

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08311

研究課題名（和文）消化器腫瘍三次リンパ組織様構造TLSの構成細胞に基づく予後予測と耐性機序の探索

研究課題名（英文）Treatment resistance based on the cellular components of tertiary lymphoid structure in gastrointestinal cancers

研究代表者

馬場 英司（Baba, Eishi）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00315475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：消化器癌細胞の近傍に存在する三次リンパ組織様構造（TLS）は複数の免疫細胞が集簇して構成されているが、腫瘍を制御する上でTLSが果たす機能は、その構成細胞により異なることが予想されていた。本研究ではイメージングマスサイトメトリーの手法を用いて、消化器癌症例のTLSを構成する細胞を同定、そのTLS中の割合を測定し、特定の表現型を示す疲弊前駆CD8陽性T細胞の多寡が免疫療法への反応性と関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌組織のTLSは腫瘍細胞傷害作用を持つT細胞に加え、B細胞や樹状細胞等の抗原提示細胞により構成されることから、腫瘍特異的Tリンパ球を感作し活性化する機能が示唆されている。腫瘍免疫におけるTLSの機能を解明し、これを標的とした治療開発をする上で、TLS構成細胞の詳細な機能的役割を知ることが重要である。本研究では、様々な疲弊状態を呈する細胞傷害性T細胞のうち、特に疲弊前駆CD8陽性T細胞がTLS中に多い食道癌症例では免疫療法が有効であることを示したことから、免疫療法において重要な免疫細胞集団の解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Multiple kinds of immune cells gather in tertiary lymphoid structure (TLS) in gastrointestinal cancer tissue and anti-tumor function of TLS has been suggested to depend on the components of immune cells of the TLS. We identified each immune cell and measure the ratio in TLSs by using imaging mass cytometry technique, and then a relationship between the ratio of the exhausted precursor CD8-positive T cells in TLS and the favorable prognosis of the patients was shown.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：消化器癌 腫瘍免疫 三次リンパ組織様構造 疲弊T細胞 免疫チェックポイント阻害

1. 研究開始当初の背景

(1) がん免疫療法に対する耐性機序としての腫瘍三次リンパ組織様構造 (TLS)

進行消化器癌治療において免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の有効性が示されているが、治療耐性を生じる例が多く、耐性機序の解明と対策が求められている。免疫療法耐性には腫瘍細胞自体の機序 (intrinsic mechanisms) と微小環境の機序 (extrinsic mechanisms) があり、後者は腫瘍細胞近傍に集積する免疫抑制性の細胞が主に関連している。ICI 治療に耐性を示す腫瘍組織の一つの類型として、腫瘍組織に三次リンパ組織様構造 (Tertiary lymphoid structure: TLS) が存在する型 (TLS 型) の報告があり、TLS を構成する Treg, DC など腫瘍免疫抑制性細胞の作用によるものと示唆されている。

TLS は異所性のリンパ組織様の構造であり、非リンパ器官、例えば悪性腫瘍、慢性ウイルス感染症などの炎症局所において見られる。T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージなど二次リンパ組織 (Secondary lymphoid organ: SLO) に存在する全ての免疫系細胞を含むことから、TLS もまた獲得免疫に働くと考えられてきた。即ち、末梢血中の CCR7 陽性ナイーブ T 細胞、B 細胞や、CXCR5 陽性 T 細胞が TLS 近傍の高内皮細静脈 (High endothelial venule: HEV) を介して TLS にホーミングし、TLS 内に存在する濾胞性樹状細胞 (Follicular dendritic cell: FDC) により抗原提示を受け、抗腫瘍活性を有する T 細胞、B 細胞に分化する。

