

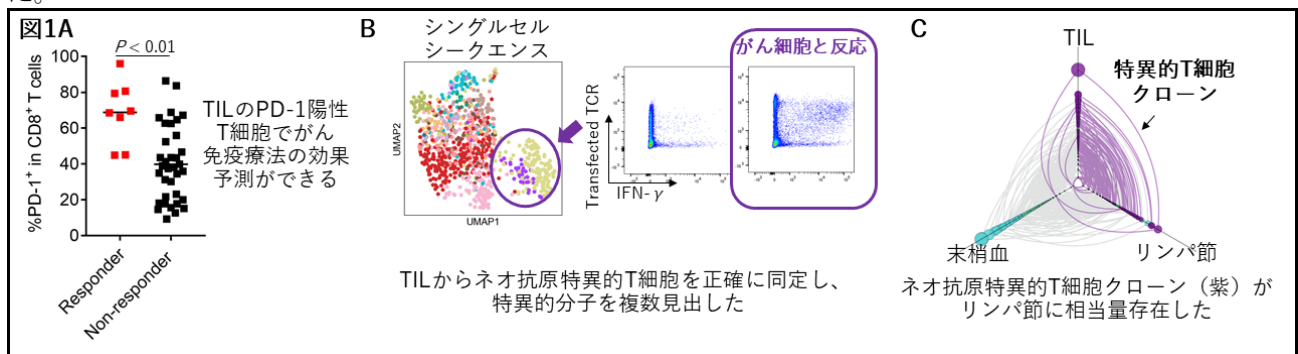
抗腫瘍免疫応答における所属リンパ節の役割の解明

岡山大学学術研究院医歯薬学域（医学系）腫瘍微小環境学分野

富樫 庸介

【背景・目的】

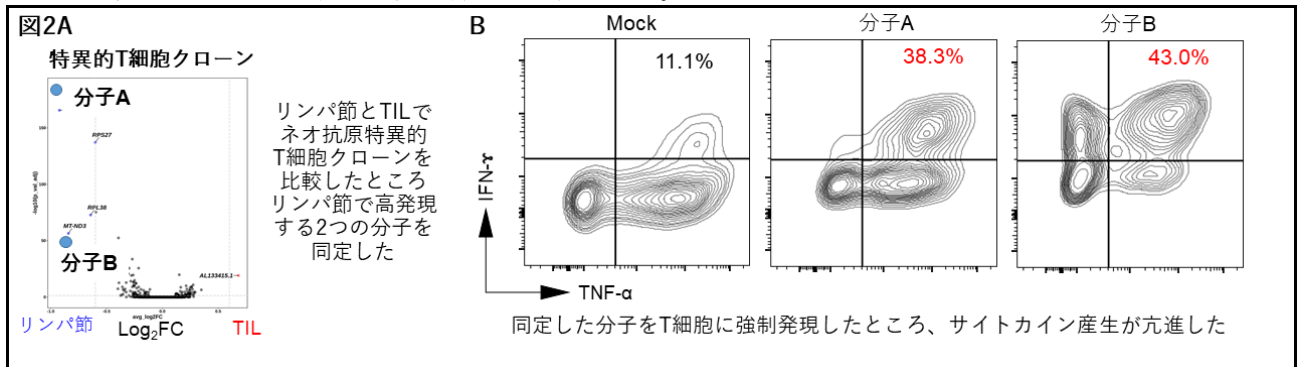
免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の効果が様々ながんで証明されたが、その効果は不十分でより有効な治療や効果予測バイオマーカーが求められている。アミノ酸置換を伴うような変異はその産物が非自己として認識され腫瘍に対して強い免疫応答が起こすことができるため（ネオ抗原）、ICI はネオ抗原を認識し腫瘍細胞を直接攻撃する T 細胞を活性化して効果を発揮しているとされている（参考文献 1）。我々は腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の PD-1 陽性 T 細胞がネオ抗原特異的 T 細胞を反映していることを報告したが、逆に増悪するような場合もあり、完璧に同定はできていなかった（図 1A）（参考文献 2, 3）。そこでシングルセルシーケンスから腫瘍浸潤 T 細胞クローンを詳細に解析し、さらに実際に患者由来腫瘍細胞株と免疫学的にアッセイすることで、ネオ抗原特異的 T 細胞を正確に同定することに成功し、PD-1 以上に特異的な分子を複数見出した（図 1B）（参考文献 4）。同時に抗 PD-1 抗体によりそのようなクローンが新たに腫瘍局所に浸潤することも発見した（参考文献 4）。一方で、このようなクローンは末梢血ではごくわずかしかなかったため、その由来に関する疑問が生じた。そこで、今まであまり注目されてこなかった所属リンパ節を同様に解析したところ、ネオ抗原特異的 T 細胞が所属リンパ節に相当量存在することを明らかにした（参考文献 4, 5）（図 1C）。リンパ節は T 細胞に抗原提示し、分化を促す場でもあるため、リンパ節に存在するネオ抗原特異的 T 細胞クローンが ICI の効果や長期奏功に関与する可能性があると考えられた。そこで、所属リンパ節に存在するネオ抗原特異的 T 細胞の特徴並びに抗腫瘍免疫応答における所属リンパ節の役割を明らかにし、抗腫瘍免疫応答の本態解明を行い、新たな治療方法やバイオマーカー開発に繋げる目的で研究を行った。



