

128. 悪性リンパ腫での濾胞性ヘルパーT細胞の二面性の解明

長崎 譲慈

*岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 腫瘍微小環境学分野

Key words : 濾胞性ヘルパーT細胞, 腫瘍微小環境, exhaustion, BLIMP1, TCF1

緒言

がん免疫療法はその有効性が証明され広く臨床応用されているが、その効果は不十分で腫瘍微小環境 (TME) の本態解明が求められている。免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) による抗腫瘍効果の中心的作用は CD8 陽性 T 細胞が担っているとされている一方で、CD4 陽性 T 細胞の TME に関する報告は限られている。我々はこれまでに、ICI の効果が乏しいとされる悪性リンパ腫の TME では細胞傷害性を有する CD4 陽性 T 細胞が抗腫瘍効果を発揮し、ICI によってそれらが増強されることを見出した [1]。さらにメラノーマ患者の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) のシングルセルシーケンスから、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} 様の細胞集団が存在することを同定した。そこで、これらの新規細胞集団を詳細に解析し、固形がん・悪性リンパ腫における CD4 陽性 T 細胞の抗腫瘍免疫応答での新しい役割を明らかにするために本研究を行った [2]。

方法および結果

1. 腫瘍浸潤 T_{FH} の中に細胞傷害性を有する新規細胞集団が存在する

メラノーマ患者の外科切除病変の残余検体から腫瘍細胞と TIL をそれぞれ分離した。腫瘍組織の分離には Lymphocyte Separation Solution を使用した。収集した腫瘍細胞は 10%FCS RPMI を用いて培養し、細胞株として樹立することに成功した。また、抽出した TIL から FACS Aria で CD3 陽性 T 細胞をソートし、10x Single-Cell Immune Profiling Solution Kit を用いてシングルセル RNA/TCR シークエンスを行った。その結果、腫瘍浸潤 T 細胞は 9 つのクラスターに分類された (図 1)。その中の CD4 陽性 T_{FH} クラスターに着目して再クラスタリングを行うと、T_{FH} の細胞集団の中に細胞傷害関連遺伝子である *GZMA/B* や *PRF1*、並びに炎症関連遺伝子である *CCL4/5* や *CXCR6* を高発現した新規の細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の集団が存在することを同定した (図 2)。

