

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20610

研究課題名（和文）がん微小環境におけるCXCL13産生T細胞解析を起点としたヒトがん免疫機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of Human Cancer Immunity Based on Analysis of CXCL13-Producing T Cells in the Cancer Microenvironment

研究代表者

吉富 啓之（Yoshitomi, Hiroyuki）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50402920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：子宮体がん組織T細胞に対してscRNA-seq解析を行い、がん組織においてはPD-1+CD39+CD103+CD8+T細胞がCXCL13を産生することが示された。更に自己免疫疾患である関節リウマチ滑膜T細胞のscRNA-seqデータと統合・比較し、がん組織におけるT細胞に対する微小環境解析とT細胞分化への影響を解析した。T細胞受容体配列に基づくクロナイト解析を行い、PD-1+CXCL13+ CD8+T細胞に高度なオリゴクローナル増殖を認めた。さらにFoxP3+CD8+T細胞集団の同定もを行い、このTCRはPD-1+CXCL13+CD8+T細胞と高度に共有されていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は申請者がこれまで行ってきたヒト検体を用いた炎症環境下におけるT細胞研究をがん免疫に応用し、ヒトがん微小環境に存在するT細胞で上昇しているバクウェイや、それらがT細胞分化に及ぼす影響を明らかにした。さらにTCRクロナイト解析より、PD-1+CXCL13+CD8+T細胞が高度にオリゴクローナルな増殖をきたすこと、一部がFOXP3+CD8+T細胞とT細胞受容体配列を共有することを示した。マウスのT細胞はCXCL13を産生しないことが知られており、CXCL13を産生するヒトT細胞にアプローチする本研究の成果はマウスモデルではすめることが困難な独創性の高いものである。

研究成果の概要（英文）：We performed scRNA-seq analysis of T cells from uterine cancer tissues and showed that PD-1+CD39+CD103+CD8+ T cells produce CXCL13 in cancer tissues. Furthermore, we integrated and compared scRNA-seq data of rheumatoid arthritis synovial T cells to analyze the microenvironment in cancer tissues and its effect on T cell differentiation. Intensive oligoclonal proliferation was observed in PD-1+CXCL13+ CD8+ T cells. We also identified a FoxP3+CD8+ T cell population and showed that this TCR is highly shared with PD-1+CXCL13+CD8+ T cells.

研究分野：T細胞

キーワード：T細胞 CXCL13 PD-1 子宮体がん がん微小環境 T細胞分化

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 療法などの免疫チェックポイント療法によりがん治療は進歩したが、有効例はいまだ一部に限られヒトがん免疫のさらなる解明が求められている。近年の解析より、がん組織に存在する CD8+および CD4+T 細胞の中には、リンパ濾胞形成にかかわるケモカイン CXCL13 を発現する細胞が多数存在することが報告され、乳がんや婦人科腫瘍においては腫瘍組織中の CXCL13 の発現が良好な患者予後と相関することが示された (Gu-Trantien et al JCI. 2013, Gu-Trantien et al. JCI insight. 2017, 濱西 et al.未発表)。一方でこれらの相関が免疫学的にどの様に説明されるのかいまだ明らかでない。

ヒトがん組織中の CD8+T 細胞を CyTOF にて解析した報告では、その大部分はがん抗原非特異的な bystander (傍観者) CD8+T 細胞であり、がん抗原に反応する一部の CD8+T 細胞は CD39 (ENTPD1) を発現するとともに CD103 を強く発現していた (Simoni Y et al. Nature 2018)。CD103+CD8+T 細胞はがん微小環境において CXCL13 を産生する分画として諸家より報告されており (Thommen DS. Nat Medicine 2018, Oja AE et al. Frontiers Immunol 2018, Workel HH et al. Cancer Immunol Res 2019) これらのことから CXCL13 を産生する CD8+T 細胞にはがん抗原特異的な分画を多く含むと考えられる。申請者はこれまで自己免疫性疾患において炎症環境中の TGF- β によりヒト CD4+T 細胞が転写因子 Sox4 を介して CXCL13 を産生する PD-1hiCXCR5-CD4+T 細胞へと分化することを示した (Kobayashi S et al. Eur J Immuno 2016, Yoshitomi H et al. Nat Commun 2018)。CD103 は TGF- β 依存的なことから (EI-Asady R et al. JEM 2005)、これらの CXCL13 を産生する分画はがん抗原により刺激されがん微小環境の因子により分化した細胞を多く含むと考えられる。