しかし腫瘍組織に存在する TLS (腫瘍 TLS) の腫瘍免疫における役割は明確ではなかった。様々なヒト腫瘍において、腫瘍組織 TLS の密度が高いと予後良好の傾向が示されており、腫瘍 TLS は抗腫瘍作用に働くことが示唆された。一方、肺癌マウスモデルにおいて制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) を多く含む TLS は腫瘍増殖能を高める報告がなされている (Joshi et al. *Immunity* 43:579, 2015)。これらの報告は、TLS を構成する免疫細胞組成がその機能を規定する可能性を示唆している。

(2) 腫瘍 TLS の構成細胞による分類と予後との関連

本研究開始時まで、ヒト消化器腫瘍において TLS 構成細胞の組成による予後の差や、さらにはその組成によりもたらされる抗腫瘍免疫への影響を明らかにした報告はなかった。その理由のひとつとして、TLS は複数の構成細胞を有するため組織学的に詳細な解析が困難であったことが挙げられる。

我々は治癒切除された大腸癌組織検体 67 例を対象とし、一つの組織スライドで最大 7 抗原を同時に染色し、マルチスペクトルイメージングシステム Mantra と形態認識イメージ解析ソフトウェア inForm を用いて、腫瘍組織の TLS の構成細胞を定量する系を確立した。そして構成細胞割合と、それらの臨床効果への影響を検討していた。その結果、TLS はその構成細胞の割合により 5 つのクラスターに分類可能であり、CD4+T 細胞やマクロファージが優位の TLS を多く有する患者群では有意に無再発生存期間 (RFS) が短く、これは既報の CD3/CD8 発現を指標とする Immunoscore よりも予後により強く相関した。この結果は、腫瘍 TLS には構成細胞割合に基づく腫瘍免疫機能の差異が存在することが強く示唆された。

(3) 腫瘍 TLS の構成細胞と治療抵抗性との関連

上述のように、大腸癌組織においては CD4+T 細胞優位の TLS (CD4T 型 TLS) が多く存在する症例で予後が不良であった。しかしこの CD4T 型 TLS を構成する CD4+T 細胞と、他の型の TLS を構成する CD4+T 細胞の表現型の差は、未だ解析されていないため機能的意義は不明であった。CD4+T 細胞は細胞傷害性 T 細胞へのヘルパー機能を有することが知られているが、腫瘍 TLS において抗腫瘍効果にどの程度関与しているかも不明であった。さらに細胞傷害性 T 細胞も含め、TLS 構成細胞の詳細なサブセットも明らかではなかった。このように研究開始時において、TLS 構成細胞の表現型を詳細に知ることが重要と考えられた。

また上述の大腸癌を対象とした研究では、主に Stage II/III の治癒切除症例の手術検体を用いたため、大腸癌に対しては臨床的に使用される頻度の低い ICI の治療効果との関連性は不明であった。

(4) 末梢血免疫細胞サブセットと腫瘍 TLS の構成細胞の関連

また我々は免疫チェックポイント阻害薬治療を受けた悪性黒色腫、胃癌症例の末梢血免疫細胞サブセットの変化の網羅的解析をすすめていた。その過程で、OX40+CD4+T 細胞あるいは LAG-3+CD4+T 細胞サブセットの活性化が抗 PD-1 抗体治療の有効性に相関する可能性が示唆されたため、この解析も継続した。さらに末梢血免疫細胞の構成や特徴は、SLO における T 細胞のプライミングと活性化の結果を間接的に反映していると考えられることから、進行消化器癌症例における腫瘍特異的 T 細胞のうち、どのようなサブセットが真に抗腫瘍効果を担い、また ICI によって活性化されるかも重要な課題であった。この末梢血免疫細胞と腫瘍組織に分布する免疫細胞のサブセットの違いを比較することは、この課題を解決する一つの方法と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は消化器腫瘍組織において腫瘍免疫微小環境を形成する TLS の構成細胞とその

