

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：83813

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22810

研究課題名（和文）卵巣癌における三次リンパ組織（TLS）の人工的誘導のための基礎的検討

研究課題名（英文）Fundamental study for induction of tertiary lymphoid structure (TLS) in ovarian cancer

研究代表者

浮田 真沙世（UKITA, Masayo）

地方独立行政法人静岡県立病院機構静岡県立総合病院（救急診療部、循環器病診療部、がん診療部、臨床診療部・臨床診療部・医長

研究者番号：50725067

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）：卵巣癌組織における三次リンパ組織（TLS）の存在は、B細胞系統やCD8+ T細胞の腫瘍内浸潤を促進し、液性免疫と細胞性免疫の協調的な抗腫瘍反応を促進し、予後改善に寄与している可能性が示された。TLSの形成に関わるCXCL13の遺伝子発現は、TLSの有無および腫瘍内の様々な腫瘍浸潤リンパ球数と相関し卵巣癌の予後因子となっており、マウス卵巣癌モデルにおいて、rCXCL13は腫瘍組織内にTLSを誘導し、CD8+T細胞の腫瘍内浸潤を促進することで担癌マウスの生存を延長していた。CXCL13やTLSの誘導は、腫瘍微小環境を変化させることができ、重要な免疫調整法となる可能性があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の進行を制御し、治療への反応性を調節するという重要な役割をもつ腫瘍微小環境（TME）を標的とした治療戦略は有望なアプローチとして発展途上にある。本研究では、慢性炎症に伴ってTMEに形成される三次リンパ組織（TLS）に着目し、卵巣癌におけるTLSの臨床的意義を明らかにし、新たな治療標的としての可能性を検討した。卵巣癌における抗腫瘍反応における液性免疫との相互作用の重要性と、CXCL13やTLSの誘導はTMEを変化させることが示された。

研究成果の概要（英文）：The presence of tertiary lymphoid structure(TLS) recruits various lymphocytes and enhances the infiltration of B-cell lineages and CD8+ T cells in ovarian cancer, leading to antitumor immunity. The strong interaction between humoral and cellular immunity in the antitumor response was revealed, and the possibility of TLS-mediated interactions was demonstrated. Gene expression of CXCL13, a chemokine involved in TLS formation, correlated with TLS presence and the infiltration of T cells and B cells, and was a favorable prognostic factor for high grade serous ovarian cancer patients. In a mouse ovarian cancer model, recombinant CXCL13 induced TLSs and enhanced survival by the infiltration of CD8+ T cells. This study revealed the TME can be altered by inducing CXCL13 and TLSs, which might be an important immunomodulatory method to enhance antitumor immunity.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：三次リンパ組織 腫瘍浸潤リンパ球 腫瘍微小環境 卵巣癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科癌では最も予後不良な疾患であり、約半数が進行期で見つかり、手術療法や化学療法による集学的治療により一旦寛解に至っても半数以上が再発に至る。新規治療の開発が求められているが、抗 PD-1 抗体に代表される免疫チェックポイント阻害剤の奏効率も 15%程度にとどまっている。

腫瘍微小環境 (TME) は、腫瘍が発生する複雑で多様な多細胞環境と定義され、構成細胞から分泌されるサイトカインやケモカインなどの分泌因子や、血管やリンパ管のネットワーク等が集合的に絡み合い、持続的に進化するとされている。腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) は、TME の不可欠な構成要素であり、T 細胞サブセットの腫瘍内浸潤は予後および治療への反応と相関することが多くの癌腫で知られている。最適な抗腫瘍効果を得るためには、腫瘍微小環境において単に PD-1/PD-L1 経路をブロックするだけでなく、癌局所へ抗腫瘍作用を担う T 細胞の浸潤を促し、免疫を活性化させる必要がある。これまでは、抗腫瘍効果の臨床効果を高める戦略は、主に腫瘍内の T 細胞に焦点が当てられてきたが、TME は腫瘍の進行を制御し、治療に対する反応を調節するという重要な役割を持っており、TME を標的とした治療戦略は、有望なアプローチとして発展途上にある。