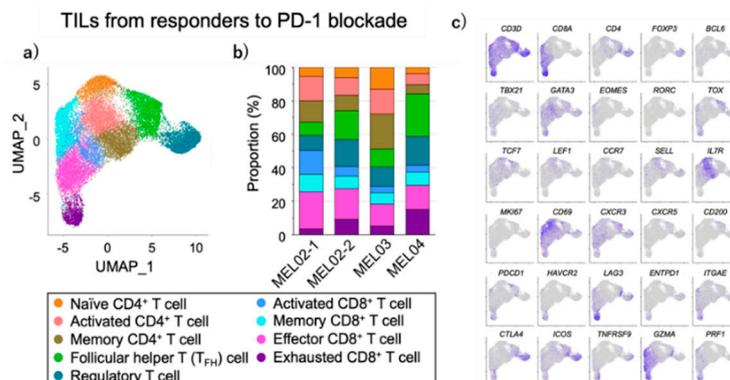


図 1. TIL のシングルセルシーケンス

シングルセル TCR/RNA シークエンスデータの解析結果。UMAP (a)、各クラスターの割合 (b)、遺伝子発現 (c) を示す。

*現在の所属：大阪公立大学 大学院医学研究科 血液腫瘍制御学

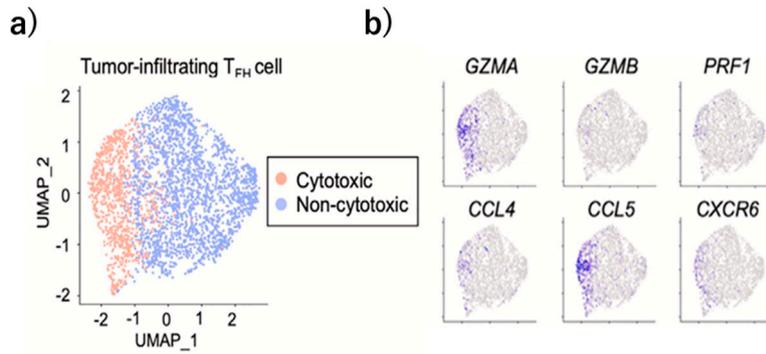


図 2. T_{FH} の再クラスタリング

腫瘍浸潤 T_{FH} の再クラスタリングの結果。2 つの集団に再分類された。UMAP (a) と代表的な細胞傷害関連遺伝子と炎症関連遺伝子 (b)。

2. 細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は腫瘍特異的である

従来型 T_{FH} 並びに新規の細胞傷害性 T_{FH} 様細胞が腫瘍細胞に反応する腫瘍特異的 T 細胞であるかを評価するために、*in vitro* での検証を行った。まずシングルセルシーケンスから得られた個々の T_{FH} の TCR 配列の中で、高頻度に認める TCR クローンを抽出した。次にそれらの配列を組み込んだウイルスベクターを作製し、T 細胞株である Jurkat 細胞に遺伝子導入した。使用した Jurkat 細胞株は NFAT-Luc 遺伝子があらかじめ導入されており、TCR シグナルを反映してルシフェラーゼを分泌する。すでに樹立してある同一患者由来の腫瘍細胞株は MHC クラス II を発現していたため、それらを共培養し、TCR-Jurkat/NFAT-Luc 細胞の腫瘍細胞への反応性を評価したところ、T_{FH} の中で高頻度に見られた TCR は MHC クラス II 発現腫瘍細胞に反応性を示し、腫瘍特異的であることが示された (図 3a)。さらにこれらの TCR ベクターをヒト CD4 陽性 T 細胞に遺伝子導入した TCR-T 細胞を作製し、腫瘍細胞と共培養することでその細胞傷害活性を評価したところ、これらの TCR-T 細胞は腫瘍細胞に対して細胞傷害性を発揮することが明らかとなった (図 3b)。

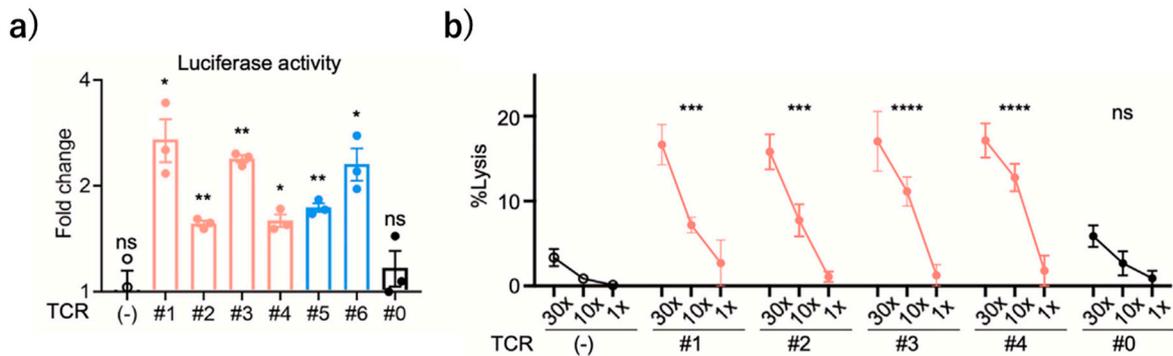


図 3. 細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の腫瘍特異性の検証

- 細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の TCR の腫瘍に対する反応性。同一患者由来の腫瘍細胞株と TCR-Jurkat/NFAT-Luc 細胞株とを共培養し、ルシフェラーゼ活性を評価した。統計解析には T 検定を用いた。
- 細胞傷害アッセイ。TCR-T 細胞 (Effector cell : E) とカルセインで標識した患者由来細胞株 (Target cells : T) とを *in vitro* で共培養し蛍光測定した。群間比較は積分値 Bonferroni 検定を用いた one-way ANOVA 分析により行った。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001、ns, not significant。