本研究では申請者がこれまで行ってきたヒト検体を用いた炎症環境下における T 細胞研究をがん免疫に応用し、ヒトがん微小環境に存在する T 細胞のがん抗原特異性ととも細胞の表現型や抗がん作用を明らかにすることを目的とし、さらにその分化機構と抗がん作用を制御することで新たながん治療をめざす。マウスの T 細胞は CXCL13 を産生しないことが知られており、CXCL13 を産生するヒト T 細胞にアプローチする本研究はマウスモデルではすすめることが困難な独創性の高いものである。

2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまで行ってきたヒト検体を用いた炎症環境下における T 細胞研究をがん免疫に応用し、ヒトがん微小環境に存在する T 細胞のがん抗原特異性ととも細胞の表現型や抗がん作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

子宮体がんに対して子宮摘出術を行った余剰検体よりがん組織を採取し、liberase ならびに DNase にて酵素消化して細胞懸濁液とし、CD3 陽性細胞をソートした後に 10X 社 chromium 5' を用いて scRNA-seq 解析を行った。遺伝子発現解析を目的としたライブラリーに加えて、T 細胞受容体に対するライブラリーを作成し、遺伝子発現とともに T 細胞受容体に対する解析を行った。各症例の scRNA-seq データを統合し教師なしクラスタリングを行い、得られた各クラスターが発現する特異的な遺伝子 (DEG) を抽出した。さらに各細胞が発現する TCR 配列に基づいたクロナイプ解析を行い、各クラスターのオリゴクローナルな増殖や分化過程の推定を行った。

さらに、子宮体がん浸潤 T 細胞のデータと自己免疫組織浸潤 T 細胞 (関節リウマチ関節滑膜組織浸潤 T 細胞) のデータを統合し、がん組織と自己免疫組織における T 細胞の遺伝子発現の違いをパスウェイ解析し、がん組織特異的な微小環境の同定を試みた。

自己免疫組織環境異なり、がん組織においては CD4+T 細胞だけでなく CD8+T 細胞も CXCL13 を産生することが知られている。CD4+T 細胞ならびに CD8+T 細胞の分化機構や免疫機能の違いを in vitro の培養系にて解析した。

4. 研究成果

(1) 子宮体がん浸潤 T 細胞シングルセル解析

子宮体がん 5 症例に対してライブラリー作成を行った。うち 1 症例は漿液性癌で残りは類内腺癌であった。ステージは IA、IIIC、IIIC2 がそれぞれ 1 例、2 例、2 例であった。ダブレットと死細胞除去を行ったあとの細胞数は 28,928 個であった。CCA 法で integrate し教師なしクラスタリングを行ったところ 17 のクラスターが定義された (図 1)。PD-1 を高発現する分画として CD4 にクラスター 6、CD8 にクラスター 1 を認め、それらは既報通り CD103 や CD39 を高発現していた (図 1)。自己免疫疾患においては CD8+T 細胞による CXCL13 の発現はわずかであるが、子宮体がん浸潤細胞においては CD8+T 細胞も高度に CXCL13 を発現した。さらに、FOXP3、IL2RA、CD4 を発現する Treg に相当する分画の他に、CD8+T 細胞にも FOXP3 を発現する分画を認めた