機能的意義を解析することにより、腫瘍免疫療法への抵抗性の機序を解明し、その有効性を高めるための新たな戦略を開発することである。具体的には以下の通りである。

- (1) 消化器腫瘍組織の TLS の構成細胞の組成、特に T 細胞サブセットを定量的に詳細に解析し、ヒト個体内、個体間の TLS の違いを明らかにする。
- (2) TLS 構成細胞の組成と ICI 治療を含む臨床経過との関連を明らかにする。
- (3) 予後に関連する TLS 構成細胞の機能を明らかにする。
- (4) 末梢血における免疫細胞サブセットと腫瘍 TLS の構成細胞を比較し、二次リンパ組織 (SLO) と TLS における抗原提示の違いについても検討する。

3. 研究の方法

九州大学病院臨床・腫瘍外科にて切除された食道癌、胃癌、大腸癌の消化器癌組織の、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体および新鮮検体を解析に用いた。これらは同院の臨床研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に基づき、対象患者の研究参加を文書による同意を得て実施した。FFPE 検体は多重免疫染色システム (Perkin Elmer 社 TSA Plus system) により、7 抗原を一つの組織スライドにて多重染色する。多重染色した検体は、マルチスペクトルイメージングシステム (Perkin Elmer 社 Mantra) により撮影し、形態認識イメージ解析ソフトウェア inForm により、検体の TLS 構成細胞の詳細な表現型解析を定量的に実施した。この方法では、TLS 構成細胞としてナイーブおよびメモリー CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、濾胞性ヘルパー T 細胞、濾胞性樹状細胞、B 細胞を同時に同定、定量可能である。腫瘍組織に分布する各種免疫細胞の詳細なサブセットを解析するため、同じく検体を最大 37 種の分子に対する金属安定同位体ラベル抗体により多重染色した。この検体を、位置情報を検知しながら UV laser によりアブレーションを行い、放出される金属をマスサイトメーターにて測定した (Standard Biotech 社 Hyperion)。得られたデータを基にイメージ解析ソフトウェアにて TLS 構成細胞の発現蛋白をさらに詳細に解析した (Fluidigm 社 Hyperion Imaging System)。この実験では、腫瘍免疫測定パネルとして 40 種余りの分子に対する金属安定同位体ラベル抗体を準備し、T 細胞サブセット同定のための膜蛋白および細胞質内転写因子、共刺激分子、T 細胞疲弊化マーカーを同時に測定し、TLS 構成細胞の詳細なフェノタイプ解析に用いた。

ICI 治療を受けた切除不能進行・再発消化器癌患者の末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリー (Thermo Fisher Scientific 社 Attune NxT) やマスサイトメトリー (Standard Biotech 社 Helios) を用いて免疫細胞の種類、サブセットの同定と定量を行った。

4. 研究成果

(1) 食道癌組織 TLS における免疫細胞の解析

本研究では複数の癌種の組織を用いて免疫細胞の解析を実施した。特に食道癌については 31 症例において、ICI 治療前の FFPE 検体を対象として測定を行うと共に、ICI 治療に関連する臨床情報を合わせて解析した。