近年、腫瘍微小環境には、慢性炎症により、二次リンパ組織と同様の構造と機能をもつ三次リンパ組織 (Tertiary lymphoid structure, TLS) が形成されることが知られ注目されている。慢性炎症に伴い、非リンパ組織に後天的に形成される一過性、異所性のリンパ組織様構造で、古くから関節リウマチ等の自己免疫疾患の増悪因子として、移植臓器の慢性拒絶と関わることで報告されている。がんにおける TLS の役割は不明な点も多いが、二次リンパ組織同様、抗原提示の場となり、T 細胞や B 細胞の活性化が起こっていることが確認されている。TLS を人工的にがん組織周囲に誘導できれば、腫瘍局所でより効率的に腫瘍抗原の免疫細胞へのプライミングが行われ、例えば、抗 PD-1/PD-L1 治療の有効性を高めることが可能になるのではないかと考える。

2. 研究の目的

卵巣癌における TLS の役割は未だ不明な点も多く、本研究では TLS の臨床的意義を明らかにし、新たな治療標的としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣高異型度漿液性癌の臨床サンプル(n=97)を用いた検討

- ・ TLS と腫瘍浸潤リンパ球との関係 (IHC)
- ・ TLS と CXCL13 の関係 (IHC とマイクロアレイデータ(n=28))
- ・ CXCL13 の分泌源の検索 (RNA ISH)

(2) CXCL13 の分泌環境の探索 (in vitro)

- ・ 健康人 CD4⁺・CD8⁺T 細胞を用いた CXCL13 誘導実験

(3) 動物モデルを用いた TLS の誘導と抗腫瘍効果の検討 (in vivo)

4. 研究成果

卵巣癌組織における TLS の存在は、CD8⁺T 細胞のみならず、B 細胞系統を含む様々な腫瘍浸潤リンパ球を増やすことを明らかにした。一方 TLS の存在のみでは、卵巣癌の予後を改善しないこ

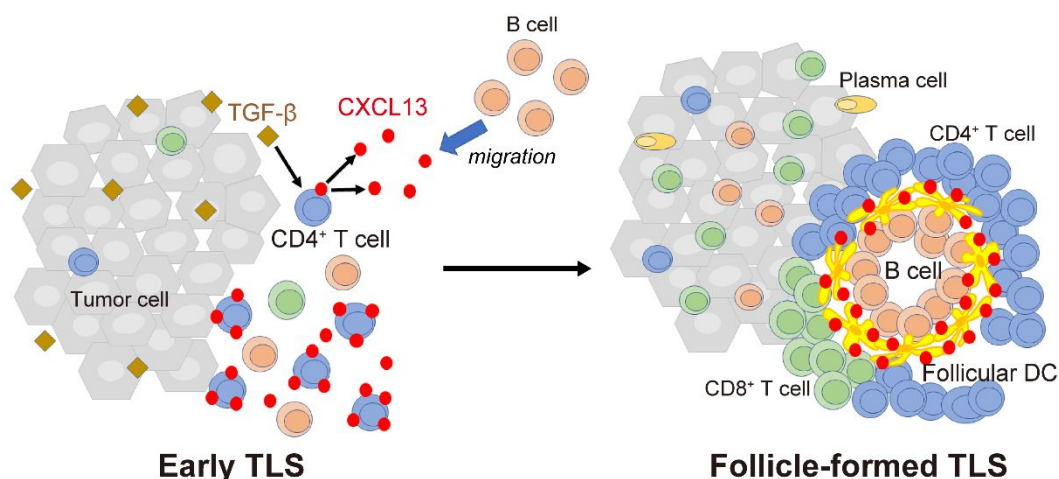
とが分かった。しかしながら、2系統以上のリンパ球の浸潤は卵巣癌の予後を改善し、2系統以上のリンパ球の腫瘍内浸潤を可能にしているのが TLS の存在であることが分かった。また、TLS の形成に関わる重要なケモカインの一つである CXCL13 の遺伝子発現は、TLS の有無と関連するのみならず、腫瘍内の様々な腫瘍浸潤リンパ球数と関連し、卵巣癌の予後因子となることがわかった。

