

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20824

研究課題名(和文)腫瘍微小環境のexhausted CD4陽性T細胞の本態解明

研究課題名(英文)The nature of exhausted CD4+ T cells in the tumor microenvironment

研究代表者

長崎 讓慈 (Nagasaki, Joji)

岡山大学・医歯薬学域・研究准教授

研究者番号：20955447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：TMEのTFHには細胞傷害性を有する新規のTFH様細胞集団が存在し、腫瘍細胞を直接攻撃することを見出した。従来型TFHと新規の細胞傷害性TFH様細胞の遺伝子発現を比較すると、前者はTCF1高発現・BLIMP1低発現、後者はTCF1低発現・BLIMP1高発現で、CD8陽性T細胞のprogenitor exhaustion/ terminally differentiated exhaustionと同様の表現型であった。TCF1を強制発現またはBLIMP1を発現抑制したTFHの機能解析では双方ともグランザイムBが低下し、実験的にもこれらはCD8陽性T細胞のexhaustionと同様の概念であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではTMEのTFHの中に細胞傷害活性を有するTFH様細胞が存在することを新たに見出し、従来型TFHと細胞傷害性TFH様細胞とは、CD8陽性T細胞におけるprogenitor exhaustion とterminally differentiated exhaustion の関係と同様であることを明らかにした。本研究により今まで明らかではなかったCD4陽性T細胞におけるexhaustionを再定義することができ、抗腫瘍免疫応答の本体解明、新規バイオマーカーの同定やCAR-T療法などの細胞療法含む新規治療開発に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：We found a novel population of cytotoxic TFH-like cells in TME, which directly attack tumor cells. Comparing the gene expression between the conventional non-cytotoxic TFH and the novel cytotoxic TFH-like cells, we identified the former showed TCF1 high and BLIMP1 low phenotypes, while the latter TCF1 low and BLIMP1 high, which are similar to progenitor exhaustion/ terminally differentiated exhaustion in CD8+ T cells. The in vitro functional analysis showed that TCF1 over-expressed or BLIMP1 knocked down TFH cells secreted a smaller volume of granzyme B, which suggests the concept is similar to that of CD8+ T cell exhaustion.

研究分野：がん免疫

キーワード：濾胞性ヘルパーT細胞 腫瘍微小環境 疲弊 腫瘍特異的T細胞 細胞傷害性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法はその有効性が認められ臨床応用されているが、無効例も存在し抗腫瘍免疫応答の本態解明が求められている。我々はヒト腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) のシングルセルシーケンスの結果から、腫瘍細胞を直接攻撃する腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を極めて正確に同定することに成功し、それらが exhaustion の表原型を呈することを報告している。一方で、腫瘍微小環境 (TME) で CD4 陽性 T 細胞が発揮する抗腫瘍免疫応答については不明点が多く、CD8 陽性 T 細胞に対するヘルパー機能に関する報告が多くを占める。一方で我々は MHC class II (MHC-II) のみを発現した悪性リンパ腫に対する抗腫瘍免疫応答には MHC-II を介してがん細胞を直接攻撃する細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞が重要であることを報告し、さらにヒト TIL のシングルセルシーケンスの結果から、TME に存在する CD4 陽性濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{FH}) の中に細胞傷害性を有する新規の T_{FH} 様細胞分画が存在することを見出した。さらにそれらの細胞分画は CD8 陽性 T 細胞における所謂疲弊の表原型を呈している可能性があった。そこで、それらの細胞分画を詳細に解析し、TME における細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の抗腫瘍免疫応答に果たす役割を解明するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

TIL のシングルセルシーケンスの結果から、TME の T_{FH} には従来の非細胞傷害性 T_{FH} に加え、新規の細胞集団である細胞傷害性 T_{FH} 様細胞が存在することを見出した。さらにそれらの細胞分画の遺伝子発現は exhausted CD8 陽性 T 細胞に近く、特に非細胞傷害性 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞がそれぞれ CD8 陽性 T 細胞の progenitor exhaustion および terminally differentiated exhaustion に相当する可能性があった。そこでこれらの T_{FH} の細胞特性を詳細に解析することで、TME に浸潤した T_{FH} の抗腫瘍免疫応答における役割を明らかにするとともに、CD4 陽性 T 細胞の exhaustion の概念を確立することを目的に本研究を遂行した。本研究により細胞傷害性 T_{FH} 様細胞という新規細胞概念を確立し、CD4 陽性 T 細胞における exhaustion を再定義でき、免疫学分野にもインパクトを与えられ、抗腫瘍免疫応答の本体解明、治療標的・バイオマーカー同定にもつながる可能性がある。

3. 研究の方法

独自に見出した CD4 陽性 T 細胞の抗腫瘍免疫応答での役割を基礎・臨床の両面から明らかにし、新たな治療標的やバイオマーカーの同定に繋げるために、以下の方法で研究を行った。

*In vitro*での T_{FH} の腫瘍特異性の検証

シングルセルシーケンスで同定した T_{FH} の TCR 配列を人工的に作成し primary T 細胞や NFAT-Luciferase vector を遺伝子導入した T 細胞株である Jurkat_NFAT-Luc に導入し、すでに樹立に成功している同一患者由来の MHC-II 発現腫瘍細胞株と共培養して反応性を検証し、同定した T_{FH} クローンの腫瘍特異性を明らかにした。