(図 1)。

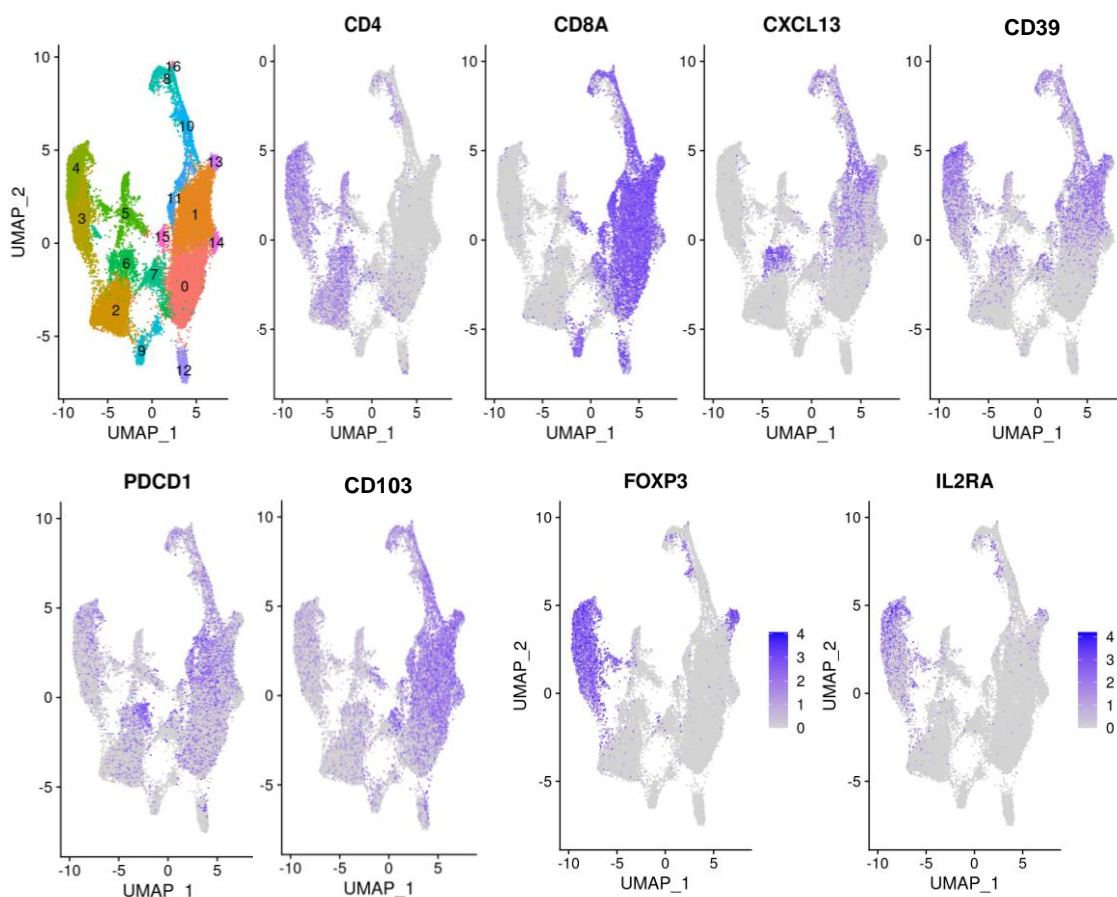


図 1 子宮体がん浸潤 T 細胞シングルセル解析

(2) 組織微小環境解析

自己免疫組織では CD8+T 細胞は CXCL13 を産生しないが、上記の子宮体がんの解析では CD8+T 細胞が CXCL13 を発現しているなど組織により T 細胞の性質には違いがある。このことから、関節リウマチ滑膜組織内 T 細胞と子宮体がん T 細胞を比較することで、がん組織における微小環境の特徴が抽出できると考えた。子宮体がん 5 症例に加え関節リウマチ組織 T 細胞 5 症例のデータを統合した 70,899 細胞で解析をすすめた。教師なしクラスタリングでは子宮体がんと同様の分画が定義された。T 細胞分画の割合を比較したところ、制御性 T 細胞分画が子宮体がん関節リウマチより有意に多いことが示された。一方で KI67 陽性の増殖 T 細胞の割合には組織間では差がなかった。これらの事は、抗原に対する反応性は自己免疫組織とがん組織で差がないものの、がん組織においては制御性 T 細胞が過剰であるためがん免疫の機能が十分に発揮できない状態にあることが示唆された。

更に、組織間の比較においてがん環境の T 細胞において特異的に発現する遺伝子群に対してパスウェイ解析を行った。(図 2)

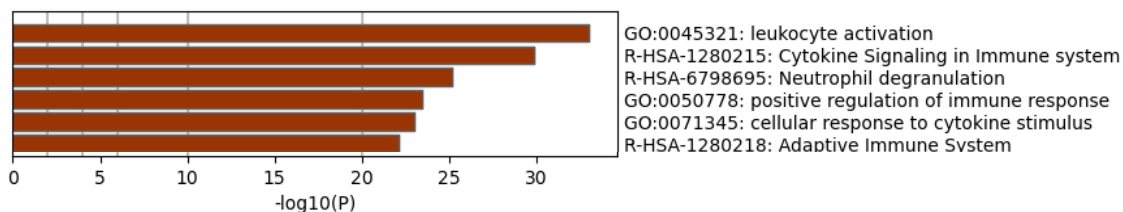


図 2 がん微小環境パスウェイ解析

さらに、これらの経路の上昇を説明する遺伝子群は IFN に関連する遺伝子群であったことから、これらの因子が T 細胞分化に及ぼす影響を解析した。健康人末梢血 CD4+T 細胞ならびに CD8+T 細胞を様々なサイトカイン存在下で CD3/CD28 刺激を行い、CXCL13 産生性 T 細胞の分化を試みた。既報通り TGFβ 存在下において CD4+T 細胞、CD8+T 細胞ともに CXCL13 の誘導を認めた。さらに、腫瘍免疫に関与する IFN を産生する Th1 誘導に重要な IL-12 の添加を試みた。IL-12 の TGFβ への添加は CD4+T 細胞に対しては CXCL13 の低下を引き起こしたが、CD8+T 細胞に対しては CXCL13 の増加をきたした。このことは、がん組織における CD8+T 細胞による CXCL13 産生は Th1 型のがん微小環境に依るものであることを強く示唆している。