持続的に腫瘍抗原に感作される患者 CD8T 細胞は疲弊状態となることが知られているが、近年の研究によりその疲弊 T 細胞は表面マーカーと機能により 3 段階に分類されることが報告された。その最初の段階と考えられる、疲弊前駆 T 細胞 (precursor exhausted T cells: T_{pex}) は、TCF-1+, PD-1+ のフェノタイプを有しており増殖能が高いとされている。またやや分化した段階の TCF-1-PD-1+ の T 細胞 (exhausted T cells: T_{ex}) は細胞傷害能が高い。本研究において、31 例の食道癌 FFPE 検体を、イメージングマスサイトメトリーを用いて解析した結果を示す。腫瘍細胞傷害活性を有する CD8T 細胞に焦点を当てて解析を行い、腫瘍組織に浸潤する CD8T 細胞を UMAP プロット上で 9 個のクラスターに分類した。これらのうち、TCF-1+CD39+PD-1+CD8T 細胞 (T_{pex}) や TCF-1-CD39+PD-1+CD8T 細胞 (T_{ex}) 等の集団では、TOX や LAG3 等の疲弊マーカーが高く発現していることが確認された。また担癌患者 T 細胞のうち腫瘍特異的 T 細胞のマーカーと見なされている CD39 陽性細胞の割合を、この 31 例と比較すると、ICI 治療に反応する患者群において有意に CD39 陽性 T_{pex} の割合が高いことが示された。腫瘍組織においては、T_{pex}、T_{ex} とともに、腫瘍細胞塊内よりも腫瘍細胞周囲の間質に多く分布していた。TLS は主に間質に局在しているが、腫瘍細胞塊内、間質、TLS のそれぞれに分布する CD8T 細胞のサブセットを比較すると、TLS において有意に多くの T_{pex} が存在していた。この結果は、TLS が増殖能の高い T_{pex} を多く含んでおり、細胞傷害活性の高い T_{ex} の供給源として働いている可能性を示唆している。同じ症例において ICI 治療前後の末梢血 T 細胞のサブセットを解析したところ、ICI 治療により末梢血 T_{pex} の割合が有意に増加することが示された。

以上より、TLS を構成する T 細胞には異なる疲弊段階にあるサブセットが混在していることが判明し、特に腫瘍抗原特異的 T 細胞の割合、T_{pex} の割合が ICI 治療の反応性に関連している可能性が示唆された。今後は TLS 中のこれらの集団の ICI 治療による変化を確認することが重要と考えられる。治療経過中にも、適切なタイミングで腫瘍検体を採取することが課題となる。

(2) 大腸癌 TLS 内の免疫細胞サブセットの解析

治療切除された大腸癌組織 FFPE 検体 67 例を対象として、腫瘍組織に局在する TLS を構成する免疫細胞の同定と定量を行った。このうち 58 症例 (87%) で TLS の存在が見られた。TLS は、

その構成細胞の割合により5つのクラスターに分類された(Germinal center型、B細胞優位型、濾胞性リンパ球優位型、CD4+T細胞優位型(CD4T型TLS)、CTL/B/helper T型)。TLSを構成する細胞全体のうちCD4T細胞とマクロファージの割合は、術後再発症例においてより高かった。さらに、上のCD4T型TLSを多く有する患者群では有意に無再発生存期間が短かった。このようにTLS中のCD4T細胞が多いことが予後不良に関与していたため、35症例、合計353個のTLSを対象としてCD4T細胞のサブセットを同定するため、T-bet, GATA3, ROR- γ T, FOXP3, CD3, DAPIを用いた新たな多重免疫組織染色を行った。その結果、CD4T型TLSの多い症例においては、Th2型(CD3+GATA3+)T細胞が有意に高く、これが再発に関わることが示唆された。

この結果は、TLS中のCD4T細胞も各種のサブセットが含まれており、一部の症例では抗腫瘍効果を減弱させる細胞集団からなるTLSが優位となる場合があることが示された。今後、TLSを治療効果予測のバイオマーカーとして用いる場合の重要な情報になる。

