2;216(12):2736-2747. PMID: 31558614 DOI: 10.1084/jem.20190557.
4) Webb JR, Milne K, Watson P, Deleeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2014 Jan 15;20(2):434-44. PMID: 24190978 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1877.
5) Damei I, Trickovic T, Mami-Chouaib F, Corgnac S. Tumor-resident memory T cells as a biomarker of the response to cancer immunotherapy. Front Immunol. 2023 Jul 20;14:1205984. PMID: 37545498 DOI: 10.3389/fimmu.2023.1205984.
6) Zheng L, Qin S, Si W, Wang A, Xing B, Gao R, Ren X, Wang L, Wu X, Zhang J, Wu N, Zhang N, Zheng H, Ouyang H, Chen K, Bu Z, Hu X, Ji J, Zhang Z. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. Science. 2021 Dec 17;374(6574):abe6474. PMID: 34914499 DOI: 10.1126/science.abe6474.