*In vivo*での TIL の解析

既に系を確立している MHC-II 発現腫瘍のマウスモデルを用いて TIL の解析を行い、CXCR5、PD-1、LAG-3、BCL6、TCF1、BLIMP1、perforin、グランザイム B (GrzB) などをフローサイトメトリーで評価し、TME の T_{FH} とその疲弊、細胞傷害性などを評価した。加えて抗 PD-1 抗体投与による T_{FH} の表現型や細胞傷害性の変化も検証した。さらに、LAG-3 をマーカーに非細胞傷害性 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞をソートし、それらの細胞傷害活性や Annexin を用いてアポトーシスを評価し、非細胞傷害性 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の progenitor/terminally differentiated exhaustion としての性質を評価した。

*In vitro*で TCF1/BLIMP1 が与える影響の検証

上記を踏まえて C57BL/6 マウス由来の T_{FH} に TCF1/BLIMP1 を強制発現もしくはノックダウンした細胞を作成し、その細胞傷害活性を評価するために perforin や GZMB 分泌をフローサイトメトリーを用いて評価した。

4. 研究成果

TIL のシングルセルシーケンスを用いて非細胞傷害性 T_{FH} と新規に同定した細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の遺伝子発現を比較すると、従来型 T_{FH} は TCF1 高発現、BLIMP1 低発現である一方、細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は TCF1 低発現、BLIMP1 高発現であり、これらは CD8 陽性 T 細胞における progenitor exhaustion および terminally differentiated exhaustion と同様の表現型であった。さらに細胞傷害性 T_{FH} 様細胞には LAG-3 が特異的に高発現していた。

これらの結果を踏まえ、まずは TME に存在する T_{FH} の腫瘍特異性を *in vitro*での免疫アッセイを用いて検証した。シングルセル TCR シークエンスの結果から抽出した T_{FH} が有する TCR を遺伝子導入した Jurkat_NFAT-Luc_TCR 細胞と患者由来の MHC-II 発現腫瘍とを共培養したところ、数的上位であった TCR は全て腫瘍細胞との反応性を認めた。これらの結果から、 T_{FH} は腫瘍特異的であることが明らかとなった。

次に、ヒト TIL のシングルセル RNA シークエンスの結果同定した非細胞傷害性 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞について *in vivo* モデルで検証を行った。マウスの TIL を解析したところ、MHC-II 発現腫瘍の TME では GZMB 陽性の細胞傷害性 T_{FH} 様細胞が増加しており、抗 PD-1 抗体治療によって細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の増加を認めた。これらの細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は LAG-3 陽性で、TCF1 低発現・BLIMP1 高発現の表原型を呈しており、ヒト臨床検体の解析結果と一致していた。さらにこれらのマウスの TIL から LAG-3 陰性/陽性 T_{FH} をソートしてそれぞれの細胞傷害活性やアポトーシスを評価したところ、LAG-3 陽性 T_{FH} 細胞は LAG-3 陰性 T_{FH} 細胞と比較してより強い細胞傷害活性を有する一方で、アポトーシスが促進されていた。これらの結果は LAG-3 陽性/陰性 T_{FH} 細胞がそれぞれ細胞傷害性 T_{FH} 様細胞/非細胞傷害性 T_{FH} に該当し、それらが機能的にも矛盾しないことが示された。

上記の結果を踏まえ、TCF1 及び BLIMP1 の T 細胞での作用を *in vitro* で検証した。C57B/6 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞に Tcf1 の強制発現並びに Blimp1 の発現抑制を行ったところ、これらの細胞の GZMB や Perforin の発現が低下した。

以上から、非細胞傷害性 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は CD8 陽性 T 細胞の progenitor exhaustion および terminally differentiated exhaustion に相当すると考えられ、CD4 陽性 T 細胞の疲弊を再定義することができたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Hideki, Nagasaki Joji, Shimizu Daiki, Katsuya Yuki, Horinouchi Hidehito, Hosomi Yukio, Tanji Etsuko, Iwata Takekazu, Itami Makiko, Kawazu Masahito, Ohe Yuichiro, Suzuki Takuji, Togashi Yosuke	4. 巻 4
2. 論文標題 Immunologic Significance of CD80/CD86 or Major Histocompatibility Complex-II Expression in Thymic Epithelial Tumors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JTO Clinical and Research Reports	6. 最初と最後の頁 100573 ~ 100573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtocrr.2023.100573	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 Zhou Wenhao, Kawashima Shusuke, Ishino Takamasa, Kawase Katsushige, Ueda Youki, Yamashita Kazuo, Watanabe Tomofumi, Kawazu Masahito, Dansako Hiromichi, Suzuki Yutaka, Nishikawa Hiroyoshi, Inozume Takashi, Nagasaki Joji, Togashi Yosuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Stem-like progenitor and terminally differentiated TFH-like CD4+ T cell exhaustion in the tumor microenvironment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113797 ~ 113797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.113797	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 Kawase Katsushige, Kawashima Shusuke, Nagasaki Joji, Inozume Takashi, Tanji Etsuko, Kawazu Masahito, Hanazawa Toyoyuki, Togashi Yosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 High Expression of MHC Class I Overcomes Cancer Immunotherapy Resistance Due to IFN Signaling Pathway Defects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 895 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-22-0815	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 Naoi Yuto, Morinaga Takao, Nagasaki Joji, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 CD106 in tumor-specific exhausted CD8+ T cells mediates immunosuppression by inhibiting TCR signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Research	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) 10.1158/0008-5472.CAN-23-0453	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------