(3) 胃癌末梢血免疫細胞の解析

切除不能進行・再発胃癌に対してICI療法を行った30症例を対象に、治療経過中の末梢血免疫細胞の解析を行った。ICI(抗PD-1抗体ニボルマブ)を1回投与した後に、各種の末梢血免疫細胞のうち、活性化central/effector memory T細胞、活性化effector T細胞、活性化Th-1型T細胞の割合のみが有意に上昇した。一方で、ICI治療が無効となった時期の末梢血では、活性化抑制性T細胞、LAG3陽性CD4/CD8 T細胞、TIMO3陽性CD4/CD8 T細胞の割合が上昇していた。無増悪生存期間の延長には、LAG3陽性CD4/CD8 T細胞、OX40陽性CD4/CD8 T細胞の割合が有意に相関した。これらの結果から、ICI療法は末梢血において活性化T細胞の割合を増加させる作用があり、LAG3やOX40を発現するT細胞が治療効果に働く可能性が示唆された。これらの結果は、ICI治療の予後予測バイオマーカーの候補になり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Mamoru, Nakano Michitaka, Ariyama Hiroshi, Yamaguchi Kyoko, Tanaka Risa, Semba Yuichiro, Sugio Takeshi, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Mizuno Shinichi, Isobe Taichi, Tanoue Kenro, Taguchi Ryosuke, Ueno Shohei, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Baba Eishi, Akashi Koichi	4. 巻 532
2. 論文標題 Macrophages are primed to transdifferentiate into fibroblasts in malignant ascites and pleural effusions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 215597 ~ 215597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.215597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shitara Kohei, Baba Eishi, Fujitani Kazumasa, Oki Eiji, Fujii Satoshi, Yamaguchi Kensei	4. 巻 24
2. 論文標題 Discovery and development of trastuzumab deruxtecan and safety management for patients with HER2-positive gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 780 ~ 789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-021-01196-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Kyoko, Ito Mamoru, Ohmura Hirofumi, Hanamura Fumiyasu, Nakano Michitaka, Tsuchihashi Kenji, Nagai Shuntaro, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Yamamoto Hidetaka, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 9
2. 論文標題 Helper T cell-dominant tertiary lymphoid structures are associated with disease relapse of advanced colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 1724763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2020.1724763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohmura Hirofumi, Yamaguchi Kyoko, Hanamura Fumiyasu, Ito Mamoru, Makiyama Akitaka, Uchino Keita, Shimokawa Hozumi, Tamura Shingo, Esaki Taito, Mitsugi Kenji, Shibata Yoshihiro, Oda Hisanobu, Tsuchihashi Kenji, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Oda Yoshinao, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 122
2. 論文標題 OX40 and LAG3 are associated with better prognosis in advanced gastric cancer patients treated with anti-programmed death-1 antibody	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0810-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihiro Tomoyasu, Ariyama Hiroshi, Yamaguchi Kyoko, Imajima Takashi, Yamaga Satoru, Tsuchihashi Kenji, Isobe Taichi, Kusaba Hitoshi, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of insulin like growth factor 1 receptor enhances eribulin induced <scp>DNA</scp> damage in colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4207 ~ 4218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Michitaka, Taguchi Ryosuke, Kikushige Yoshikane, Isobe Taichi, Miyawaki Kohta, Mizuno Shinichi, Tsuruta Nobuhiro, Hanamura Fumiyasu, Yamaguchi Kyoko, Yamauchi Takuji, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Nakamura Masafumi, Maeda Takahiro, Kuo Calvin J., Baba Eishi, Akashi Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 RHAMM marks proliferative subpopulation of human colorectal cancer stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tanoue K, Ohmura H, Tsuchihashi K, Shinohara Y, Ito M, Yamaguchi K, Tamura S, Shimokawa H, Isobe T, Shibata Y, Ariyama H, Tanaka R, Kusaba H, Esaki T, Mitsugi K, Akashi K, Baba E
2. 発表標題 Circulating "stem-like" PD-1+ CD8 T cells respond to PD-1 blockade predict clinical outcomes in esophageal cancer
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohmura H, Baba E, et al.
2. 発表標題 CD28null CD4+T cells associate with better prognosis in advanced gastric cancer cases treated with anti-PD-1 antibody
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanoue K, Ohmura H, Shinohara Y, Ito M, Baba E, et al.
2. 発表標題 Dual recruiting pathways of precursors of exhausted T cells to tumor microenvironment for esophageal cancer receiving immune checkpoint blockade.
3. 学会等名 第20回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有山 寛 (Ariyama Hiroshi) (80713437)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------