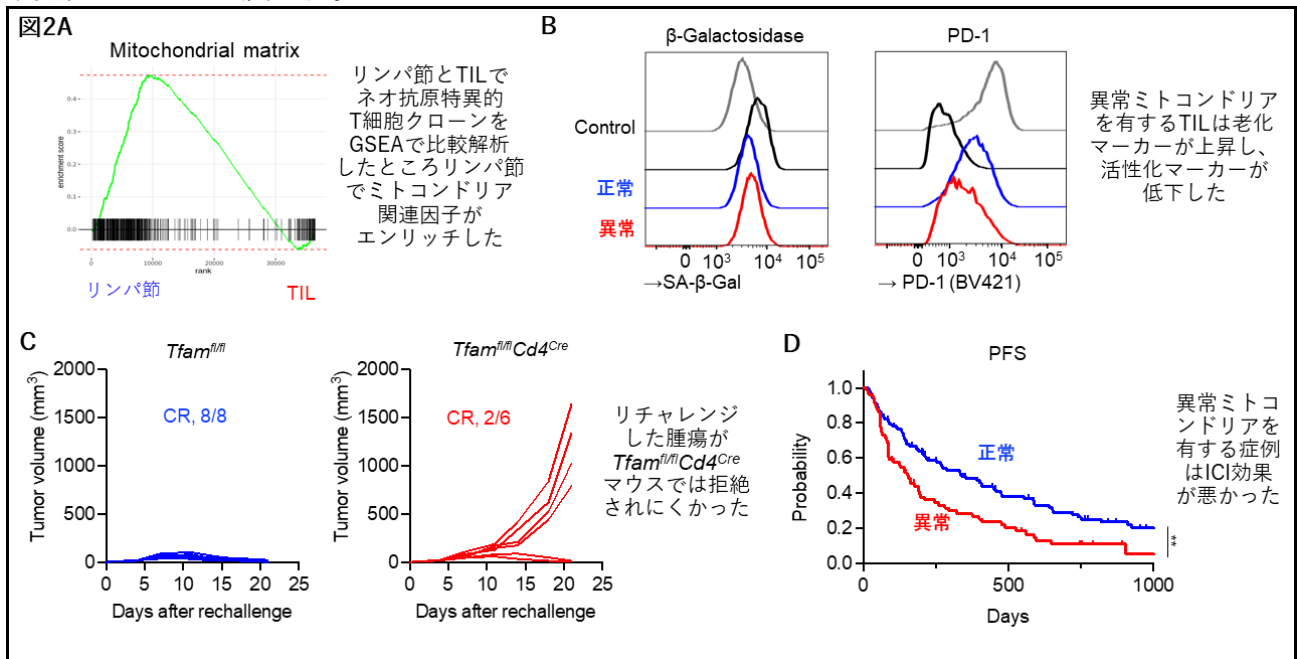
【結果】

肺癌や頭頸部癌の同一患者由来ペアの TIL とリンパ節のシングルセルシーケンスデータからネオ抗原特異的 T 細胞クローンを抽出したうえで、同じ特異的クローン同士でリンパ節と TIL とに存在するもので分け、遺伝子発現の比較を行った。すると、リンパ節でも同クローンは TIL と同様に PD-1 などを発現した「疲弊」の表現型を有していたが、一方で TIL に比べて特徴的に上昇してくるエピジェネティクスに関わるような分