3. 細胞傷害性 T_{FH} 様細胞はマウスモデルで抗腫瘍免疫応答を発揮する

次に *in vivo* モデルを用いて T_{FH} が及ぼす抗腫瘍免疫応答への影響を検証した。C57BL/6 マウスの脾臓細胞から FACS Aria を用いて CD4 陽性 CXCR5 陽性 PD-1 陽性の T_{FH} をソートした。それらの細胞を MHC クラス II のみが発現した MC-38 を接種された SCID マウスに移入すると、 T_{FH} を移入したマウスでは腫瘍の成長が抑制された (図 4)。以上から、*in vivo* モデルでも T_{FH} が抗腫瘍免疫応答を発揮することが明らかとなった。

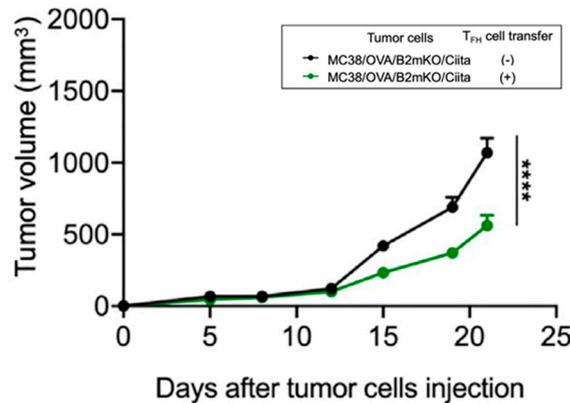


図 4. *In vivo* での T_{FH} の細胞傷害性の検証

MHC クラス II のみ発現した MC-38 を接種した SCID マウスに

T_{FH} を移入した。2 群間の比較には two-way ANOVA を使用した。

**** $p < 0.0001$ 。

4. BLIMP1 と TCF1 のバランスが従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞への分化を決定している

次に従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の遺伝子発現の違いを明らかにするために、シーケンズデータを用いて両者の間で比較を行った。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 *BLIMP1* 高発現、*TCF1* 低発現であった (図 5a)。TME における CD8 陽性 T 細胞の exhaustion は抗腫瘍免疫応答を減弱させることが知られており、自己増殖可能な progenitor exhaustion と、アポトーシス傾向で自己増殖困難な terminally differentiated exhaustion に大別される。さらにそれらはそれぞれ *TCF1* 高発現・*BLIMP1* 低発現、および *BLIMP1* 高発現、*TCF1* 低発現であることが知られており [3]、我々が同定した従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の遺伝子発現パターンは、CD8 陽性 T 細胞の progenitor exhaustion および terminally differentiated exhaustion と同様であった。そこで、これらの遺伝子が T_{FH} の細胞傷害性に関連するかを検証するために、マウス脾臓から抽出した T_{FH} に *TCF1* を強制発現、または *BLIMP1* をノックダウンさせてグランザイム B の発現量を評価したところ、双方ともにコントロールと比較してグランザイム B の分泌が低下しており、 T_{FH} の細胞障害活性が低下することが示された。(図 5b)。以上から、従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の関係は、CD8 陽性 T 細胞の progenitor exhaustion および terminally differentiated exhaustion と同様の関係であると考えられ、CD4 陽性 T 細胞の exhaustion を再定義できる可能性があると考えられた (図 6) [2]。