(3) クロノタイプ解析

T細胞受容体には膨大な多様性があるため、細胞のバーコードとして追跡することでオリゴクローナルな増殖をきたしたクローンの同定が可能である。同一の T 細胞受容体 α 鎖/ β 鎖 CDR3 の組み合わせを持つ細胞の頻度を解析したところ、CXCL13, PD-1, CD39, CD103 を発現する分画に高度な増殖を認め全細胞の 6% を占めていた (図 3A)。このことは、CXCL13, PD-1, CD39, CD103 の分画にがん抗原特異的な T 細胞が集積していることを示す。

さらに、FoxP3+CD8T 細胞と TCR 配列を共有している細胞の同定を試みた。興味深いことに CXCL13, PD-1, CD39, CD103 を発現する分画と TCR を高度に共有していることが明らかとなった (図 3B)。このことはがん特異的 CTL の一部が FoxP3 を発現する可能性を強く示唆しており、これらの制御が今後重要になると考えられた。

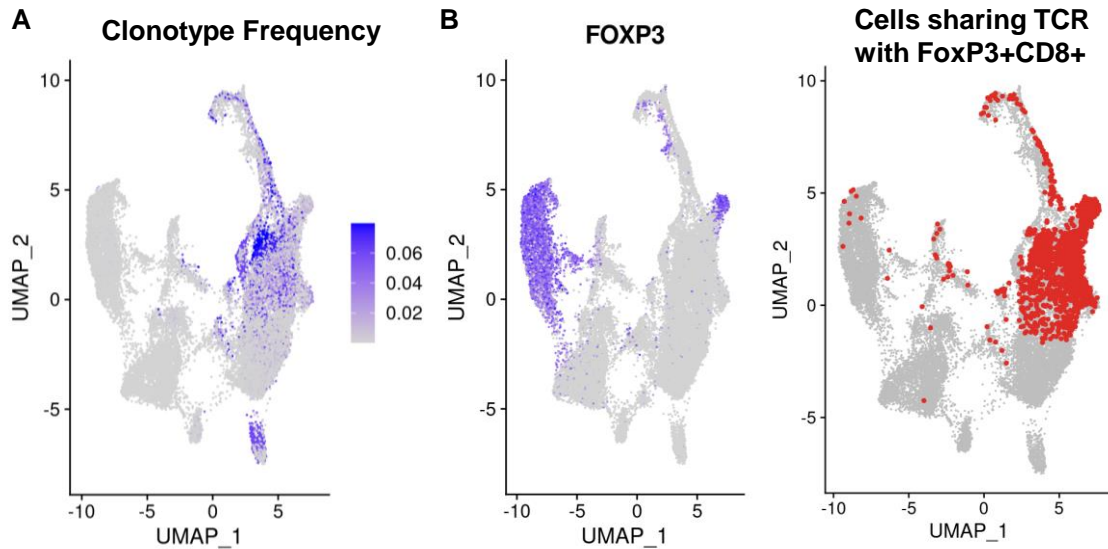


図3 TCR クロノタイプ解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Ukita Masayo, Hamanishi Junzo, Yoshitomi Hiroyuki, Yamanoi Koji, Takamatsu Shiro, Ueda Akihiko, Suzuki Haruka, Hosoe Yuko, Furutake Yoko, Taki Mana, Abiko Kaoru, Yamaguchi Ken, Nakai Hidekatsu, Baba Tsukasa, Matsumura Noriomi, Yoshizawa Akihiko, Ueno Hideki, Mandai Masaki | 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 e157215 |
| 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshitomi Hiroyuki, Ueno Hideki | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology | 6. 最初と最後の頁 523 ~ 527 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41423-020-00529-z | 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 Yoshitomi Hiroyuki | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 CXCL13-producing PD-1hiCXCR5? helper T cells in chronic inflammation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Immunological Medicine | 6. 最初と最後の頁 156 ~ 160 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2020.1781998 | 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤岡麻友 |
| 2. 発表標題 Tfh細胞によるオリゴクローナルなIgG+形質細胞は子宮体癌の良好な予後と関連する |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mayu Fujioka |
| 2. 発表標題 Clonal expanded IgG-producing plasma cells triggered by Tfh cells are associated with better survival in endometrial cancer |
| 3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022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 | 上野 英樹 (Ueno Hideki) (50850442) | 京都大学・医学研究科・教授 (14301) | |
| 研究分担者 | 濱西 潤三 (Hamanishi Junzo) (80378736) | 京都大学・医学研究科・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 |
|---------|---------|