子を2つ同定した(図2A)。この分子はいずれもT細胞の機能に関わる報告があったため、この遺伝子をT細胞に強制発現させたところ、いずれもT細胞の活性化が促された(図2B)。そこで、この分子をCD8陽性T細胞特異的にノックアウトするようなコンディショナルノックアウトマウスを作成する目的で *Cd8a^{cre}* マウスと同遺伝子の *flxed* マウスを掛け合わせが終了した。



また同じデータセットをGSEAで解析したところ、リンパ節ではミトコンドリア関連因子がエンリッチしていた(図3A)。さらに患者由来TILに関して電子顕微鏡で観察したところクリステの消失などの形態異常も認められた。ミトコンドリア異常に関して機能解析を行ったところ、異常ミトコンドリアを有するTILは正常なTILに比較して、酸化的リン酸化が障害されて半面解糖系依存にシフトし、ROSの産生が増え、老化分子・分画が上昇し、細胞分裂が低下し、アポトーシスが亢進し、メモリー分画が低下し、活性化が低下していた(図3B)。T細胞特異的にミトコンドリア機能が低下する *Tfam^{fl/fl}Cd4^{cre}* マウスを作成し、ICI治療を行ったところ、ICI効果がミトコンドリア機能が正常なコントロールマウスに比較して減弱した。さらに、同じマウスで一度ICI治療したのちに完全に腫瘍が消失したマウスだけを選び同じ腫瘍をリチャレンジしたところ、コントロールのミトコンドリア機能が正常なマウスでは腫瘍が既報通り100%拒絶されたが、機能が低下したマウスでは2/6しか拒絶されなかった(図3C)。最後に肺癌とメラノーマ患者200例程度でミトコンドリア異常とICI治療効果の関係性を解析したところ、異常のある患者では優位にICI治療効果、特に長期奏効が悪かった(図3D)。



【考察】

元来、リンパ節では抗原提示を受けたナイーブ T 細胞が分化・活性化するとされている（プライミング）。我々は TIL と同様にリンパ節にもネオ抗原特異的な T 細胞クローンが存在していることを明らかにした。さらにそのようなクローンが TIL でもリンパ節でも PD-1 を発現した疲弊の表現型を呈していたが、慢性的な抗原刺激を受けることで T 細胞疲弊が起こるとされるため、このことは従来から考えられていたように、リンパ節でもネオ抗原の提示を受けていることを意味していると考えられた。一方でリンパ節では T 細胞機能に関わるエピジェネティクス関連分子が高発現していることや、ミトコンドリア機能が TIL に比較して保たれていることも見出した。同定したエピジェネティクス因子に関しては T 細胞分化などに関与する可能性が報告されており、現在コンディショナルノックアウトマウスを作成して検証中である。

また、見出したミトコンドリア機能に関しては過去の報告でも T 細胞の長期生存・メモリー形成に関与する報告がなされている一方で（参考文献 6）、疲弊 T 細胞は長期生存・メモリー形成が障害されているとされている。リンパ節でその機能が保たれているということはリンパ節での特異的 T 細胞は疲弊の表現型をしていてもメモリー形成能を有し、長期生存でき、ICI による長期生存に関与している可能性が考えられた。実際に *Tfam^{fl/fl}Cd4^{cre}* マウスを用いた腫瘍のリチャレンジモデルでは、拒絶されずに生着する腫瘍が有意に多く見られ、実際の臨床検体でもミトコンドリア異常がある場合には ICI 治療効果が悪いという結果であった。したがって、リンパ節でミトコンドリア機能が保たれることは抗腫瘍免疫応答にとって重要で、特に長期生存可能なメモリー T 細胞が増えることで ICI の長期奏効に寄与していることが考えられた。現在そのミトコンドリア異常が TIL で起きる原因に関して詳細に解析中である。

【謝辞】

本研究を行うにあたってサポートくださったアステラス病態代謝研究会にこの場を借りて深謝申し上げます。

【文献】

1. Rizvi NA, et al. *Science* 2015
2. Kumagai S and Togashi Y, et al. *Nat Immunol* 2020
3. Kamada T and Togashi Y, et al. *PNAS* 2019
4. Nagasaki J and Togashi Y, et al. *Cell Rep* 2022
5. Inamori K and Togashi Y, et al. *JCI Insight* 2021
6. Liu X, et al. *Nat Immunol* 2021.