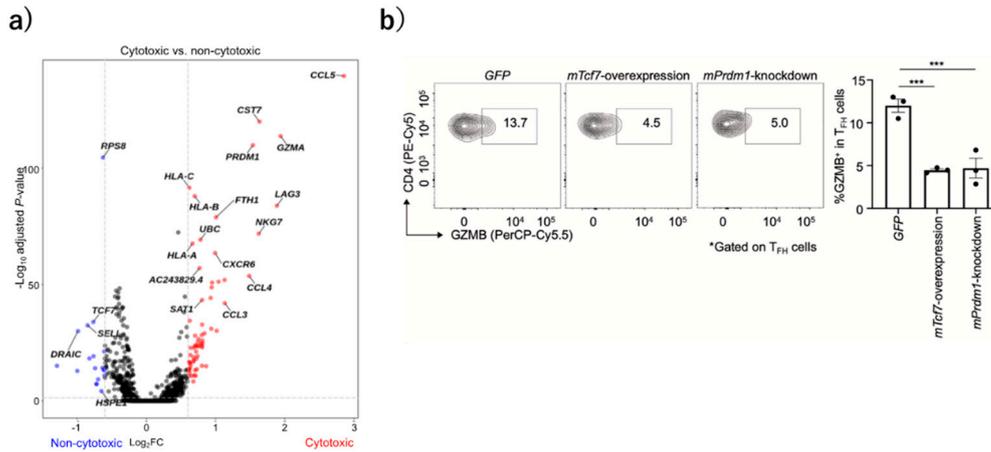


図 5. 従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は progenitor/terminally exhaustion の表現型を示す。

- 従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の遺伝子発現の比較。遺伝子発現量を比較し volcano plots で示した。
- TCF1* を強制発現または *BLIMP1* を抑制した T_{FH} のグランザイム B の発現量。C57BL/6J マウスの脾臓細胞にレンチウイルスを用いて *TCF1* を強制発現または *BLIMP1* を抑制し、グランザイム B の発現量を評価した。群間比較のために積分値を使用して Bonferroni 検定を用いた one-way ANOVA 分析により行った。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、ns : not significant。

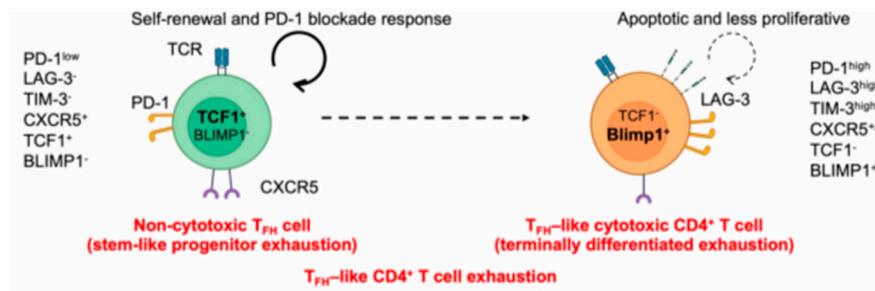


図 6. T_{FH} の疲弊に関する要旨図

従来型 TFH はアポトーシスしにくく PD-1 阻害薬に反応して自己増殖可能であるが、細胞傷害性 TFH 様細胞はアポトーシスしやすく自己増殖しにくい。

考 察

本研究では TME に存在する T_{FH} が引き起こす抗腫瘍免疫応答について検証し、T_{FH} の中に細胞傷害活性を有する T_{FH} 様細胞が存在することを新たに見出した。これらの細胞は MHC クラス II を介して直接的な細胞傷害活性を発揮しており、TME での抗腫瘍効果の一端を担っていると考えられた。さらに従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 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と考えられ、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た。現在、同様に MHC クラス II が一般的に発現している悪性リンパ腫においてこれらの細胞の詳細な抗腫瘍免疫メカニズムを検証しており、悪性リンパ腫における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。

共同研究者・謝辞

本研究をサポートいただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に謹んで感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nagasaki, J., Togashi, Y., Sugawara, T., Itami, M., Yamauchi, N., Yuda, J., Sugano, M., Ohara, Y., Minami, Y., Nakamae, H., et al. (2020). The critical role of CD4⁺ T cells in PD-1 blockade against MHC-II-expressing tumors such as classic Hodgkin lymphoma. *Blood Adv.* 4, 4069–4082. PMID: 32870971 DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002098.
- 2) Zhou W, Kawashima S, Ishino T, Kawase K, Ueda Y, Yamashita K, Watanabe T, Kawazu M, Dansako H, Suzuki Y, Nishikawa H, Inozume T, Nagasaki J, Togashi Y. Stem-like progenitor and terminally differentiated T_{FH}-like CD4⁺ T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Rep.* 2024 Feb 27;43(2):113797. doi: 10.1016/j.celrep.2024.113797. Epub 2024 Feb 15.
- 3) Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S.A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S.J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., et al. (2019). Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8⁺ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* 50, 195–211.e10. PMID: 30635237 DOI: 10.1016/j.immuni.2018.12.021