CXCL13 を分泌する腫瘍組織内の細胞を RNA ISH にて調べたところ、TLS においては CD4⁺T 細胞に一致して、腫瘍間質においては CD8⁺T 細胞優位に CXCL13 の共局在が観察された。TLS には成熟段階が存在することが報告されているが、CD21⁺濾胞樹状細胞 (FDC) のネットワークが形成される段階になってくると、二次リンパ組織において主要な CXCL13 の産生源として知られる CD21⁺FDC に CXCL13 の分泌源がシフトする現象が捉えられた。すなわち、CXCL13 分泌 CD4⁺T 細胞は TLS の初期形成において重要である可能性が示唆された。

次に CXCL13 の分泌を促進する因子を明らかにするために、卵巣癌において CXCL13 と遺伝子発現の正の相関のある TGF-β に着目し、健康人の PBMC から単離した CD4⁺、CD8⁺T 細胞を用いた CXCL13 の誘導実験を行った。CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞はともに TGF-β の添加や、卵巣癌細胞株の conditioned medium により CXCL13 の分泌は有意に促進され、TGF-β シグナル阻害剤によりその反応は阻害された。更に T 細胞の分化に寄与する様々な炎症性サイトカインを添加したところ CD4⁺T 細胞は、TGF-β + IL-2 阻害環境において、CD8⁺T 細胞は TGF-β + IL-12 存在下において有意に CXCL13 の分泌が促進されることが明らかとなり CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞では、CXCL13 分泌の制御が異なることが分かった。したがって、腫瘍切片上においても CXCL13 の発現は、TLS (CD4⁺T 細胞優位) と TIL (CD8⁺T 細胞優位) で異なるのであると考えられた。

マウス卵巣癌モデルに、マウスリコンビナント (r)CXCL13 を腹腔内投与したところ大網腫瘍内に Ki-67 陽性の B 細胞を中心とした TLS 様構造を誘導でき、CD8⁺T 細胞の誘導を介して担癌マウスの生存期間を延長させることを見出した。

以上より CXCL13 産生 CD4⁺T 細胞は、TLS の初期形成に重要で、TLS の存在は、卵巣癌において B 細胞系統や CD8⁺T 細胞の腫瘍内浸潤を促進し、液性免疫と細胞性免疫の協調的な抗腫瘍反応を促進している可能性が示された。CXCL13 や TLS の誘導は、腫瘍微小環境を変化させることができ、抗腫瘍免疫を増強するための重要な免疫調整法となる可能性があることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Masayo Ukita, Junzo Hamanishi, Hiroyuki Yoshitomi, Koji Yamanoi, Shiro Takamatsu, Akihiko Ueda, Haruka Suzuki, Yuko Hosoe, Yoko Furutake, Mana Taki, Kaoru Abiko, Ken Yamaguchi, Hidekatsu Nakai, Tsukasa Baba, Noriomi Matsumura, Akihiko Yoshizawa, Hideki Ueno, Masaki Mandai	4. 巻 7
2. 論文標題 CXCL13-producing CD4+ T cells accumulate in the early phase of tertiary lymphoid structures in ovarian cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	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） 10.1172/jci.insight.157215	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浮田真沙世
2. 発表標題 CXCL13は三次リンパ組織の誘導に関与し腫瘍浸潤リンパ球を増加させ卵巣癌の抗腫瘍効果に関わる
3. 学会等名 第19回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masayo Ukita
2. 発表標題 CXCL13 produced by CD4-positive T cell induces tertiary lymphoid structures and tumor infiltrating lymphocytes, and contributes to antitumor effect in ovarian cancer
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2020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
研究協力者	万代 昌紀 (Mandai Masaki)	京都大学大学院医学研究科・婦人科学産科学・教授 (14301)	
研究協力者	濱西 潤三 (Hamanishi Junzo) (80378736)	京都大学大学院医学研究科・婦人科学産科学・准教授 (14301)	
研究協力者	上野 英樹 (Ueno Hideki)	京都大学大学院医学研究科・免疫細胞生物学・教授 (14301)	
研究協力者	吉富 啓之 (Yoshitomi Hiroyuki)	京都大学大学院医学研究科・免疫細胞生物学・准教授 (14301)	

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